

# Bioluminiscencijski reporterski geni i njihova primjena u razvoju lijekova

---

Tekić, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:556418>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-02**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Tea Tekić

*Bioluminiscencijski reporterski geni i njihova  
primjena u razvoju lijekova*

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2019.

*Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Gordane Maravić Vlahoviček.*

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček na stručnom vodstvu i konstruktivnim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Hvala roditeljima koji su mi omogućili ovaj put, na svemu uloženoj i njihovom ogromnom razumijevanju i strpljenju. Hvala sebi što se zbog nje ni u jednom trenutku nisam na njemu osjećala sama.*

*Hvala svim prijateljima, onima koji su mi svojim vrsnim primjerima osvjetljavali put i onima koji su zajedničkim lutanjem u mraku, traženjem prečaca i utabavanjem novih staza učinili ovo putovanje vrijednim proživljavanjem.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 Reporterski geni .....	1
1.2 Bioluminiscencija.....	1
1.3 Primjena bioluminiscencijskih reporterskih gena u razvoju lijekova .....	1
2. OBRAZLOŽENJE METODE.....	3
3. MATERIJALI I METODE .....	4
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	5
4.1 Bioluminiscencijski geni reporteri .....	5
4.1.1 Raznolikost bioluminiscencijskih reportera .....	5
4.1.2 Bioluminiscencijski sustavi ovisni o D-luciferinu .....	8
4.1.2.1 Luciferaza krijesnice .....	8
4.1.2.2 Luciferaze klišnjaka .....	20
4.1.2.3 <i>Luciola</i> luciferaze .....	24
4.1.3 Bioluminiscencijski sustavi ovisni o koelenterazinu.....	26
4.1.3.1 <i>Renilla</i> luciferaza.....	28
4.1.3.2 <i>Gaussia</i> luciferaza .....	33
4.1.3.3 <i>Metridia</i> luciferaza .....	36
4.1.4 Bioluminiscencijski sustavi ovisni o <i>Cypridina</i> luciferinu .....	38
4.1.4.1 <i>Cypridina</i> luciferaze .....	38
4.1.5 Umjetni bioluminiscencijski sustav ovisan o furimazinu .....	41
4.1.5.1 NanoLuc® luciferaza .....	41
4.1.6 Bakterijski bioluminiscencijski sustavi.....	45
4.2 Luciferazna reakcija u laboratorijskim uvjetima.....	50
4.2.1 Jednostruki i dvostruki luciferazni testovi .....	53
4.2.2 Dvobojni dvostruki luciferazni testovi.....	59
4.2.3 Višestruki luciferazni testovi.....	60

4.3 Primjena bioluminiscencijskih ispitivanja u razvoju lijekova.....	61
4.3.1 Kvantitativna visokoprotočna pretraživanja.....	63
4.3.1.1 Ispitivanje vijabilnosti stanica određivanjem koncentracije ATP-a u uzorku..	66
4.3.1.2 Visokoprotočno pretraživanje modulatora genske ekspresije .....	69
4.3.1.3 Visokoprotočno pretraživanje modulatora protein-protein interakcija .....	74
4.3.2 Biološko oslikavanje čitavih organizama.....	81
4.3.2.1 Metode biološkog oslikavanja.....	81
4.3.2.2 Bioluminiscentno biološko oslikavanje <i>in vivo</i> .....	84
4.3.2.3 Usporedba bioluminiscencije i fluorescencije.....	87
4.4 Novije primjene bioluminiscencijskih gena reportera u razvoju lijekova.....	92
4.4.1 Luciferaza krijesnice .....	92
4.4.2 Luciferaze klišnjaka .....	99
4.4.3 <i>Luciola</i> luciferaza .....	101
4.4.4 <i>Renilla</i> luciferaza.....	101
4.4.5 <i>Gaussia</i> luciferaza .....	102
4.4.6 <i>Metridia</i> luciferaza .....	104
4.4.7 <i>Cypridina</i> luciferaza .....	105
4.4.8 NanoLuc® luciferaza .....	106
4.4.9 Bakterijske luciferaze .....	108
5. ZAKLJUČCI.....	111
6. LITERATURA.....	112
7. SAŽETAK.....	150
8. SUMMARY .....	151
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1. UVOD

### 1.1 Reporterski geni

Reporterski geni široko se koriste u proučavanju genske ekspresije i staničnih događaja povezanih s ekspresijom gena u farmaceutskim i biomedicinskim istraživanjima, kao i u molekularnoj biologiji i biokemiji. Glavna uloga im je praćenje ekspresije ciljnog gena (vrijeme, mjesto, razina itd.). Tipično, reporterski gen je kloniran s DNA sekvencom od interesa u ekspresijski vektor koji se zatim unosi u stanice domaćina. Nakon unosa rekombinantnog vektora, prisutnost reportera u stanicama testira se izravnim određivanjem koncentracije samog reporterskog proteina ili mjerenjem enzimske aktivnosti reportera. Dobar reporterski gen može se lako identificirati i kvantitativno mjeriti kada se ekspirira u organizmu ili stanicama od interesa. Najpoznatiji reporteri su primjerice,  $\beta$ -galaktozidaza, kloramfenikol acetil-transferaza,  $\beta$ -glukuronidaza, zeleni fluorescentni protein te luciferaza.

### 1.2 Bioluminiscencija

Pojam bioluminiscencija dolazi od grčke riječi *bios* što znači život i latinske riječi *lumos* što znači svjetlo. Bioluminiscencija predstavlja jedan od oblika kemiluminiscencije u kojem se energija (40-60 kcal) oslobađa kemijskom reakcijom u obliku vidljive svjetlosti. Bioluminiscencijska reakcija podrazumijeva oksidaciju luciferina kataliziranu enzimom luciferazom. Luciferin i luciferaza su generički pojmovi i moraju biti detaljnije definirani vrstom organizma u kojem se pojavljuju. Luciferaze su proteini različitih veličina (20-62 kDa), struktura i fizikalno-kemijskih svojstava. Bioluminiscencijski reporterski geni koji kodiraju za luciferaze izolirani su iz raznih vrsta filogenetički udaljenih organizama sposobnih za proizvodnju svjetlosti. Luciferini su supstrati luciferaza koji nakon oksidacije prelaze u vrste odgovorne za svjetlosnu emisiju (Roda, ured., 2010).

### 1.3 Primjena bioluminiscencijskih reporterskih gena u razvoju lijekova

Uvođenjem bioluminiscencijskih reporterskih gena u prokariotske i eukariotske stanice omogućeno je praćenje određenih staničnih događaja mjerenjem bioluminiscenog signala. Pomoću bioluminiscencijskih reporterskih gena mogu se proučavati genska ekspresija, posttranslacijske modifikacije, protein-protein interakcije, stanična signalizacija i drugi stanični događaji. Luciferazni testovi su jednostavni za izvođenje, dodatkom luciferina u medij stanica koje ekspiriraju luciferazu dolazi do reakcije popraćene emisijom svjetlosti, koju se detektira pomoću uređaja za detekciju svjetlosti, tzv. luminometra s

fotomultiplikatorom. Napredna bioluminiscencijska tehnologija omogućuje kvantitativnu vizualizaciju staničnih događaja na razini pojedinačne stanice u stvarnom vremenu korištenjem visoko osjetljivih kamera s ugrađenim nabojem spregnutim uređajima (eng. charge coupled device, CCD). Zbog jednostavnosti izvođenja, neinvazivnosti i velike osjetljivosti bioluminiscencijskih ispitivanja ona se često primjenjuju u ranim fazama razvoja lijekova. Prikladna su za visokoprotlačno pretraživanje (eng. high-throughput screening, HTS) opsežnih knjižnica kemijskih spojeva u potrazi za spojevima kandidatima za lijek te za proučavanje mehanizma djelovanja kandidata lijekova u svrhu njihove optimizacije. Također, injektiranjem bioluminiscentnih tumorskih, imunosnih, matičnih ili drugih tipova stanica malim životinjama moguće je pratiti broj i prostornu raspodjelu tih stanica u životinjskim modelima. Na taj način mogu se proučavati patološki mehanizmi određenih bolesti i odgovor organizma na tretman lijekovima pa je bioluminiscentno biološko oslikavanje (eng. bioluminescence imaging, BLI) prikladno za primjenu u prekliničkom razvoju lijekova.

## 2. OBRAZLOŽENJE METODE

Korisnost bioluminiscencijskih gena reportera i bioluminiscencijske tehnologije u osnovnim i primijenjenim znanstvenim istraživanjima potvrđuje ogromna količina znanstvenih publikacija, patenata, proizvoda na tržištu i namjenske instrumentacije. Otkrivanje i razvoj lijekova je bez sumnje jedno od područja koje primjena bioluminiscencije može značajno unaprijediti. Dobro je poznato koliki se napori i novčana sredstva moraju uložiti u razvoj novog lijeka koji se želi plasirati na tržište te koliko lijekova zaista uspije proći klinička ispitivanja zbog nedostatka učinkovitosti i sigurnosti. Stoga je vrlo važno u najranijim fazama postupka otkrivanja lijeka dobiti maksimalnu količinu informacija o spojevima koji su kandidati za novi lijek i tako povećati pouzdanost i predvidljivost rezultata u sljedećim koracima. Takav pristup potiče smanjenje troškova i ubrzava cijeli proces otkrivanja i razvoja lijeka, a i u skladu je sa zahtjevima o etičnim i odgovornim istraživanjima.

U literaturi se bioluminiscencijske metode često navode kao najprikladnije za proces ranog razvoja lijekova i pretklinička ispitivanja pa ovaj diplomski rad daje pregled najčešće korištenih bioluminiscencijskih gena reportera i njihovih svojstava. Također, cilj ovog rada je istražiti mogućnosti primjene bioluminiscencijskih gena reportera u procesu razvoja lijekova, opisati prednosti bioluminiscencijskih metoda pred drugim konvencionalnim metodama korištenim u razvoju lijekova, uzeti u obzir i nedostatke i potencijalna ograničenja njihove primjene te razmotriti smjerove u kojima bi se bioluminiscencijska tehnologija mogla razvijati u budućnosti kako bi nadišla postojeće probleme.



### 3. MATERIJALI I METODE

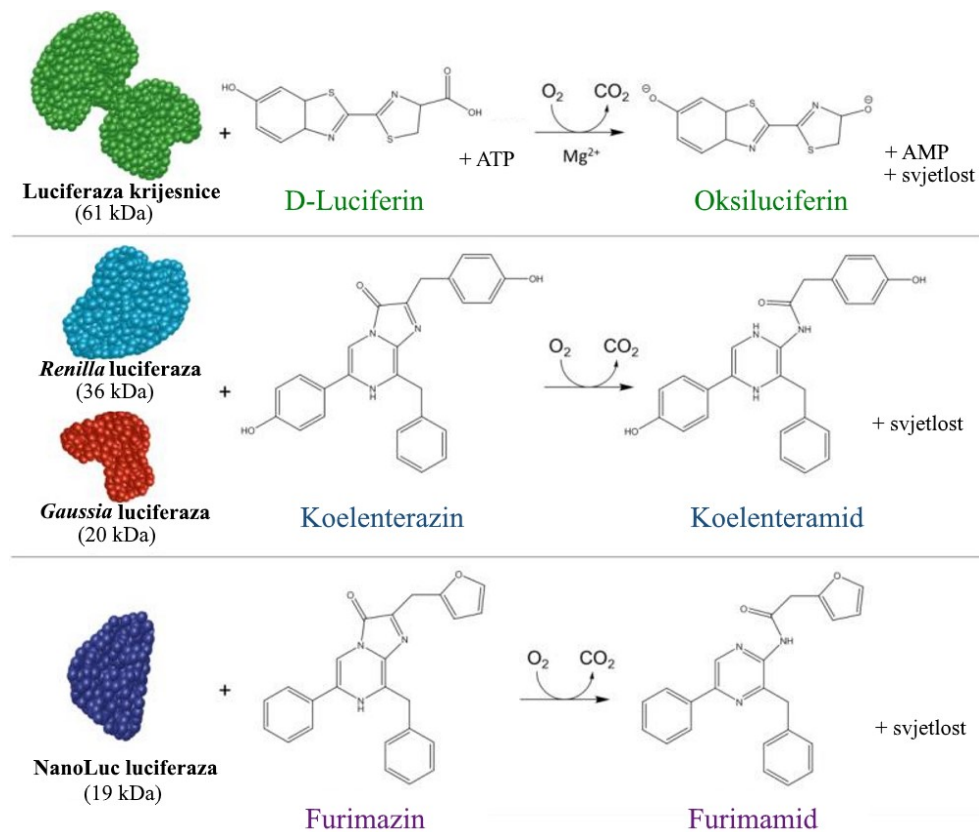
Istraživanje u okviru ovog diplomskog rada je teorijskog karaktera i uključuje pregled dostupne znanstvene i stručne literature o predloženoj temi. Literatura je pretražena elektroničkim putem, a korištene su relevantne bibliografske baze podataka PubMed i Science Direct. Nakon početnog uvida u pregledne radove na temu bioluminiscencijskih gena reportera dostupne u literaturi napravljen je popis najčešće korištenih bioluminiscencijskih gena reportera. Prema popisu su u detaljnijem pretraživanju baza podataka korištene ključne riječi koje uključuju kolokvijalne nazive pretraživanih bioluminiscencijskih reportera „firefly“, „click beetle“, „luciola“, „renilla“, „gaussia“, „metridia“, „nanoluc“, „cypridina“, „bacterial luciferase“ kao i puni latinski nazivi organizama iz kojih luciferaze potječu, primjerice „photinus pyralis“, „luciola italica“, „renilla reniformis“ itd. u kombinaciji s ključnom riječi „luciferase“. Istraživanje je dopunjeno i pretragom kratica koje se koriste u nazivlju reportera, npr. „fluc“, „rluc“, „gluc“ itd. Pri pretraživanju literature na temu novije primjene bioluminiscencijskih gena reportera u razvoju lijekova korištene su gore navedene ključne riječi, ali uz dodatak ključnih riječi „drug development“, „drug discovery“, „new drugs“ i sl. U tom su slučaju prilikom pretraživanja literaturni izvori ograničeni na one objavljene u zadnjih 5 godina. Osim toga, pretražene su i mrežne stranice proizvođača i distributera bioluminiscencijskih reporterskih gena kao što su Promega, ThermoFisher Scientific, Biotium, Sigma Aldrich i New England Biolabs.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 Bioluminiscencijski geni reporteri

#### 4.1.1 Raznolikost bioluminiscencijskih reportera

Najrazličitije vrste organizama, poput bakterija, gljiva, mekušaca, rakova, insekata, riba i biljaka sposobne su emitirati svjetlost u obliku bioluminiscencije. Postoje dva glavna tipa bioluminiscencije. Prvi tip uključuje biokemijsku reakciju oksidacije male organske molekule, luciferina, katalizirane pomoću enzima luciferaze. Ukupna količina emitirane svjetlosti u ovom je tipu bioluminiscencije izravno proporcionalna količini luciferina prisutnog u organizmu. Luciferaze se mogu podijeliti s obzirom na vrstu supstrata koji iskorištavaju za svoje reakcije pa razlikujemo luciferaze ovisne o D-luciferinu, koelenterazinu, furimazinu, *Cypridina* luciferinu (vargulinu) i drugim supstratima (Slika 1.) (Kaskova i sur., 2016).



**Slika 1.** Sažeti prikaz bioluminiscencijskih reakcija oksidacije različitih luciferinskih supstata kataliziranih pripadnim luciferazama (preuzeto i prilagođeno iz England i sur., 2016).

S druge strane, postoje bioluminiscencijski sustavi izolirani iz različitih vrsta bioluminiscentnih bakterija koji ne zahtijevaju dodatak luciferina za provođenje bioluminiscencijske reakcije. Naime, bakterijski operon *luxABCDE*, osim za samu luciferazu kodira i za enzime potrebne za sintezu supstrata i obnavljanje aktivnosti luciferaze (Contag i sur., 1995).

Najčešće korištena luciferaza je izolirana iz sjevernoameričke krijesnice *Photinus pyralis* (eng. firefly luciferase, FLuc), a neka od njezinih svojstava kao i svojstva ostalih često korištenih luciferaza prikazana su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Najčešće korištene luciferaze za koje su komercijalno dostupne kodirajuće sekvence (preuzeto i prilagođeno iz Michelini i sur., 2014).

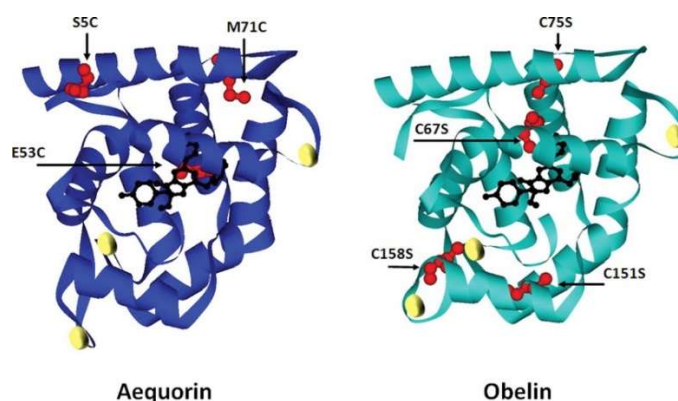
Luciferaza	Organizam	Duljina proteina (nm)	M <sub>r</sub> (kDa)	Supstrat	BL λ <sub>max</sub> (nm)	Distributeri
FLuc*	<i>Photinus pyralis</i>	550	61	D-luciferin	557	Promega, Thermo Scientific, Sigma Aldrich, Biotium, NEB
GLuc*	<i>Gaussia princeps</i>	185	19,9	koelenterazin	482	Thermo Scientific, Targeting Systems
RLuc*	<i>Renilla reniformis</i>	312	36	koelenterazin	475	Thermo Scientific, Targeting Systems
NanoLuc*	<i>Oplophorus gracilirostris</i>	171	19,1	furimazin	465	Promega
<i>Luciola</i> luciferaza	<i>Luciola italica</i>	548	61	D-luciferin	610	Targeting Systems
CBG99	<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i>	542	64	D-luciferin	537	Promega

CBR	<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i>	542	64	D-luciferin	613	Promega
Cypridina luciferaza	<i>Cypridina noctiluca</i>	555	62	Cypridina luciferin	463	Prolume, Targeting Systems
Bakterijska luciferaza (LuxAB)	Bakterije rodova <i>Photobacterium</i> i <i>Vibrio</i>	700	A: 42 B: 37	FMNH <sub>2</sub> + dugolančani aldehidi	490	Promega, Sigma Aldrich, NEB

aa- aminokiseline, BL- bioluminiscencija

\*-luciferaze dostupne u različitim oblicima (npr. unutarstanične, sekrecijske, s kraćim poluživotom)

Drugi tip bioluminiscencije uključuje drugačiji reakcijski mehanizam koji uključuje fotoproteine. Fotoproteini imaju sposobnost emisije svjetlosti u vodenim otopinama neovisno o kemijskoj ili enzimskoj reakciji. Za razliku od luciferaza oni su kovalentno vezani za luciferin te se emisija svjetlosti događa u prisutnosti dodanog okidača, najčešće kalcijevih ili vodikovih iona, a ukupna količina emitirane svjetlosti u tom je slučaju proporcionalna količini prisutnog fotoproteina (Roda, ured., 2011). Najpoznatiji fotoproteini su aequorin izoliran iz morske vrste *Aequorea victoria* te obelin iz vrste *Obelia longissima* (Slika 2.) (Michelini i sur., 2014).



**Slika 2.** Strukture fotoproteina aequorina (lijevo) i obelina (desno) (preuzeto iz Li i sur., 2012).

Luciferaze su izolirane i okarakterizirane u puno većem broju nego fotoproteini, a i primjera njihove primjene u biomedicinskom području je više. Stoga ovaj rad obrađuje prvi tip bioluminiscencije, odnosno luciferazne reporterske enzime i načine na koje se njihove bioluminiscencijske reakcije mogu iskoristiti u razvoju lijekova.

## 4.1.2 Bioluminiscencijski sustavi ovisni o D-luciferinu

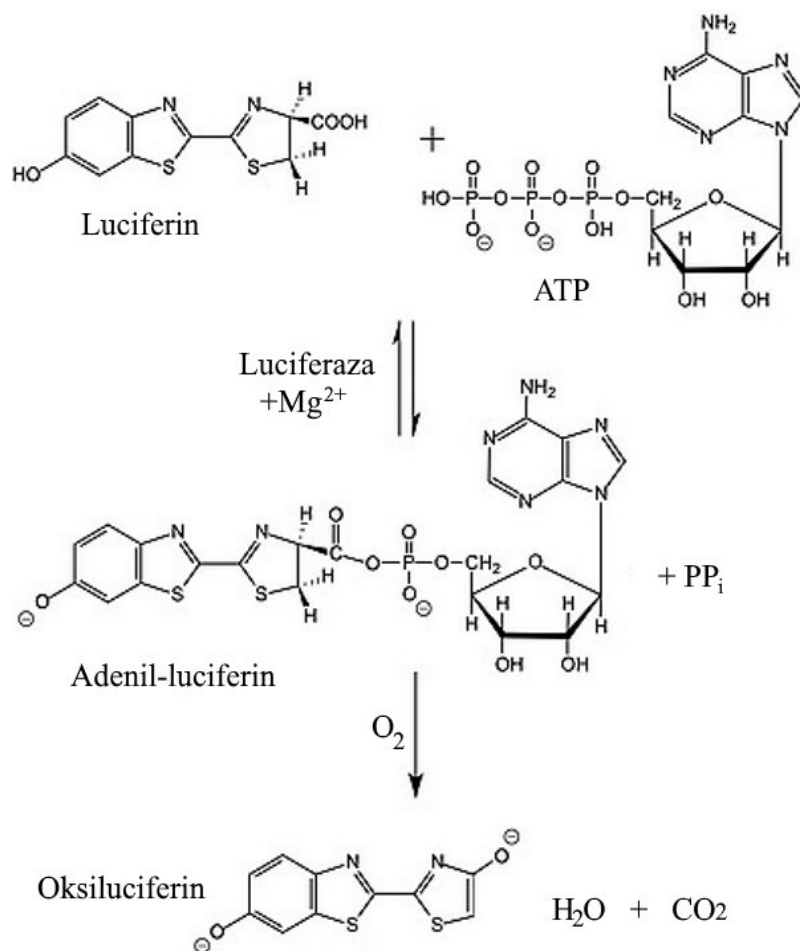
### 4.1.2.1 Luciferaza krijesnice

Najčešće korišten bioluminiscencijski reporter je luciferaza krijesnice (eng. firefly luciferase, FLuc) (Shimomura, 2006). FLuc je monomerni enzim od 61 kDa kloniran iz sjevernoameričke krijesnice *Photinus pyralis* (Slika 3.), član superporodice adenilat-formirajućih enzima koja uključuje acil- i aril-CoA-sintetaze i neribosomske peptidne sintetaze. Primarnom je strukturom FLuc najbliža određenim acil-CoA ligazama (oko 30% homologije s biljnom 4-kumarat:CoA ligazom) (Baldwin, 1996).



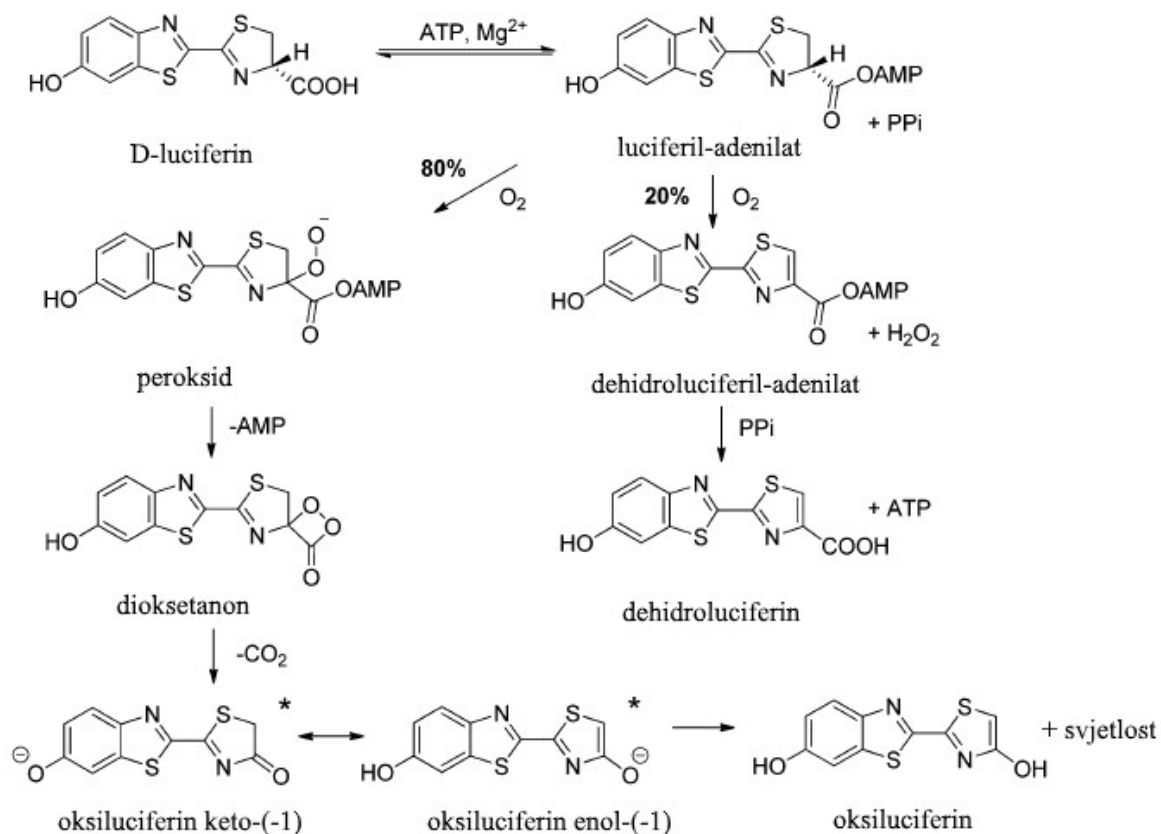
Slika 3. Sjevernoamerička krijesnica (*Photinus pyralis*) (preuzeto s [https://en.wikipedia.org/wiki/Photinus\\_pyralis](https://en.wikipedia.org/wiki/Photinus_pyralis)).

Zajednički mehanizam ove porodice enzima čini aktivacija supstrata prijenosom adenilatne skupine na supstrat uz nastajanje međuproducta vezanog na enzim (Conti i sur., 1996; McElroy i sur., 1967). FLuc je 4-oksidoreduktaza (ATP-hidrolizirajuća, dekarboksilirajuća) (EC 1.13.12.7) koja za reakciju zahtijeva luciferinski supstrat koji u svojoj strukturnoj formuli sadrži hidroksi-benzotiazolil-tiazolin-karboksilnu kiselinu (D-LH<sub>2</sub>). FLuc katalizira reakciju oksidacije D-luciferina (Slika 4.) u dva koraka popraćenu emisijom svjetlosti, obično u zeleno-žutom području (emisijski maksimum na 550-570 nm). Osim D-luciferina, da bi mogla proizvesti svjetlost, luciferazi je potrebna prisutnost ATP-a, kisika i metalnih kationa (najčešće Mg<sup>2+</sup>) (Marques i Esteves da Silva, 2009).



**Slika 4.** Reakcija oksidacije D-luciferina u dva koraka popraćena emisijom bioluminiscentne svjetlosti (preuzeto s [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

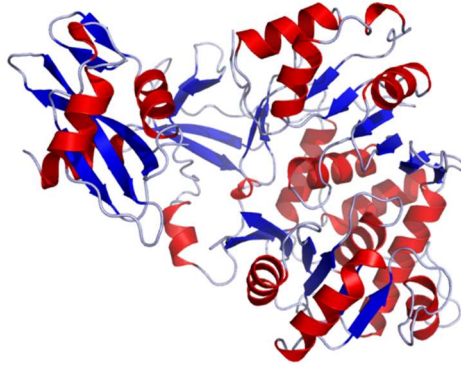
Reakcija luciferaze (Slika 5.) je S<sub>N</sub>2 nukleofilna supstitucija na molekuli luciferina (D-LH<sub>2</sub>) u kojoj karboksilat na tiazolinskom prstenu napada α-fosfatnu skupinu ATP-a. U prvom se koraku reakcije oslobađa pirofosfat (PP<sub>i</sub>) i nastaje luciferil-adenilat (LH<sub>2</sub>-AMP) vezan na enzim (Fraga i sur., 2004). U drugom koraku reakcije dolazi do oksidacije LH<sub>2</sub>-AMP-a (80%) molekulskim kisikom u nestabilni luciferil-dioksetanon. Luciferil-dioksetanon se u daljnjim koracima raspada na CO<sub>2</sub> i oksiluciferin u pobuđenom elektronskom stanju. Oksiluciferin spontanijem prijelazom u osnovno stanje generira fotone zelene (enolni tautomer) i crvene (keto tautomer) svjetlosti (Inouye, 2010; Marques i Esteves da Silva, 2009).



**Slika 5.** Mehanizam bioluminiscencijske reakcije luciferaze (preuzeto i prilagođeno iz Kaskova i sur., 2016).

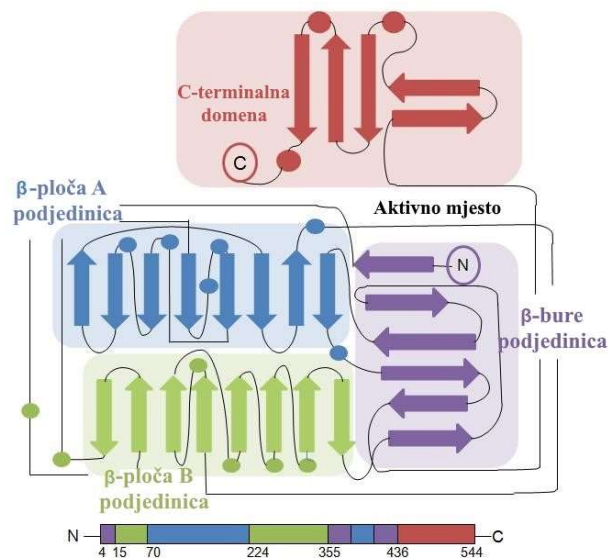
Oksiluciferin primarno nastaje u neutralnom obliku, a zatim gubi proton prijenosom protona u pobuđenom stanju (eng. excited state proton transfer, ESPT) čime nastaju keto ili enolni oblici oksiluciferina. Iako su mogući različiti tautomerni oblici oksiluciferina u pobuđenom stanju, keto i enolni oblici se smatraju odgovornima za emisiju svjetlosti iz luciferaze (Solntsev i sur., 2012). Prilikom povratka oksiluciferina iz pobuđenog elektronskog stanja u osnovno stanje luciferaza proizvodi početni bljesak svjetlosti kojem se intenzitet smanjuje tijekom otprilike 15 sekundi na nisku razinu održive bioluminiscencije (Gould i Subramani, 1988). Takav kinetički profil bioluminiscencije posljedica je nakupljanja jednog ili više potentnih inhibitora luciferaze, primjerice dehidroluciferil-AMP-a, čime se ograničava katalitički promet enzima (Kaskova i sur., 2016). Dehidroluciferil-AMP nastaje iz ostatka luciferil-adenilata (20%) koji u drugom koraku reakcije nije oksidiran u luciferil-oksetanon te se zatim prevodi u vodikov peroksid i dehidroluciferin u nizu reakcija u kojima se ne oslobađa svjetlost (tzv. „tamne“ reakcije) (Fraga i sur., 2006).

Proteinsku strukturu FLuc čine dvije kompaktne domene. N-terminalna domena je sastavljena od dviju  $\beta$ -ploča u  $\alpha\beta\alpha$  strukturi i strukturi  $\beta$ -bačve.  $\beta$ -ploče leže jedna na drugoj, a  $\beta$ -bačva pokriva krajeve ploča (Slika 6.) (Baldwin, 1996).



**Slika 6.** Kristalna struktura luciferaze krijesnice *Photinus pyralis* objavljena u bazi podataka Protein Data Bank (PDB: 1LCI) (preuzeto iz Conti i sur., 1996).

C-terminalna domena je povezana s N-terminalnom domenom preko savitljive zglobne (eng. hinge) regije (Slika 7). Aminokiselinski slijed na površini dviju domena koje su okrenute jedna prema drugoj su evolucijski očuvane u bakterijskim luciferazama i luciferazama krijesnica što ukazuje da je aktivno mjesto luciferaze smješteno u procjepu između dviju domena (Conti i sur., 1996).

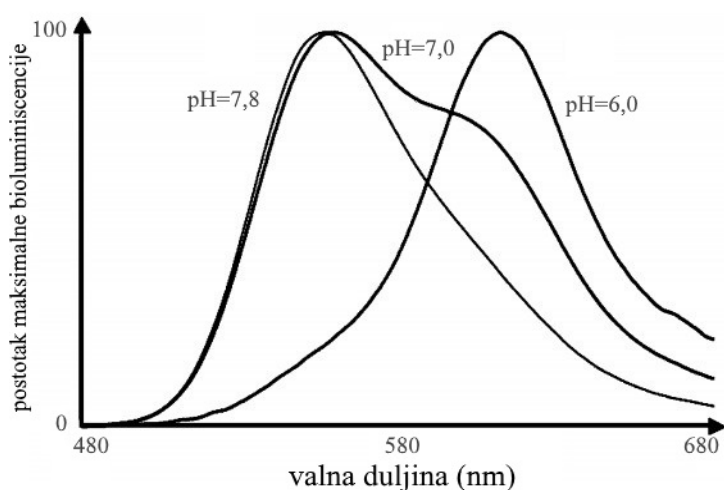


**Slika 7.** Dijagram sekundarne strukture luciferaze krijesnice (FLuc). Strelice predstavljaju  $\beta$ -vrpce, a krugovi  $\alpha$ -uzvojnice. Smještaj svake od poddomena u aminokiselinskom slijedu luciferaze je prikazan na donjem dijagramu (preuzeto i prilagođeno s [https://en.wikipedia.org/wiki/Firefly\\_luciferase#cite\\_note-conti-5](https://en.wikipedia.org/wiki/Firefly_luciferase#cite_note-conti-5)).



Tijekom reakcije luciferaza prolazi kroz konformacijsku promjenu u „zatvorenu“ konformaciju u kojoj su domene sklopljene kako bi ogradile supstrat. To omogućuje isključenje vode iz reakcije te sprječava hidrolizu ATP-a ili produkta u pobuđenom elektronskom stanju (Conti i sur., 1996).

$K_M$  konstanta luciferaze varira između vrsta, ali je uobičajeno oko  $1.3 \times 10^{-4}$  mol/L za ATP i  $1.4 \times 10^{-4}$  mol/L za D-luciferin. Optimalna pH vrijednost za aktivnost enzima je 7,8, a za analitičke svrhe može se koristiti pH 6-8. Pri nižem pH opaža se značajan pomak emisijskog spektra FLuc prema većim valnim duljinama (Slika 8.) (Fraga, 2008). Kvantni prinos luciferazne reakcije na 562 nm iznosi 0,88 na sobnoj temperaturi i pri pH=7,8 (Gould i Subramani, 1988).



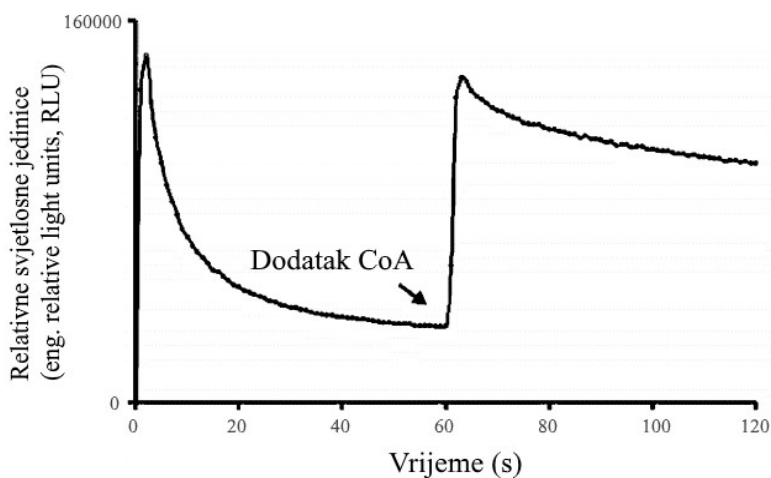
**Slika 8.** Bioluminiscencijski spektri luciferaze krijesnice na pH 7.8, 7.0 i 6.0. Niži pH uzrokuje pomak emisijskog maksimuma FLuc prema većim valnim duljinama. Spektri su normalizirani, intenzitet emisije svjetlosti je značajno niži pri kiselom pH (preuzeto iz Fraga, 2008).

D-luciferin je stabilan pri nižim pH vrijednostima, a kod višeg pH podliježe racemizaciji u L-luciferin koj je potentni inhibitor reakcije luciferaze. U normalnim analitičkim uvjetima stabilnost D-luciferina ne predstavlja problem, ali uzrokuje ograničeno vrijeme skladištenja nakon odležavanja smrznutih uzoraka (Kaskova i sur., 2016).

Stabilnost FLuc ovisna je o temperaturi (Gupta i sur., 2011; Koksharov i Ugarova, 2011). Divlji tipovi luciferaza su nestabilni iznad  $25^{\circ}\text{C}$  i potpuno se inaktiviraju nakon 5 min na  $50^{\circ}\text{C}$ , ali razvijeni su njihovi termostabilni mutanti koji su uz dodatak stabilizatora mjesecima stabilni na sobnim temperaturama (Branchini i sur., 2005). Također, uz tri točkaste mutacije

aktivnost luciferaze *P.pyralis* povećana je 12,5 puta, što omogućuje detekciju 1 amol ATP-a, odnosno detekciju pojedinačne bakterijske stanice (Roda, ured., 2011). U stanicama sisavaca na 37°C vrijeme poluživota luciferaze je otprilike 3-4 sata (Thompon i sur., 1991). Dodatak sekvence za razgradnju proteina (PEST sekvence) uvelike destabilizira luciferazu (Paguio i sur., 2010), što ju čini prikladnijom za proučavanje dinamičkih procesa koji se odvijaju u kratkom vremenu. Degradacijski slijed (PEST) je peptidni slijed bogat aminokiselinama prolinom (P), glutaminskom kiselinom (E), serinom (S) i treoninom (T).

Za stvaranje stabilne luminiscencije i optimizaciju bioluminiscencijskih ispitivanja za rutinsku laboratorijsku upotrebu dosad su provedene različite strategije, a najuspješnija od njih uključuje koenzim A (CoA) pomoću kojeg se postiže maksimalni intenzitet luminiscencije koji polako opada tijekom nekoliko minuta. Dodatak ~100  $\mu$ M CoA u reakcijski medij pomaže očistiti aktivno mjesto enzima od potentnih inhibitora (poput dehidroluciferil-AMP-a) čime se luminiscencija održava kroz dulje vrijeme (Slika 9.) (Marques i Esteves da Silva, 2009).



**Slika 9.** Kinetički profil luciferaze krijesnice pri visokim koncentracijama supstrata i učinak dodatka koenzima A (CoA) nakon 60 sekundi (preuzeto i prilagođeno iz Fraga, 2008).

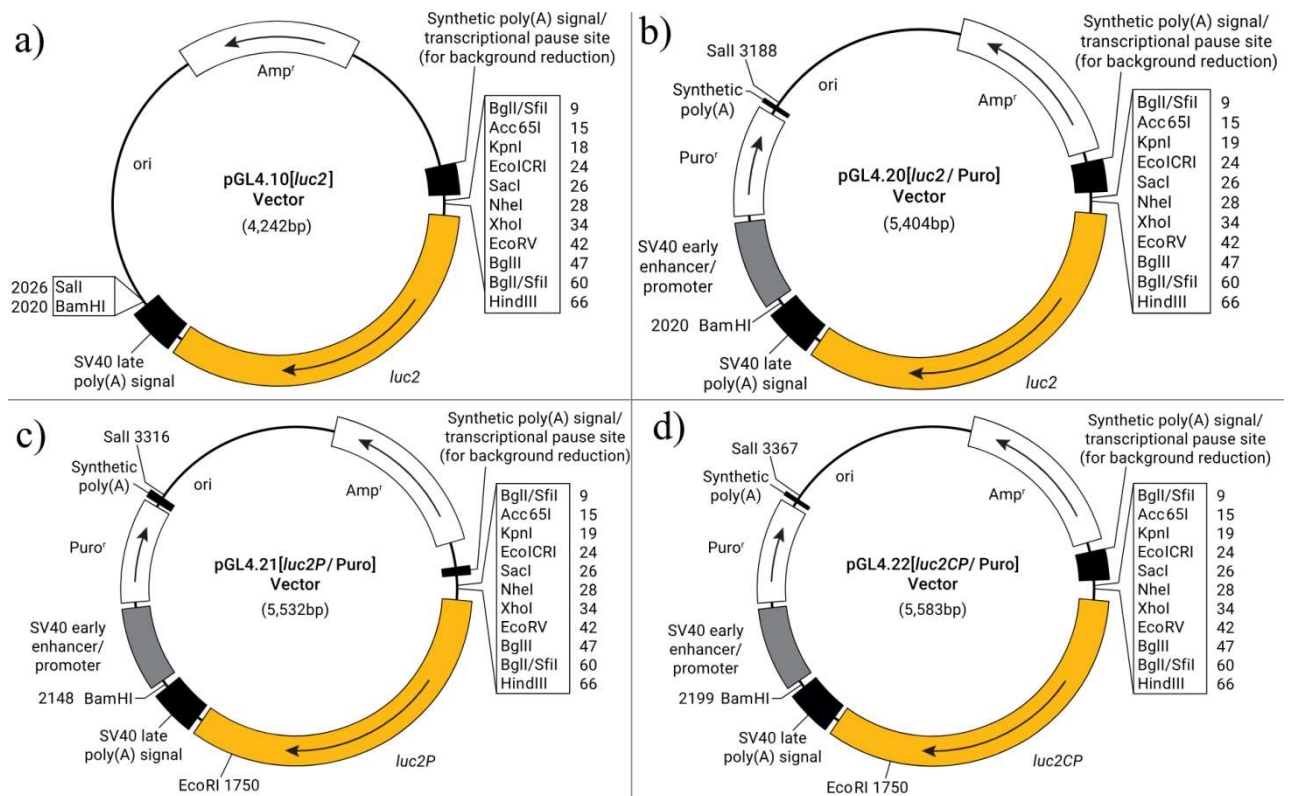
Komercijalno dostupni reagensi za određivanje aktivnosti FLuc stoga često sadrže CoA. Optimizirano ispitivanje uz CoA proizvodi relativno stabilnu luminiscenciju za manje od 0,3 sekunde, s linearnim područjem 100 milijuna puta većim od koncentracije enzima. Osjetljivost analize omogućuje kvantitativno određivanje manje od  $10^{-20}$  mola enzima (Gold i Subramani, 1988).

Svoju popularnost među reporterskim molekulama luciferaza krijesnice duguje jednostavnosti luciferaznih metoda i visokoj osjetljivosti ispitivanja koja se na njima temelje, kao i uskoj povezanosti sinteze proteina i enzimske aktivnosti. Ekspresijom gena *luc* koji kodira za luciferazu nastaje monomerni protein koji ne zahtijeva nikakve posttranslacijske modifikacije. Također, njegova katalitička sposobnost postignuta je odmah nakon oslobađanja s ribosoma (de Wet, 1985) pa to omogućuje neposredno mjerenje ukupne ekspresije reportera u stanici.

Osim dizajna same metode ispitivanja za učinkovitu primjenu luciferaze vrlo je bitan i dizajn reporterskih vektora. Jedno od svojstava luciferaze koje se mora uzeti u obzir je unutarstanična kompartmentalizacija luciferaze nakon ekspresije u eukariotskim stanicama. Naime, luciferaza krijesnice usmjerena je, nakon ekspresije u prirodnim uvjetima, na odlaganje u peroksisome, no nakon zasićenja peroksisoma luciferazom kod visokih razina ekspresije može se izlučivati i u citoplazmu (Gould i sur., 1988). Zbog toga relativna stabilnost enzima može biti različita u citoplazmi od one u peroksisomima i može doći do krive interpretacije rezultata prilikom izražavanja koncentracije luciferaze preko određive bioluminiscencije (Pinto i sur., 1991). Također, postoje dokazi da poremećaji u radu peroksisomne aktivnosti mogu dovesti do destabilizacije transgeničnih staničnih linija koje eksprimiraju luciferazu. Kako bi se nadišli ovi problemi, razvijeni su modificirani oblici luciferaznih gena (tzv., *luc+*) kojima je uklonjen signalni slijed za odlaganje u peroksisome ([www.worldwide.promega.com](http://www.worldwide.promega.com)).

Nadalje, većina luciferaznih reporterskih vektora sadrži mali intron SV40 smješten nizvodno od luciferaznog gena, a SV40 je često neprikladno procesiran u stanicama sisavaca (Huang i Gorman, 1990). Primjerice, nepravilno prekrajanje SV40 može dovesti do kraćenja gena reportera i do smanjene ekspresije luciferaze. Zbog toga su razvijeni i pGL3 vektori bez SV40 introna, a poboljšani su im i poliadenilacijski sljedovi što omogućuje 20 do 200 puta intenzivniju bioluminiscentnu svjetlost nego u uobičajenim pGL2 vektorima (Groskreutz, 1994).

Geni luciferaze krijesnice su komercijalni proizvodi, a na tržištu su dostupni u različitim oblicima uključujući *luc+* i nekoliko vrsta *luc2* (*luc2*, *luc2P* i *luc2CP*) (Slika 10.), koji su karakterizirani smanjenim vremenom poluživota u stanici ([www.worldwide.promega.com](http://www.worldwide.promega.com)). Osim Promega Corporation, neki od proizvođača luciferaznih gena su Merck, New England Biolabs, Termo Fischer Scientific i dr.



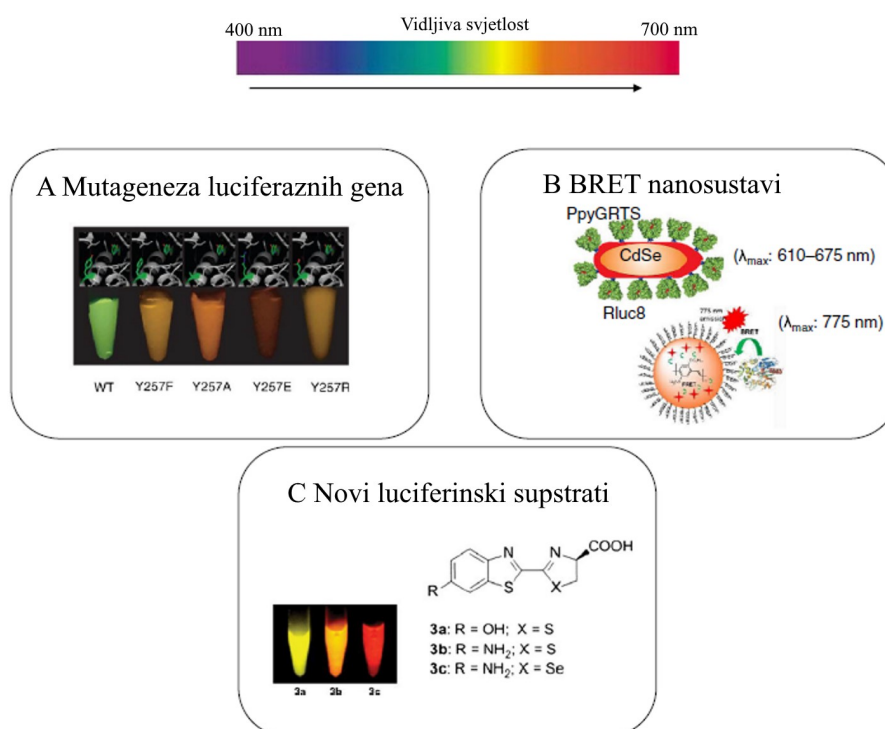
**Slika 10.** Primjer komercijalno dostupnih vektora s luciferaznim genima. Osim reporterskog gena *luc2*, *luc2P* ili *luc2CP* vektori često uključuju i selekcijski marker (gen rezistencije na neomicin, higromicin ili puromicin) te višestruko mjesto za kloniranje preko kojeg je moguće u vektor unijeti gen od interesa. Prikazani su pGL4 vektor s genom *luc2* (vrijeme poluživota u stanici 3 h) bez selekcijskog markera (a) i sa selekcijskim markerom rezistencije na puromicin (*luc2*/Puro) (b). Vektor pGL4 s genom *luc2P* (c) reagira brže (vrijeme poluživota u stanici 1 h) od *luc2*, ali s umjerenim intenzitetom signala, a *luc2CP* (d) reagira najbrže (vrijeme poluživota u stanici 0,4 h) s najnižim intenzitetom signala (preuzeto i prilagođeno s [www.worldwide.promege.com](http://www.worldwide.promege.com)).

Zbog toga što je FLuc najčešće korištena i najpoznatija luciferaza čija su svojstva opsežno opisana, osim u otkrivanju novih luciferaza veliki se naponi ulažu u unaprijeđenje FLuc genetičkim inženjersvom i poboljšanje njezinih supstrata kako bi se što više približila idealnom reporteru.

Primjerice, bitno je razviti luciferaze koje održavaju svoja svojstva emisije u različitim eksperimentalnim uvjetima, pri različitim pH i temperaturama. Luciferaze izolirane iz krijesnice općenito pokazuju pH-ovisnu emisiju (Roda, 2003), a vrlo malo mutanata nema ovaj nedostatak. Zanimljivo je da je bioluminiscencija luciferaza izoliranih iz vrsta kukaca rodova *Pyrophorus* i *Phrixothrix* (Viviani i sur., 2006) pH neovisna, i takvi enzimi, zajedno s mutantima luciferaze krijesnice koji pokazuju isto svojstvo, su iznimno korisni za razvoj staničnih testova i *in vivo* modela za biološko oslikavanje (Wang i sur., 2013).

Nadalje, ugradnja signalne sekvence za razgradnju proteina u gen luciferaze daje enzimu luciferaze kraće vrijeme poluživota (Leclerc i sur., 2000). Ove luciferaze kratkog vijeka su naširoko korištene u analizama reporterskih gena za praćenje prolaznih dinamičkih promjena u ekspresiji gena.

Zahvaljujući teorijskim i eksperimentalnim istraživanjima mehanizama modulacije boje dobiveno je nekoliko mutanata, što je omogućilo rasvjetljavanje katalitičkih mehanizama različitih luciferaza te je prijavljen širok raspon luciferaza s podešenim spektralnim svojstvima (Yao i sur., 2018; Kaskova i sur., 2016). Različite strategije za promjenu boje bioluminiscencije (Slika 11.), uglavnom se temelje na mutagenezi luciferaznih gena, sintezi novih luciferinskih supstrata i konjugaciji s nano-fluorescentnim akceptorima. Neki FLuc mutanti osigurali su 50 do 100 puta veći intenzitet svjetlosti od izvornog oblika enzima (Branchini i sur., 2010), iako se ponašanje luciferaze u živim sustavima može razlikovati od stvarne enzimske aktivnosti izmjerene u pročišćenim ekstraktima.



**Slika 11.** Različite strategije za promjenu boje bioluminiscencije: A) mutagenaza luciferaznih gena B) sinteza konjugata luciferaza i nano-fluorescentnih akceptora ili C) sinteza novih luciferinskih supstrata (preuzeto i prilagođeno iz Michelini i sur., 2014).

Glavni napori bili su usmjereni na dobivanje mutanata s crveno pomaknutom emisijom za *in vivo* snimanje i za dvobojne reporterske analize kada su upareni s luciferazama koje emitiraju

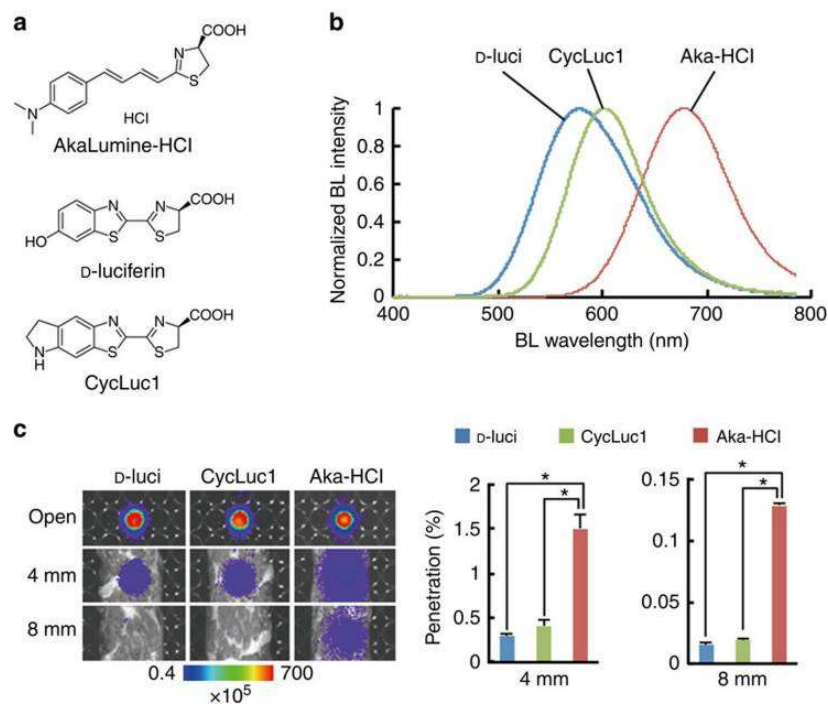
u zelenom području spektra (Rahnama i sur., 2017; Yeh i sur., 2017; Rumyantsev i sur., 2016; Wang i sur., 2013).

Osim dizajna novih rekombinantnih luciferaza, pomak bioluminiscentne emisije u NIR-područje spektra može se postići sintezom posebnih novih supstrata, analoga prirodnog D-luciferina. Promjene kromofora D-luciferina mogu izravno utjecati na boju oslobođene svjetlosti. Na primjer, valnu duljinu svjetlosti emitirane korištenjem određenog supstrata može promijeniti proširenje konjugacije luciferinskog  $\pi$ -sustava ili mijenjanje supstituenata na heteroatomu (Hall i sur., 2018; Anderson i sur., 2017; Kuchimaru i sur., 2016). Dodatno, dizajnirani su i enzimi koji bolje obrađuju modificirane analoge luciferina i tako povećavaju intenzitet emitirane svjetlosti (Hall i sur., 2018; Zhang i sur., 2018; Mofford i sur., 2014).

Također, sintetiziran je ciklički alkilaminoluciferin (CycLuc1) s emisijskim maksimumom ( $\lambda_{\max}$ ) na valnoj duljini od 604 nm koji je omogućio olakšanu detekciju bioluminiscentnog signala *in vivo* zahvaljujući pojačanom signalu (Slika 12.) (Evans i sur., 2014). Međutim, kratka  $\lambda_{\max}$  onemogućila je maksimalno iskorištenje postignute pojačane osjetljivosti u dubokim tkivima.

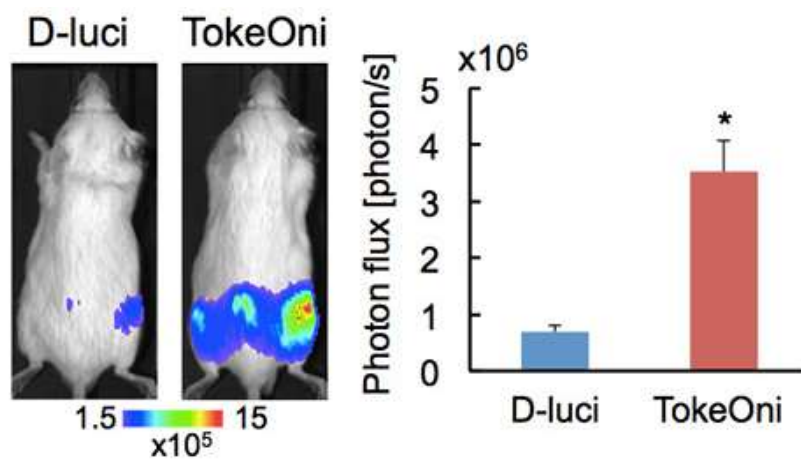
Prodor svjetlosti kroz tkiva puno je bolji na valnim duljinama od 650 do 900 nm (NIR područje). Ove se valne duljine mogu postići korištenjem sintetskih analoga D-luciferina ( $\lambda_{\max}=706$  nm) (Jathoul i sur., 2014), ali takvi supstrati imaju intenzitet signala niži od D-luciferina.

Primjer supstrata s kojim su riješena oba navedena problema je AkaLumine ( $\lambda_{\max}=675$  nm) u kojem je aromatska struktura u D-luciferinu zamijenjena benzotiazolom (Iwano i sur., 2013). Međutim, AkaLumine je jako hidrofoban spoj što uzrokuje njegovu slabu topljivost u vodi (<2 mM) i veliki nedostatak za upotrebu *in vivo*. Zbog toga je morao biti sintetiziran i AkaLumine-hidroklorid (AkaLumine-HCl) (Slika 12.) (Kuchimaru i sur., 2016) komercijalnog naziva TokeOni. TokeOni praktični je supstrat koji postiže dobru kemijsku stabilnost, visoku topljivost u vodi i robusnu emisiju NIR-bioluminiscencije ( $\lambda_{\max} = 677$  nm) s prirodnim Fluc. TokeOni je kompatibilan sa sadašnjim BLI sustavima koji koriste Fluc i pruža superiornu osjetljivost detekcije meta lijekova, osobito u dubokim živim tkivima jer izbjegava probleme apsorpcije i raspršivanja svjetlosti kratkih valnih duljina u životinjskom tkivu ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).



**Slika 12.** Usporedba svojstava različitih supstrata FLuc. A) Kemijske strukture luciferaznih supstrata AkaLumine-HCl, D-luciferina i CycLuc1. B) Bioluminiscencijski emisijski spektri AkaLumine-HCl, D-luciferina i CycLuc1. C) Učinkovitost tkivne penetracije bioluminiscencije postignute korištenjem AkaLumine-HCl, D-luciferina i CycLuc1. Učinkovitost tkivne penetracije odnosi se na relativne intenzitete bioluminiscenčnih signala iz pojedinog bunarića na mikrotitarskoj ploči pokrivenog biološkim tkivom debljine 4 ili 8 mm u odnosu na intenzitet iz nepokrivenih bunarića (preuzeto iz Kuchimaru i sur., 2016).

Da bi se ilustrirao učinak TokeOni *in vivo*, uspoređena je osjetljivost otkrivanja metastaza kosti pomoću TokeOni s onom pomoću D-luciferina. SCID miševima su intraarterijski injektirane stanice humanog raka prostate PC-3 koje stabilno eksprimiraju luciferazu krijesnice (PC-3/*luc*) u obliku metastaza kosti. 100  $\mu$ L 33 mM supstrata (~50 mg/tijelo) je intraperitonealno injektirano u iste miševe u intervalima od 4 sata, a slike bioluminiscencije su dobivene pomoću IVIS-Spectruma (PerkinElmer). TokeOni je uvelike pojačao intenzitet signala iz metastatskih lezija u stražnjici i ilijačnim kostima, što je detektirano kao povećanje protoka fotona 5,2 puta (Slika 13.).

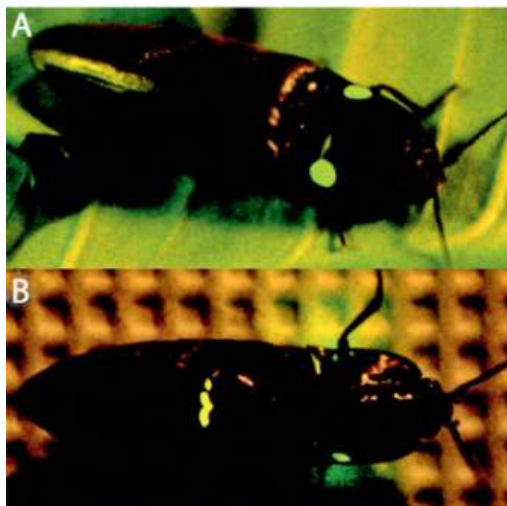


**Slika 13.** Visoko osjetljivo *in vivo* snimanje metastaza kosti pomoću TokeOni. Reprezentativne slike bioluminiscencije dobivene 10 minuta nakon injektiranja supstrata (lijevo) i kvantitativne analize intenziteta bioluminiscencije iz stražnjih udova (desno). TokeOni je injiciran u iste miševе 4 sata nakon injektiranja D-luciferina. Prikazane su srednje vrijednosti s pripadnim standardnim devijacijama; n = 6, \* p < 0,05 (preuzeto s [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).



#### 4.1.2.2 Luciferaze klišnjaka

Luciferaze klišnjaka (eng. click beetle luciferase, CBLuc) kao i luciferazu krijesnice ubrajamo u bioluminiscencijske sustave ovisne o D-luciferinu. Nedugo nakon kloniranja cDNA luciferaze iz sjevernoameričke krijesnice uslijedilo je i uspješno kloniranje cDNA čak četiri vrste luciferaza iz jamajčanskog klišnjaka *Pyrophorus plagiophthalmus* (Wood i sur., 1989a). *P. plagiophthalmus* ima dva seta bioluminiscentnih organa (Slika 14.), ventralni i dorzalni set, koji emitiraju svjetlost različitih boja. Iz ventralnog seta izolirane su luciferaze koje emitiraju svjetlost u žuto-zelenom (547 nm) i narančastom (594 nm) području, a iz dorzalnog luciferaze s emisijom u području zelene (548 nm) i žuto-zelene (565 nm) boje (Biggley i sur., 1967).

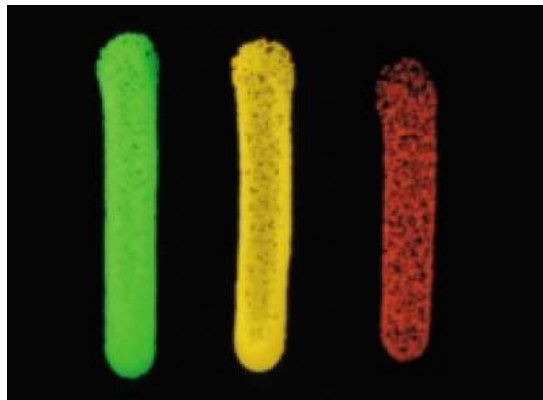


**Slika 14.** Jamajčanski klišnjak, *Pyrophorus plagiophthalmus*, s dva seta bioluminiscentnih organa (preuzeto iz Roda, ured., 2011).

Veličinom od 64 kDa su CBLuc slične FLuc, a u aminokiselinskom slijedu imaju samo 7 aminokiselina manje od FLuc. Ipak, strukturno su CBLuc znatno različite od FLuc, a razlike se očituju u kemijskim svojstvima. Naime, CBLuc su manje osjetljive na vanjske uvjete, promjenu temperature, pH vrijednosti i denaturaciju detergentima (Kricka i DeLuca, 1982). CBLuc su stabilne u rasponu pH vrijednosti od 6-9, a i pri pH >9 je pomak njihovog emisijskog spektra prema crvenom području znatno manji nego što se opaža kod FLuc, zbog čega su luciferaze klišnjaka svrstane u luciferaze neovisne opH (Wood i sur., 1989a). Zadnje tri aminokiseline u primarnoj strukturi CBLuc istovjetne su onima u FLuc i predstavljaju signalni slijed za odlaganje u peroksisome (Wood i sur., 1989a). Aminokiselinski slijedovi raznobojnih CBLuc se međusobno poklapaju u 95-99% pa imaju slične razine ekspresije i

vrijeme poluživota u stanicama. Sve CBLuc kao i FLuc kao supstrat koriste D-luciferin uz kofaktore ATP i  $Mg^{2+}$  te je razlika u boji bioluminiscentne svjetlosti rezultat različitih primarnih struktura, konkretno, odstupanja u 5-32 aminokiseline, a ne kataliziranja različitih supstrata (Wood i sur., 1989b).

Dostupnost nekoliko bioluminiscentnih boja u jednoj vrsti dovela je do razvoja ideje o višebojnim reporterskim sustavima, jer je samo nekoliko točkastih mutacija potrebno za proizvodnju enzima čiji će se signali moći jednostavno razlikovati. Kao kalup za nove poboljšane CBLuc između četiri divlja tipa luciferaza za manipulaciju genetičkim inženjerstvom izabrana je žuto-zelena emitirajuća luciferaza jer je pokazala najveći intenzitet emisije bioluminiscentne svjetlosti. Modificiranjem ove luciferaze napravljene su crveno emitirajuća luciferaza klišnjaka (eng. click beetle red luciferase, CBRLuc) te zelenu emitirajuću luciferazu (eng. click beetle green luciferase, CBGLuc): CBG68Luc i CBG99Luc koje kodiraju geni identični 68,8% odnosno 99% luciferaznom genu CBRLuc luciferaze (Slika 15.) (Almond i sur., 2003).

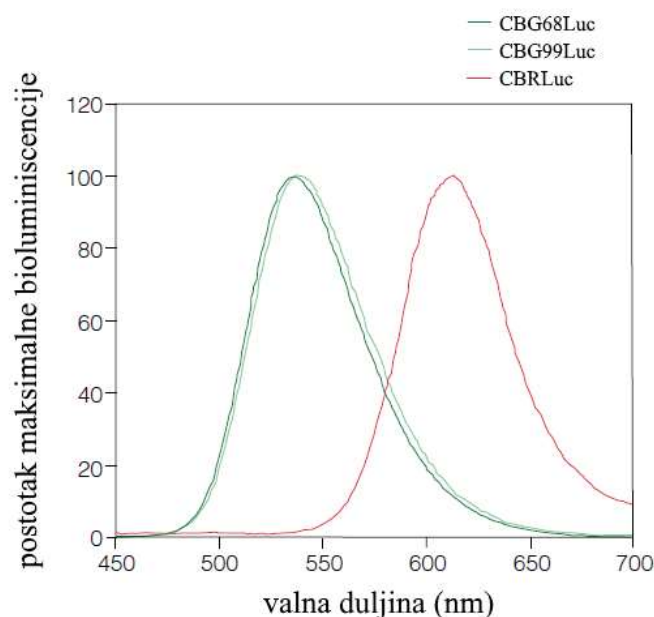


**Slika 15.** Zelena i narančasta bioluminiscentna svjetlost koju emitiraju divlji tipovi CBLuc luciferaza izoliranih iz *Pyrophorus plagiophthalmus* te crvena bioluminiscentna svjetlost mutantne luciferaze CBRLuc (preuzeto iz Almond i sur., 2003).

Važno je napomenuti da se u proteinskim strukturama CBG68Luc i CBRLuc ipak podudaraju u 98% unatoč velikim razlikama u genetskom kodu. Komercijalno su geni *CBRLuc*, *CBG68Luc* i *CBG99Luc* dostupni u obliku vektora u luciferaznom testu Chroma-Luc™ (Slika 16.) ([www.worldwide.promega.com](http://www.worldwide.promega.com)).

U primarnoj je strukturi CBLuc učinjeno nekoliko promjena kako bi im se povećala stabilnost na temperaturama do 40°C, pojačao intenzitet emisije svjetlosti te postigao pomak emisijskog maksimuma CBRLuc-a prema crvenom području spektra. Osim toga, uklonjen im je slijed za

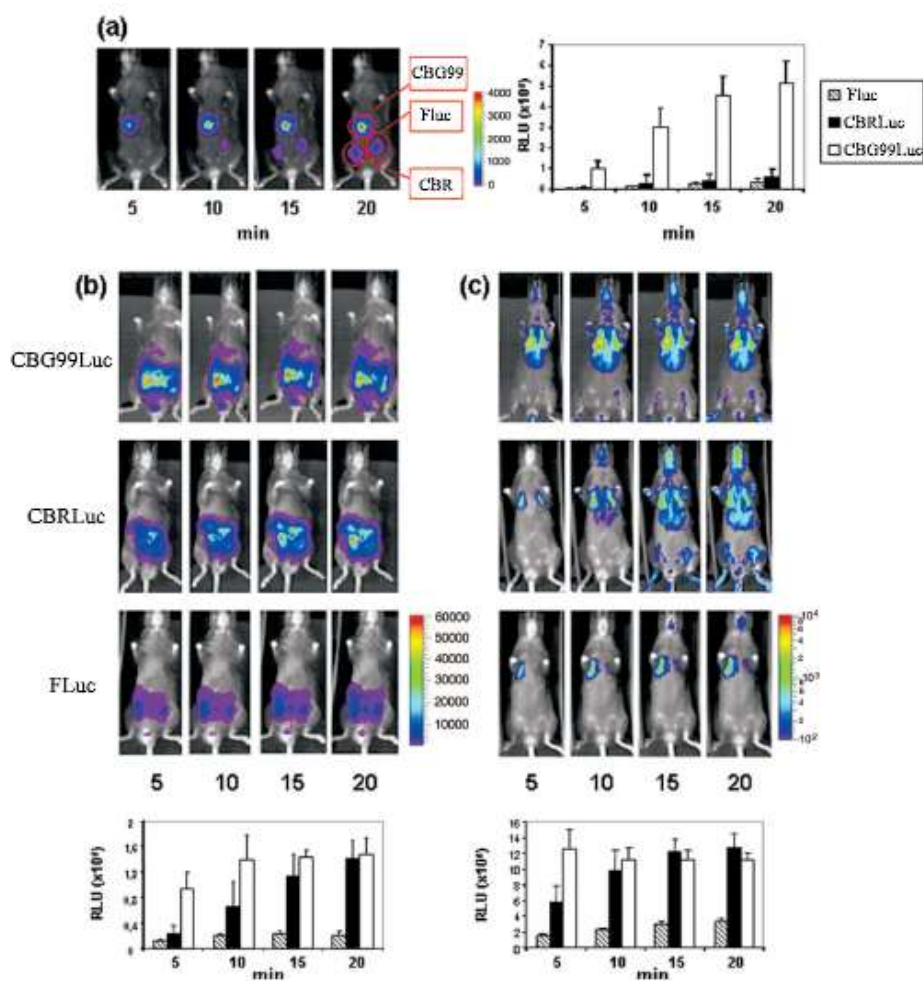
odlaganje u peroksisome kako bi se nakon ekspresije zadržavale u citosolu stanice (Almond i sur., 2003). Kodonskom optimizacijom su prilagođene ekspresiji u stanicama sisavaca, u odnosu na divlji tip CBLuc im je osjetljivost povećana više od 10 puta te je dokazano da se nakon kotransfekcije u istu stanicu putem različitih vektora CBLuc eksprimiraju neovisno jedna o drugoj što omogućuje simultano mjerenje različitih fizioloških procesa od interesa unutar jedne stanice (Almond i sur., 2003). Zbog navedenih svojstava Chroma-Luc™ luciferaze su idealan izbor za dvostruki luciferazni test te za primjenu u HTS-u (Slika 16.).



**Slika 16.** Emisijski spektri Chroma-Luc™ enzima. Zeleno emitirajuće luciferaze kodirane *CBG68luc* i *CBG99luc* genima imaju emisijski maksimum na 537 nm, a crveno emitirajuća luciferaza kodirana genom *CBRLuc* na 613 nm. Udaljenost emisijskih maksimuma veća od 75 nm omogućuje iskorištavanje Chroma-Luc™ seta luciferaza za dvostruki luciferazni test u kojemu se detekcija bioluminiscentnog signala odvija pomoću luminometra s prikladnim optičkim filtrima (preuzeto i prilagođeno iz Almond i sur., 2003).

Za *in vitro* i *in vivo* primjenu CBRLuc i CBG99Luc su uspoređene s FLuc te je dokazana njihova superiornost nad FLuc koja je i dalje najkorištenija luciferaza za BLI (Miloud i sur., 2007). Zbog visokog fotonskog prinosa i znatnog udjela crvene bioluminiscencije u ukupnoj emitiranoj svjetlosti, primjena CBRLuc i CBG99Luc omogućuje BLI veće osjetljivosti u različitim mišjim tumorskim modelima (Slika 17.).

Emisijski maksimum CBRLuc luciferaze može se dodatno pomaknuti prema većim valnim duljinama (730-743 nm) idealnim za BLI upotrebom sintetskog naftil-luciferina kao supstrata za bioluminiscencijsku reakciju (Hall i sur., 2018).



**Slika 17.** Usporedba intenziteta bioluminiscentnih signala CBG99Luc, CBRLuc i FLuc u BLI *in vivo*. Miševima su bioluminiscentne tumorske stanice MO4 ubrizgane supkutano (a), intraperitonealno u peritonealnu šupljinu (b) i intravenozno u plućno tkivo (c) te su nakon injekcije D-luciferina miševi podvrgnuti detekciji BLI signala u različitim vremenskim intervalima. (a) Na supkutanoj razini CBG99Luc pokazuje znatno veći intenzitet signala nego CBRLuc i FLuc. (b) U peritoneumu, prisustvo organa poput želuca i bubrega uzrokuje apsorpciju svjetlosti u zelenom području pa su intenziteti CBG99Luc i CBRLuc usporedivi, iako CBG99Luc brže postiže maksimum intenziteta emisije. FLuc u svim vremenskim točkama mjerenja pokazuje znatno niži intenzitet emisije svjetlosti. (c) Intravenozno ubrizgane stanice tumora se rasprostranjuju kapilarima u plućnom tkivu, a kasnije se pojavljuju i u jetri. Zbog toga što fotoni moraju proći kroz visoko prokrvljeno tkivo bogato hemoglobinom ukupni intenzitet emisije svjetlostisvih luciferaza je smanjen 10 puta u usporedbi s peritonealnim modelom. Maksimalni prinos fotona jednak je za CBG99Luc i CBRLuc, ali je CBG99Luc karakterizirana bržom kinetikom (preuzeto i prilagođeno iz Miloud i sur., 2007).

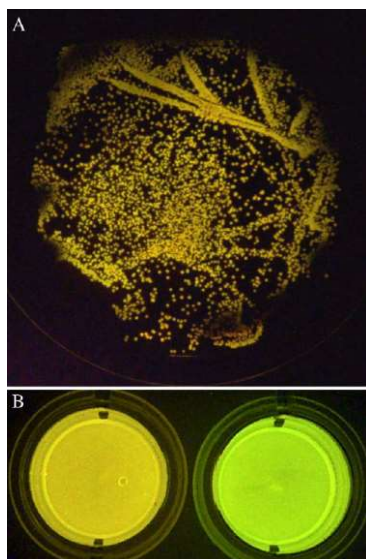
#### 4.1.2.3 *Luciola* luciferaze

Jedna vrsta luciferaza koje spadaju ubioluminiscencijske sustave koji kao supstrat koriste D-luciferin su *Luciola* luciferaze. Najčešće se primjenjuju enzimi izolirani iz vrsta *Luciola lateralis*, *Luciola cruciata* te *Luciola italica*. Među njima je najbolje okarakterizirana luciferaza izolirana iz talijanske krijesnice *Luciola italica* (Slika 18.) (Branchini i sur., 2006).



**Slika 18.** Talijanska krijesnica *Luciola italica* (preuzeto iz Branchini i sur., 2006).

Slijed cDNA ove luciferaze sastoji se od 1647 pb koje kodiraju za 584 aminokiselina. Filogenetička analiza proteinskog slijeda ukazala je na blisku povezanost ove luciferaze s ostalim luciferazama krijesnica koje pripadaju porodici *Lampyridae*, uključujući i luciferazu iz *P. pyralis*. Specifična aktivnost luciferaze iz *L. italica* je procijenjena na 78 % aktivnosti luciferaze iz *P. pyralis* (nakon korekcije zbog razlika u boji emitirane svjetlosti (Slika 19.)), ali je intenzitet izlaznog svjetlosnog signala oko 2 puta veći zbog razlika u katalitičkom obrtaju enzima (Branchini i sur., 2006).



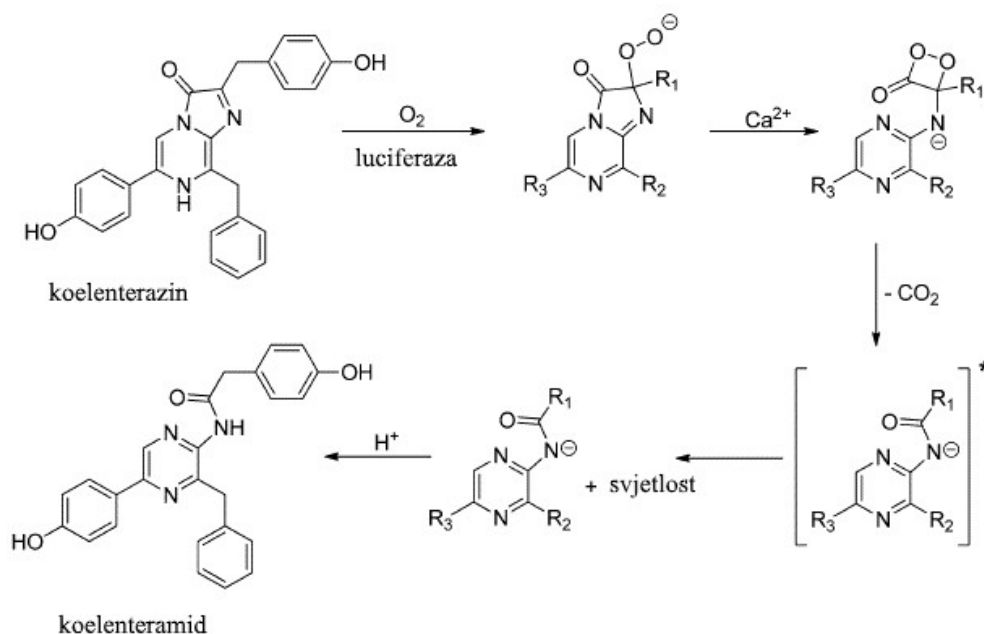
**Slika 19.** Bioluminiscentne kolonije *E. coli* koje ekprimiraju *L. italica* luciferazu (A) i usporedba boje bioluminiscencije *Luciola* luciferaze (lijevo) i luciferaze krijesnice (desno) (preuzeto iz Branchini i sur., 2006).

Bioluminiscencija luciferaze iz *L.italica* je osjetljiva na promjene pH (kao i kod ostalih luciferaza krijesnica) pa emisijski maksimum s 566 nm pri pH 7,8 pomiče prema crvenom području spektra na 614 nm pri pH 6,0.  $K_M$  konstante za D-luciferin i ATP iznose  $90 \mu\text{M} \pm 9 \mu\text{M}$  i  $180 \mu\text{M} \pm 14 \mu\text{M}$ , dakle  $K_M$  konstanta za D-luciferin je 6 puta veća od  $K_M$  konstante luciferaze iz *P. pyralis*, dok za ATP nije značajno drugačija (Branchini i sur., 2006). Kao i u ostalih luciferaza ovisnih o D-luciferinu C-terminus aminokiselinskog slijeda *Luciola* luciferaze završava s tripeptidom Ala-Lys-Met koji predstavlja signalni slijed za odlaganje u peroksisome (Branchini i sur., 2006; Gould i sur., 1988).

Za dubokotkivno oslikavanje razvijena je termostabilna crvena varijanta (610 nm) *Luciola* luciferaze te je ona kodonski optimizirana za ekspresiju u stanicama sisavaca (Maguire i sur., 2012). Kombinacijom C-terminalne domene divljeg tipa *Luciola* luciferaze i N-terminalne domene FLuc kreirana je nova kimerna luciferaza PpyLit s 1,4 puta većim kvantnim prinosom bioluminiscentnog signala (Branchini i sur., 2014). Zatim je PpyLit poslužila za dizajn PGL2 luciferaze poboljšane pH-stabilnosti i termostabilnosti koja omogućuje 3 puta osjetljivije ispitivanje nego FLuc, može detektirati  $10^{-15}$  mola ATP-a, a osim toga je i jeftinija (Branchini i sur, 2015).

### 4.1.3 Bioluminiscencijski sustavi ovisni o koelenterazinu

Većina bioluminiscentnih morskih organizama reagira s luciferinom koelenterazinom. Imidazopirazin koelenterazin je modificirani diciklički tripeptid građen od dva tirozinska i jednog fenilalaninskog ostatka (Hart i sur., 1978). Mehanizam nastanka bioluminiscentne svjetlosti tijekom oksidacije koelenterazina sličan je onom pri oksidaciji D-luciferina (Slika 20.). Oksidacija molekule luciferina (koelenterazina) u prisustvu kisika katalizirana je luciferazom, pri čemu nastaju dioksetani koji gube CO<sub>2</sub> i daju oksiluciferin (koelenteramid) u pobuđenom elektronskom stanju. Pri povratku koelenteramida u osnovno elektronsko stanje dolazi do emisije plave svjetlosti na 480 nm (Shifera i Hardin, 2010; Liu i Escher, 1999). Za razliku od reakcije s D-luciferinom, bioluminiscencijska reakcija oksidacije koelenterazina neovisna je o ATP-u i ostalim kofaktorima (Hart i sur., 1979).



**Slika 20.** Reakcija oksidacije koelenterazina popraćena emisijom bioluminiscentne svjetlosti (preuzeto i prilagođeno iz Kaskova i sur., 2016).

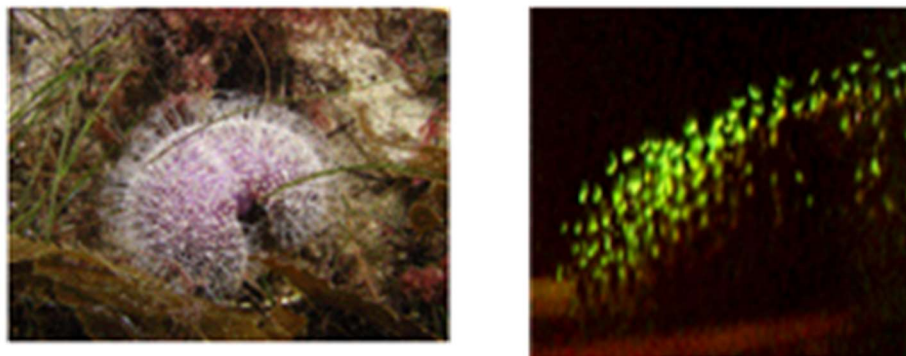
Brojne luciferaze prirodnog podrijetla ovisne su o prisutnosti supstrata koelenterazina. Prva takva luciferaza izolirana je 1978. godine iz dubokomorskog škampa *Opholophorus gracilirostris* (Shimomura, 1978). *Opholophorus* luciferaza ima molekulsku masu 106 kDa, a sastoji se od dva identična para podjedinica (19 kDa i 35 kDa), od kojih je podjedinica od 19 kDa zaslužna za katalitičku aktivnost, odnosno, reakciju s luciferinom (Inouye i sur., 2000). Stoga je katalitički aktivan fragment kloniran odvojeno te je potvrđena njegova aktivnost

(Inouye i Sasaki, 2007). Emisijski maksimum *Opholophorus* luciferaze je na 454 nm valne duljine, a intenzitet bioluminiscencije i kvantni prinos je puno veći nego u ostalih luciferaza koje iskorištavaju koelenterazin. Ipak, luciferaza iz *O. gracilirostris* nije kao takva naišla na širu primjenu nego je Promega korporacija na temelju njezine katalitičke podjedinice razvila umjetnu luciferazu nazvanu NanoLuc® (Hall i sur., 2012) koja kao luciferinski supstrat koristi sintetički analog koelenterazina, furimazin, a o kojoj će biti riječi u daljnjim poglavljima. Među bioluminiscencijskim sustavima ovisnim o koelenterazinu najčešće se koriste luciferaze izolirane iz morskih organizama iz razreda koralja vrste *Renilla reniformis* te veslonožaca vrsta *Gaussia princeps* i *Metridia longa* (Markova i Vysotski, 2015).



#### 4.1.3.1 *Renilla luciferaza*

*Renilla luciferaza* (RLuc) je monomerni enzim veličine 36 kDa sačinjen od 311 aminokiselina. Izolirana je iz vrste *Renilla reniformis*, morske maćuhice (eng. sea pansy) (Slika 21.), iz razreda koralja (Anthozoa) (Lorenz i sur., 1991).

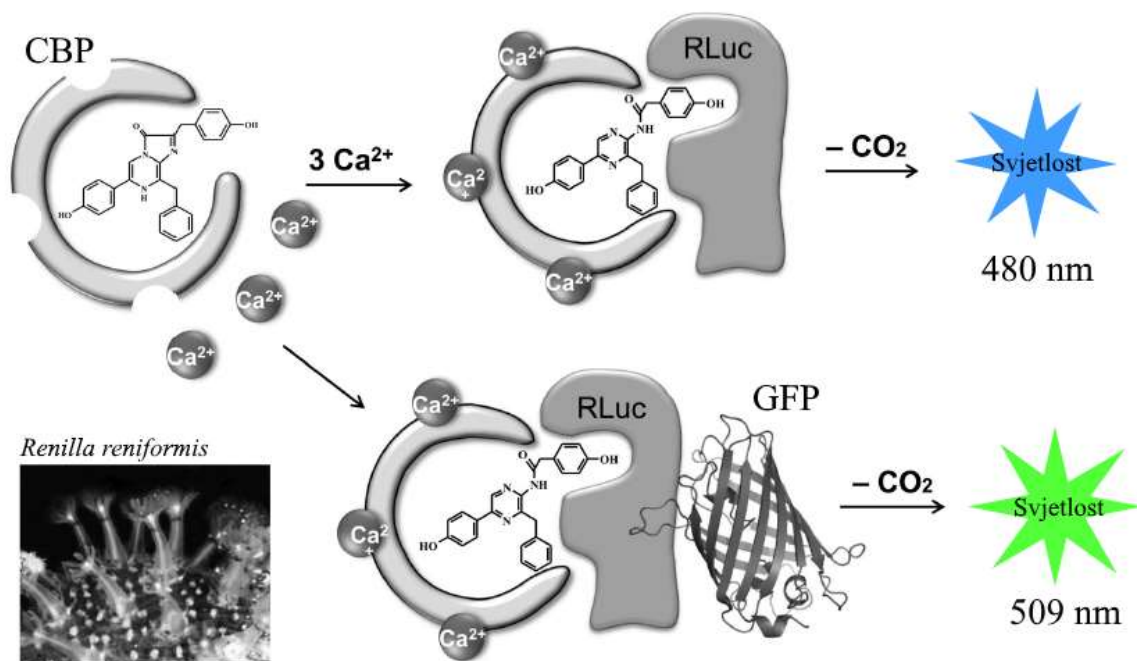


**Slika 21.** Morska maćuhica *Renilla reniformis* fotografirana na danjem svjetlu (desno) i prilikom bioluminiscencije u mraku (lijevo) (preuzeto i prilagođeno iz Lee i Vysotski, 2014).

Enzim RLuc je dekarboksilirajuća *Renilla*-luciferin:kisik 2-oksidoreduktaza (EC 1.13.12.5) koja katalizira oksidaciju koelenterazina u koelenteramid (Matthews i sur., 1977). Osim luciferaze, bioluminiscencijski *Renilla* sustav *in vivo* uključuje još najmanje dva proteina –  $\text{Ca}^{2+}$ -regulirani koelenterazin-vezujući protein (eng. coelenterazine-binding protein, CBP) (Charbonneau i Cormier, 1979) te zeleni fluorescentni protein (GFP) koji je sekundarni emiter svjetlosti u prirodnom sustavu bioluminiscencijskog rezonantnog prijenosa energije (eng. Bioluminescence Resonance Energy Transfer, BRET) prisutnom u morskoj maćuhici (Ward i Cormier, 1979). BRET podrazumijeva fenomen u kojem se energija nastala luciferaznom reakcijom umjesto oslobađanja emisijom bioluminiscentne svjetlosti prenosi s luciferaze (donorske molekule) na fluorescentni protein (akceptorsku molekulu) u neposrednoj blizini koji onda emitira svjetlost na drugoj valnoj duljini. U odsutnosti GFP oksidacija koelenterazina popraćena je emisijom svjetlosti plave boje s emisijskim maksimumom na 480 nm (Hart i sur., 1978), a u pristustvu GFP emisijski maksimum bioluminiscencijske reakcije *in vivo* i *in vitro* pomiče se u zeleno područje spektra na 509 nm zahvaljujući BRET fenomenu. Prisustvom GFP u reakcijskom mediju također se povećava kvantni prinos bioluminiscencijske reakcije (Ward i Cormier, 1979).

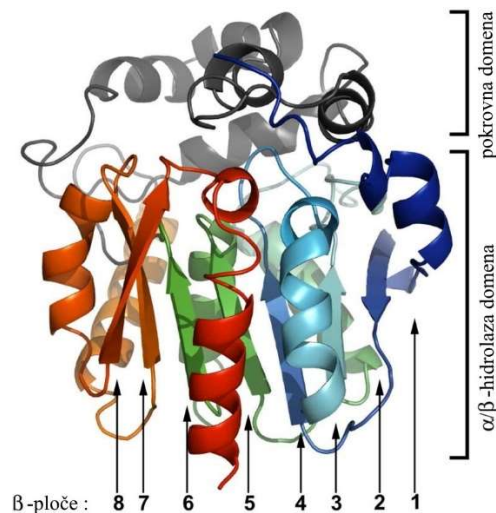
CBP sadrži tijesno nekovalentno vezanu molekulu nativnog koelenterazina u unutarnjoj hidrofobnoj šupljini (Stepanyuk i sur., 2008a), a vezanje  $\text{Ca}^{2+}$  kationa na CBP potiče male konformacijske promjene proteina koje RLuc omogućuju pristup molekuli koelenterazina.

Učinkovitost luciferazne reakcije *in vitro* povećana je nekoliko puta kad se umjesto slobodnog koelenterazina koristi CBP zbog formacije kompleksa CBP-RLuc (Stepanyuk i sur., 2009). Dakle, bioluminiscencijska reakcija RLuc uključuje tvorbu trostrukog kratko-živućeg proteinskog kompleksa CBP-RLuc-GFP u kojem je koelenterazin putem CBP dostavljen RLuc za oksidaciju, a energija oslobođena oksidacijom se prenosi na kromofor GFP uz emisiju zelene svjetlosti (Slika 22.) (Markova i Vysotski, 2015).



**Slika 22.** Prikaz bioluminiscencijskog sustava prisutnog u *Renilla reniformis*. Nakon vezanja tri  $Ca^{2+}$  iona, CBP mijenja konformaciju čime omogućuje RLuc pristup koelenterazinu. RLuc oksidira koelenterazin, a reakcija je u odsutstvu GFP popraćena emisijom plave svjetlosti (480 nm). Kad je GFP prisutan u reakcijskom mediju javlja se BRET fenomen između RLuc i GFP i emitira se svjetlost zelene boje (509 nm) (preuzeto i prilagođeno iz Markova i Vysotski, 2015).

Strukturno se RLuc sastoji od dvije domene, pokrovne domene koja uključuje tunel za prilaz supstrata luciferazi i domene slične  $\alpha/\beta$  hidrolazi, sastavljene od 8  $\beta$ -ploča, koja sadrži većinu aminokiselinskih ostataka ključnih za enzimsku aktivnost (Slika 23.) (Adrio i Demain, 2010; Loening i sur., 2007). Ne dijeli sličnosti u aminokiselinskom slijedu ni s FLuc, ali ni drugim luciferazama ovisnim o koelenterazinu (Roda i sur., 2009; Lorenz i sur., 1991).



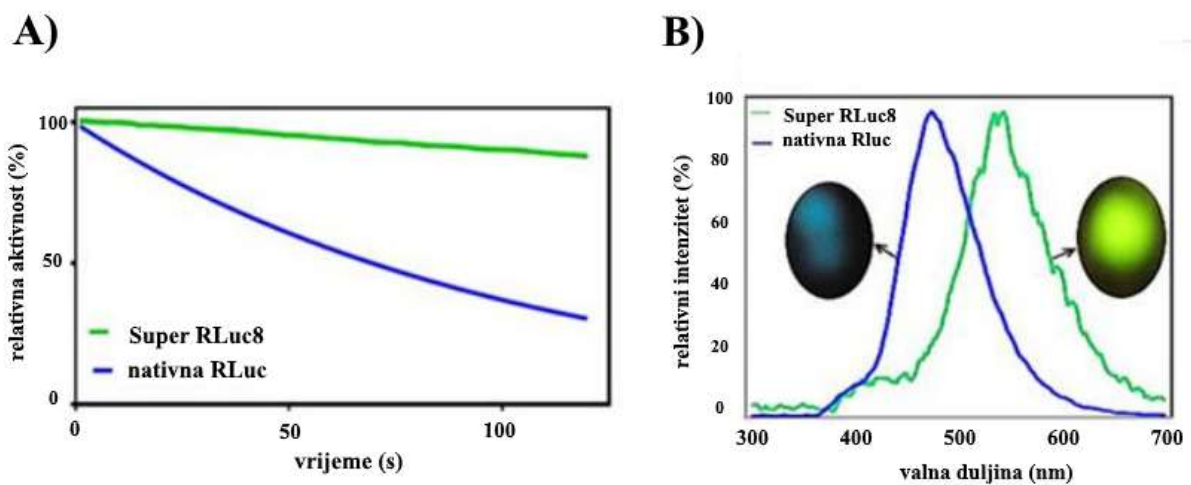
**Slika 23.** Sekundarna struktura monomernog enzima RLuc (preuzeto i prilagođeno iz Loening i sur., 2007).

RLuc se nakon ekspresije zadržava u citoplazmi, a također je jedina luciferaza ovisna o koelenterazinu koja se ne izlučuje iz stanice (Woo i von Arnim, 2008). Optimalna pH vrijednost za aktivnost RLuc je 7,2.  $K_M$  vrijednost pri 25°C i pri pH 7,2 za divlji tip RLuc enzima je 0,0025 mM (Farzannia i sur., 2015).

RLuc je pogodna za ispitivanja na staničnoj razini zbog kratkog vremena poluživota od 4,5 h pa se često koristi u HTS-u, no ne pokazuje posebne prednosti u usporedbi s FLuc pa se najčešće koristi kao kontrolni reporter u dvostrukim luciferaznim testovima uz FLuc kao eksperimentalni reporter (Thorne i sur., 2010). RLuc ipak može ponuditi određenu prednost pred FLuc u ispitivanjima s niskim staničnim preživljenjem jer za bioluminiscencijsku reakciju ne zahtijeva ATP, a koelenterazin ne inhibira stanični rast (Rahnama i sur., 2017). Primjena divljeg tipa RLuc zabilježena je u studijama karcinoma te praćenju i kvantificiranju specifičnih stanica. Na primjer, za otkrivanje apoptoznih stanica se koristi aneksin V označen RLuc luciferazom (Farzannia i sur, 2015; Emamzadeh, 2014; Nazari i sur., 2012; Gambhir i sur., 1999).

Problem u primjeni divljeg tipa RLuc luciferaze je taj što se enzim brzo inaktivira (0,4-0,9 h) na 37°C u mediju sličnom serumu (Loening i sur., 2006). Također, plava boja bioluminiscencije i kratak poluživot emisije svjetlosti kinetikom bljeska ograničavaju njegovu primjenu *in vivo* (Loening i sur., 2006). Zbog toga su na divljem tipu enzima provedena razna usavršavanja genetičkim inženjerstvom (Song i sur., 2013; Loening i sur., 2010; Loening i sur., 2007). Primjerice, pokazano je da se otpornost RLuc može povećati 6 puta jednostrukom mutacijom C124A (Liu i Escher, 1999). Supstitucijom tri aminokiseline (K189V, V267I i M185V) u primarnoj strukturi stvorena je super-RLuc luciferaza s poboljšanim enzimskim

obrtajem, jačim intenzitetom izlaznog svjetlosnog signala te produljenim poluživotom emitiranih fotona. Ipak, super-RLuc i dalje emitira u plavom području spektra i karakterizirana je niskom termostabilnošću (Woo i von Arnim, 2008). U RLuc8 termostabilnost je uvođenjem 8 mutacija (A55T, C124A, S130A, K136R, A143M, M185V, M253L i S287L) uspješno povećana čak 200 puta, a postignut je i četverostruko veći izlazni svjetlosni signal (Loening i sur., 2006). Pomak valne duljine emisijskog maksimuma u crveno područje i stabilna svjetlosna emisija kroz dulje vrijeme postignuta je tek u luciferazi super-RLuc8 (Slika 24.) (Rahnama i sur., 2017).



**Slika 24.** Slabljenje emisije svjetlosti nativne RLuc kroz vrijeme i stabilna emisija svjetlosti super RLuc8 luciferaze (A). Emisijski spektri nativne RLuc s maksimumom na 480 nm i pomak emisijskog maksimuma u crveno područje spektra super RLuc8 luciferaze (B) (preuzeto i prilagođeno iz Rahnama i sur., 2017).

Posljednja unaprijeđena verzija RLuc uključuje pet prethodno provjerenih mutacija (Shigehisa i sur., 2017) i jednu novu mutaciju čime je luciferaza stabilna na temperaturama višim za 10°C nego divlji tip enzima te je povećana njezina otpornost na razgradnju proteazama i inaktivaciju organskim otapalima (Ishibashi i sur., 2018).

RLuc se često koristi za analizu protein-protein interakcija (PPI) (Stefan i sur., 2007; Paulmurugan i Gambhir, 2003), a posebno je popularna njezina primjena u obliku BRET sustava u istraživanju protein-protein interakcija. RLuc se u BRET-u kombinira s fluorescentnim proteinima GFP2, YFP, mOrange, TagRFP, TurboFB kao akceptorima bioluminiscentne svjetlosti (De, 2011; Dragulescu-Andrasi i sur., 2011; De i sur., 2009; Ozawa i Umezawa, 2001; Xu i sur., 1999). Poboljšana varijanta RLuc8 korištena je u kombinaciji s fluorescentnim proteinom GFP2, primjerice u BRET ispitivanju signalnih puteva potaknutih inzulinskim receptorima (Kulahin i sur., 2012) te za oslikavanje dubokog

tkiva u kombinaciji s mOrange (De i sur., 2009). Još značajniji pomaci emisije u crveno područje postignuti su kombinacijama RLuc8 s TagRFP (584 nm) ili TurboFP (635 nm) fluorescentnim proteinima (Dragulescu-Andrasi i sur., 2011).

RLuc geni u obliku vektora za različite primjene komercijalno su dostupni od mnogih proizvođača poput Thermo Fisher Scientific, Promega, Biotium, BPR Bioscience, AAT Bioquest, GoldBio i dr.

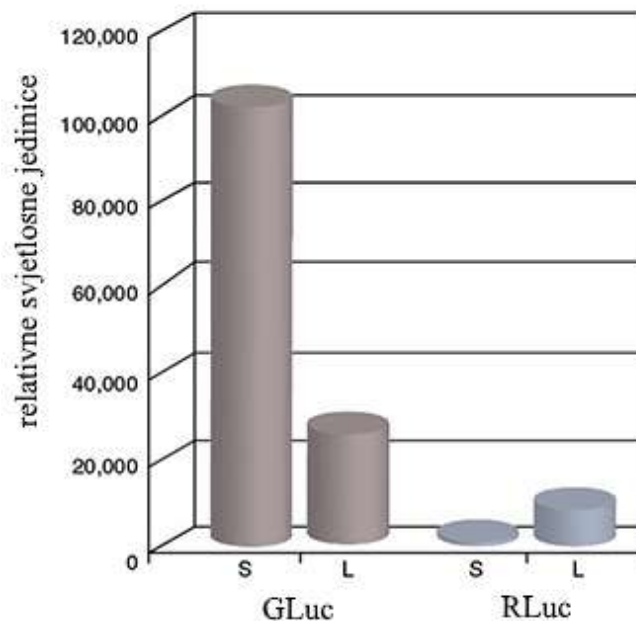
#### 4.1.3.2 *Gaussia* luciferaza

*Gaussia* luciferaza (GLuc) je mala luciferaza izolirana iz morskog veslonošca vrste *Gaussia princeps* (Slika 25.) od svega 19,9 kDa i 185 aminokiselina koja katalizira oksidaciju koelenterazina neovisnu o ATP-u u prisutnosti  $\text{Na}^+$  iona te proizvodi svjetlost širokog emisijskog spektra s pikom na 480 nm koji se širi do 600 nm (Tannous i sur., 2005).



**Slika 25.** Morski veslonožac *Gaussia princeps* iz kojeg je izolirana GLuc (preuzeto iz Wu i sur., 2015).

Aktivnost GLuc enzima je visoko stabilna i pri niskom pH do 1,5 (Wiles i sur., 2005) te unutar širokog raspona temperatura (90% aktivnosti očuvano je nakon 30 min inkubacije na 60°C, a 65% na 90°C) (Rathnayaka i sur., 2011; Rathnayaka i sur., 2010). Optimalna aktivnost GLuc postiže se na pH 7,9 pri temperaturi od 15-20°C (Larionova i sur., 2018). Bioluminiscencija GLuc ovisna je o koncentraciji soli u mediju, a postiže maksimum aktivnosti pri 50 mM NaCl (Rathnayaka i sur., 2010). GLuc snažno inhibiraju teški metali ( $\text{Cu}^{2+}$ ) i aktiviraju monovalentni ioni ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ) (Inouye i Sahara, 2008). U kulturi stanica sisavaca, u usporedbi s FLuc i RLuc generira 200 puta intenzivniju svjetlost (Slika 26.) kratkog trajanja, no kinetika bljeska GLuc ujedno omogućuje učinkovitu penetraciju svjetlosti kroz tkiva pa tako i lakšu detekciju bioluminiscentnog signala, iako se radi o emisiji svjetlosti u plavom području podložnoj raspršivanju i apsorpciji u tkivima (Tannous i sur., 2005). Nakon izlučivanja u stanični medij vrijeme poluživota GLuc proteina je 6 dana (Thorne i sur., 2010).



**Slika 26.** Usporedba intenziteta svjetlosti GLuc i RLuc. HeLa stanice su transficirane s 1  $\mu$ g pCMV-GLuc ili pCMV-RLuc vektora, a aktivnost luciferaza je mjerena u staničnom supernatantu (S) i staničnom lizatu (L). Iako se GLuc velikim dijelom izlučuje iz stanice, u stanici ipak zaostaje određena količina GLuc s mjerljivom aktivnošću. RLuc je eksprimirana samo unutar stanice (preuzeto i prilagođeno iz [www.international.neb.com](http://www.international.neb.com)).

Ipak, kinetika bljeska ograničava upotrebu GLuc pa su zbog toga razvijene varijante GLuc s produljenom bioluminiscencijom kroz vrijeme. Primjerice, mutacijom M43I u primarnoj sturkturi GLuc postignuta je produljena bioluminiscencija, ali je i intenzitet smanjen 3 puta (Maguire i sur., 2009), a mutacijama M43L i M110L bioluminiscencija se održava stabilnom kroz 14 minuta bez smanjenja intenziteta ako se mjeri u prisutnosti detergenta (npr. Tween 20) (Welsh i sur., 2009). Doduše, dodatak detergenta može interferirati s oslikavanjem ili pretraživanjem procesa unutar stanice denaturacijom proteina ili utjecanjem na njegove interakcije sa supstratom pa su za BLI *in vivo* potrebni mutanti GLuc koji imaju produljeno vrijeme bioluminiscencije i u mediju bez detergenta. Takve varijante GLuc stvorene su uvođenjem 3 mutacije (L30P, L40P, M43V) (Degeling i sur., 2013) ili 16 mutacija (Kim i sur., 2009). Najprikladnija varijanta GLuc za BLI *in vivo* je ipak tzv. Monsta luciferaza u kojoj je mutacijama F72W, I73L, H78E i Y80W osim promjene kinetičkog profila postignut i pomak emisijskog maksimuma za 33 nm prema crvenom području spektra (Kim i sur., 2011). Nadalje, GLuc je luciferaza koja podliježe izlučivanju iz stanice, a to svojstvo, iako poželjno u nekim vrstama ispitivanja, značajno ograničava primjenu GLuc u mnogim unutarstaničnim ispitivanjima, npr. praćenju signalnih puteva u intaktnim stanicama i proučavanju protein-protein interakcija. Stoga je nedavno stvorena GLuc koja se zadržava u stanici modifikacijom

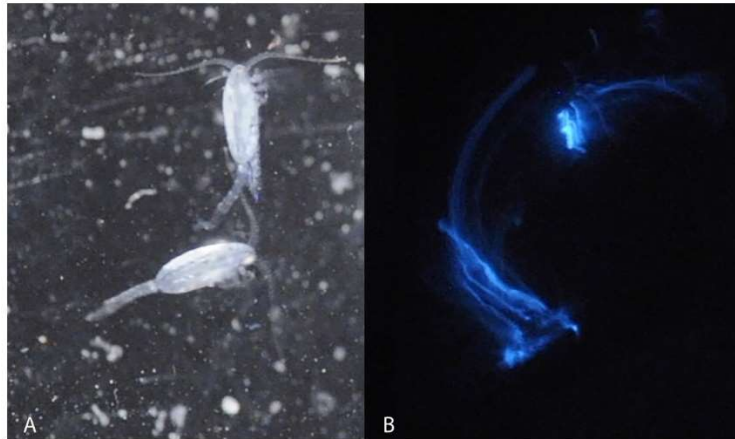
N-terminalnog signalnog slijeda za izlučivanje i dodatkom četiri aminokiseline (KDEL) na C-terminus (Gaur i sur., 2017).

Unaprijedene verzije GLuc komercijalno su dostupne od nekolicine proizvođača: New England Biolabs, Promega, Thermo Fisher Scientific i dr.



#### 4.1.3.3 *Metridia luciferaza*

Iz vrste morskog veslonošca *Metridia longa* 2004. godine je izolirana je jedna od najmanjih luciferaza s 219 aminokiselina i 23,9 kDa (Markova i sur., 2004). *Metridia luciferaza* (MLuc) katalizira jednostavnu reakciju oksidacije koelenterazina popraćenu emisijom plave svjetlosti (Slika 27.) kao i RLuc i GLuc iako s njima ne dijeli strukturne sličnosti (Markova i Vysotski, 2015).



**Slika 27.** Morski veslonožac roda *Metridia* pod svjetlosnim mikroskopom pri normalnom osvjetljenju (A) i prilikom proizvodnje bioluminiscencije (B) (preuzeto iz Tessler i sur., 2018).

Strukturno se MLuc sastoji od evolucijski očuvane C-terminalne domene u kojoj se nalazi aktivno mjesto enzima, N-terminalne varijabilne domene nevažne za katalitičku aktivnost te N-terminalnog signalnog slijeda od 17 aminokiselina za izlučivanje iz stanice (Petersen i sur., 2011). Katalitička C-terminalna domena sastoji se od dva homologna ponavljanja 70 aminokiselina i sadržava ukupno 10 Cys aminokiselinskih ostataka koji međusobno tvore 5 disulfidnih veza (Markova i sur., 2004). Cisteinski ostatci bitni su za katalitičku aktivnost enzima što je dokazano pokušajem zamjene Cys s Ala ostatcima što je uzrokovalo potpuni gubitak aktivnosti MLuc (Goerke i sur., 2008). Pretpostavlja se da disulfidne veze stabiliziraju prostornu strukturu MLuc zbog čega su izoforme MLuc stabilne u širokom području temperatura (Kim i sur., 2009), ali otežavaju pravilno smatanje MLuc proteina u reducirajućim uvjetima u citoplazmi prokariotskih stanica (npr. *E. coli*) pa točna prostorna struktura enzima do danas nije još potvrđena (Markova i sur., 2018). N-terminalna domena je varijabilna pa su iz jednog organizma izolirane različite izoforme enzima: MLuc2 s najkraćim, MLuc7 sa srednje dugim i MLuc164 s najduljim N-terminalnim dijelom (Larionova i sur., 2017; Markova i sur., 2015; Stepanyuk i sur., 2008b). Varijabilni dio ne utječe značajno na bioluminiscenciju što je dokazano skraćivanjem N-terminalne domene na

svoga 6 aminokiselina u divljem tipu MLuc7 bez gubitka aktivnosti (Markova i sur., 2015). Također, daljnje skraćivanje varijabilnog N-terminalnog dijela MLuc164 na 15,1 kDa čak je rezultiralo pojačavanjem svjetlosnog intenziteta i učinkovitosti bioluminiscencijske reakcije. Skraćeni oblici enzima zadržali su glavne značajke MLuc7 i MLuc164 uz jednu iznimku – kinetika gašenja bioluminiscencije postala je puno brža nego u divljim tipovima enzima (Markova i sur., 2012). Sve izoforme karakterizira velika termostabilnost (90% aktivnosti očuvano je nakon 1h inkubacije na 60°C, a 50% nakon 1h na 100°C) (Takenaka i sur., 2008), ali se one razlikuju po optimalnim temperaturama za aktivnost, primjerice, MLuc2 je najaktivnija pri 5°C, a MLuc7 pri 10-17°C zbog čega ih svrstavamo u izrazito psihrofilne enzime (Siddiqui, 2015). Nadalje, izoforme se razlikuju po optimalnom pH za aktivnost, MLuc7 ima široki pH optimum s najvećom aktivnošću pri pH 6,5-7,5 dok MLuc2 i MLuc164 imaju nešto uže pH optimume s najvećom aktivnošću pri pH 7,5 i 7,7 (Larionova i sur., 2017). Kinetika bljeska je zajednička svim izoformama, ali MLuc164 ima 10 sporije gašenje bioluminiscencije kroz vrijeme od MLuc2 i MLuc7 (Markova i sur., 2012; Tannous i sur., 2005). MLuc2 ispoljava najveći bioluminiscentni signal u 1 mM NaCl, a MLuc7 i MLuc164 u 0,5 mM NaCl (Markova i sur., 2015). Među rekombinantnim MLuc proteinima najuspjelija je tzv. TurboLuc luciferaza od 16 kDa stvorena na temelju katalitičkih domena divljih tipova luciferaza MLuc164 iz *M. longa* i MLuc1 iz *M. pacifica*. TurboLuc ima aktivnost sličnu GLuc, ali je njezin emisijski spektar pomaknut na 480 nm te joj je produljeno vrijeme gašenja svjetlosnog signala i postignuta učinkovita unutarstanična ekspresija uklanjanjem signala za izlučivanje (Auld i sur., 2018).

Mala veličina, visoka enzimska aktivnost te visoka termostabilnost MLuc enzime čini vrlo prikladnim reporterima za HTS. Mala veličina reportera omogućuje smanjenje metaboličkog opterećenja u stanicama domaćina, a smanjuje i steričke smetnje prilikom spajanja reporterskih proteina s proteinima od interesa te uzrokuje bolji prijenos energije u BRET konstruktima. Također, s MLuc enzimima provedeno je pretraživanje knjižnice 44 000 kemijskih spojeva na PubChem-u i knjižnice pročišćenih prirodnih spojeva pri čemu nisu identificirani njezini inhibitori (Auld i sur., 2018; Ho i sur., 2013).

Zanimljivo je da je u rodu *Metridia* postoji posebna vrsta veslonošca *M. lucens* koja proizvodi vlastiti luciferin za bioluminiscencijsku reakciju, a ne unosi koelenterazin prehranom kao ostale vrste (Tessler i sur., 2018). *M. lucens* još nije potpuno istražena, ali bi se u budućnosti mogla iskoristiti njezina navedena svojstva za uklanjanje potrebe dodatka egzogenog supstrata u reakcijski medij prilikom izvođenja luciferaznog testa.

#### 4.1.4 Bioluminiscencijski sustavi ovisni o *Cypridina* luciferinu

##### 4.1.4.1 *Cypridina* luciferaze

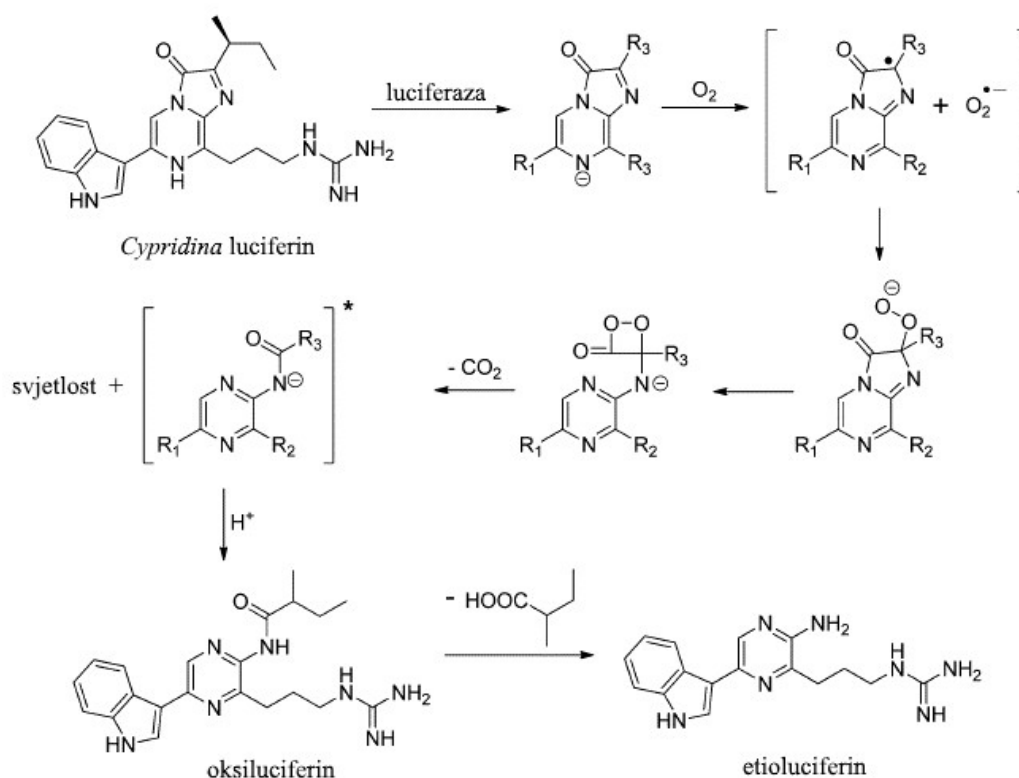
*Cypridina* luciferaza (CLuc) prirodno je izlučiva luciferaza izolirana iz morskog ljuskara vrste *Cypridina* (*Vargula*) *hilgendorffii* (Slika 28.) koji obitava u južnim obalnim vodama Japana, a često se naziva „morskom krijesnicom“ (Thompson i sur., 1989). CLuc je prva luciferaza izolirana iz morskog organizma koja za bioluminiscencijsku reakciju koristi *Cypridina* luciferin (vargulin), supstrat imidopirazinonskog tipa različit od koelenterazina (Shimomura, 2006).



Slika 28. Bioluminiscentni morski ljuskari *Cypridina hilgendorffii* (lijevo) i *Cypridina noctiluca* (desno) (preuzeto iz Nakajima i sur., 2004).

CLuc teži 61,7 kDa, a sastoji se od 555 aminokiselina koje tvore protein s jednom domenom. U primarnoj strukturi CLuc se osim signalnog slijeda za izlučivanje iz stanice, nalaze 32 Cys aminokiselinska ostatka koji tvore 16 disulfidnih veza potrebnih za uspostavu tercijarne strukture enzima koja omogućava topljivost proteina (Nakajima i sur., 2004). Na dva mjesta CLuc podliježe N-glikozilaciji pa bi zbog toga i brojnih disulfidnih veza ekspresija CLuc trebala biti ograničena na eukariotske stanice (Markova i Vysotski, 2015; Shimomura, 2006), ali je posljednjih godina uspješno provedena i u prokariotskim stanicama (Hunt i sur., 2017). Nedavno je utvrđeno da je N-glikozilacija bitna za smatanje proteina sa stabilnim aktivnim mjestom te omogućuje pravilnu interakciju između supstrata i enzima, a na termostabilnost i izlučivanje CLuc iz stanice nema utjecaj (Yasuno i sur., 2018).

CLuc katalizira reakciju oksidativne dekarboksilacije *Cypridina* luciferina (Slika 29.) u prisustvu kisika bez dodatka kofaktora popraćenu emisijom plave svjetlosti s emisijskim maksimumom na 465 nm (Nakajima i sur., 2004).



**Slika 29.** Mehanizam *Cypridina* bioluminiscencijske reakcije (preuzeto i prilagođeno iz Kaskova i sur., 2016).

Bioluminiscencijska reakcija CLuc ovisna je o pH, ionskoj jakosti i temperaturi, a optimalna temperatura reakcije je  $30^\circ C$  (Shimomura i Johnson, 1970). Također, od ostalih luciferaza izoliranih iz morskih organizama razlikuje ju puno sporija kinetika gašenja bioluminiscencije kroz vrijeme (Hunt i sur., 2017) zbog čega je popularna njezina primjena za određene oblike ispitivanja, a komercijalno ju distribuiraju brojni proizvođači kao što su New England Biolabs, ATTO, InVivoGen, Prolume RTD, Targeting Systems i dr.

Luciferaza slična CLuc izolirana je iz još jedne vrste japanskog ljuskara - *Cypridina noctiluca* (Slika 29.). Molekulska masa *C. noctiluca* luciferaze je 61,4 kDa, a sastoji se od 553 aminokiseline s otprilike 84% homologije u nukleotidnom i aminokiselinskom slijedu s luciferazom iz *C. hilgendorffii*. Svojstva *C. noctiluca* luciferaze su slična onima *C. hilgendorffii* (Tablica 2.), ali *C. noctiluca* luciferaza posjeduje znatno veću aktivnost u mediju stanične kulture (Nakajima i sur., 2004).

**Tablica 2.** Usporedba kemijsko-fizikalnih svojstava *Cypridina noctiluca* i *Cypridina (Vargula) hilgendorffii* luciferaza (preuzeto i prilagođeno iz Nakajima i sur., 2004).

	<i>C. noctiluca</i> luciferaza	<i>C. hilgendorffii</i> luciferaza
Broj aminokiselina	553	555
Molekulska masa (kDa)	61,464	61,693
$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	30,0	11,5
$V_{\text{max}}$ ( $\times 10^5$ RLU/s)	2,20	2,20
$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	465	465
Poluvrijeme života (h) na 37°C	53	50

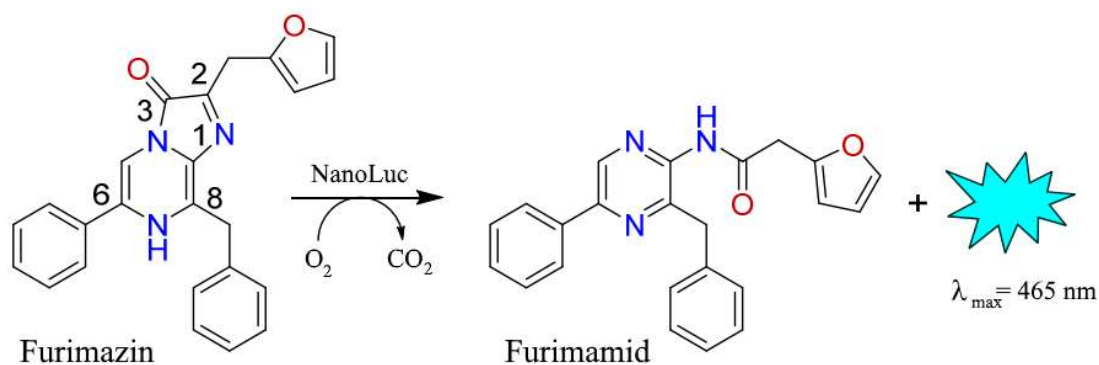
CLuc je kao i ostale luciferaze koje se izlučuju iz stanice idealna za HTS u obliku sekrecijskog testa. Zahvaljujući dugom vremenu poluživota proteina u staničnom mediju (53 h) CLuc omogućuje provođenje ispitivanja sekvencijalno tijekom duljih vremenskih perioda (sati do dani) korištenjem istih staničnih linija jer one ne moraju biti uništene prije mjerenja bioluminiscentnog signala (Thorne i sur., 2010). Aktivnost luciferaza koje se izlučuju je dovoljno velika da se one mogu mjeriti u malim volumenima karakterističnim za HTS (<10  $\mu\text{L}$ ), a proces mjerenja je jednostavan i ne zahtijeva posebnu opremu (Nakajima i Ohmiya, 2010). Međutim, CLuc se može koristiti samo u eukariotskim staničnim linijama, dok se GLuc može eksprimirati u aktivnom obliku i u *E. coli*.

Također, izlučive luciferaze mogu poslužiti za *ex vivo* praćenje tumorskog rasta jer će veličina bioluminiscentno označenog tumorskog tkiva korelirati s intenzitetom bioluminiscentnog signala luciferaze izlučene u krv miševa (Wurdinger i sur., 2008).

## 4.1.5 Umjetni bioluminiscencijski sustav ovisan o furimazinu

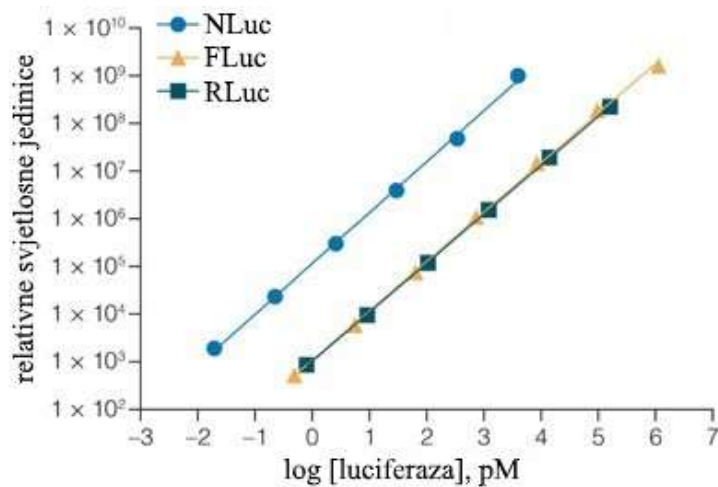
### 4.1.5.1 NanoLuc® luciferaza

NanoLuc® (NLuc) luciferaza je mali monomerni enzim (19,1 kDa, 171 aminokiselina) stvoren genetičkim inženjerstvom na temelju katalitičke podjedinice luciferaze iz dubokomorskog škampa *Oplophorus gracilirostris* (Hall i sur., 2012.). Ovaj rekombinantni enzim koristi novi sintetički luciferinski supstrat, furimazin, za dobivanje luminiscencije visokog intenziteta ( $\lambda_{\max} = 465$  nm) u reakciji neovisnoj o ATP-u. Furimazin je strukturno vrlo sličan koelenterazinu, ali sadrži furilni supstituent na drugoj poziciji imidopirazinonskog prstena (Slika 30.) (Kaskova i sur., 2016).



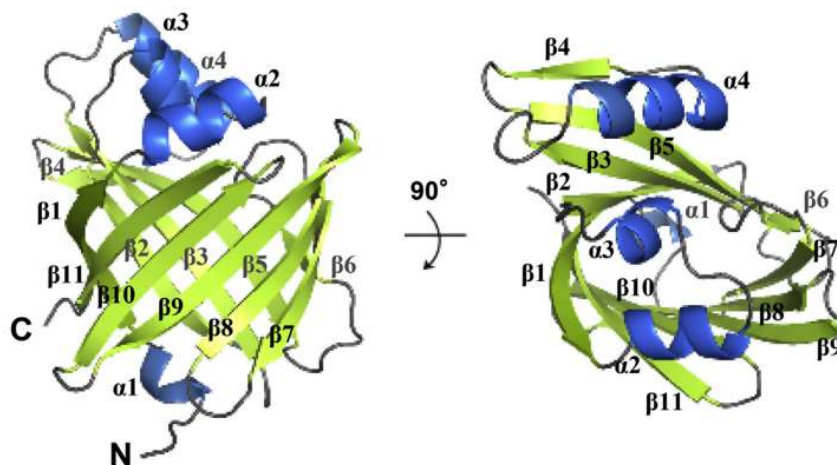
**Slika 30.** Reakcija oksidacije furimazina u furimamid katalizirana NanoLuc® luciferazom popraćena emisijom svjetlosti valne duljine 465 nm (preuzeto i prilagođeno iz Walker i sur., 2017).

$K_M$  reakcije oksidativne konverzije furimazina u furimamid je 10  $\mu\text{M}$ , a kinetika reakcije odgovara profilu svjetlucanja s gašenjem bioluminiscencije kroz 2 h (Hall i sur., 2012). Specifična aktivnost NLuc veća je oko 150 puta od aktivnosti FLuc i RLuc (Slika 31.), a smatra se da nije uzrokovana samo povećanim kvantnim prinosom bioluminiscencijske reakcije jer su kvantni prinosi FLuc i RLuc također dosta visoki (Ando i sur., 2008; Loening i sur., 2006), nego i većim katalitičkim obrtajem NLuc. NLuc je znatno otpornija na vanjske uvjete, ima veću termostabilnost i toleranciju na ionsku jakost i pH medija (Hall i sur., 2012). NLuc zadržava aktivnost dulje od 15 h na 37°C, a 30 min na 55°C (Dixon i sur., 2016) te je aktivna u rasponu pH od 5-9, s optimalnom pH vrijednošću za aktivnost od 7-9 (Hall i sur., 2012).



**Slika 31.** Usporedba intenziteta bioluminescentnog signala pročišćenih NLuc, FLuc i RLuc luciferaza. NLuc luciferaznom reakcijom proizvodi svjetlost otprilike 150 puta većeg intenziteta nego ekvivalentne koncentracije FLuc ili RLuc (preuzeto i prilagođeno iz Hall i sur., 2012).

Strukturno se NLuc sastoji od 4  $\alpha$ -uzvojnice i 11 antiparalelnih  $\beta$ -ploča koje formiraju strukturu  $\beta$ -bačve. U sredini molekule 3  $\alpha$ -uzvojnice ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ) i  $\beta$ -bačva omeđuju šupljinu u kojoj se nalazi aktivno mjesto enzima (Slika 32.) (Tomabechi i sur., 2016).



**Slika 32.** Prikaz sekundarne kristalne strukture NLuc u dijagramu vrpce. NLuc se sastoji od 4  $\alpha$ -uzvojnice i 11 antiparalelnih  $\beta$ -ploča koje formiraju strukturu  $\beta$ -bačve (lijevo), a rotacijom prikaza za 90° vidljiva je središnja šupljina u kojoj se nalazi aktivno mjesto enzima (desno) (preuzeto i prilagođeno iz Tomabechi i sur., 2016).

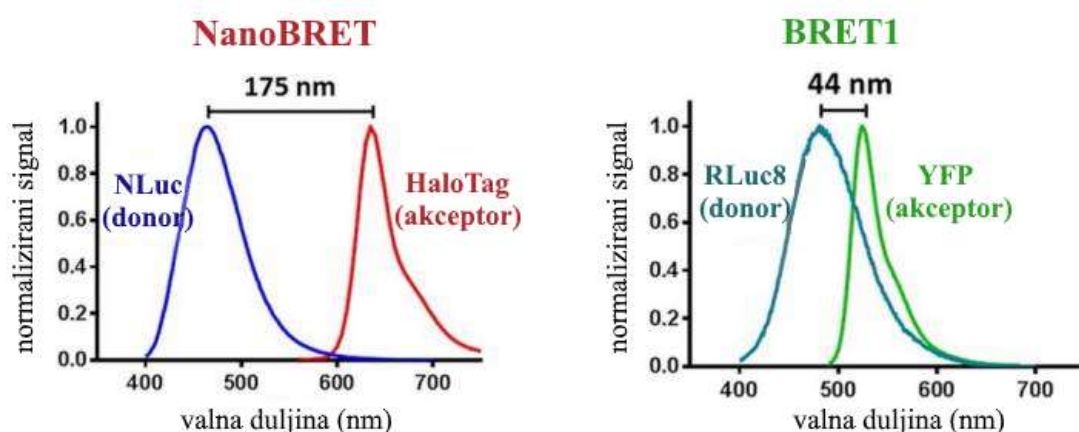
NLuc se može prilagoditi različitim zahtjevima ispitivanja, primjerice, spajanjem sa slijedom za razgradnju (NLuc-PEST) skraćuje se poluživot NLuc u stanici i postiže brži odgovor na

dinamiku transkripcije, a spajanjem sa slijedom za izlučivanje iz stanice (secNLuc) omogućuje se neinvazivno mjerenje bioluminiscencije kroz dulje vrijeme (Hall i sur., 2012).

NLuc je kodonski optimizirana za ekspresiju u eukariotskim stanicama, npr. za ekspresiju u stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* razvijeni su yNLuc s poluživotom od 40 min i yNLuc-PEST s dodatkom signala za razgradnju s poluživotom od 5 min (Masser i sur., 2016). Ne postoje dokazi da NLuc podliježe ikakvim posttranslacijskim modifikacijama ili stvaranju disulfidnih veza u stanicama sisavaca, a raspodjela unutar stanice je uniformna (Hall i sur., 2012).

NLuc osim furimazina može oksidirati i ostale spojeve slične koelenterazinu. Primjerice sintetiziran je analog koelenterazina s arilnom skupinom na C8 položaju imidopirazinonske jezgre koji uzrokuje emisiju svjetlosti pojačanog intenziteta s pomakom u crveno područje spektra. Nadalje, uvođenje arilne skupine na C6 dodatno pomiče spektar u crveno područje te je takav supstrat posebice prikladan za BRET (Shakhim i sur., 2017).

Zbog male veličine, visokog intenziteta bioluminiscencije i relativno uskog emisijskog spektra NLuc je prikladna za energetskog donora u BRET sustavima. Najčešća BRET kombinacija NLuc je ona s HaloTag crvenim fluorescentnim proteinom (635 nm) nazvana NanoBRET (Machleidt i sur., 2015). Spektralna udaljenost emisijskih maksimuma NLuc i HaloTag od 175 nm (Slika 33.) uzrokuje poboljšano spektralno razlučivanje i povećanu osjetljivost i dinamički raspon ispitivanja u usporedbi s ostalim BRET sustavima (England i sur., 2016).



**Slika 33.** Usporedba NanoBRET i BRET1 sustava. Spektralna udaljenost između emisijskih maksimuma donorske i akceptorske molekule puno je veća u NanoBRET nego u BRET1 sustavu (preuzeto i prilagođeno iz England i sur., 2016).



Za ispitivanja protein-protein interakcija razvijen je tzv. NanoBit sustav u kojem je NLuc podijeljena na polipeptidne fragmente od 1,3 kDa i 18 kDa. Dinamički odgovor na PPI procijenjen je ispitivanjem s protein kinazom A i  $\beta$ -arestinom 2 te se metoda s NanoBit sustavom pokazala brzom, reverzibilnom i robusnom na temperaturama od 21-37°C (Dixon i sur., 2017).

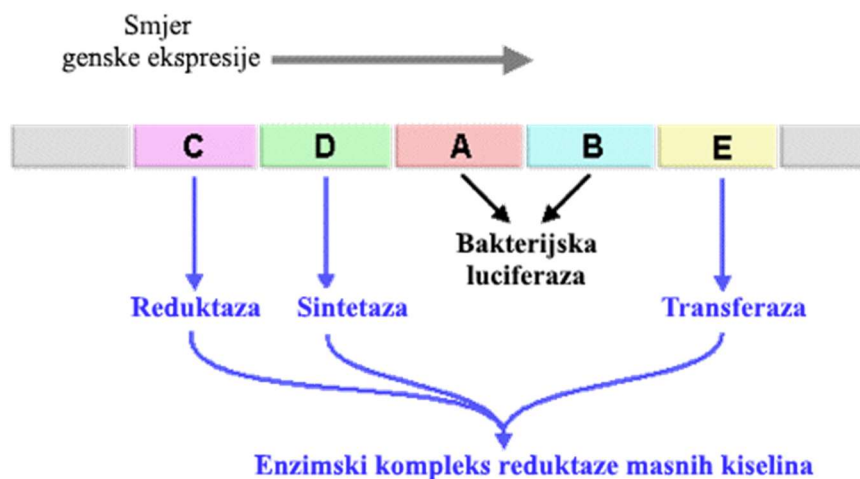
NLuc je prikladna i za HTS u malim volumenima zbog velikog intenziteta bioluminiscencije. Također, za HTS ima prednost pred FLuc i zbog manje osjetljivosti na inhibiciju kemijskim spojevima u knjižnicama što je vjerojatno posljedica male molekulske mase i neovisnosti luciferazne reakcije NLuc o ATP-u (Auld i sur., 2018). Pretraživanjem knjižnice 42 000 kemijskih spojeva na PubChem-u pronađeno je da 2% knjižnice inhibira aktivnost NLuc (Ho i sur., 2013) te je na temelju identificiranih inhibitora zaključeno da NLuc inhibiraju spojevi koji sadrže tienopirrol karboksilat u svojoj kemijskoj strukturi (Walker i sur., 2017).

U usporedbi s RLuc8 (520 nm) za praćenje vezanja liganda na GPCRs NLuc je pokazala veći intenzitet bioluminiscentnog signala i veću osjetljivost ispitivanja te je dokazano da ne uzrokuje promjene u signalizaciji i prometu receptora koje je RLuc8 ispoljila u nekim slučajevima (Stoddart i sur., 2015).

S druge strane, NLuc nema optimalna spektralna svojstva za BLI *in vivo*, svjetlost valne duljine 465 nm uvelike podliježe apsorpciji u tkivima. No NLuc se ipak uspješno koristi u praćenju virusnih infekcija i progresije bolesti, a u dvostrukom luciferaznom testu iskorištena je s GLuc za BLI karcinoma dojke (Stacer i sur., 2013). Za primjenu *in vivo* je NLuc puno prikladnija kao dio BRET sustava. Također, jedan od problema u primjeni NLuc je generička nedostupnost furimazina te njegova visoka cijena (Hall i sur., 2012).

#### 4.1.6 Bakterijski bioluminiscencijski sustavi

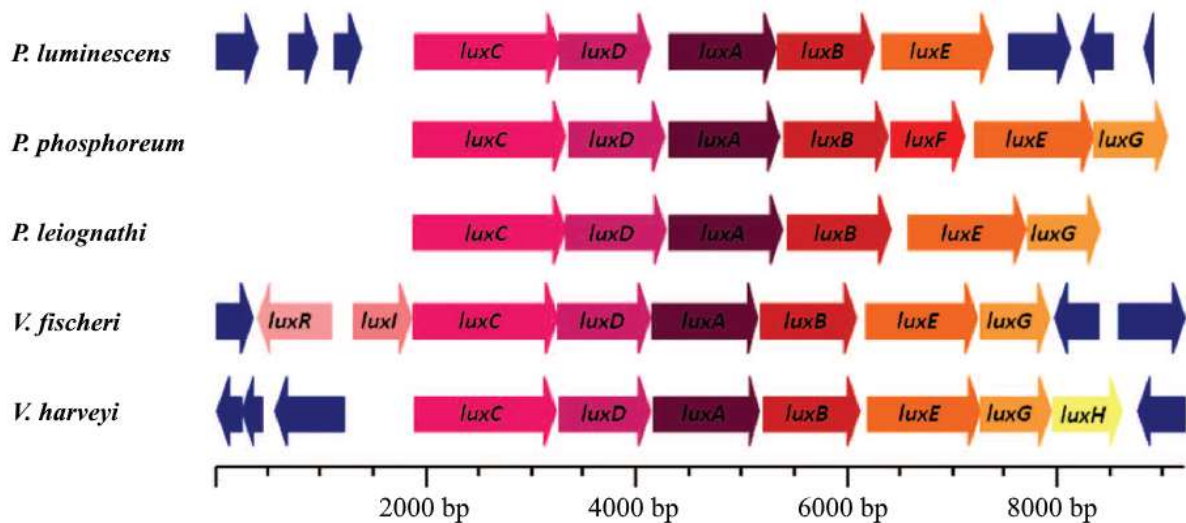
Bakterijske luciferaze su izolirane iz različitih vrsta bioluminiscentnih bakterija prije otprilike 30 godina (Frackman i sur., 1990; Engebrecht i sur., 1984; Belas i sur., 1982). Među brojnim bakterijskim bioluminiscencijskim sustavima najbolje su proučene luciferaze iz bakterija *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium leiognathi*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri* te *Photorhabdus (Xenorhabdus) luminescens*. Svi bakterijski bioluminiscencijski sustavi kodirani su *luxCDABE* operonom (Slika 34.) u kojem *luxAB* geni kodiraju za  $\alpha$ - i  $\beta$ -podjedinicu heterodimerne luciferaze, a *luxCDE* kodiraju za kompleks reduktaze masnih kiselina sastavljene od tri polipeptida s funkcijom reduktaze, sintetaze i transferaze (Slika 34.) (Dunlap, 2009). Kompleks reduktaze masnih kiselina katalizira reakciju sinteze dugolančanih masnih aldehida koji imaju ulogu bakterijskih luciferina (Meighen, 1991).



**Slika 34.** Ustrojstvo *luxCDABE* operona. Geni *luxA* i *luxB* kodiraju bakterijsku luciferazu, a *luxCDE* kodira kompleks reduktaze masnih kiselina sastavljene od reduktaze, sintetaze i transferaze (preuzeto i prilagođeno iz [www.photobiology.info](http://www.photobiology.info)).

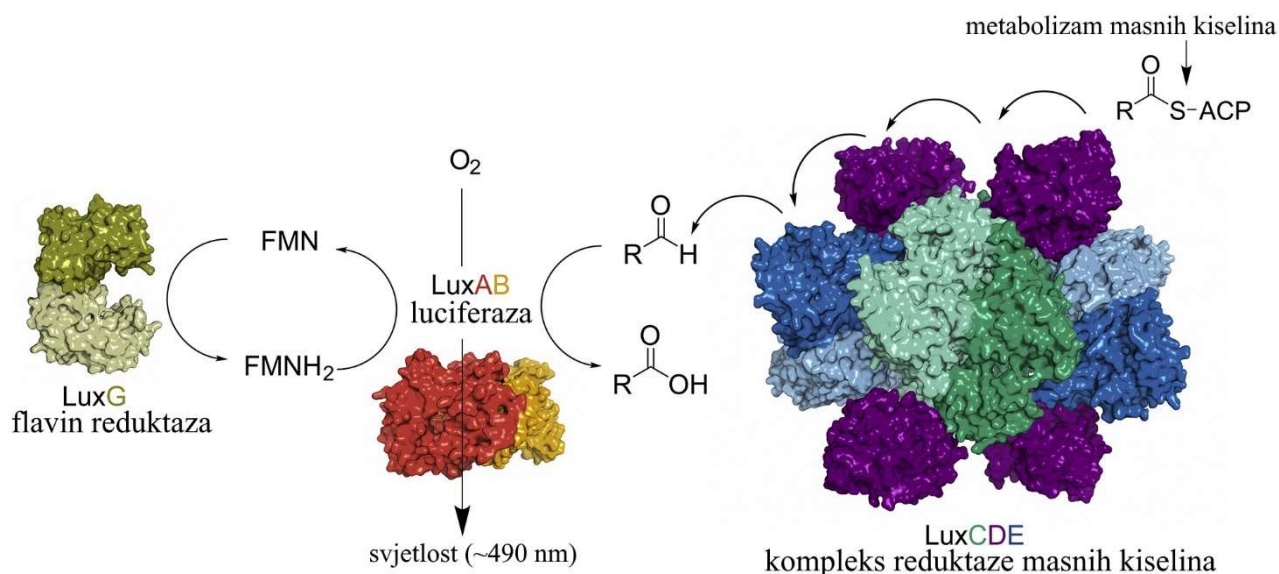
Sve morske vrste bioluminiscentnih bakterija posjeduju i *luxG* koji kodira flavin reduktazu koja katalizira nastanak reduciranog oblika flavin mononukleotida (FMNH<sub>2</sub>) potrebnog za luciferaznu reakciju (Nijvipakul i sur., 2008; Lee i sur., 1991; Swartzman i sur., 1990), a u *V. harveyi* nalazi se i *luxH* koji vjerojatno ima ulogu u biosintezi FMN riboflavina (Richter i sur., 1997; Meighen, 1993). Dodatno, *luxF* gen koji se u većini bakterija roda *Photobacterium* nalazi između *luxB* i *luxE* gena (Slika 35.), kodira flavoprotein homologan luciferazi bez očite uloge u bioluminiscenciji (Lee i sur., 1991; Soly i sur., 1988). U normalnim uvjetima pojedinačne bakterije ne luminisciraju nego je bioluminiscencija jedan od načina bakterijske

međustanične komunikacije (eng. quorum sensing, QS) koji je reguliran bakterijskom gustoćom (Miller i Bassler, 2001). Najbolje je opisan LuxI/LuxR tip QS mehanizma prisutan u Gram-negativnim bakterijama (Schaefer i sur., 1996). Primjerice, u *V. fischeri* gen *luxI* kodira N-acilhomoserin lakton (AHL)-sintazu koja proizvodi autoinducirajuće molekule N-(3-oksoheksanoil)-homoserin laktona (Eberhard i sur., 1981). *luxI* se nalazi uzvodno od *luxC* (Slika 35.) kao dio *lux* operona i konstitutivno je eksprimiran na niskoj razini. *luxR* je lociran uzvodno od *luxI* i prepisuje se u suprotnom smjeru te kodira transkripcijski aktivator eksprimiran također na niskoj razini u normalnim uvjetima (Frackman i sur., 1990). Pri većoj gustoći bakterija u kulturi proizvodi se veća količina autoinducirajućih molekula koje aktiviraju LuxR te on vezanjem na regulatorne elemente uzvodno od *lux* operona potiče transkripciju *lux* gena. *luxI* je dio *lux* operona pa mehanizmom pozitivne povratne sprege potiče vlastitu sintezu, sintezu luciferaze i emisiju svjetlosti (Engebrecht i sur., 1983; Eberhard i sur., 1981).



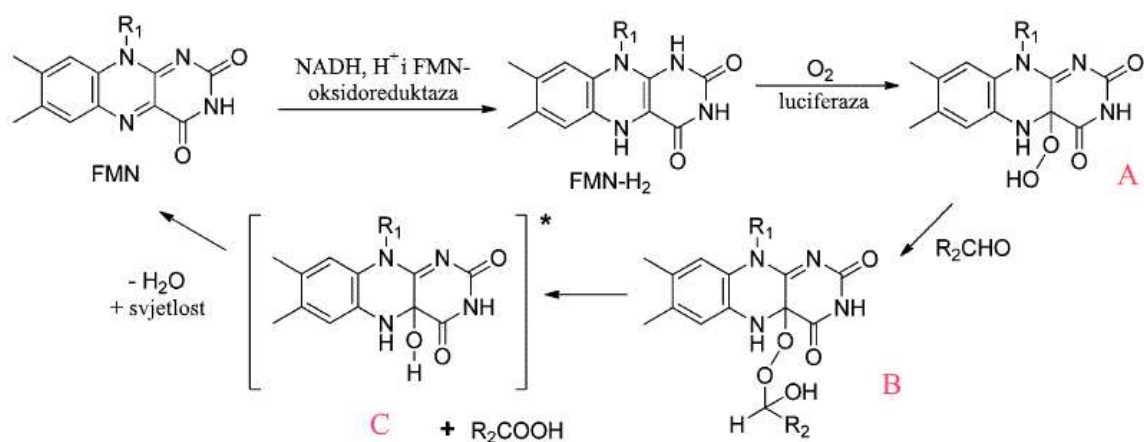
**Slika 35.** Primjeri *lux* operona prisutnih u različitim vrstama bioluminiscentnih bakterija (preuzeto iz Waidmann i sur., 2011).

Sve su bakterijske luciferaze (EC 1.14.14.3) heterodimeri koji se sastoje od katalitičke  $\alpha$ -podjedinice (40 kDa) i  $\beta$ -podjedinice (35 kDa) koja je važna održavanje aktivne konformacije katalitičke podjedinice.  $\alpha$ - i  $\beta$ -podjedinice su 32% identične primarnom strukturom što upućuje na to da je  $\beta$ -podjedinica posljedica duplikacije gena (Wilson i Hastings, 1998). Bakterijska luciferaza katalizira oksidaciju reduciranog flavin mononukleotida (FMNH<sub>2</sub>) i dugolančanog alifatskog aldehida u prisustvu molekuskog kisika (Slika 36.).



**Slika 36.** Prikaz reakcija uključenih u bakterijsku bioluminiscenciju. Središnju ulogu ima LuxAB luciferaza koja oksidira dugolančani masni aldehid u odgovarajuću masnu kiselinu u prisustvu FMNH<sub>2</sub> i kisika pri čemu se oslobađa svjetlost na 490 nm. Za reakciju potreban FMNH<sub>2</sub> nastaje redukcijom preko NAD(P)H-ovisne FMN reduktaze (LuxG), a masni aldehid je sintetiziran pomoću kompleksa reduktaze masnih kiselina (LuxCDE) (preuzeto i prilagođeno iz Brodl i sur., 2018).

Luciferaza veže jednu molekulu FMNH<sub>2</sub> čime ju zaštićuje od oksidacije, a zatim FMNH<sub>2</sub> reagira s O<sub>2</sub> i nastaje visoko stabilni peroksiflavin (spoj A) (Slika 37.). U drugom koraku ovaj kompleks stupa u interakciju s aldehidom kojom nastaje peroksihemiactal, a on pak podliježe Baeyer-Villigerovoj pregradnji dajući odgovarajuću kiselinu i spoj C u pobuđenom stanju. Povratak spoja C u osnovno elektronsko stanje popraćen je emisijom plavo-zelene svjetlosti na 490 nm valne duljine (Kaskova i sur., 2016).



**Slika 37.** Mehanizam luciferazne reakcije u bakterijama (preuzeto i prilagođeno iz Kaskova i sur., 2016).

Nakon emisije svjetlosti i eliminacije vode, FMN se obnavlja. Stoga se derivat FMN smatra stvarnim izvorom svjetlosti u bakterijskoj bioluminiscencijskoj reakciji, iako se tijekom reakcije oksidira dugolančani alifatski aldehid pa se on smatra bakterijskim luciferinom (Close i sur., 2010).

Budući da ne trebaju dodatak egzogenog supstrata, *lux* operoni su prikladni za ispitivanje genske regulacije u bakterijama, konstrukciju staničnih biosenzora, proučavanje patogeneze infekcija u malim životinjama i praćenje bakterija usmjernih na tumore. U literaturi su najzastupljenije studije koje koriste bakterijsku luciferazu iz *P. luminescens* koja zadržava stabilnost i aktivnost na temperaturama do 45°C (Szittner i Meighen, 1990). Prednost bakterijskih luciferaza je to što se bioluminiscentna svjetlost proizvodi na mjestu reporterskog enzima bez oslanjanja na bioraspodjelivost i kinetiku luciferina kao što je slučaj s ostalim bioluminiscencijskim reporterima (Close i sur., 2010).

Ipak, bakterijski bioluminiscencijski sustavi se ne preferiraju pred ostalim luciferazama zbog nekoliko nedostataka. Osim očitog porasta u veličini gena potrebnih za konstrukciju genske *lux* kazete, glavni nedostaci bakterijske luciferaze leže u tome što LuxA i LuxB podjedinice nekada mogu biti eksprimirane u različitim količinama što može uzrokovati netočne kvantitativne interpretacije bioluminiscentnih signala (Roda, ured., 2010), a produkti ostalih *lux* gena mogu ometati biokemijske procese u stanicama domaćina (Wood i sur., 1998). Također, bakterijska luciferaza ima nižu razinu genske ekspresije nego FLuc, niži intenzitet emitirane svjetlosti, a valna duljina emitirane svjetlosti od 490 nm nije prikladna za BLI. Opaženo je i to da je aldehidni supstrat u visokim koncentracijama toksičan za stanice sisavaca pa to otežava optimizaciju ispitivanja (Close i sur., 2010).

Jedna studija provedena na 5 bioluminiscentnih sojeva Gram negativnih bakterija koje su tretirane različitim koncentracijama 6 antibiotika ukazala je na još jedan aspekt primjene bakterijskih luciferaza koji ne treba zanemariti prilikom interpretacije rezultata (Wang i sur., 2018b). Naime, tretiranje bakterija koncentracijama antibiotika koje su ispod minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) dovodi do povećanja broja bakterija u kulturi te jačeg bioluminiscentnog signala.

Novija istraživanja pokazuju da je točna interpretacija podataka dobivenih korištenjem bakterijskog bioluminiscencijskog sustava otežana time što molekularna i enzimska dinamika *lux* sustava ne korelira linearno s genskom ekspresijom koja se proučava. Zbog toga su Iqbal i sur., razvili računalni program koji omogućuje korisnicima *lux* sustava točno zaključivanje o

razini genske ekspresije iz izmjerenih vrijednosti intenziteta svjetlosnog signala. Program se temelji na matematičkom modelu koji u obzir uzima aktivnost LuxAB, LuxEC i Fre s unaprijednim mehanizmima svih reakcija bakterijske bioluminiscencije, kao i sintezu i katalitički obrtaj Lux proteina (Iqbal i sur., 2017).

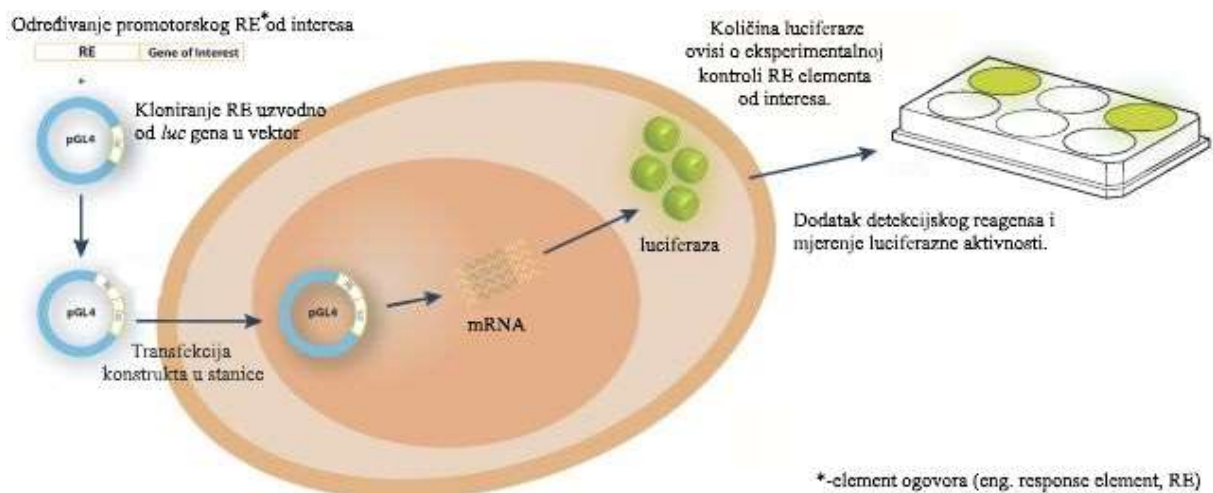
Iako su na bakterijskim luciferazama provedene brojne mutacije za pomak emisijskog spektra u crveno područje, mijenjanje kinetike gašenja bioluminiscencije i poboljšanja sposobnosti ekspresije u eukariotskim stanicama (Tinikul i Chaiyen, 2014) bakterijska luciferaza još nije dosegla razinu na kojoj bi značajkama konkurirala ostalim bioluminiscencijskim reporterima. Nedavne studije, poput one u kojoj je stvoren poboljšani *ilux* operon sa sedam puta intenzivnijom emisijom svjetlosti kad se eksprimira u *E. coli* (Gregor i sur., 2018), uz prethodna saznanja da se *lux* operon može uspješno ekspimirati u stanicama sisavaca bez potrebe za dodatkom egzogenog supstrata (Xu i sur., 2014) dokazuju veliki potencijal primjene bakterijskih luciferaza koji još nije potpuno iskorišten.

## 4.2 Luciferazna reakcija u laboratorijskim uvjetima

Prvi korak u izvođenju luciferaznog testa je dodatak pufera s detergentom za lizu stanica u uzorak stanica koje su transficirane luciferaznim reporterskim plazmidom. Potom se stanični ostaci uklone mikrocentrifugiranjem te se u ispitivani uzorak dodaje luciferinski supstrat. Time započinje luciferazna reakcija koja proizvodi svjetlost. Intenzitet svjetlosti, odnosno aktivnost luciferaze mjeri se pomoću luminometra. Neki luminometri direktno injektiraju reagens u lizat stanica. Takva automatizacija omogućuje mjerenje signala u precizno vrijeme odmah nakon injekcije supstrata što povećava dosljednost rezultata. Za ručne (manualne) luminometre, otopina supstrata pomiješa se ručno sa staničnim lizatom i bioluminiscencija se očitava u definirano vrijeme nakon miješanja reakcijske smjese.

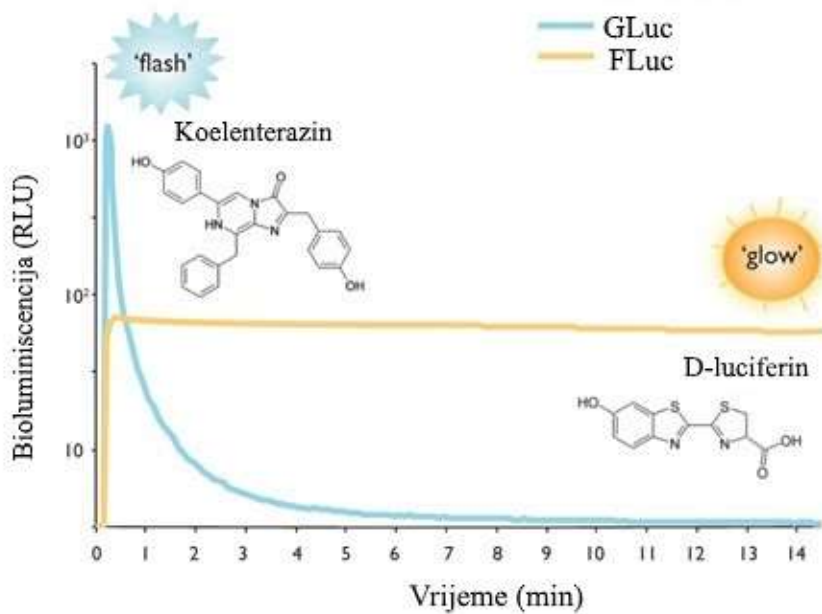
Osim luminometrom, detekcija svjetlosnog signala iz luciferazne reakcije može se provoditi i pomoću scintilatorskog brojača (Nguyen i sur., 1988; de Wet i sur., 1987) ili fotografskog filma, ali je takvo mjerenje manje kvantitativno (Wood i DeLuca, 1987).

Detekcija luciferaze može se provoditi *in vitro* (nakon ekstrakcije luciferaze iz stanica koje ju ekspimiraju) ili *in vivo* (Slika 38.). Nedostatak *in vitro* testova luciferazne aktivnosti je taj što je uzorak uništen u procesu (kao što je slučaj s većinom reporterskih genskih sustava).



Slika 38. Primjer jednostrukog luciferaznog testa u kojem se koristi pGL4 vektor s genom luciferaze krijesnice (*luc*) (preuzeto i prilagođeno iz [www.worldwide.promega.com](http://www.worldwide.promega.com))

Prema kinetici emisije svjetlosti razlikujemo luciferaze s kinetikom bljeska (eng. flash kinetics) i luciferaze s kinetikom svjetlucanja (eng. glow kinetics) (Slika 39.) (Matta i sur., 2018). Prilikom odabira luciferaznog testa, obično je potrebno postići kompromis između intenziteta luminiscencije i njezinog trajanja, budući da se reakcije velikog intenziteta vrlo brzo i gase.



**Slika 39.** Prikaz kinetičkih profila *Gaussia* luciferaze s kinetikom bljeska („flash“) i luciferaze krijesnice s kinetikom svjetlucanja („glow“) (preuzeto i prilagođeno iz [www.invivogen.com](http://www.invivogen.com)).

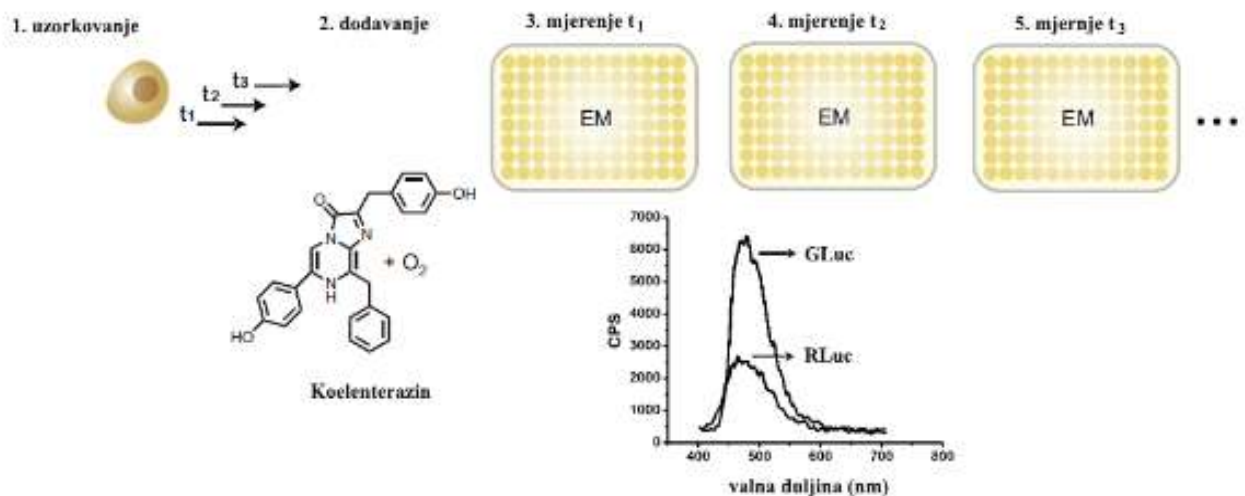
Primjerice, korištenje luciferaze krijesnice ili *Renilla* luciferaze koja daje maksimalnu luminiscenciju rezultira većom osjetljivošću analize (Matta i sur., 2018), ali analiza s duljim poluživotom signala i stabilnijeg luminiscentnog signala prikladnija je za ispitivanja na mikrotitarskim pločicama. Žrtvovanje intenziteta luminiscencije za poluživot signala slabije je izraženo kod NanoLuc® luciferaze (England i sur., 2016).

Bioluminiscencija se tijekom reakcije polako gasi uslijed odvijanja popratnih reakcija u kojima nastaju inhibitori luciferaze, primjerice adenilat-oksiluciferin u reakciji FLuc (Kaskova i sur., 2016). Nastali inhibitori uzrokuju nepovratnu inaktivaciju enzima. Za održavanje konstantne luminiscencije luciferaze tijekom duljeg vremenskog perioda, u rasponu od minuta do sati, često je potrebno inhibirati luciferaznu reakciju u različitim stupnjevima. Ova inhibicija može smanjiti brzinu propadanja luminiscencije do točke gdje je smanjenje signala beznačajno tijekom vremena potrebnog za mjerenje višestrukih uzoraka (Fraga i sur., 2006).



Na tržištu su dostupni komercijalni testni kompleti različitih proizvođača koji sadrže pufere za lizu stanica, testni supstrat i reakcijski pufer. Ovi su kompleti posebno pogodni jer nisu skupi i uključuju odgovarajuće modifikacije koje polučuju jače signale (mjerenja) te pojačavaju enzimski obrtaj luciferaza ([www.thermofischer.com](http://www.thermofischer.com); [www.worldwide.promega.com](http://www.worldwide.promega.com); [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

Liza stanica kao jedan od koraka u protokolu luciferaznog testa može se izbjeći korištenjem luciferaza koje se prirodno izlučuju iz stanice, npr. *Gaussia* luciferaze (GLuc) (Slika 40.) (Thorne i sur., 2010).

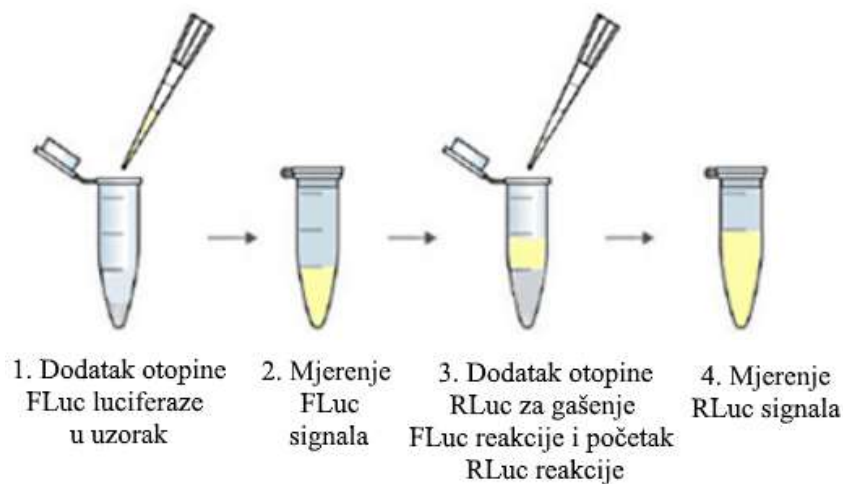


**Slika 40.** Sekretijski luciferazni test koji koristi GLuc luciferazu koja se izlučuje iz stanica. Supernatant stanične kulture koji sadrži izlučenu GLuc uklanja se u različito vrijeme (1) i nakon miješanja s koelenterazinskim supstratom (2), ukupna luminiscencija za svaku vremensku točku se mjeri pomoću prozirnog filtra (3, 4, 5 ...). Prikazan je i emisijski spektar za GLuc u odnosu na RLuc. Maksimalna emisija GLuc valne duljine slična je RLucu, ali GLuc pokazuje intenzivniju bioluminiscenciju (preuzeto i prilagođeno iz Thorne i sur., 2010).

### 4.2.1 Jednostruki i dvostruki luciferazni testovi

Većina bioluminiscencijskih testova uključuje korištenje jednog ili dvaju reporterskih gena. Testovi temeljeni na jednom reporterskom genu pružaju najbrži i najjeftiniji način za stjecanje podataka o genskoj ekspresiji iz stanica. Međutim, zbog složene građe stanica, informacije prikupljene korištenjem jednog reporterskog gena mogu biti nedovoljne za dobivanje detaljnih i točnih rezultata. U nekim eksperimentalnim uvjetima, promjene bioluminiscencije mogu biti uzrokovane drugim čimbenicima osim kontrole transkripcije koja se proučava (Schagat i sur., 2007). Na primjer, pri ekspresiji prolaznog reporterskog vektora mogu se pojaviti eksperimentalne razlike zbog varijabilnosti u učinkovitosti transfekcije između različitih bunarića. Drugi problem nastaje kada sam eksperimentalni tretman smanjuje vijabilnost stanica, što rezultira ne-transkripcijskom redukcijom signala luciferaze. Dakle, jedno od prvih razmatranja prilikom odabira reporterske metodologije odnosi se na procjenu hoće li informacije koje se mogu dobiti od jednog reportera biti dostatne ili je potrebno prikupljanje dodatnih informacija pomoću drugog reportera.

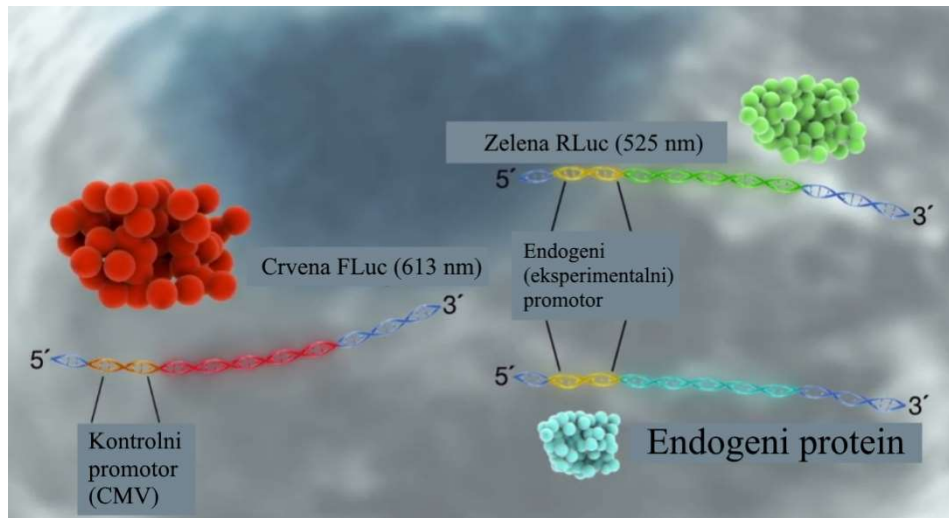
Dvostruki reporterski sustavi podrazumijevaju simultanu ekspresiju i mjerenje dvaju pojedinačnih reporterskih enzima unutar jednog sustava (Slika 41.).



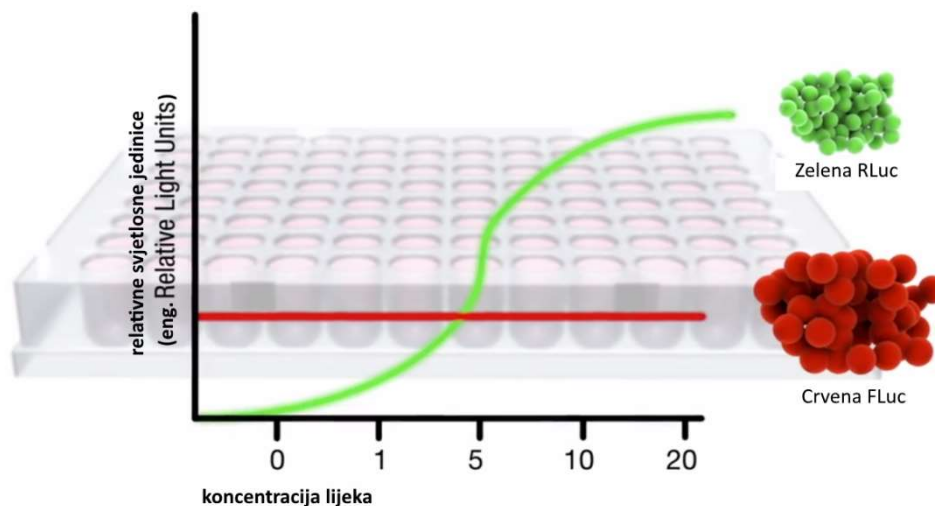
**Slika 41.** Koraci u izvođenju dvostrukog luciferaznog testa koji koristi luciferazu krijesnice kao eksperimentalni reporter i *Renilla* luciferazu kao normalizacijski reporter (preuzeto i prilagođeno iz [www.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com)).

Ekspresija eksperimentalnogreportera korelira s djelovanjem specifičnih eksperimentalnih uvjeta, dok aktivnost kotransficiranog kontrolnog reportera predstavlja unutarnju kontrolu. Vektor s kontrolnim genom reporterom kotransfeciran je s eksperimentalnim

vektorom, a njegovu ekspresiju pokreće konstitutivni promotor, npr. citomegalovirusni (CMV) promotor (Slika 42., Slika 43.) (Branchini i sur., 2017).



**Slika 42.** Primjer konstrukcije gena reportera za izvođenje dvostrukog luciferaznog testa u kojemu je zelena RLuc luciferaza eksperimentalni reporter, a crvena FLuc kontrolni reporter (preuzeto i prilagođeno iz [www.worldwide.promege.com](http://www.worldwide.promege.com)).



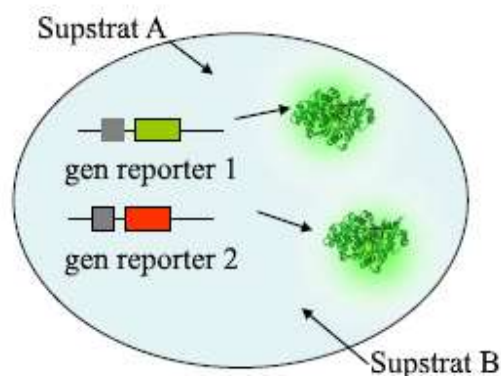
**Slika 43.** Ekspresija kontrolnog reportera (crvena FLuc) je konstantna jer je on pod kontrolom konstitutivnog promotora, a ekspresija eksperimentalnog reportera (zelena RLuc) ovisi o specifičnim eksperimentalnim uvjetima (preuzeto i prilagođeno iz [www.worldwide.promege.com](http://www.worldwide.promege.com)).

Najčešće se drugi reporterski gen ekspirira putem kontrolnog vektora radi normalizacije rezultata eksperimentalnog reporterskog gena te služi otklanjanju varijacija u broju stanica ili učinkovitosti transfekcije između uzoraka. Također, na ovaj način mogu se ukloniti i drugi

izvori varijabilnosti, kao što su razlike u volumenima pipetiranja, učinkovitosti stanične lize i sl. (Schagat i sur., 2007).

Dakle, dvostruki luciferazni testovi omogućuju pouzdanije tumačenje eksperimentalnih rezultata. Još neke od prednosti korištenja dvostrukog reporterskog sustava su ušteda mikrotitarskih pločica, vremena i novca.

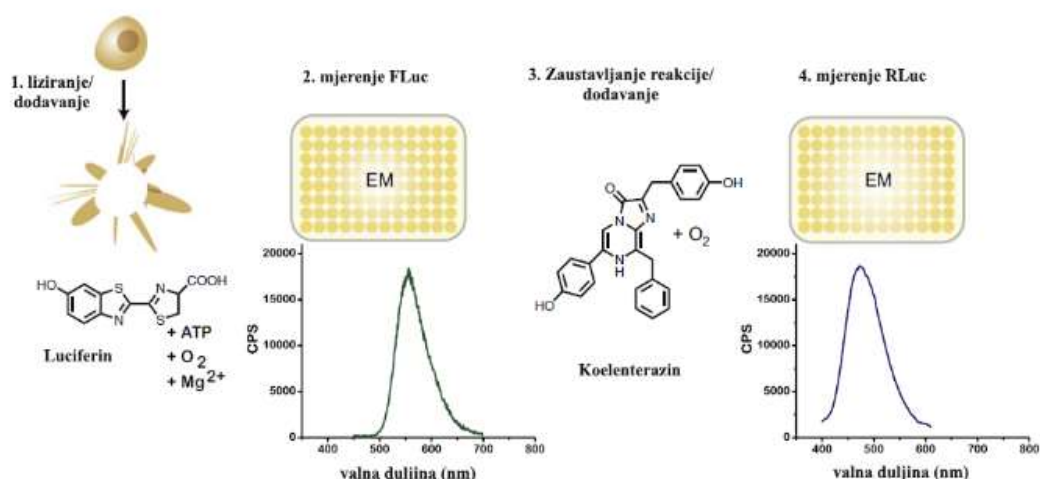
Dvostruki luciferazni testovi zahtijevaju učinkovitu separaciju svjetlosnih signala eksperimentalnog i kontrolnog luciferaznog reportera. To je moguće provesti na nekoliko načina. Prva strategija je supstratna diskriminacija ili sekvencijalno očitavanje rezultata (eng. substrate discrimination, sequential reading) (Slika 44.). Ona podrazumijeva korištenje dviju luciferaza koje koriste različite supstrate. Kod ovog tipa testa detekcija svjetlosnog signala pojedine luciferaze provodi se u različitom vremenu tijekom ispitivanja dodatkom prikladnog supstrata u reakcijski medij (Heise i sur., 2013).



**Slika 44.** Dvostruki luciferazni test koji koristi supstratnu diskriminaciju odnosno sekvencijalno očitavanje za razdvajanje svjetlosnih signala dviju različitih luciferaza (preuzeto i prilagođeno iz Michelini i sur., 2014).

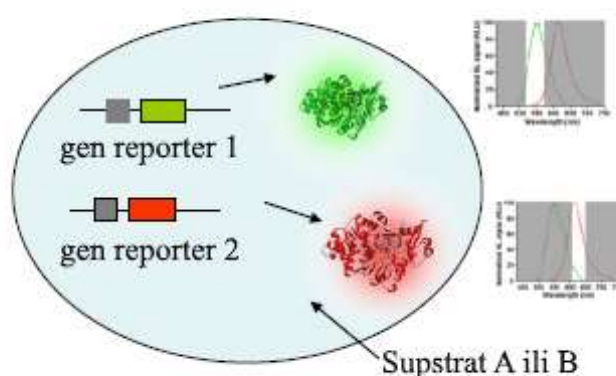
Primjerice, luciferaza krijesnice i *Renilla* luciferaza su različite strukture zbog različitog evolucijskog podrijetla, i imaju afinitete za različite supstrate pa upravo te razlike omogućuju selektivno razlikovanje njihovih bioluminiscentnih signala u istom reakcijskom mediju bez dijeljenja lizata (Slika 45.) (Heise i sur., 2013). Na isti je način moguće kombinirati i ostale luciferaze koje ne iskorištavaju jednake supstrate za svoje reakcije.

### A FLuc/RLuc Dvostruki luciferazni test

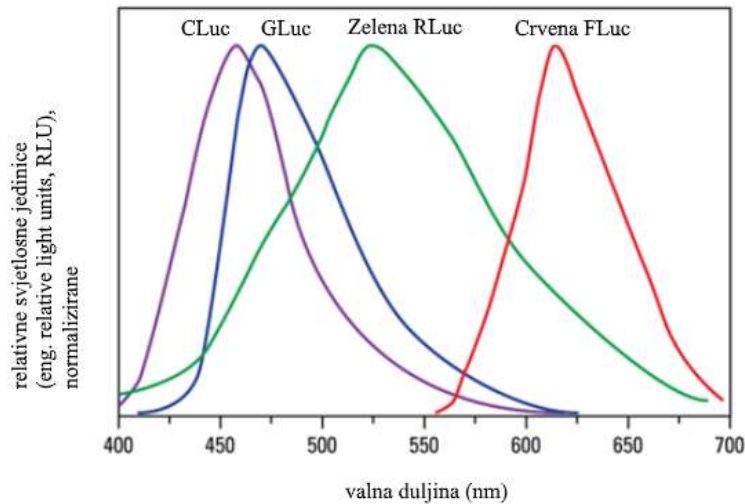


**Slika 45.** Postupak u izvođenju dvostrukog luciferaznog testa s FLuc i RLuc. Stanice su lizirane reagensom za detekciju koji sadrži supstrate luciferaze (1), izmjeren je bioluminiscentni signal FLuc (2), zatim je zaustavljena FLuc reakcija zajedno s dodavanjem supstrata koelenterazina za RLuc (3) te je izmjerena bioluminiscencija RLuc (4). U ovom slučaju, ukupna bioluminiscencija se mjeri uporabom prozirnog filtra. Prikazani su i emisijski spektri FLuc i RLuc (CPS, counts per second, broj fotona po sekundi izmjeren na luminometru) (preuzeto i prilagođeno iz Thorne i sur., 2010).

Druga strategija (spektralna separacija) (Slika 46.) podrazumijeva korištenje luciferaza koje koriste jednaki luciferiski supstrat za svoje reakcije, ali ne emitiraju svjetlost na istim valnim duljinama (Slika 47.) pa se detekcija signala može provoditi jednostrukim dodavanjem reagensa uz korištenje odgovarajućih optičkih filtara (Cevenini i sur., 2013).

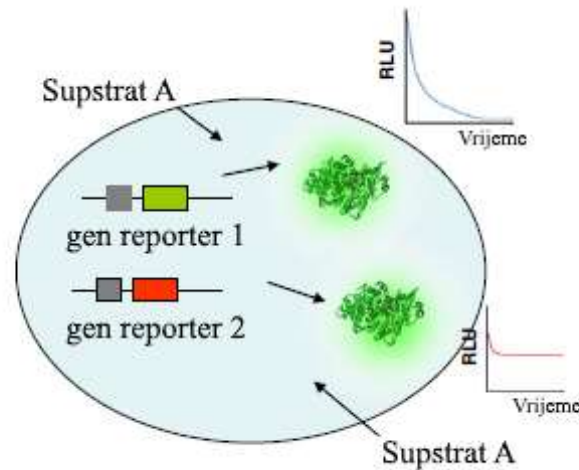


**Slika 46.** Dvostruki luciferazni test koji koristi spektralnu separaciju za razdvajanje svjetlosnih signala dviju različitih luciferaza (preuzeto i prilagođeno iz Michelini i sur., 2014).



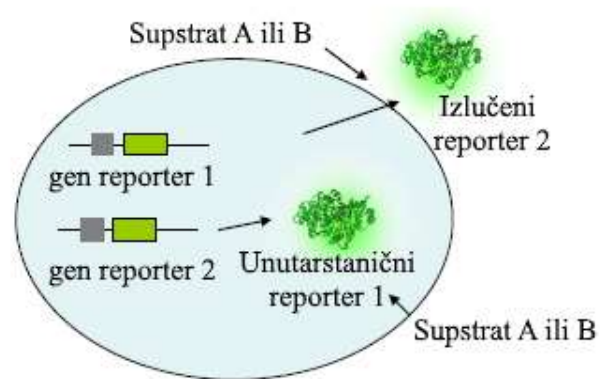
**Slika 47.** Spektralna rezolucija između različitih luciferaza. Emisijski maksimum FLuc pomaknut prema crvenom području spektra omogućuje kombiniranje FLuc s ostalim luciferazama (preuzeto i prilagođeno iz [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

Treća strategija je tzv. vremenska separacija (Slika 48.). Ona podrazumijeva korištenje luciferaza koje pokazuju različite kinetike emisije svjetlosti pa se njihovi svjetlosni signali mogu očitavati u različitom vremenu tijekom ispitivanja (Michelini i sur., 2014).



**Slika 48.** Dvostruki luciferazni test koji koristi vremensku separaciju za razdvajanje svjetlosnih signala dviju luciferaza s različitim kinetikama emisije svjetlosti (preuzeto i prilagođeno iz Michelini i sur., 2014).

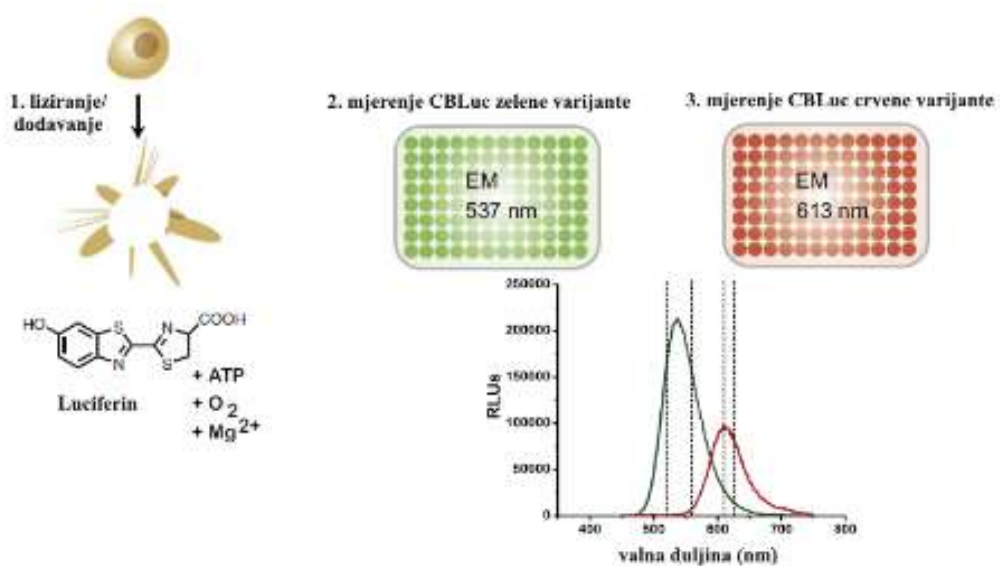
Posljednja strategija razdvajanja signala dvaju luciferaznih reportera u dvostrukom luciferaznom testu je prostorna separacija (eng. spatial separation) (Slika 49.). Ona je omogućena kad se korištene luciferaze eksprimiraju u različitim staničnim odjeljcima ili se kombinira upotreba luciferaze koja se izlučuje s onom koja ostaje unutar stanice.



**Slika 49.** Dvostruki luciferazni test koji koristi prostornu separaciju za razdvajanje svjetlosnih signala luciferaze koja se izlučuje i one koja ostaje unutar stanice (preuzeto i prilagođeno iz Michelini i sur., 2014).

## 4.2.2 Dvobojni dvostruki luciferazni testovi

Moguće je dizajnirati i dvobojne reporterske testove u kojima se također koriste dva luciferazna reportera, ali oba kao eksperimentalni reporteri (Branchini i sur., 2018). Takva dvostruka reporterska ispitivanja mogu biti osobito korisna za učinkovito dobivanje više informacija u jednom eksperimentu, primjerice pomoću CBGLuc i CBRLuc se može provesti ispitivanje dva različita stanična događaja dodatkom samo jednog supstrata koji iskorištavaju obje luciferaze i mjerenjem zelene i crvene bioluminiscencije korištenjem luminometra s odgovarajućim filtrima (Slika 50.) (Thorne i sur., 2010).



**Slika 50.** Prikazan je protokol dvobojnog dvostrukog luciferaznog testa s luciferazama klišnjaka (CBLuc) u kojem se liza stanica i detekcija provode uz jednostruko dodavanje reagensa (1), a zelena i crvena bioluminiscencija se zatim mjere sekvencijalno na čitaču mikrotitarske pločice (2) koristeći odgovarajuće optičke filtre. Zabilježeni su emisijski maksimumi luciferaza, a prikazani su i emisijski spektri luminiscencije za zelenu i crvenu CBLuc. Točkaste linije na emisijskom spektru predstavljaju valne duljine koje propuštaju korišteni optički filtri (preuzeto i prilagođeno iz Thorne i sur., 2010).



### 4.2.3 Višestruki luciferazni testovi

U luciferaznom ispitivanju moguće je koristiti odjednom i više od dvije luciferaze kako bi se omogućilo istodobno praćenje više bioloških procesa. Primjerice, razvijen je trostruki luciferazni test koji uključuje luciferaze iz tri različite vrste: zelenu luciferazu iz divljeg tipa *Photinus pyralis*, sekrecijsku luciferazu iz *Gaussia princeps* te novu termostabilnu crvenu varijantu luciferaze iz vrste *Luciola italica* (Michelini i sur., 2008). Kombiniranjem luciferaza koje se izlučuju i onih koje se ne izlučuju iz stanica, a koriste i različite supstrate onemogućene su međusobne interferencije između različitih svjetlosnih signala. Ovakav je oblik ispitivanja prvotno namijenjen za HTS jer može dovesti do smanjenja vremena potrebnog za pretraživanje knjižnica biološki aktivnih spojeva, povećati protok pretraživanja i omogućiti bolji omjer cijene i učinkovitosti ispitivanja. No, prijavljeni su i višestruki luciferazni testovi za biološko oslikavanje *in vivo*, primjerice, sustav koji se sastoji tri para luciferaza i njima pripadajućih supstrata za luciferaznu reakciju. Luciferaze iz vrsta *Photinus pyralis*, *Gaussia princeps* i *Vargula hilgendorffii* s pripadajućim D-luciferinom, koelenterazinom i vargulinom, iskorištene su za istodobno praćenje tri različita biološka događaja u ortotopičnom modelu tumora mozga (Maguire i sur., 2013). Međutim, korištenje višestrukih supstrata u *in vivo* ispitivanjima neizbježno dovodi do manje točnih rezultata zbog razlika u bioraspoloživosti različitih supstrata i njihovom unosu u ispitivane organizme. Također, višestruko injektiranje supstrata može biti stresno za životinju i dovesti do potencijalnih operativnih pogrešaka (Xu i sur., 2016). Ovi nedostaci mogu se ublažiti korištenjem luciferaza koje za svoje reakcije iskorištavaju isti supstrat, ali emitiraju svjetlost različitih boja.

### 4.3 Primjena bioluminiscencijskih ispitivanja u razvoju lijekova

Iako su do sada razvijene brojne reporterske tehnologije za upotrebu u laboratoriju, bioluminiscencijski testovi su u istraživanjima posljednjih godina pokazali neusporedivu osjetljivost, dinamički raspon, svestranost te jednostavnost korištenja. Zbog visokog kvantnog prinosa bioluminiscencijskih reakcija i relativne netoksičnosti luciferina, dosad je razvijen širok repertoar analitičkih *in vitro* i *in vivo* metoda temeljenih na bioluminiscenciji, koji se neprestano širi zahvaljujući napretku u kemiji i molekularnoj biologiji i razvoju novih uređaja za spektrofotometriju i molekularno oslikavanje. Primjena bioluminiscencijskih analitičkih metoda uključuje ispitivanja na različite analite, imunoanalize, ispitivanja genske ekspresije, probir lijekova, molekularno oslikavanje živih organizama, studije karcinoma, istraživanja zaraznih bolesti i ekološke studije, ali cilj ovog rada je naglasiti mogućnosti primjene bioluminiscencijskih sustava u razvoju lijekova.

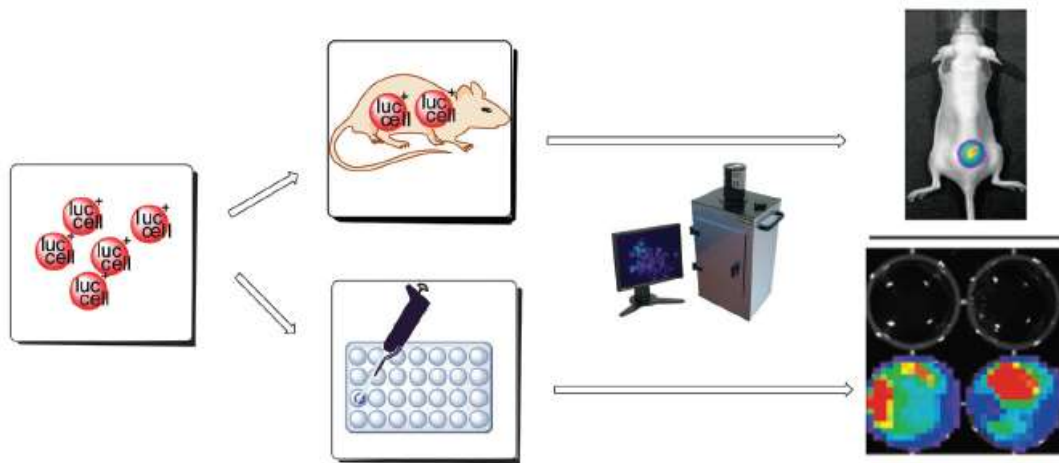
Razvoj novih lijekova dugotrajan je proces koji zahtijeva godine pretkliničkih ispitivanja i mnogobrojne nezaobilazne korake koji će osigurati sigurnost primjene molekule od interesa kod ljudi s minimalnim rizikom toksičnog djelovanja. Zbog toga i najmanja redukcija u inicijalnim fazama razvoja lijekova rezultira značajnim uštedama vremena pa je farmaceutska industrija sklona primjeni novih *in vitro* i *in vivo* metoda koje zahtijevaju kraće vrijeme za ispitivanja farmakokinetike, farmakodinamike i toksikoloških profila potencijalnih lijekova kandidata.

Glavni načini na koje bioluminiscencija može olakšati razvoj lijekova su implementacija bioluminiscencijske tehnologije u visokoprotočna pretraživanja (eng. high-throughput screening, HTS) i biološko oslikavanje (eng. bioluminescence imaging, BLI) (Slika 51.).

HTS podrazumijeva nekoliko koraka: odabir i karakterizaciju mete, razvoj metode ispitivanja, preparaciju reagensa, pretraživanje baze spojeva i validaciju spoja koji je pokazao najbolja svojstva (eng. hit compound) u sekundarnim ispitivanjima. Ovaj proces obično traje 2-3 godine u većini poduzeća za razvoj lijekova (Paul i sur., 2010). Integraciju bioluminiscencijskih sustava u HTS omogućila je činjenica da su za bioluminiscenciju potrebne niske koncentracije reagensa (luciferina i luciferaze).

Nadalje, u pretkliničkom *in vitro* i *in vivo* ispitivanju lijekova, neinvazivno bioluminiscentno oslikavanje postalo je bitna alternativa drugim tehnologijama biološkog oslikavanja, a

bioluminiscentne transgenične životinje prikladni modeli za pretklinička ispitivanja i patofiziološke studije (Stell i sur., 2007).



**Slika 51.** Prikaz *in vitro* (dolje) i *in vivo* (gore) bioluminiscentnog oslikavanja. Stanice koje su unošenjem luciferaznog gena učinjene bioluminiscentnim mogu se koristiti za ispitivanja na mikrotitarskim pločicama s ili se mogu injektirati u animalne modele. Bioluminiscentni signal se detektira pomoću posebne namjenske opreme, a rezultati se prikazuju kao slike u skalama pseudo-boja te se mogu računalno spojiti sa slikama životinja za preciznu lokaciju signala (preuzeto i prilagođeno iz Li i sur., 2012).

Bioluminiscencijska tehnologija olakšava primjenu načela „zamjene, redukcije i usavršavanja“ odnosno „tri Rs“ (eng. replacement, reduction, refinement) Russella i Burcha (Tannenbaum i Bennett, 2015). "Zamjena" (eng. replacement) se odnosi na preferiranu upotrebu metoda za koje nisu potrebne životinje kad god je moguće takvim metodama postići isti znanstveni cilj. "Redukcija" (eng. reduction) se odnosi na metode koje omogućuju istraživačima da dobiju usporedive razine informacija od manjeg broja životinja, ili da dobiju više informacija od istog broja životinja, ako se primjena životinja u istraživanjima ne može izbjeći. "Usavršavanje" (eng. refinement) se odnosi na metode koje ublažavaju ili umanjuju potencijalne bolove, patnje ili nevolje i poboljšavaju dobrobit životinja u istraživanjima. Ovo načelo snažno potiče Europska unija u ranom procesu otkrivanja lijekova, u skladu s etičkim i odgovornim istraživanjima kako bi se smanjili troškovi i poboljšala pouzdanost i predvidljivost rezultata (Michelini i sur., 2014).

### 4.3.1 Kvantitativna visokoprotočna pretraživanja

Mikrotitarska pločica 96 jažica, izvorno dizajnirana da olakša serološke studije u virologiji (Sever, 1962), kasnije je prepoznata kao prikladna zamjena za testove na bazi kiveta, epruveta i laboratorijskog posuđa. U kombinaciji sa spektrofotometrijskim čitačima pločica, mikrotitarska pločica je brzo postala standard za izvođenje paralelnih analiza za brzu preliminarnu procjenu biološke aktivnosti spojeva. Tijekom 1990-ih, ogroman porast u broju spojeva u kemijskim knjižnicama i razvoj metoda s osjetljivošću prikladnom za ispitivanja u malim volumenima dodatno je potaknuo koncept paralelne obrade koji se danas prakticira u formatima ploča s 96, 384 ili 1536 bunarića. "Visoka protočnost" je relativan pojam, ali se općenito definira kao testiranje od 10 000 do 100 000 spojeva dnevno, postignuto mehanizacijom koja se kreće od ručno upravljanih radnih stanica do potpuno automatiziranih robotskih sustava (Martins Lima i sur., 2018; Veloria i sur., 2017).

HTS je preferirani format za identifikaciju novih i potentnih farmakoloških spojeva. Povijesno gledano, testovi pretraživanja usmjereni su na ograničen broj meta od kojih mnogi uključuju pročišćene proteine. Približno dvije trećine terapijskih meta čine enzimi i receptori (Zheng i sur., 2006). No u zadnje vrijeme HTS laboratoriji sve više skreću pažnju na visoko-sadržajno pretraživanje (eng. high content screening, HCS) koje ispituje biološke događaje na substancijskoj razini (Inglese, ured., 2006; Taylor, ured., 2006) u intaktnim živim stanicama umjesto lizatima staničnih kultura kao uzorcima.

Zbog jednostavnosti, omjera cijene i učinkovitosti, lakog rukovanja, visoke osjetljivosti i velikog dinamičkog opsega bioluminiscencijske su metode metode od izbora za primjenu u HTS-u (Kelkar i De, 2012). Uvođenjem supstrata u žive stanice (Levi i sur., 2007; Pflieger i sur., 2006) i upotrebom luciferaza s visokim kvantnim prinosom (Loening i sur., 2006) može se pratiti bioluminiscentni signal iz tek nekoliko stanica kao i njihova kinetika u stvarnom vremenu što čini bioluminiscencijske metode idealnim za pretraživanje velikih baza biološki aktivnih spojeva (Badr i sur., 2011; Feng i sur., 2009).

Biološko oslikavanje živih stanica omogućio je razvoj mikroskopa sposobnog za mjerenje ograničenog broja fotona iz pojedine stanice ili čak unutarstaničnih odjeljaka (Welsh i sur., 2004). Nekoliko je studija zadnjih godina potvrdilo da se mikroskopska procjena bioluminiscentnog signala kao i BRET signala može primijeniti i na pojedinačne stanice (Dimiri i sur., 2016; Goyet i sur., 2016; Kubota i sur., 2017; Enomoto i sur., 2018).

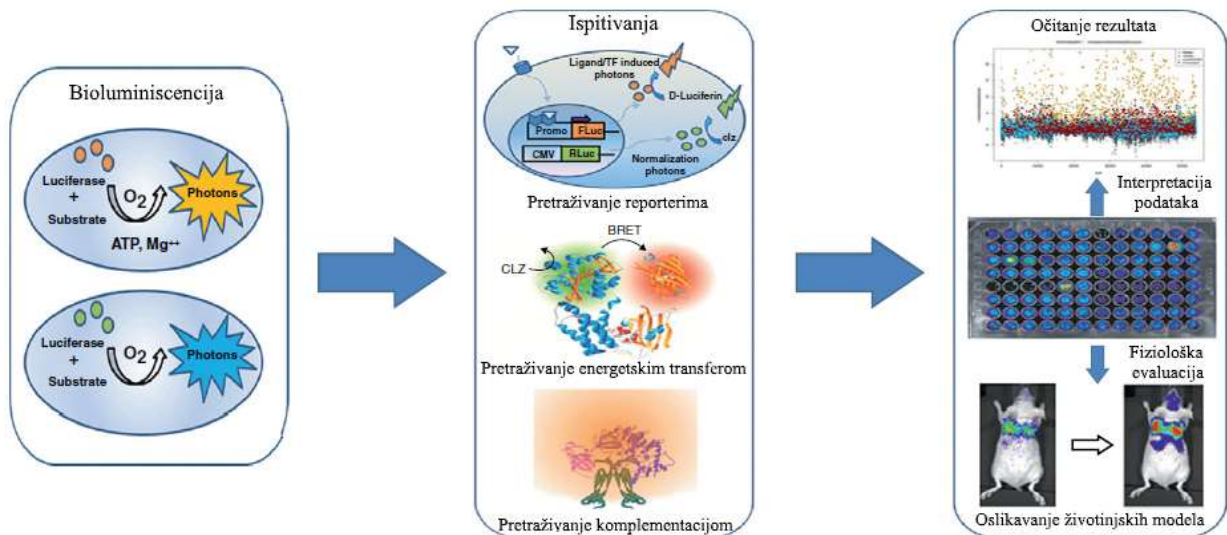
Analize bioluminiscencije na bazi stanica, zbog svojih posebnih prednosti predvidljivosti, mogućnosti automatizacije, multipleksiranja i minijaturizacije, čine se najprivlačnijim alatom za visoke zahtjeve ranih faza probira lijekova (Michelini i sur., 2014). Široko se primjenjuju tehnologije genskih reportera te ispitivanja protein-protein interakcija (Sun i sur., 2016), a pomoću njih se mogu provesti studije otkrivanja terapijskih meta i mehanizma djelovanja lijekova, primjerice, vezanja novih agonista/antagonista za humane receptore eksprimirane u različitim staničnim linijama. Osim toga, bioluminiscencija se može koristiti za *in vitro* i *in vivo* praćenje patofizioloških procesa unutar živih stanica i malih životinjau stvarnom vremenu što olakšava dijagnostiku i praćenje progresije i regresije bolesti u odgovoru na farmakološku terapiju.

Pomoću HTS-a moguće je ispitivati i farmakokinetička svojstva lijekova, tzv. ADMET (apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija i toksičnost) *in vitro* ili *in vivo* ispitivanjem na životinjama (Michelini i sur., 2010).

Ono što ograničava bioluminiscencijski HTS je činjenica da određeni spojevi mogu inhibirati luciferazu ili čak paradoksalno pojačati bioluminiscentni signal dajući tako lažne rezultate, što treba uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata (Thorne i sur., 2007). Za primjer, već je dulje vrijeme dobro poznata i opisana inhibicija FLuc luciferaze resveratrolom (Bakhtiarova i sur., 2006), a u pretraživanju knjižnice spojeva u potrazi za inhibitorima FLuc otkriveno je da između 2 i 3% knjižnice može ometati njezinu detekciju (Thorne i sur., 2010). Također, neki od lijekova, poput bortezomiba i iksazomiba zaštićuju FLuc od proteolitičke degradacije i produljuju joj vrijeme poluživota što dovodi do lažno pozitivnih rezultata (Becker i sur., 2016). Kao inhibitori luciferaze već su okarakterizirani benzotiazoli, benzimidazoli, benzoksazoli koji su strukturno slični D-luciferinu (Thorne i sur., 2012) te kalkoni, odnosno aromatski ketoni i enoni, koji su osnovice struktura mnogih lijekova (Zhang i sur., 2017a), ali razvijeni su i različiti sustavi pomoću kojih je moguće predvidjeti koji će spojevi u knjižnici potencijalno mijenjati aktivnost FLuc (Ghosh i sur., 2018; Chen i sur., 2017).

Ipak, važno je napomenuti da se artefakti povezani s luciferazama mogu razumjeti u odnosu na enzimologiju reportera, što čini njihovu aktivnost relativno predvidljivom. Nasuprot tome, artefakti povezani s drugim oblicima ispitivanja, kao što je fluorescencija, mogu biti manje predvidljivi (Simeonov i sur., 2008). Zbog toga vrijedi ovom problemu doskočiti daljnjim istraživanjima i razvojem luciferaza s poboljšanom otpornošću na inhibiciju malim molekulama.

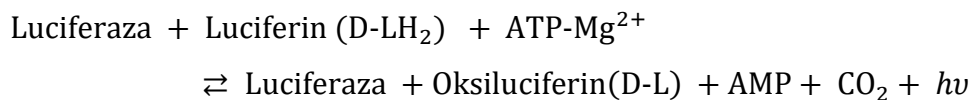
Glavni smjerovi istraživanja za koje se bioluminiscencijski HTS prilagođava su pretraživanja modulatora genske ekspresije i pretraživanja modulatora protein-protein interakcija (PPI) (Slika 52.) (Kelkar i De, 2012). Najjednostavniji pak oblik primjene je ispitivanje vijabilnosti stanica detekcijom i određivanjem koncentracije ATP-a, posebice primjenjiv u ispitivanju tumorskih stanica i praćenju infekcija, odnosno razvoju citostatskih i antimikrobnih lijekova.



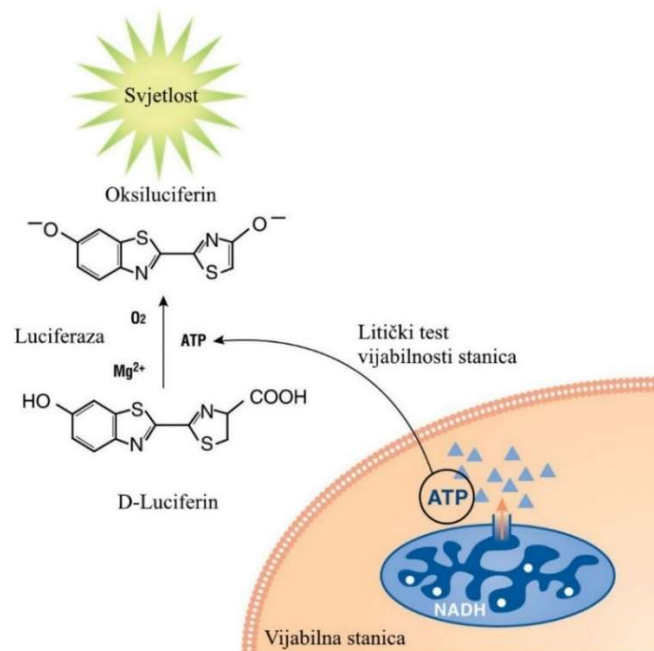
**Slika 52.** Shematski prikaz primjene bioluminiscencijskih procesa u metodama pretraživanja. Različiti oblici pretraživačkih ispitivanja mogu se razviti na temelju raznih bioluminiscencijskih procesa kao što su prijenos energije ili komplementacija proteina. Rezultati se mogu očitati mjerenjem povećanja ili smanjenja intenziteta svjetlosnog signala koje se može kvalitativno i kvantitativno odrediti i/ili vizualno predočiti. Naglašena su ona ispitivanja koja se mogu koristiti u mjerenjima *in vivo* dinamike u odgovoru na modulare u stanicama ili životinjskim/biljnim modelima (preuzeto i prilagođeno iz Kelkar i De, 2012).

#### 4.3.1.1 Ispitivanje vijabilnosti stanica određivanjem koncentracije ATP-a u uzorku

Najpopularniji analit koji se može detektirati pomoću luciferaze svakako je ATP zahvaljujući ranom otkriću da je intenzitet svjetlosti koju proizvede luciferazna reakcija proporcionalan koncentraciji ATP-a u analiziranom uzorku (McElroy i sur., 1967) te presudnom značaju ovog spoja za žive stanice. Na temelju jednadžbe:



moгу se napraviti jednostavni sustavi sastavljeni od luciferaze, luciferina (D-LH<sub>2</sub>) i uzorka koji je potrebno kvantificirati (Slika 53.).

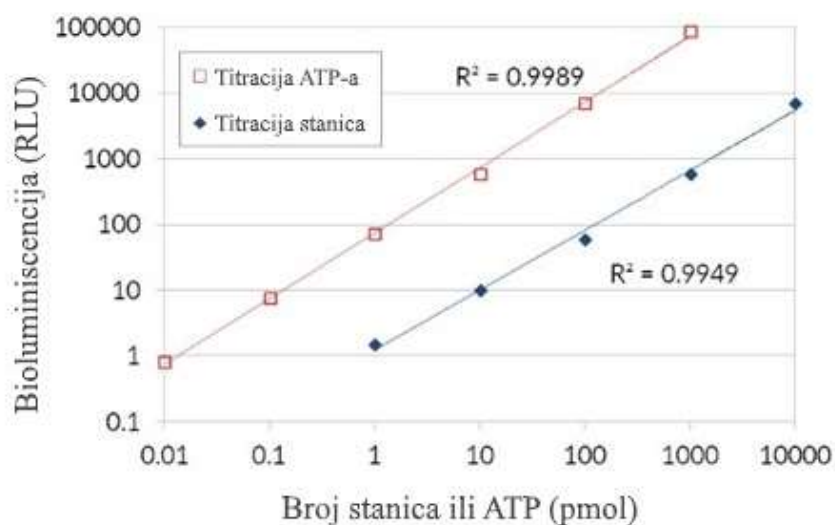


**Slika 53.** Ispitivanje vijabilnosti stanica određivanjem koncentracije ATP-a nakon lize stanica uz pomoć luciferaze. Svjetlosni signal iz luciferazne reakcije proporcionalan je koncentraciji ATP-a dostupnog u uzorku ispitivane stanične kulture, a koncentracija ATP-a korelira s brojem živih stanica u ispitivanoj staničnoj kulturi (preuzeto i prilagođeno iz [www.worldwide.promega.com](http://www.worldwide.promega.com)).

Molekula ATP-a univerzalni je energetska nosač unutar stanica te je potreban različitim enzimima za obavljanje katalitičke aktivnosti i sl. Zbog toga se unutarstanična koncentracija ATP-a uvijek održava na visokoj razini, dakle, analizom njegove koncentracije moguća je procjena metaboličkog potencijala stanice. Ako je stanica zdrava i funkcionalna, održava normalnu razinu ATP-a, međutim, kada stanica umre, razine ATP-a brzo opadaju.

Određivanje unutarstanične koncentracije ATP-a omogućuje procjenu učinka različitih agensa na staničnu proliferaciju, odnosno, ispitivanje citotoksičnosti (Guardigli i sur., 2010).

Luciferazni testni setovi za ispitivanje vijabilnosti stanica određivanjem koncentracije ATP-a u staničnim kulturama komercijalno su dostupni od različitih distributera kao što su Biotium ([www.biotium.com](http://www.biotium.com)), Merck Millipore ([www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com)), Sigma Aldrich ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)), Promega ([www.worldwide.promega.com](http://www.worldwide.promega.com)) i dr. Postupak osjetljivog ispitivanja pomoću ovih testnih kompleta uključuje jednostruko dodavanje smjese reagensa za određivanje koncentracije ATP-a izravno u stanice uzgojene u mediju koji je dopunjen serumom. Nije potrebno ispiranje stanica, uklanjanje medija i višestruko pipetiranje, a testni komplet se može koristiti za otkrivanje samo jedne stanice ili 0,01 pikomola ATP-a. Proizvedeni signal je linearan unutar 6 redova veličine (Slika 54.). Povezivanjem količine ATP-a s brojem živih stanica, test ima široku primjenu, od određivanja broja živih stanica do ispitivanja proliferacije stanica ili citotoksičnosti.



**Slika 54.** Grafički prikaz ovisnosti intenziteta bioluminescentnog signala o koncentraciji ATP-a, odnosno vijabilnosti stanica. A) Deseterostruka razrjeđenja ATP-a pripravljena su u 100  $\mu$ L PBS-a po uzorku (označeno crvenom bojom). B) Deseterostruka razrjeđenja Jurkat stanica pripravljena su u 100  $\mu$ L RPMI medija po uzorku (označeno plavom bojom). Neposredno prije mjerenja luminiscencije, u svaki uzorak je dodano 100  $\mu$ l smjese reagensa za određivanje koncentracije ATP-a. Luminiscencija je mjerena tijekom 10 sekundi uporabom Turner Designs luminometra (preuzeto i prilagođeno iz [www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com)).

Za razliku od normalnih stanica, tumorske stanice većinu ATP-a dobivaju procesom glikolize, a ne oksidativnom fosforilacijom (Warburg, 1925). Stoga je u sklopu proučavanja metabolizma tumorskih stanica potrebno posebno proučiti doprinos glikolize u sintezi ATP-a jer nam to može ukazati i na nove potencijalne mete djelovanja antitumorskih lijekova. Dosad



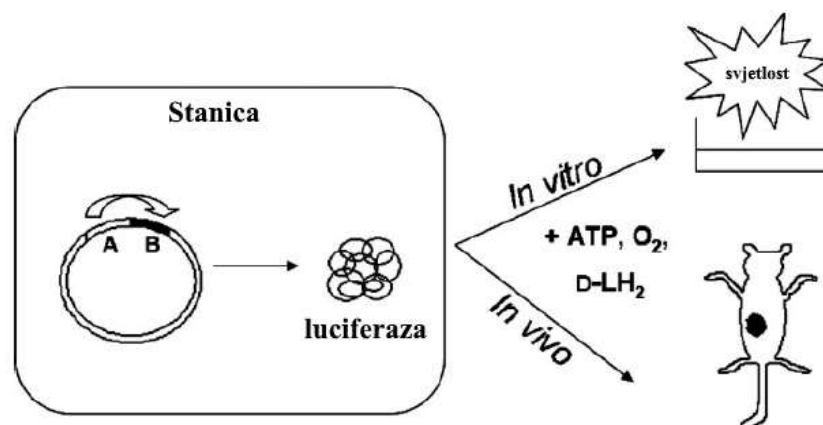
su objavljeni brojni radovi o metodama određivanja koncentracije ATP-a u tumorima pomoću luciferaze krijesnice (Patergnani i sur., 2014).

Osim na ATP, mnogo je pažnje usmjereno i na ostale biološki važne metabolite koji sudjeluju u reakciji kataliziranoj luciferazom, posebice na koenzim A (eng. coenzyme A, CoA) (Marques i Esteves da Silva, 2008), pirofosfat (Sun i sur., 2007; Nyren i Lundin, 1985) te adenzin-monofosfat (eng. adenosine monophosphate, AMP) (Jansson i Jansson, 2003; Tanaka i sur., 2001).

#### 4.3.1.2 Visokoprotlačno pretraživanje modulatora genske ekspresije

Reporterski geni se primarno koriste za proučavanje staničnih događaja povezanih s ekspresijom gena. Da bi se izveo reporterski test (Slika 55.), regulatorna regija gena od interesa klonira se uzvodno od luciferaznog gena u određeni ekspresijski vektor. Taj se rekombinantni ekspresijski vektor uvodi u stanice te se one inkubiraju određeno vrijeme u određenim uvjetima. Nakon toga slijedi skupljanje stanica i opcionalno liziranje da bi otpustile sve proteine (uključujući luciferazu). Na kraju se u uzorak stanica iz kulture ili stanični lizat dodaje luciferin i ostali kofaktori potrebni za luciferaznu reakciju i mjeri se enzimska aktivnost luciferaze korištenjem luminometra. Na taj se način luciferazna aktivnost izravno može povezati s aktivnošću gena od interesa (Roda i sur., 2004).

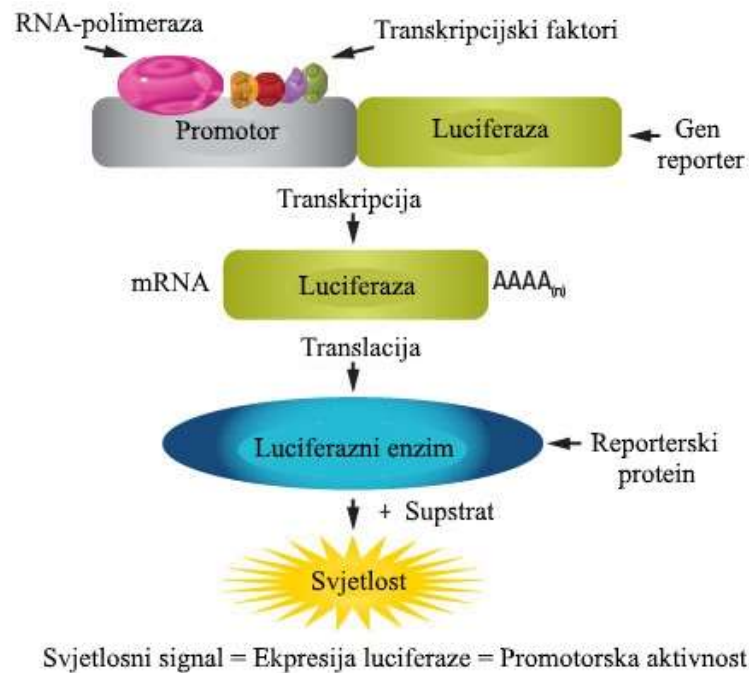
Luciferazni reporterski geni uspješno su primijenjeni u različitim vrstama organizama, primjerice virusima (Sponken i sur., 2015), bakterijama (Gregor i sur., 2018), gljivicama (Vande-Velde i sur., 2018), kvascima (Zhang i sur., 2016), biljkama (Muranaka i sur., 2013) i životinjama (Iwano i sur., 2018).



**Slika 55.** Shematski prikaz tehnologije luciferaznih reporterskih gena. Ekspresijski vektor je uveden u stanicu. Vektor sadrži regulatorni slijed (A) pod čijom je kontrolom ekspresija *luc* gena (B). Kad se postigne ekspresija *luc* gena, količina nastalog proteina (luciferaze) može se pratiti pomoću mjerenja intenziteta svjetlosti *in vitro* (u staničnim ekstraktima) ili *in vivo*, podvrgavanjem životinje CCD kameri za detekciju fotona. Dobivena slika svjetlosnih točaka može se zatim umjetno stopiti s prethodno dobivenom fotografijom životinje. U oba slučaja ATP i luciferin (D-LH<sub>2</sub>) moraju biti egzogeno primijenjeni neposredno prije prikupljanja podataka (preuzeto i prilagođeno iz Roda i sur., 2004).

Luciferazni reporterski geni nailaze na svoju primjenu u ispitivanju strukture promotora i promotorske aktivnosti (Slika 56.) te funkcionalnoj analizi promotorskih polimorfizama jednog nukleotida (eng. single nucleotide polymorphism, SNP). Promotorski SNP-ovi mogu imati veliki biološki značaj, primjerice polimorfizmi citokina su povezani s ishodom bolesti,

uključujući i odgovor na tretman interferonom u liječenju infekcije virusom hepatitisa C (Huang i sur., 2007). Također, na ovaj je način moguća identifikacija i procjena učinkovitosti lijekova koji djeluju na gensku ekspresiju.

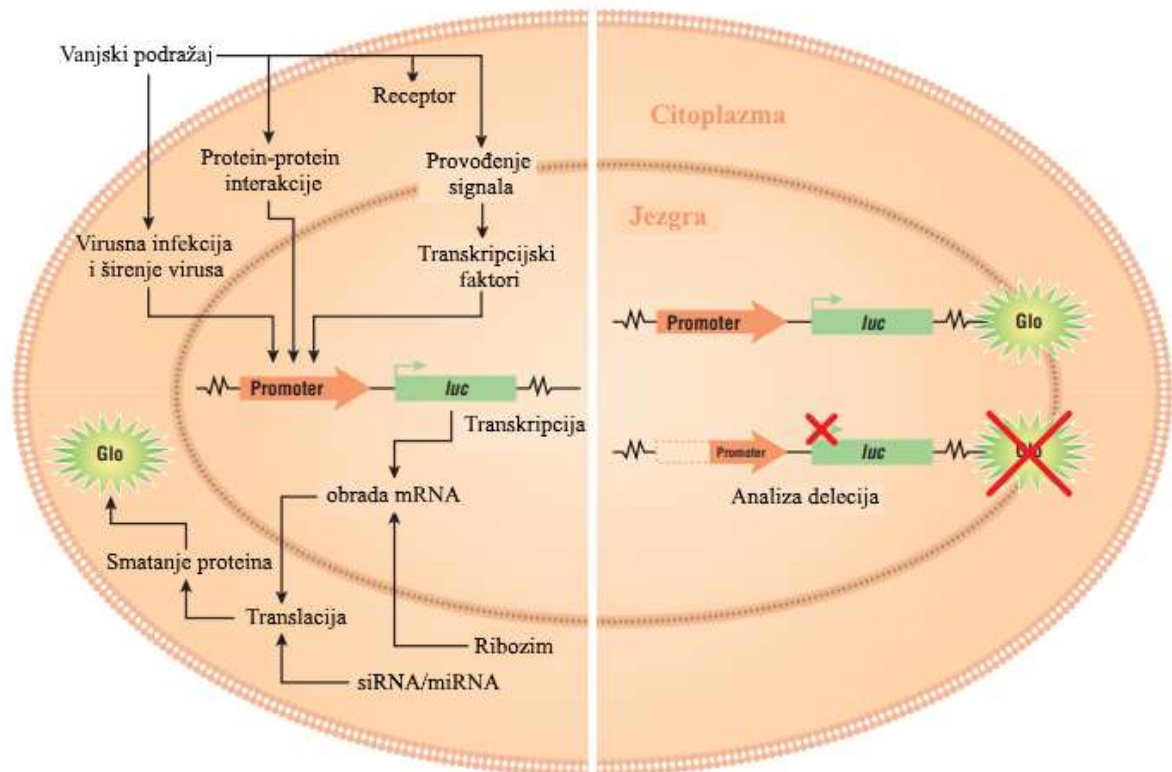


**Slika 56.** Anliza promotorske aktivnosti pomoću luciferaznog gena reportera. Aktivnost određenog promotora može se odrediti mjerenjem svjetlosnog signala koji je ovisan o ekspresiji luciferaze jer je luciferazni gen pod kontrolom promotora čija se aktivnost ispituje (preuzeto i prilagođeno s [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

Također, pomoću gena reportera moguće je ispitivati i signalne puteve u stanicama. Primjerice, među najvažnijim metama lijekova su receptori povezani s G-proteinima (eng. G-protein coupled receptors, GPCR). Procijenjeno je da je više od 50% lijekova usmjereno upravo na GPCR-ove (Klabunde i Hessler, 2002). Vezanje liganda na GPCR potiče signalnu kaskadu koja završava aktivacijom transkripcije gena što omogućuje povezivanje bioluminiscencije s receptorskom aktivnošću.

Nadalje, luciferazni geni reporteri iskorišteni su i za studije RNA-interferencija (eng. RNA interference, RNAi). RNAi je mehanizam koji inhibira gensku ekspresiju prije nego se ciljna mRNA prevede u protein. Dvije povezane vrste molekula RNA koje moduliraju RNAi procese su kratke nekodirajuće molekule microRNA (miRNA) i mala interferirajuća RNA (eng. Small interfering RNA, siRNA) (Lin i sur., 2008).

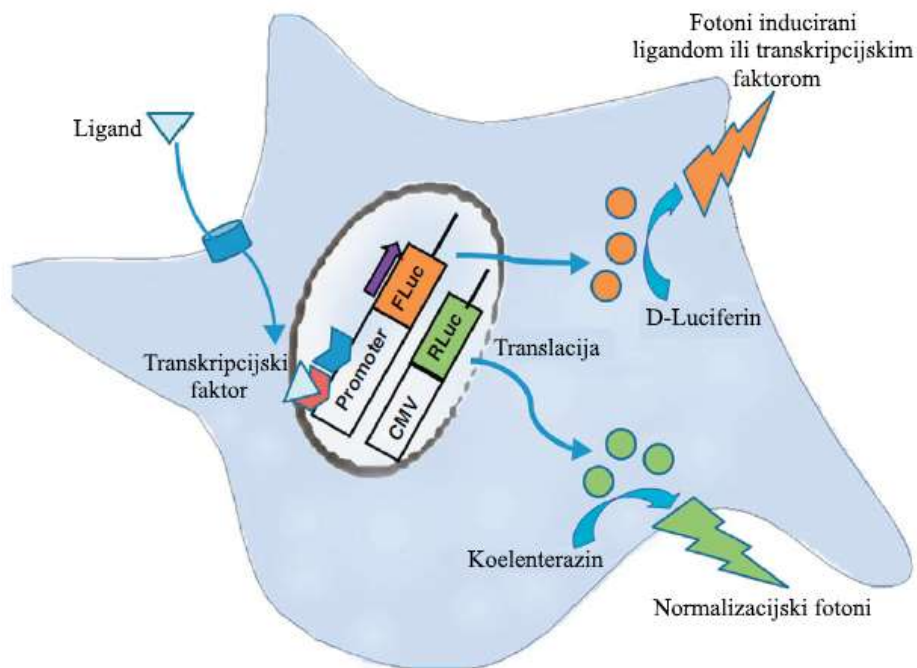
Bilo koji biološki događaj koji utječe na aktivnost transkripcijskog faktora ili razinu ekspresije gena može se pratiti genskim reporterskim testom (Slika 57.).



**Slika 57.** Primjene bioluminiscencijskih gena reportera uključuju proučavanje strukture i aktivnosti promotora, analizu transkripcijskih faktora, proučavanje vezanja i aktivacije membranskih receptora, aktivacije jezgrinih receptora, protein-protein interakcija, RNAi i sl. (preuzeto i prilagođeno iz Allard i Kopish, 2008).

HTS se može prilagoditi za identifikaciju modulatora genske ekspresije tako da se u pretraživanju koriste stanične kulture s ekspresijskim vektorima sisavaca koji sadrže luciferazni reporterski gen pod specifičnim promotorom ili regulatornom sekvencom od interesa. Takav oblik HTS-a omogućit će identifikaciju spojeva koji moduliraju gensku ekspresiju. Primjerice, uvođenjem luciferaznog gena pod kontrolu transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B (eng. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) i Nrf2 (eng. nuclear factor erythroid 2-like 2) istražen je učinak niza fitokemijskih spojeva i biljnih ekstrakata iz vrsta *Withania somnifera* (Ashwagandha), *Sutherlandia frutescens* (Sutherlandia) i *Euterpe oleracea* (Açaí) na oksidativni stres i upalne procese koji su povezani s aktivacijom navedenih transkripcijskih faktora, a imaju bitnu ulogu u neurodegenerativnim bolestima (Ajit i sur., 2016).

Zbog potrebe uvođenja unutarnjeg referentnog signala za korekciju analitičkog odgovora i normalizaciju nespecifičnih interakcija dobar izbor vrste luciferaznog testa u HTS-u je dvostruki luciferazni test (Slika 58.) (Kelkar i De, 2012). Reporter se bira na temelju korištene stanične linije, kinetike promatranog staničnog procesa te vrste detekcijskog uređaja (oslikavanje žive stanice ili mjerenje na mikrotitarskoj pločici).



**Slika 58.** Shematski prikaz dvostrukog luciferaznog testa dizajniranog za ispitivanja događaja na razini stanice.

Prikazane su konstitutivno eksprimirana FLuc za promatranje tkivno specifične transkripcije te RLuc namijenjena kontroli stanične proliferacije. Kad ispitivani ligand (ili neki drugi faktor) uđe u stanicu, veže se na regulatorni slijed promotora i utječe na transkripciju gena bilo njezinom aktivacijom ili supresijom. Aktivacija ili supresija ekspresije proteina može se mjeriti kao normalizirani svjetlosni signal iz reporterskih molekula i proporcionalna je količini biološki dostupnog liganda (preuzeto i prilagođeno iz Kelkar i De, 2012).

Luciferaza koja će se koristiti u bioluminiscencijskom HTS-u odabire se prema njezinim svojstvima (veličini, valnoj duljini emisijskog maksimuma, poluvremenu života u stanici, izlučivanju iz stanice) s obzirom na zahtjeve ispitivanja, a Tablica 3. daje pregled najčešće korištenih luciferaza u HTS-u i njihova svojstva.

**Tablica 3.** Luciferaze koje se najčešće koriste u HTS-u (preuzeto i prilagođeno iz Thorne i sur., 2010).

Luciferaza	Vrsta	Molekulska masa	Valna duljina emisijskog maksimuma	Ovisna o ATP-u?	Supstrati	Sekrecija ?	Vrijeme poluživota proteina	Tip HTS testa
Luciferaza krijesnice (FLuc)	<i>Photinus pyralis</i>	62 kDa	550-570 nm	Da	D-luciferin /ATP	Ne	3 h	B&C
Luciferaza klišnjaka (CBLuc)	<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i>	60 kDa	Zelena: 573 nm Crvena: 613 nm	Da	D-luciferin /ATP	Ne	7 h	C
<i>Renilla</i> luciferaza (RLuc)	<i>Renilla reniformis</i>	36 kDa	480 nm	Ne	Koelenterazin	Ne	4.5 h	B&C
<i>Gaussia</i> luciferaza (GLuc)	<i>Gaussia princeps</i>	20 kDa	460 nm	Ne	Koelenterazin	Da	6 dana (u staničnom mediju)	-**
<i>Cypridina</i> luciferaza (CLuc)	<i>Cypridina noctiluca</i>	62 kDa	465 nm	Ne	Vargulin (tzv. <i>Cypridina</i> luciferin)	Da	53 h (u staničnom mediju)	-**

B, format biokemijskog ispitivanja; C, format staničnog ispitivanja.

\*-nije primjenjiva, \*\*-Ove luciferaze trenutno nemaju široku primjenu u HTS-u.

#### 4.3.1.3 Visokoprotlačno pretraživanje modulatora protein-protein interakcija

Male promjene u ekspresiji gena uzrokovane malim molekulama u nekim slučajevima mogu povezati te male molekule sa specifičnim staničnim mehanizmom djelovanja te se stoga analiza genske ekspresije može koristiti za identificiranje staničnih procesa na koje djeluju lijekovi (Higa i sur., 2017; Lee i sur., 2017a). Konkretno, ako inaktivacija (eng. knockout) jednog gena ili skupa gena rezultira istom promjenom obrasca genske ekspresije koja se opaža i kada se stanice tretiraju određenim lijekom, tada se može zaključiti da su ti geni mete djelovanja lijeka. Međutim, ključno ograničenje ispitivanja djelovanja lijekova na proučavanje genske ekspresije je to da promjene ekspresije gena mogu biti udaljene u vremenu i zaklonjene opsežnim umreženjem istraživanih signalnog puta s drugim signalnim putovima. Na primjer, inhibicija enzima u biokemijskom putu može pokrenuti čitav niz paralelnih promjena u nekoliko drugih signalnih putova, što u konačnici rezultira pokretanjem kompleksnog remodeliranja ekspresije gena (Michnick i sur., 2007). Dakle, iako se analizom genske ekspresije pomoću genskih reportera mogu dobiti mnoge korisne informacije o djelovanju lijekova, one često nisu dostatne za točnu identifikaciju mete djelovanja lijeka i potpuno razumijevanja njegovog mehanizma djelovanja. Naime, istraživanjem isključivo genske ekspresije ne može se dobiti uvid u protein-protein interakcije (PPI) koje su u osnovi mnogih staničnih procesa. Stoga, da bi se točno odredio signalni put na koji je usmjereno djelovanje lijeka unutar složene biokemijske mreže žive stanice, poželjno je razviti metodu koja će izvještavati o promjenama u PPI.

PPI se često smatraju okosnicom "interaktoma", koji je cijeli niz molekularnih interakcija koje postoje u stanici (Vidal i sur., 2011). U interaktomu, molekularne interakcije povezuju sve vrste molekula kako bi oblikovale ogromnu sofisticiranu mrežu, koja predstavlja sve biološke procese u toj stanici i ključna je za razumijevanje života na temeljnoj razini. Budući da se veći dio interaktoma sastoji od interakcija između proteina, PPI posreduju mnoge druge vrste interakcija kako bi ih doveli u jednu interakcijsku mrežu. Na primjer, mnogi transkripcijski faktori (u interakcijama protein-DNA) obavljaju svoje funkcije u spoju s drugim proteinima u kompleksu (Chen i Rajewsky, 2007), a mnogi receptori (u interakcijama protein-ligand) koriste PPI u nizvodnim signalnim kaskadama (Hunke i Müller, 2012). U teoriji, svi PPI i njihova svojstva mogu se precizno predvidjeti iz genomskih informacija putem računalnih pristupa, međutim, praktična točnost i primijenjivi opseg su ograničeni zbog računalne snage i metodologije (Sun i sur., 2016). Stoga se pouzdani i detaljni PPI podaci mogu dobiti ili

potvrditi samo eksperimentima, a imati odgovarajuće metode za to je iznimno važno u bilo kojim biološkim istraživanjima koja uključuju procese na molekularnoj razini.

#### 4.3.1.3.1 Konvencionalne metode ispitivanja protein-protein interakcija

Postoje mnoge tehnike dostupne za istraživanje PPI-a, svaka ima svoje prednosti i slabosti, ali se samo nekolicina njih obično koristi zbog njihove ukupne izvedbe i upotrebljivosti. Najčešće se koristi sustav dvaju kvašćevih hibrida (eng. yeast two-hybrid, Y2H system), a iz svog prvotnog oblika ova se metoda razvila u mnogo varijanti te postala svestrana metoda za otkrivanje PPI svih vrsta. Koristi činjenicu da mnogi eukariotski transkripcijski faktori imaju dvije različite domene, od kojih su obje potrebne za aktivaciju transkripcije. Ako svaku domenu transkripcijskog faktora spojimo s različitim proteinom od interesa (protein „mamac“ i protein „plijen“), sustav će moći pokazati stupaju li ta dva proteina u interakciju aktivacijom reporterskog gena koji je pod kontrolom transkripcijskog faktora (Brückner i sur., 2009; Berggard i sur., 2007). Y2H se može lako postići osnovnim molekularnim tehnikama, pogodnim čak i za slabe PPI, i prikladne je osjetljivosti. Međutim, može se izvoditi samo *in vivo*, ima nulti ili zanemariv odgovor na dinamičke interakcije i zahtijeva da se proteinski testovi lokaliziraju. Koimunoprecipitacija (eng. co-immunoprecipitation, Co-IP) i tandemsko afinitetno pročišćavanje (eng. tandem affinity purification, TAP) su također popularne metode; obje se oslanjaju na stabilna vezanja između proteina i razvile su se iz metoda pročišćavanja proteina (Berggard i sur., 2007). Ove dvije metode imaju prednost u otkrivanju višestrukih PPI u jednom trenutku i intrinzično visoke protočnosti, što je korisno za razvoj lijekova pri pronalaženju potencijalnih partnera za vezanje specifičnih proteina. Ipak, njihov opseg primjene je još više ograničen od Y2H, budući da se mogu obaviti samo *in vitro* i nisu prikladni za slabe ili prolazne PPI i detaljnije PPI studije.

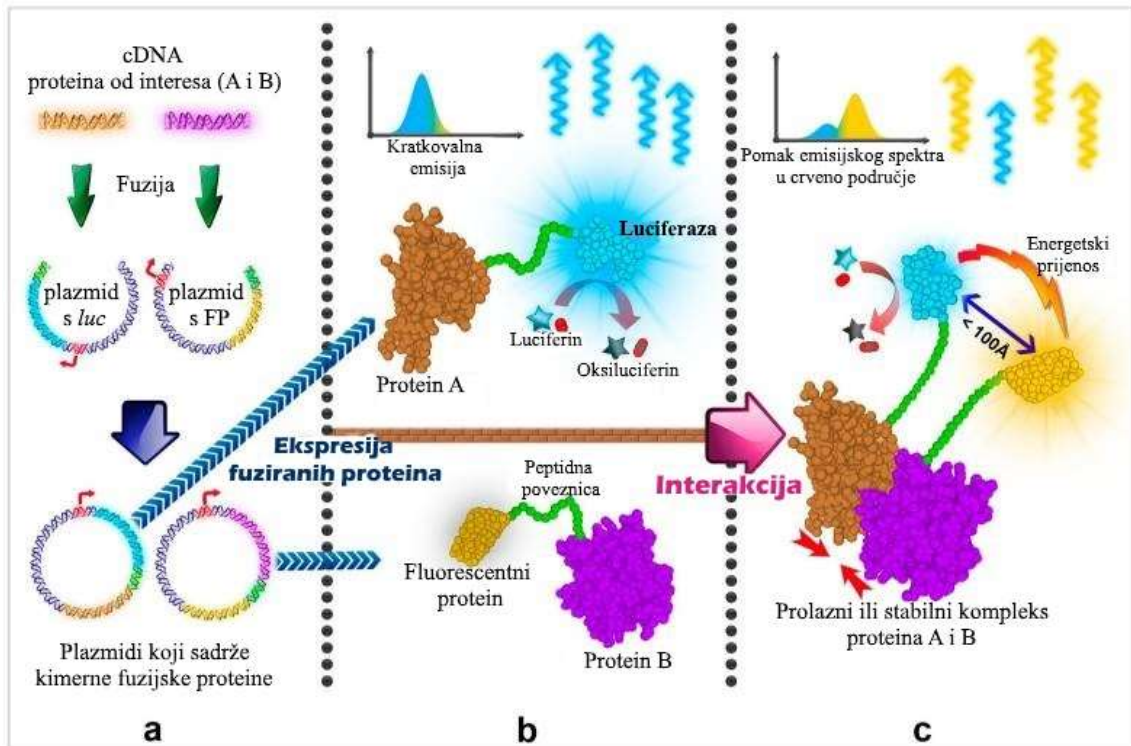
Zbog ograničenja ovih dominantnih metoda, konstantno se razvijaju nove i poboljšane metode kako bi se zadovoljile potrebe sve važnijeg istraživanja PPI. Primjerice, metoda analize proteina na mikročipu (eng. protein microarray) se pokazala briljantnom za praćenje i funkcionalno određivanje PPI u velikim razmjerima (LaBaer i Ramachandran, 2005), a NMR spektroskopija može se koristiti za proučavanje PPI u iznimno preciznim detaljima (O'Connell i sur., 2009). Međutim, mnoge od tih metoda zahtijevaju specijaliziranu ili skupu opremu za izvođenje, a ponekad zahtijevaju i specifično znanje za analizu rezultata (Rao i sur., 2014; Berggard i sur., 2007). Stoga se klasične, ali jednostavne metode kao što je Y2H još uvijek naširoko rutinski koriste u mnogim laboratorijima za otkrivanje PPI.



#### 4.3.1.3.2 Bioluminiscentni rezonantni prijenos energije

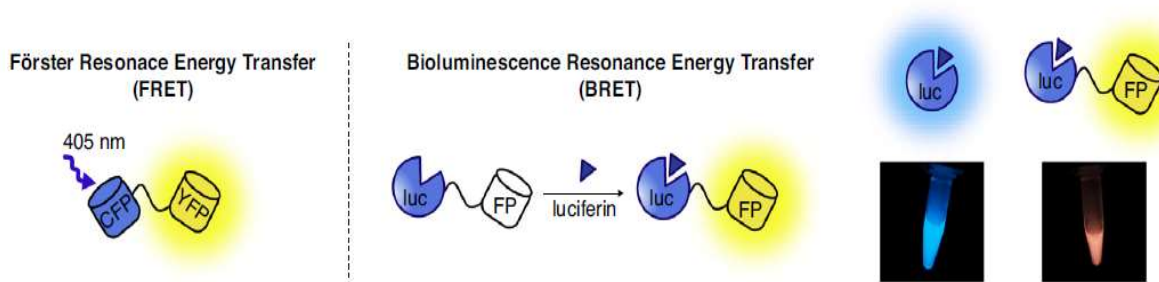
Metoda bioluminiscentnog rezonantnog prijenosa energije (eng. Bioluminescence Resonance Energy Transfer, BRET), koja je prisutna već nekoliko godina, uz nedavna dostignuća pokazuje superiorni potencijal da bude moćna, ali jednostavna metoda i izvrsna alternativa Y2H za istraživanja PPI. Procedura BRET-a je vrlo jednostavna i rezultat je lako interpretirati, a može se obaviti osnovnim molekularnim tehnikama uz relativno niske troškove te je stoga vrlo pristupačna mnogim laboratorijima. Za razliku od Y2H, BRET ne zahtijeva staničnu aktivnost da bi pokazao signal, tako da se može postići i *in vivo* i *in vitro*, i može se koristiti na proteinima koji nisu lokalizirani u jezgri. Najvažnija karakteristika BRET testa je da ima brz i reverzibilan odgovor na dinamičke PPI, te koristi lako mjerljivu svjetlost kao signal očitavanja, što je izuzetno vrijedno za praćenje PPI-a u stvarnom vremenu za funkcionalna i regulatorna istraživanja ili druge korisne primjene. Osim toga, uz odgovarajuću opremu, može se čak koristiti kao tehnika snimanja za mapiranje i proučavanje lokalizacije PPI-a (Sun i sur., 2016).

U BRET-u, dva proteina od interesa, koja se nazivaju "mamac" i "plijen" (slično kao i kod Y2H), odvojeno su vezana za luciferazu i fluorescentni protein (FP) (Slika 59.). I luciferaza i fluorescentni protein su proteini koji mogu proizvesti svjetlost, međutim luciferaza proizvodi svjetlost oksidacijom luciferina, dok FP zahtijeva vanjsku pobudu kao što je svjetlost veće frekvencije (Rowe i sur., 2010). Stoga, u prisutnosti luciferina, ali bez vanjske ekscitacije, normalno samo luciferaza može konstantno proizvoditi svjetlost, što je slučaj kada nema izravne interakcije između proteina od interesa. S druge strane, ako dva proteina od interesa mogu međusobno djelovati, interakcija će ih dovesti u neposrednu blizinu, kao i s njima povezane luciferaze i FP-e, i može se pojaviti fenomen Försterovog rezonantnog prijenosa energije (eng. Förster Resonance Energy Transfer, FRET) (Subramanian i sur., 2006). Tijekom FRET događaja, pobuđena energija elektrona na luciferazi (donorska molekula) se prenosi na FP (akceptorska molekula), uzrokujući pobuđivanje FP-a i njegovu proizvodnju svjetlosti.



**Slika 59.** Principi BRET testa. Strelice pokazuju pojednostavljenu proceduru korištenja BRET-a za detektiranje interakcije između dva proteina: (a) cDNA proteina od interesa (Protein A i B) spojene su s genima luciferaze i fluorescentnog proteina, i koeksprimirane kao obilježeni kimerni proteini, (b) luciferaza oksidira luciferin, oslobađajući visokofrekventnu svjetlost, dok FP ostaje neaktivan, (c) interakcije između proteina A i proteina B dovode luciferazu i FP u neposrednu blizinu te FP crpi energiju iz luciferaze i generira svjetlost niže frekvencije, uzrokujući lako uočljivu promjenu valne duljine emisije u spektru (preuzeto iz Sun i sur., 2016).

Kako luciferaza i FP emitiraju svjetlost različitih frekvencija, odnosno valnih duljina, događaj prijenosa energije može se lako promatrati i kvantificirati, što ukazuje na prisutnost interakcije između proteina od interesa (Slika 60.).

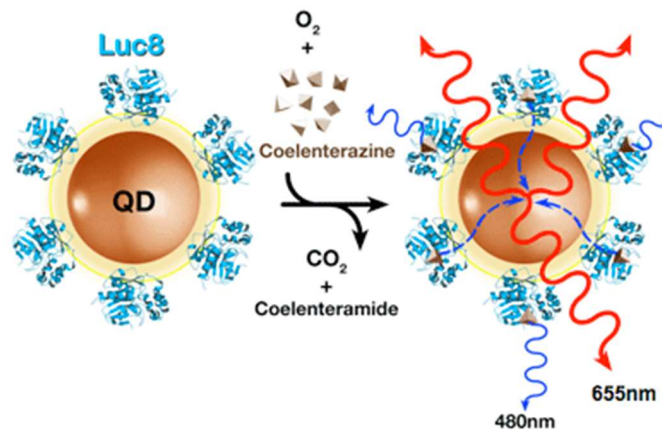


**Slika 60.** Prikaz FRET i BRET fenomena. Luciferaza emitira svjetlost drugačije valne duljine od one kad se u BRET-u upari s fluorescentnim proteinom (preuzeto iz Yao i sur., 2018).

Postoje mnogi tipovi luciferaza i fluorescentnih proteina, od kojih svaki ima svoja posebna fizička i optička svojstva, a BRET se može izvesti različitim kombinacijama. Ovisno o izboru,

svaka kombinacija može imati određene prednosti nad drugima; na primjer, parovi koji sadrže FP-e koji emitiraju na duljim valnim duljinama bolji su u PPI detekcijama dubokog sloja. Različiti odabiri luciferaza i FP-a dovode do BRET sustava s različitim prednostima, a kada studije navode stvaranje nove BRET metode, to obično znači da su pronađeni novi parovi luciferaze i FP-a koji imaju određene prednosti, a ne stvarne promjene BRET principa ili postupaka, što treba uzeti u obzir prilikom pretraživanja literarnih baza podataka na ovu temu.

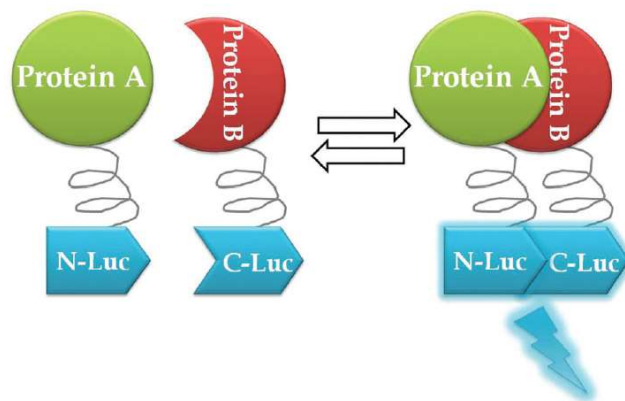
Također, u zadnje je vrijeme proučavana i prikladnost BRET sustava koji kombiniraju bioluminiscentne proteine i kvantne točke (eng. quantum dots, QD). QD su poluvodičke čestice nanometarskih promjera koje mogu emitirati svjetlost specifičnih valnih duljina kada se pobude električnom ili svjetlosnom energijom (Mezzanotte i sur., 2017). Oni pružaju dvostruku prednost jer imaju samoemitirajuće sonde (npr. nema potrebe za vanjskim izvorom svjetlosti) i emisiju svjetlosti u NIR području spektra. Iako se većina BRET nanosustava na bazi QD sastoji od RLuc konjugiranog s QD (Slika 61.) (Yu i sur., 2016; Kumar i sur., 2011), uspješno je razvijen i vrlo učinkovit BRET sustav s FLuc konjugiranim na kvantne štapiće CdSe/CdS i CdSe/CdS/ZnS (Alam i sur., 2014). Doduše, još nije prijavljena njihova prikladnost za *in vivo* primjenu. Još uvijek je konjugacija bioluminiscentnih sonda s QD vrlo komplicirana i zahtijeva mnogo vremena pa to otežava širu primjenu ovih sustava i oni nisu komercijalno dostupni.



**Slika 61.** Primjer BRET sustava koji kombinira Luc8 luciferazu i kvantne točke (eng. quantum dots, QD). Luc8 (donorska molekula) emitira svjetlost na 480 nm koja pobuđuje kvantnu točku (akceptorska čestica) koja onda emitira svjetlosni signal u NIR-području spektra na 655 nm (preuzeto iz Xing i sur., 2009).

#### 4.3.1.3.3 Metoda komplementacije proteinskih fragmenata

Metoda razdvojene luciferaze (eng. split luciferase assay, SLA) drugi je način izučavanja PPI pomoću bioluminiscencije. SLA je jedna od metoda komplementacije proteinskih fragmenata (eng. protein-fragment complementation assay, PCA) pa se u literaturi može naći i pod tim nazivom. U ovom pristupu (Slika 62.), luciferaza je rastavljena na dva dijela, što uzrokuje gubitak njezine aktivnosti. Svaki je dio (na genskoj razini) spojen s jednim proteinom od interesa. Fragmenti reporterskih proteina dovode se u međusobnu neposrednu blizinu kroz povezivanje dvaju proteina od interesa koji su u međusobnoj interakciji, što im omogućuje da se smotaju ponovno u jedinstvenu trodimenzijsku strukturu reporterskog proteina i rekonstruiraju njegovu aktivnost. Dodatkom luciferina u reakcijski medij može se očitati bioluminiscentni signal koji je posljedica PPI (Azad i sur., 2014).



**Slika 62.** Metoda razdvojene luciferaze – zbog interakcije proteina A i proteina B dolazi do spajanja dviju fragmenata razdvojene luciferaze i obnavljanja njezine aktivnosti što se očituje kao bioluminiscentni signal (preuzeto iz Kaskova i sur., 2016).

PCA je jednostavna metoda koja omogućuje međusobno povezivanje gena, a zatim i povezivanje gena s njihovim funkcijama. To se postiže prvenstveno, mjerenjem interakcija među proteinima koji su kodirani genima od interesa, a zatim promatranjem onoga što se događa s tim interakcijama kada se na njih djeluje lijekom, hormonom ili inaktivacijom nekih drugih gena.

Ključna zabrinutost koja se javlja vezana za PCA strategiju je i ta da bi proteinski kompleksi mogli ostati „zarobljeni“ kada ponovno smotani PCA reporterski enzim spriječi disocijaciju kompleksa, a to može dovesti do krivog tumačenja lokalizacije ili prometa proteinskog kompleksa. Međutim, to se općenito ne opaža jer se reverzibilnost PCA temelji se na

principima smatanja proteina kako je i dokazano u studijama baziranim na *Gaussia* i *Renilla* luciferazama (Stefan i sur., 2007; Remy i Michnick, 2006).

Umjesto otkrivanja nepoznatih PPI, PCA se također može koristiti za ispitivanje posljedica određenih podražaja na signalne putove. U takvoj strategiji, u signalni su put na različita mjesta ubačeni unaprijed definirani PCA reporteri. Na primjer, u signalnoj kaskadi, PCA reporteri mogu biti dizajnirani da izvještavaju o početnom događaju vezanja, kao što je povezivanje signalnog efektorskog proteina s receptorom koji se aktivira hormonom. Mogu izvještavati i o posredničkim interakcijama uključenim u sekundarni događaj na signalnom putu ili mogu izvjestiti o krajnjem odgovoru kao što je aktivacija specifičnog transkripcijskog faktora. Dakle, skup PCA reportera može izvještavati o različitim koracima određenog signalnog puta te dati uvid u djelovanje perturbacije na bilo koju proteinsku komponentu tog signalnog puta ili bilo kojeg drugog puta koji na njega djeluje (Wehr i Rossner, 2016).

Brojne su prednosti korištenja PCA u razvoju lijekova. Primjerice, optimalna meta u signalnom putu od interesa može se identificirati u jednostavnoj staničnoj analizi, a procjena potencijalnih mimoilaznih puteva, nespecifičnih ili toksičnih učinaka može se provesti unutar istog testa, čime se zaobilaze skupe pogreške u srednjem i kasnom stadiju kliničkih faza ispitivanja lijekova. Osim toga, razvoj PCA je relativno jednostavan, i nema potrebe za proizvodnjom rekombinantnih proteina ili pročišćavanja proteina, što je često nužno za razvoj *in vitro* testova za identifikaciju novih meta za lijekove u velikim razmjerima. Nadalje, budući da se primarne pretrage provode u živim stanicama, odmah se dokazuje i da su ispitivane male molekule permeabilne za membranu i stoga je vjerojatnije da su bioraspoložive (Michnick i sur., 2007). Naposljetku, PCA omogućuju analizu kombinacija lijekova, koji mogu utjecati na više različitih meta istovremeno (Wehr i Rossner, 2016), što je posebno bitno u području razvoja antitumorskih lijekova.

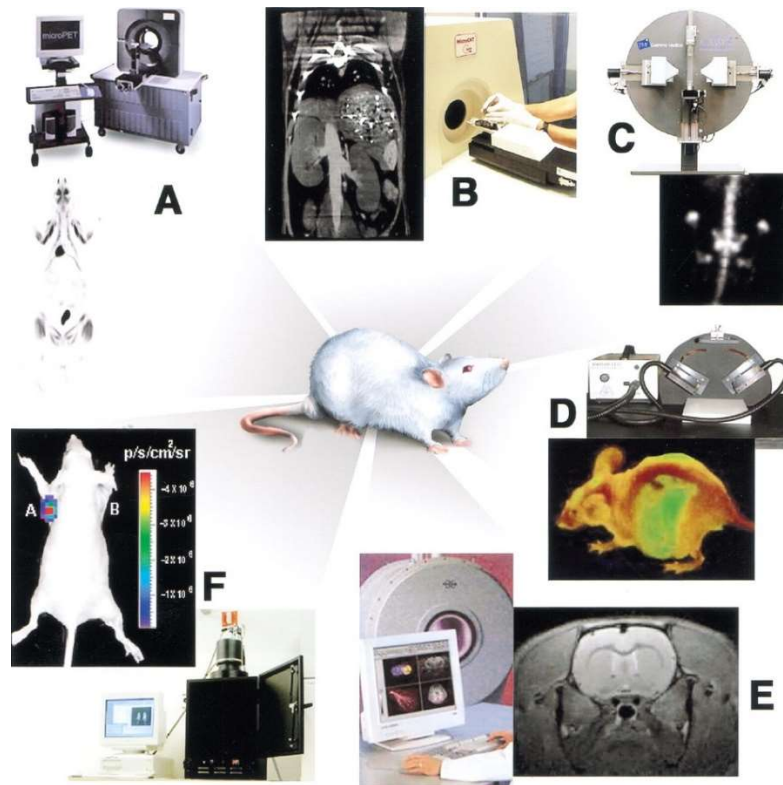
### **4.3.2 Biološko oslikavanje čitavih organizama**

Alati za biološko oslikavanje omogućuju istraživačima da "vide" unutar tkiva i stanica i prate stanične događaje u stvarnom vremenu. No, većina sonde koje se koriste u biološkom oslikavanju ograničena je na praćenje staničnog ponašanja na mikro skali - u posudama za uzgoj staničnih kultura i na mikrotitarskim pločicama (Porterfield i Prescher, 2015). Vizualiziranje staničnog ponašanja u autentičnijim okruženjima zahtijeva alate koji mogu funkcionirati u većim prostornim i vremenskim razmacima. Uzimajući u obzir zahtjeve biokompatibilnosti i osjetljivosti u čitavim tkivima i životinjama, tek nekolicina reportera odgovara ovoj primjeni (Rathburn i Prescher, 2017).

#### **4.3.2.1 Metode biološkog oslikavanja**

Trenutno dostupni alati biološkog oslikavanja temelje se na detekciji specifičnog reporterskog sustava eksprimiranog na staničnoj razini. Konvencionalne metode biološkog oslikavanja temelje se na detekciji sonde koje emitiraju gama zračenje vizualizirano pozitronskom emisijskom tomografijom (eng. positron emission tomography, PET) i jednofotonskom emisijskom kompjutoriziranom tomografijom (eng. single photon emission computed tomography, SPECT) u nuklearnom oslikavanju ili magnetske rezonancije u oslikavanju magnetskom rezonancijom (eng. magnetic resonance imaging, MRI) (Slika 63.) (Cunha i sur., 2014).

Glavni nedostatak ovih metoda za razvoj lijekova predstavlja činjenica da su prvotno sve navedene metode razvijene za kliničku upotrebu i slabo su prilagođene potrebama pretkliničkih ispitivanja. Metode nuklearnog oslikavanja, PET i SPECT, imaju nisku rezoluciju koja ograničava njihovu upotrebu u malim životinjama te njihov kapacitet za visoko protočna pretraživanja (HTS) u analizi lijekova kandidata. Glavna prepreka za njihovu pretkliničku upotrebu je i to što su zahtijevaju upotrebu specifičnih radioizotopa kratkog poluvremena raspada (Nairne i sur., 2015). MRI je prikladniji za primjenu u malim životinjama zbog sposobnosti da isporuči vrlo detaljnu anatomsku i funkcionalnu informaciju o učinku lijekova čak i u kompleksnim organima (primjerice, mozgu), međutim, kapacitet izlaznog signala u MRI je vrlo nizak, a MRI ujedno zahtijeva visoke operativne troškove i skupocjenu opremu kojom može upravljati samo posebno obučeni stručnjak (Beckmann i sur., 2004).



**Slika 63.** Različiti načini biološkog oslikavanja malih životinja. Prikazani su uobičajeni uređaji koji se koriste u prikazanim metodama i ilustrativni primjeri slika koje se mogu njima dobiti. (A) mikroPET cijelo tijelo koronarne slike štakora injiciranog s [ $^{18}\text{F}$ ]FDG (2-deoksi-2- $^{18}\text{F}$ fluoroglukoza), koji pokazuje prihvaćanje sonde u mišićnom, srčanom i moždanom tkivu te akumulaciju u mjestu zbog bubrežnog klirensa. (B) mikroCT koronarna slika trbuha miša nakon injekcije intravenskog jodiranog kontrastnog sredstva. (C) microSPECT koronarna slika trbuha miša i područja zdjelice nakon injektiranja  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  metilen difosfonata, koja prikazuje nakupljanje sonde u kostima. (D) Slika mišjeg modela koji sadrži tumorske stanice označene fluorescentnim proteinom GFP koje su se proširile na različita mjesta. (E) mikroMRI koronarna T2-ponderirana slika mišjeg mozga. (F) Slika dobivena bioluminiscentnim oslikavanjem miša s potkožnim ksenograftom koji eksprimira *Renilla* luciferazu u regiji lijevog ramena, nakon injekcije supstrata koelenterazina u repnu venu. Slike su dobivene korištenjem CCD kamere. Slika vidljivog svjetla prekrivena je fotografskom slikom miša sa skalom u p/s/cm<sup>2</sup>/sr (fotonima po sekundi po kvadratnom centimetru po steradianu) (preuzeto i prilagođeno iz Massoud i Gambhir, 2003).

Zbog toga se primjena konvencionalnih metoda biološkog oslikavanja u pretkliničkom razvoju lijekova uglavnom zamjenjuje primjenom optičkih metoda. Optičke metode temelje se na snimanju svjetlosnih signala u vidljivom i bliskom infracrvenom (NIR) području spektra za vizualizaciju različitih staničnih procesa. U metode optičkog biološkog oslikavanja spadaju fluorescentno i bioluminiscentno biološko oslikavanje (eng. bioluminescence imaging, BLI) koje se temelji na korištenju fluorescencijskih i bioluminiscencijskih reportera (sondi). Fluorescencijski reporteri podrazumijevaju niz fluorescentnih proteina (FP) od kojih je najpoznatiji i najčešće korišten zeleni fluorescentni protein (eng. green fluorescent protein, GFP). FP apsorbiraju fotone na valnim duljinama karakterističnim za pojedinu vrstu FP-a

čime molekula FP-a prelazi u pobuđeno elektronsko stanje. Pri povratku u osnovno elektronsko stanje dolazi do emisije svjetlosti valne duljine različite od pobudne svjetlosti (Lichtman i Conchello, 2005). Bioluminiscencijski reporteri obuhvaćaju luciferaze koje također proizvode fotone kao posljedicu energetskih prijelaza iz pobuđenog elektronskog stanja više energije u niže energetsko stanje. Međutim, oni se razlikuju u načinu nastanka pobuđenih stanja. U bioluminiscenciji, pobuđena stanja su proizvod egzotermnih kemijskih reakcija, dok u fluorescenciji pobuđena stanja nastaju apsorpcijom svjetlosti (Hosseinkhani, 2011).

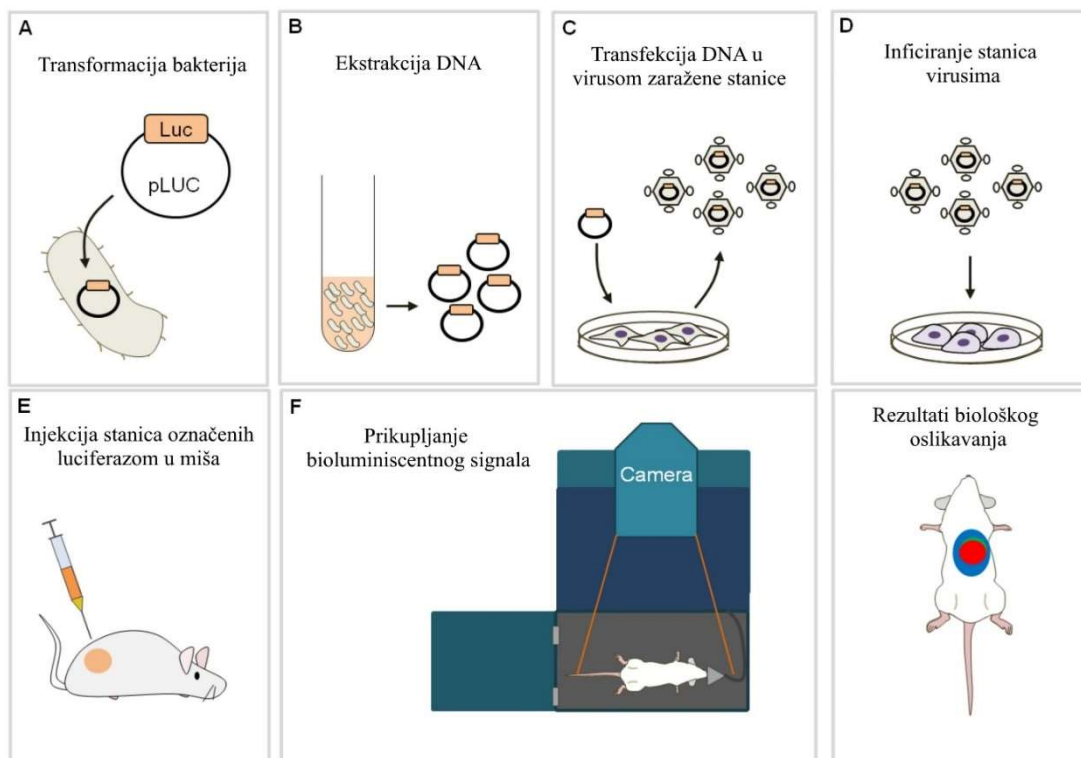
Optičke metode biološkog oslikavanja prednjače u jednostavnosti izvođenja i omjeru cijene i učinkovitosti. Napredovale su od opažanja anatomskih razlika u tkivnim prerezima u točno određenom trenutku do istovremenog oslikavanja višestrukih bioloških svojstava stanica longitudinalno u vremenu, na neinvazivan način unutar živog životinjskog modela (Ntziachristos, 2010). Optičko biološko oslikavanje *in vivo* pruža važnu dopunu informacijama dobivenim u *in vitro* ispitivanjima (Maggi i Ciana, 2005). Također, *in vivo* pristup omogućuje smanjenje broja životinja koje se koriste u istraživanjima. Primjerice, jedna se životinja može višestruko snimati kako bi se (obično u stvarnom vremenu) vizualno pratila progresija ili regresija infekcije ili bolesti, a ujedno služi samoj sebi kao kontrola te se posljedično uklanja potreba za sekvencijalnim žrtvovanjem životinja u različitim vremenskim točkama tijekom ispitivanja. Dakle, omogućeno je prikupljanje podataka veće statističke značajnosti upotrebom manjeg broja životinja (Patterson i sur., 2014). Također, velika je prednost optičkih metoda neinvazivnost koja počiva na snimanju fotona vidljivog spektra svjetlosti umjesto ponavljajućeg ionizirajućeg zračenja korištenog u drugim metodama biološkog oslikavanja.

Ipak, važno je razmotriti i ograničenja optičkih metoda. Važna razmatranja uključuju dubinu prodiranja svjetlosti kroz tkiva, raspršenje i apsorpciju fotona u tkivima te pravilan izbor sondis obzirom na valnu duljinu emitirane svjetlosti - jer svi navedeni čimbenici utječu na rezoluciju slike, omjer signala i pozadinskog šuma oslikavanja te kvalitetu podataka koji se oslikavanjem stječu (McKinnon i sur., 2017).



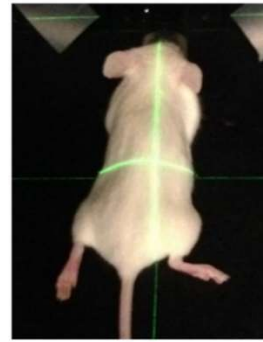
#### 4.3.2.2 Bioluminiscentno biološko oslikavanje *in vivo*

*In vivo* BLI cijelog tijela nudi osjetljivu, kvantitativnu, neinvazivnu metodu u praćenja infektivnih stanja i rasta tumora i metastaza živih životinja u stvarnom vremenu. BLI se može prilagoditi i za praćenje ekspresije luciferaze specifične za tkivo u transgeničnim miševima, te proučavanje PPI i signalnih kaskada u stvarnom vremenu (Zinn i sur., 2008). Napredovanje bolesti ili djelotvornost lijekova može se procijeniti ubrizgavanjem životinji bioluminiscentnog markera kao što su tumorske stanice ili stanice patogena preobražene da emitiraju svjetlost. Stanice su učinjene bioluminiscentnima uvođenjem ili bakterijske genske kasete (*lux*ABCDE) ili gena za luciferazu (*luc*) (Slika 64.).



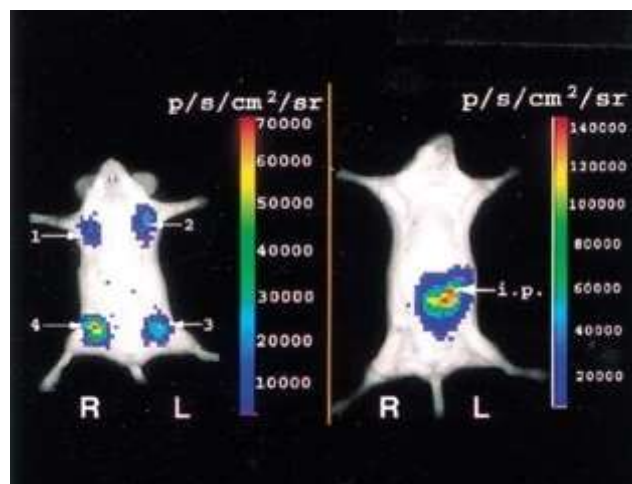
**Slika 64.** Shematski prikaz koraka potrebnih za uspješno označavanje stanica luciferazom i izvođenje *in vivo* bioluminiscentnog biološkog oslikavanja (preuzeto i prilagođeno iz Carceles-Cordon i sur., 2016).

Nakon injekcije luciferina u tijelo životinje moguće je detektirati bioluminiscentnu svjetlost koja prolazi kroz slojeve životinjskog tkiva pomoću fotoosjetljivih uređaja spregnutih nabojem (eng. charge-coupled devices, CCD) (Slika 65.).



**Slika 65.** Uređaj za snimanje bioluminiscentnog signala *in vivo* (lijevo) i miš postavljen unutar uređaja (desno) (preuzeto i prilagođeno iz Carceles-Cordon i sur., 2016).

CCD uređaji pretvaraju fotone u elektronske naboje i tako pružaju slike visoke kvalitete (Slika 66.) (Mezzanotte i sur., 2017). Najčešće se slike detektiranog bioluminiscentnog signala prikazuju uz skalu pseudo-boja od kojih svaka predstavlja određeni intenzitet bioluminiscentne svjetlosti izražen u fotonima po sekundi po kvadratnom centimetru po steradianu ( $\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$ ) te stapaju s fotografijama miševa za preciznu lokalizaciju bioluminiscentnog signala u životinjskom tijelu (Slika 66.) (Massoud i Gambhir, 2003).



**Slika 66.** Primjeri slika dobivenih bioluminiscentnim biološkim oslikavanjem miševa *in vivo*. Lijevom je mišu implantiran potkožni ksenotransplantacijski tumor koji eksprimira Fluc, a desnom intraperitonealne tumorske stanice koje ekspimiraju Fluc. Nakon injekcije D-luciferina (bilo intravenskim ili intraperitonealnim putem) pomoću CCD kamera detektira se bioluminiscentni signal. Fotografije miševa stapaju se sa slikama detektiranog bioluminiscentnog signala i skalom u fotonima po sekundi po kvadratnom centimetru po steradianu ( $\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$ ) (preuzeto i prilagođeno iz Massoud i Gambhir, 2003).

Većina sustava za snimanje daje dvodimenzionalnu (2D) informaciju omjestu i intenzitetu bioluminiscentne svjetlosti emitirane iz životinjskog modela, ali razvijena je i metoda trodimenzionalnog (3D) BLI. Ipak, 3D BLI je skuplje i manje učinkovito (Zinn i sur., 2008) pa njegova primjena još uvijek nije zaživjela u procesu razvoja lijekova.

Iako je potencijal za *in vivo* BLI u razvoju lijekova uzbudljiv, postoje neki nedostaci ove metode zbog kojih nije vjerojatno da će se BLI moći implementirati u klinička ispitivanja na ljudima nego je njegova primjena isključivo ograničena na pretkliničku fazu. Prvenstveno, vrlo je problematično uvođenje nekralježnjačkog gena u čovjekove stanice (Kelkar i De., 2012). Drugi je nedostatak u BLI slabljenje bioluminiscentnog signala koje ovisi o valnoj duljini emisije svjetlosti, dubini stanica koje sadrže bioluminiscencijske reportere i tipu tkiva koje ih okružuje. Naime, generalni problem bioluminiscencije je slaba penetracija svjetlosti kroz kožu i tkiva jer se većina svjetlosti na valnim duljinama ispod 600 nm apsorbira uglavnom zbog prisutnosti hemoglobina u vaskulariziranom tkivu. Koeficijent apsorpcije tkiva sisavaca na 400 nm je  $10 \text{ cm}^{-1}$ , dok je na 700 nm  $0,03 \text{ cm}^{-1}$ , i izračunato je da se do 99% svjetlosti emitirane iz unutarnjih organa, kao što su pluća, može izgubiti tkivnom apsorpcijom (Weissleder i Ntziachristos, 2003). Također, prostorna rezolucija BLI je relativno niska (3,0–5,0 mm) u usporedbi s drugim načinima snimanja, kao što su MRI i kompjutorska tomografija (Zinn i sur., 2008).

Ova ograničenja osjetna su i u pretkliničkoj fazi razvoja lijekova, ali im se može doskočiti na razne načine. Primjerice, genetičkim inženjerstvom moguće je iz divljih tipova luciferaza izoliranih iz raznih organizama kreirati njihove poboljšane verzije kao što je opisano u ranijim poglavljima.

### 4.3.2.3 Usporedba bioluminiscencije i fluorescencije

Razlika u načinu nastanka pobuđenih stanja odgovornih za emisiju fotona u fluorescenciji i bioluminiscenciji (Hosseinkhani, 2011) uvelike utječe na karakter fotometrijske analize. Na primjer, analize na bazi fluorescencije obično su mnogo većeg intenziteta svjetlosnog signala, jer se svjetlost visokog intenziteta koristi za generiranje pobuđenog stanja. U bioluminiscencijskim testovima, kemijske reakcije potrebne za generiranje pobuđenih stanja obično donose niže stope emisije fotona. Iako bi se dalo zaključiti da veća svjetlina fluorescencije korelira s boljom osjetljivošću ispitivanja, obično to nije slučaj. Osjetljivost ispitivanja određena je statističkom analizom signala u odnosu na pozadinu, pri čemu relativni signal predstavlja razliku izmjerenog signala uzorka i izmjerenog signala pozadine. Fluorescencijski testovi imaju puno veće signale pozadine, što dovodi do nižih relativnih signala (Leblond i sur., 2010). To se događa jer fluorometri ne mogu savršeno diskriminirati između vrlo velikog priljeva fotona u uzorak i mnogo manjeg ispuštanja fotona iz analitičkih fluorofora. Razlikovanje pobudnih i emisijskih fotona postiže se u velikoj mjeri pomoću optičkih filtara koji razlikuju fotone na temelju njihovih duljih valnih duljina i smjera putovanja. Ipak, optički filtri nisu savršeni u svojoj sposobnosti razlikovanja valnih duljina, a fotoni mogu promijeniti smjer raspršivanjem (Rathburn i Prescher, 2017). Budući da fotoni nisu potrebni za stvaranje pobuđenih stanja u bioluminiscenciji, oni ne predstavljaju inherentnu pozadinu pri mjerenju fotonskog priljeva iz uzorka pa bioluminiscencija ima prednost pred fluorescencijom. Dobiven niski pozadinski signal omogućuje precizno mjerenje vrlo malih promjena u intenzitetu svjetlosti (Schulz i Semmler, 2008).

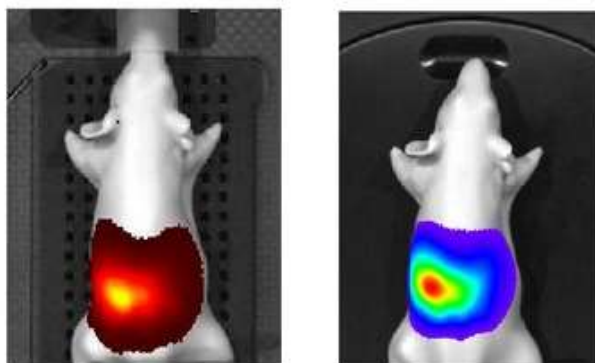
Neke od prednosti fluorescencije su jednostavnost izvođenja ispitivanja, veliki broj dostupnih fluorescentnih proteina i mogućnost da se simultano za oslikavanje koriste višestruki reporteri različitih boja (Patterson i sur., 2014). Provođenje bioluminiscencijskih ispitivanja nešto je kompliciranije od fluorescencijskih. Luciferinski supstrat potreban je za većinu luciferaznih reakcija, a nije endogen u animalnim modelima pa mora biti primijenjen egzogeno. Stoga je bitno postići eksperimentalnu konzistentnost kako bi dobiveni rezultati iz različitih ispitivanja bili usporedivi. Potrebno je, naime, na početku ispitivanja generirati kinetičku krivulju raspodjele luciferina u organizmu kako bi se postiglo optimalno doziranje luciferina i optimalno vrijeme za oslikavanje animalnih modela nakon injekcije supstrata. Iako se za svako ispitivanje kinetička krivulja generira samo jednom, problem se može javiti u eksperimentima u kojima se životinje promatraju od rođenja do odrasle dobi zbog promjena u metabolizmu koje mogu utjecati na procesuiranje luciferina (Patterson i sur., 2014).

Problem dodatka egzogenog luciferina u nekim je modelima riješen upotrebom bakterijske luciferazne genske kazete (*luxABCDE*) koja sadrži gene i za luciferazu i za luciferin (Close i sur., 2013), a može se riješiti i primjenom luciferaza koje se prirodno izlučuju iz stanica kao što su luciferaze iz vrsta *Gaussia princeps* i *Oplophorus gracilirostris*. Međutim, izlučivanje luciferaze iz stanice može dovesti do njezine difuzije u tijelu i tako onemogućiti točnu lokalizaciju svjetlosnog signala (Patterson i sur., 2014).

S druge strane, ponekad interpretacija rezultata dobivena snimanjem FP može biti otežana. Glavni razlog tomu je autofluorescencija kože, dlake i tkiva životinja, kao i određenih staničnih komponenti, primjerice nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfata (NADPH), flavinskih koenzima, elastina i kolagena (Monici, 2005). Ako se valna duljina emisije FP-a preklapa s valnim duljinama autofluorescentnih spojeva rezultati se ne mogu pravilno očitati. Autofluorescencija uzrokuje i interferencije mnogih često korištenih FP s klorofilom koji je prisutan u uobičajenoj hrani za laboratorijske miševe (McNally i sur., 2006). Poteškoće su osobito uočljive pri ispitivanju bioloških uzoraka koji mogu biti ispunjeni različitim heterocikličkim spojevima koji fluoresciraju, obično u koncentracijama mnogo većim od analitičkih fluorofora od interesa. Problem se, doduše, minimizira u jednostavnim uzorcima, kao što su pročišćeni proteini, ali za otkriće lijekova se sve više u HTS-u koriste žive stanice koje imaju izuzetno složene kemijske konstitucije i mogu pokazivati značajnu inherentnu fluorescenciju. Nadalje, i same knjižnice kemijskih spojeva iz kojih se HTS-om probiru novi potencijalni lijekovi sačinjene su od spojeva koji mogu pokazivati fluorescenciju na određenim valnim duljinama (Simeonov i sur., 2008).

Nasuprot fluorescenciji kod koje očitavanje rezultata može biti otežano zbog autofluorescencije, sva detektirana svjetlost u bioluminiscencijskim ispitivanjima potječe iz luciferaznih reportera jer komponente stanica i tkiva ne pokazuju endogenu bioluminiscenciju (Patterson i sur., 2014).

Slika dobivene biološkim oslikavanjem miša kojem su ubrizgane stanice označene fluorescencijskim i bioluminiscencijskim reporterima prikazane su na Slici 67., a usporedba nekih od relevantnih svojstava fluorescencije i bioluminiscencije u Tablici 4.



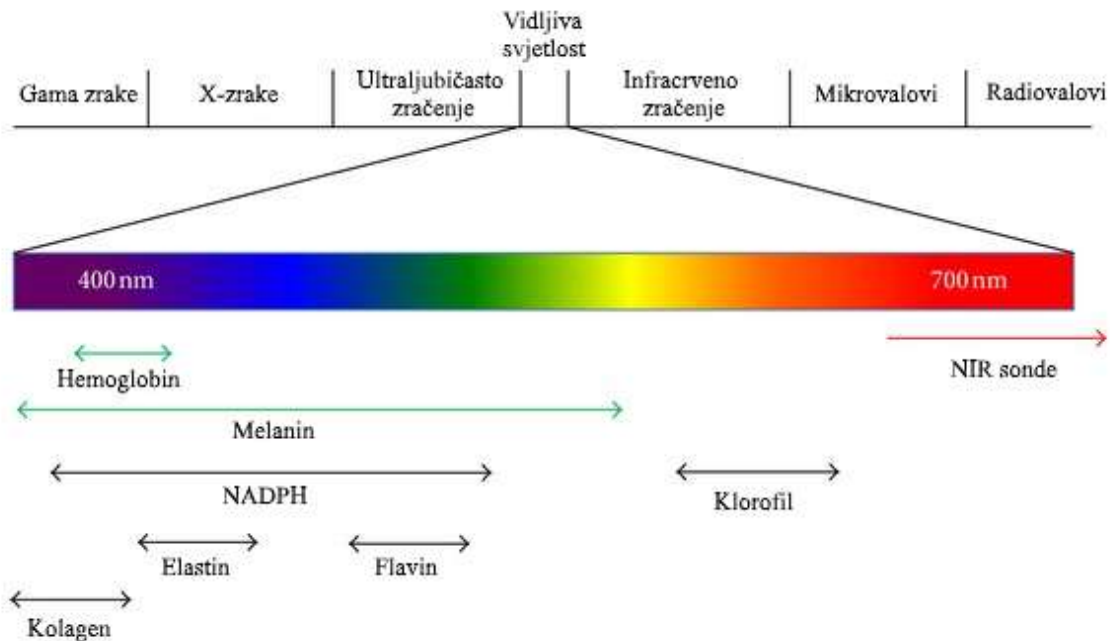
**Slika 67.** Slike dobivene biološkim oslikavanjem miša kojem su ubrizgane stanice označene fluorescencijskim (lijevo) i bioluminiscencijskim (desno) reporterima (preuzeto i prilagođeno iz Patterson i sur., 2014).

**Tablica 4.** Usporedba svojstava fluorescencijskih i bioluminiscencijskih reportera za uporabu u optičkom oslikavanju *in vivo*. Luciferaza upotrebljena za ovu usporedbu je FLuc (preuzeto i prilagođeno iz Patterson i sur., 2014).

	<b>Fluorescencija</b>	<b>Bioluminiscencija</b>
Izvor svjetlosti	Protein	Kemijska reakcija
Autofluorescencija	Da	Ne
Supstrat	-	D-luciferin
Potrebni kofaktori	-	ATP + O <sub>2</sub>
Reporteri	Veliki broj dostupnih fluorescentnih proteina	Manji broj dostupnih luciferaza
Broj miševa po snimanju	Nekoliko	Nekoliko
Vrijeme snimanja	Milisekunde	Minute

Zajednički problem kojem bioluminiscencija i fluorescencija podliježu je apsorpcija svjetlosti u tkivima. Fluorescentni i bioluminiscentni signal kod oslikavanja u animalnim modelima mora proći kroz nekoliko slojeva tkiva u kojima se događaju apsorpcija i raspršenje signala (Imamura i sur, 2018). Apsorpcija se razlikuje po tkivima ovisno o molekulama kromofora koje se u njima nalaze, primjerice, hemoglobin u krvi ili melanin u koži i kosi (Slika 68.) (Patterson i sur., 2014). Kromofori imaju niske apsorpcijske koeficijente u NIR području spektra (650-900 nm) pa uglavnom apsorbiraju plavi i zeleni dio vidljivog svjetla (do otprilike 600 nm). Posljedično, crveni dio (bliski i srednji dio infracrvenog spektra) emitirane svjetlosti prolazi kroz tijelo životinje i može se detektirati detektorima koji se nalaze izvan samog animalnog modela (Arranz i Ripoll, 2015). Elastično Rayleigh raspršenje, pak, manje ovisi o

tkivu kroz koje emitirana svjetlost prolazi, a više na njega utječu interakcije sa staničnim komponentama, posebice membranama i obrnuto je proporcionalno valnoj duljini emitirane svjetlosti. Iako se i NIR svjetlost raspršuje, većinom ipak prolazi kroz animalno tkivo pa se signali iz unutarnjih organa mogu detektirati izvan tijela male životinje kakve su eksperimentalni miševi (Rice i sur., 2001).



**Slika 68.** Područja valnih duljina na kojima se događa tkivna apsorpcija svjetlosti i autofluorescencija. Čimbenici koji doprinose tkivnoj apsorpciji označeni su zelenim strelicama, a autofluorescentne komponente stanica i tkiva crnim strelicama. Crvenom strelicom označeno je poželjno područje emisije optičkih NIR-sondi (preuzeto i prilagođeno iz Patterson i sur., 2014).

Rješavanje problema tkivne apsorpcije svjetlosti obično se postiže dizajniranjem posebnih bioluminiscencijskih i fluorescencijskih sonda (Anderson i sur., 2017; Kuchimaru i sur., 2016; Rumyantsev i sur., 2016) i modifikacijom luciferinskih supstrata da emitiraju u bliskom infracrvenom (eng. near-infrared, NIR) području spektra (Evans i sur., 2014; Harwood i sur., 2014; Mofford i sur., 2014).

Zaključno, za oslikavanje mikroskopske strukture, preferirana je fluorescencija u odnosu na bioluminiscenciju zbog većeg intenziteta proizvedene svjetlosti jer je optika potrebna za oslikavanje staničnih struktura relativno neučinkovita pri prikupljanju svjetlosti. Stoga nizak pozadinski šum svojstven bioluminiscenciji u mikroskopskim ispitivanjima čini neznatnu prednost jer je signal obično daleko ispod mogućnosti detekcije uređaja (Schulz i Semmler, 2008). Nadalje, bioluminiscencijske metode zasad imaju ograničenu prostornu razlučivost,

koja predstavlja udaljenost dvaju detalja koji se još mogu razlikovati na slici (Kelkar i De, 2012), a dobivanje slike je u velikoj mjeri stvar detekcije rubova koja se više oslanja na jačinu signala i na nju puno manje utječe pozadinski šum.

S druge strane, u makroskopskim mjerenjima, koja zahtijevaju točnu kvantifikaciju s visokom osjetljivošću, bioluminiscencijski testovi često nadmašuju analogne analize na bazi fluorescencije. Makroskopska mjerenja temelj su HTS-a koji se oslanja na upotrebu mikrotitarskih pločica kako bi se što brže izmjerio jedan parametar u velikom broju uzoraka. Testovi koji se temelje na fluorescenciji ili bioluminiscenciji mogu pružiti brzi protok uzoraka, međutim, velika je vjerojatnost da će fluorescencijska mjerenja biti otežana svjetlosnom kontaminacijom (zbog pobudne svjetlosti) ili kemijskim sastavima uzoraka i knjižnice kemijskih spojeva. Korištenje bioluminiscencije kod HTS-a ograničeno je uglavnom nedostatkom raspoloživih metoda analize.

Zbog svoje duge povijesti, fluorescencija se češće koristi (Thorne i sur., 2010), ali napretkom u studijama bioluminiscencije i razvojem novih unaprijeđenih bioluminiscencijskih metoda, bioluminiscencija sve više zauzima mjesto fluorescencije.



## 4.4 Novije primjene bioluminiscencijskih gena reportera u razvoju lijekova

### 4.4.1 Luciferaza krijesnice

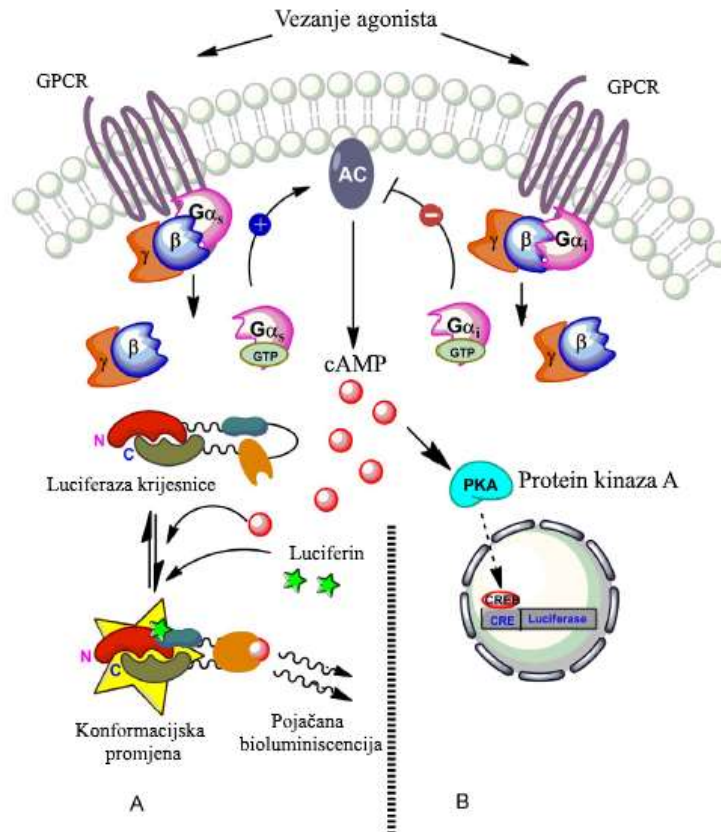
Tipična biokemijska ispitivanja koja koriste FLuc uključuju mjerenje koncentracije ATP-a i ADP-a i određivanje vijabilnosti stanica (Kaskova i sur., 2016) ili korištenje pro-luciferinskih supstrata za detekciju aktivnosti ciljnog proteina od interesa (Fan i Wood, 2007; Cali i sur., 2006).

FLuc je prikladna i za stanična ispitivanja dinamičkih promjena u transkripciji gena zbog kratkog vremena poluživota (Thorne i sur., 2010). Za otkriće inhibitora proteina toplinskog šoka (eng. heat shock protein 90, Hsp90) ključnih u terapiji tumora i neurodegenerativnih bolesti razvijen je HTS temeljen na smatanju toplinski denaturirane FLuc (Davenport i sur., 2018), a za HTS novih lijekova koji sprječavaju nepravilno proteinsko smatanje FLuc je iskorištena u obliku PCA testa (Sheahan i sur., 2016).

Također, PCA test s FLuc pokazao se iznimno korisnim u istraživanju signalnih puteva u stanici u koje su uključeni GPCR (Hattori i Ozawa, 2015). Primjerice, spajanje jednog proteinskog fragmenta FLuc s GPCR-om, a drugog s  $\beta$ -arestinom2 ili Rab5 omogućilo je kvantitativnu analizu internalizacije GPCR-a (Lu i sur., 2016). Nadalje, razvijena je posebna osjetljiva platforma za ispitivanje novih lijekova, agonista, antagonista i alosteričkih modulatora ove vrste receptora koja iskorištava FLuc, nazvana GloSensor (Slika 69.) (Fan i sur., 2008). GloSensor se temelji na rekombinantnom senzoru razine cikličkog adenozinmonofosfata (cAMP) u stanici koji je dobiven modifikacijom FLuc. Između N- i C-terminusa FLuc ubačena je domena protein kinaze A (PKA) odgovorna za vezanje cAMP-a ( $R_{II}\beta$ ) čime je omogućeno moduliranje aktivnosti luciferaze u prisutnosti cAMP-a. Stoga se promjena u razini unutarstaničnog cAMP-a, sekundarnog glasnika, zbog aktivacije  $G_s$  ili  $G_i$ -vezanih GPCR-a, može pratiti detekcijom bioluminiscentnog signala (Kumar i sur., 2017).

Osim GloSensor testa, GPCR-ovi koji moduliraju unutarstaničnu razinu cAMP-a se mogu ispitivati pomoću luciferaza kao gena reportera smještenih pod kontrolu elementa odgovora na cAMP (eng. cAMP response element, CRE) (Slika 69.) (Hill i sur., 2001). Povećana razina unutarstaničnog cAMP-a aktivira protein kinazu A (PKA) vezanjem na njezinu regulatornu podjedinicu nakon čega dolazi do oslobađanja njezine katalitičke podjedinice koja migrira između citoplazme i jezgre (Karin i sur., 1994). Katalitička podjedinica fosforilira CRE-vezujući protein (eng. cAMP response element binding protein, CREB) koji se veže na CRE u

promotorskoj regiji luciferaznog gena čija se ekspresija inducira cAMP-om. Stoga se može pratiti aktivacija receptora popraćena povećanjem unutarstanične razine cAMP-a mjerenjem ekspresije luciferaznog gena koji je pod kontrolom CRE.

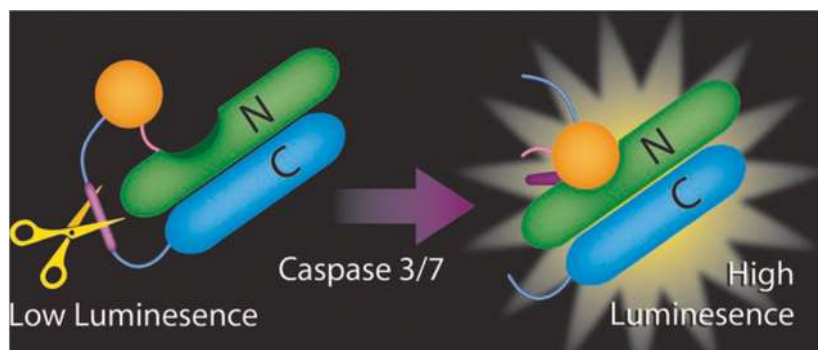


**Slika 69.** Prikaz GloSensor testa i CRE (eng. cAMP response element) reporterskog testa za G $_s$  i G $_i$ -vezani GPCR. Nakon vezanja agonista dolazi do aktivacije GPCR-a i disocijacije G $\alpha$  podjedinice s G $\beta\gamma$  podjedinica. G $_s$  podjedinica stimulira adenilat ciklazu (AC) čime se povećava razine cAMP-a u stanici, a suprotno tome, G $_i$  podjedinica inhibira AC čime se smanjuje razina cAMP-a. Ova promjena u staničnom cAMP-u može se mjeriti bioluminiscencijskim testovima u živim stanicama: (A) GloSensor testom i (B) CRE-luciferaznim testom. U GloSensor testu, nastali cAMP se veže na cAMP-veznu domenu GloSensor proteina, koji je rekombinantna luciferaza kriješnice s cAMP-veznom domenom protein kinaze A (RIIbB). Vezanje cAMP-a na ovo mjesto uzrokuje konformacijsku promjenu rekombinantne luciferaze u aktivni oblik, koji zatim oksidira supstrat D-luciferin u oksiluciferin i emitira svjetlost (A). U CRE reporterskom luciferaznom testu, cAMP aktivira PKA uslijed fosforilacije i nuklearne translokacije CREB-a. Prema tome, ekspresija luciferaze se indirektno regulira indukcijom cAMP (B) (preuzeto i prilagođeno iz Kumar i sur., 2017).

Ovaj način ispitivanja je jako osjetljiv, jednostavan i daje uvid u nizvodne modulatore i inhibitore cAMP/PKA signalnih puteva. Glavno ograničenje ovog testa je to što zahtijeva relativno duže vrijeme izvođenja i postoji mogućnost dobivanja lažno pozitivnih rezultata zbog stimulacije CREB-a koja nije povezana s aktivacijom GPCR-a (Kumar i sur., 2017). Na isti je način moguće pratiti aktivaciju transkripcijskih faktora NF- $\kappa$ B, nuklearnog faktora aktiviranih T-stanica (eng. nuclear factor of activated T-cells, NFAT) i serumskog elementa

odgovora (eng. serum response element, SRE) nakon vezanja liganda na GPCR (Azimzadeh i sur., 2017). Iskorištenje FLuc za ovu namjenu je vrlo bitno jer od 70% odobrenih lijekova na tržištu koji spadaju u male molekule na selektivne ligande GPCR-a otpada 33% (Santos i sur., 2017).

GloSensor se često koristi za detekciju aktivnosti enzima ili proteina u odgovoru na lijekove. Primjerice, razvijena je GloSensor platforma za aktivaciju kaspaza 3/7 (Slika 70.) koja se može koristiti i za prikazivanje aktivnosti brojnih drugih proteaza (Pal i Rehemtulla, 2018). Kaspaze su cistein-aspartat proteaze koje pokreću proces apoptoze razgradnjom proteina bitnih za stanične funkcije, a među njima su efektorske kaspaze 3 i 7 koje se aktiviraju pomoću inicijatorskih kaspaza 8 i 9 koje su, pak, aktivirane u odgovoru na ekstrinzični ili intrinzični signal (Duclos i sur., 2017). Stoga se aktivacija kaspaza 3/7 koristi kao surogatni signal apoptoze (Zhivotovsky, 2003) te je iskorištena za proučavanje procesa apoptoze i narušene regulacije apoptoze u tumorima (Julien i Wells, 2017). Sposobnost neinvazivnog biološkog oslikavanja apoptoze u živim stanicama i životinjskim tumorskim modelima ne samo da može pružiti novi uvid u biološke osnove ove bolesti, već se može koristiti i kao kvantitativna metoda za pretraživanje i procjenu učinkovitosti novih terapijskih strategija u liječenju tumora.



**Slika 70.** Shematski prikaz mehanizma GloSensor testa za kaspaze 3/7. U odgovoru na apoptozu aktiviraju se kaspaze 3/7 te potiču razgradnju peptidne poveznice između N- i C-fragmenta FLuc što rezultira obnovom enzimske aktivnosti FLuc i pojačanjem bioluminiscentnog signala u prisutnosti D-luciferina (preuzeto iz Pal i Rehemtulla, 2018).

U BRET sustavima FLuc nije uobičajena, iako emisija dugih valnih duljina karakteristična za FLuc može biti korisna u otkrivanju PPI-a dubokog sloja, tako da je vrlo rano razvijen BRET sustav koji koristi Fluc kao donorsku molekulu i DsRed kao akceptorski fluorescentni protein (Arai i sur., 2002) u literaturi nazvan BRET3 (isto ime se koristi i za jedan BRET sustav koji

iskorištava RLuc). Međutim, ovaj sustav nije postao popularan poput mnogih BRET sustava temeljenih na RLuc-u, a primjena FLuc je još uvijek vrlo rijetka u današnjim BRET sustavima (Sun i sur., 2016). Jedan od glavnih uzroka tome je glomazna veličina FLuc od 62 kDa (Thorne i sur., 2010). FLuc je gotovo dvostruko veća od RLuc, a to otežava manipulaciju njome i može imati negativan utjecaj na obilježene proteine. Drugo, aktivnost FLucovisi o ATP-u i zahtijeva dodatak magnezijevih kationa, što je dodatno ograničilo njezinu primjenu u BRET-u (De i sur., 2013). Konačno, emisija FLuc osjetljiva je na temperaturu i ionsku snagu, a spektar će biti pomaknut prema crvenom ako se temperatura poveća, što znači da Försterova udaljenost nije konstantna, a rezultat će biti netočan ili zbunjujući (Gammon i sur., 2009).

Luciferaza krijesnice prikladna je i za molekularno oslikavanje *in vivo* na cijelim organizmima jer svjetlost koju emitira sadrži i značajnu frakciju u bliskom infracrvenom (NIR) području spektra pa može prolaziti kroz biološka tkiva. D-luciferin također dobro difundira u tkivima sisavaca (Ciana i sur., 2003) čak i kroz krvno-moždanu, krvno-testisnu barijeru i placentu, a odlikuje ga i niska toksičnost te slaba antigenost (Lipshutz i sur., 2001).

Dakle, FLuc se široko primjenjuje u ranim stadijima otkrića i u pretkliničkim ispitivanjima lijekova, a najčešće je iskorištena u području antitumorskih lijekova. Zadnjih nekoliko godina razvijeni su, primjerice, jednostavni testovi s FLuc kao reporterom za procjenu toksičnosti lijekova koji djeluju na ekspresiju tumorskog supresora p21 (McMahon i sur., 2016), a HTS-om temeljenim na PCA testu s FLuc pretraženi su lijekovi koji uzrokuju stabilizaciju p53 sumoilacijom (Sekar i sur., 2016) u staničnim kulturama i životinjskim modelima. Osim p21, pomoću FLuc kao gena reportera proučeni su transkripcijski faktor TWIST1 zaslužan za poticanje tumorskih metastaza i rezistencije tumora na lijekove (Roberts i sur., 2017) te TWEAK-Fn14 signalni put koji završava aktivacijom transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B i uzrokuje terapijsku rezistenciju glioblastoma, najsmrtonosnijeg oblika karcinoma mozga (Roos i sur., 2017). Pomoću FLuc se može pratiti i ekspresija proteaze 50 specifične za testise (eng. testes-specific protease 50, TSP50) koja je pojačana u tumorskim stanicama i povezana s inhibicijom apoptoze pa se TSP50 nameće kao potencijalna meta antitumorskih lijekova (Wang i sur., 2016). Za praćenje tumorske progresije *in vivo* koriste se i mišji modeli koji ekspimiraju FLuc pod kontrolom E2F1 genskog promotora, aktivnog tijekom proliferacije stanica (Lamprecht Tratar i sur., 2018). Navedene studije pokazale su da su bioluminiscencijski testovi prikladni za razvoj HTS-a za identifikaciju novih antitumorskih lijekova koji ciljaju navedene mete.

Kao platforma za testiranje antitumorskih lijekova razvijena je korioalantoinska membrana (eng. chorioallantoic membrane, CAM) pilećeg embrija na koju su nasadene stanice primarnog pankreasnog duktalnog adenokarcinoma (eng. pancreatic ductal adenocarcinoma cells, PDAC) transducirane lentivirusima koji eksprimiraju FLuc (Rovithi i sur., 2017). Veliki je uspjeh to što je model zadržao histopatološke i genetičke karakteristike originalnog tumora, a tumorski rast se može lako pratiti pomoću bioluminiscentnog signala FLuc.

Pomoću bioluminiscentnih mišjih modela hepatocelularnog karcinoma koji eksprimiraju FLuc otkrivena je antitumorska aktivnost apigenina (Li i sur., 2017a), a seskviterpenski lakton, partenolid, identificiran je kao potencijalni inhibitor Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta čija je pojačana aktivacija karakteristična za tumore (Zhu i sur., 2018). Bioluminiscencijska tehnologija s FLuc iskorištena je u praćenju karcinoma debelog crijeva u mišjem modelu koji oponaša humanu tumorsku progresiju uz intaktni imunوسي antitumorski odgovor (Terracina i sur., 2015), a označavanjem makrofaga povezanih s tumorom (eng. tumor-associated macrophages, TAMs) s FLuc moguće je pratiti migraciju TAMs u tumorske lezije (Choi i sur., 2016). Migracija TAMs u tumorsku leziju potiče tumorsku progresiju pa se navedeni modeli koriste za procjenu djelovanja lijekova koji blokiraju mehanizme tumorske progresije povezane s makrofagima. Na sličan način iskorišteno je i označavanje mastocita s FLuc u praćenju njihove migracije u tumorske lezije na mišjim modelima karcinoma pluća (Oh i sur., 2017).

Antitumorski lijekovi često imaju ozbiljne nuspojave od kojih je najčešća citotoksičnost. Nrf2 (eng. nuclear factor erythroid 2-related factor 2) je glavni regulatorni transkripcijski faktor koji igra ključnu ulogu u antioksidacijskom signalnom putu koji predstavlja zaštitni odgovor organizma na citotoksične efekte uzrokovane antitumorskim lijekovima. Uvođenjem luciferaznog gena pod kontrolu transkripcijskih faktora koji pokreću Nrf2 signalni put, moguće je predvidjeti odgovor tumora na terapiju određenim antitumorskim lijekom i u ranim stadijima otkrića lijekova identificirati spojeve kandidate za lijek koji će ispoljavati citotoksične nuspojave (Ning i sur., 2015). Za mjerenje *in vivo* odgovora na endogeni i egzogeni oksidacijski stres, uključujući i onaj uzrokovan lijekovima, razvijen je i bioluminiscentni mišji model u kojem je ekspresija FLuc spregnuta s ekspresijom hem oksigenaze 1 (McMahon i sur., 2018).

Bioluminiscencija nalazi svoju primjenu i u prijeko potrebnom razvoju novih antimikrobnih lijekova. Bioluminiscencijska tehnologija omogućava stvaranje bioluminiscentnih

mikroorganizama prilagodbom luciferaza za ekspresiju u ispitivanom patogenu. Inokulacijom staničnih kultura ili eksperimentalnih životinjskih modela transformiranim patogenom moguće je pratiti infekciju i njezin odgovor na farmakološku terapiju detekcijom bioluminiscentnog signala (Avcı i sur., 2018).

Općenito, primjena bioluminiscentnog oslikavanja u proučavanju patogena ima prednosti u usporedbi s konvencionalnim strategijama za analizu infekcija u životinjskim modelima (Hutchens i Luker, 2007; Doyle i sur., 2004). Tradicionalne metode lokalizacije i kvantificiranja prisutnosti patogenih mikroorganizama u živim eksperimentalnim životinjskim modelima infekcija uglavnom su se oslanjale na žrtvovanje životinja, uzorkovanje tkiva i brojanje jedinica koje stvaraju kolonije (eng. colony-forming units, CFU) (Chang i sur., 2011). Pomoću BLI infekcije se mogu vizualizirati unutar pojedinih životinja tijekom vremena, bez potrebe za eutanazijom kako bi se odredilo mjesto i količina patogena. Optičko snimanje omogućuje sveobuhvatno ispitivanje svih tkiva i organa, umjesto uzorkovanja mjesta za koja se ranije znalo da su zaražena. Osim toga, točnost inokulacije specifičnih tkiva može se izravno odrediti prije nastavka eksperimenta s životinjama koje su neuspješno cijepljene ispitivanim mikroorganizmom. Varijabilnost između životinja može se kontrolirati, jer BLI omogućuje da se svaka životinja prati pojedinačno (Avcı i sur., 2018).

U literaturi postoje brojni primjeri iskorištenja FLuc za praćenje virusnih, bakterijskih, gljivičnih i parazitskih infekcija te HTS i BLI u razvoju lijekova usmjerenih protiv različitih patogenih mikroorganizama.

Mnogi lijekovi usmjereni protiv virusa humane imunodeficijencije (HIV) su trenutno u prekliničkim i kliničkim fazama razvoja, ali se razvoj ovih lijekova odvija relativno sporo čemu je djelomično uzrok nedostatak prikladnih HTS testova kojima bi se procjenjivao učinak novih antivirusa. Zbog toga su razvijeni bioluminiscencijski HTS za brzu i direktnu metodu pretrage anti-HIV lijekova, u obliku dvostrukog luciferaznog testa s FLuc i RLuc za nadziranje genske ekspresije kemokinskih receptora CCR5 i CXCR4 koji posreduju ulazak HIV-a u stanice (Feng i sur., 2018) i za detekciju inhibitora transkripcijskog trans-aktivatora (eng. transcription trans-activator, Tat) koji je zadužen za transkripcijsku elongaciju virusne RNA (Shin i sur., 2017). Također, ista kombinacija luciferaza u dvostrukom luciferaznom testu je iskorištena i za HTS u kojem se simultano mogu pratiti replikacija HIV-a i citotoksičnost ispitivanih antivirusa (Mitsuki i sur., 2016). Osim za HIV, u zadnjih nekoliko godina pokazano je da se bioluminiscencijski HTS mogu koristiti za pretragu antivirusa

protiv virusa svinjske gripe (Shen i sur., 2014), virusa malih boginja (Liu i sur., 2015) te virusa žute groznice, Dengue-virusa i Zika-virusa (Liu i sur., 2017). Mišji modeli zaraženi bioluminiscentnim uzročnicima infekcije razvijeni su za *in vivo* procjenu djelotvornosti antivirusa protiv virusa ebole (Li i sur., 2016) i Dengue-virusa (Lee i sur., 2017b).

Iako se u istraživanju bakterijskih infekcija više koriste bakterijske luciferaze, i FLuc je moguće unijeti u bakterijske kromosome te stvoriti bioluminiscentne sojeve bakterija (de Wet i sur., 1985; Chang i sur., 2011) za vizualizaciju i praćenje procesa infekcije i imunskog odgovora domaćina na infekciju te ispitivanja učinkovitosti antibiotske terapije i razvoja bakterijske rezistencije na antibiotike. Zadnjih godina, u razvoju antibakterijskih lijekova iskorištene su bakterije *Leptospira interrogans* (Ratet i sur., 2014), *Escherichia coli* (Lowell i sur., 2015), *Mycobacterium bovis* (Ozeki i sur., 2015), *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* i *Streptococcus sanguinis* (Merritt i sur., 2016), *Pseudomonas aeruginosa* (Turcano i sur., 2017), *Borrelia burgdorferi* (Adams i sur., 2017) i dr. transformirane da eksprimiraju FLuc.

Uspješna transformacija gljivica s FLuc za primjenu u ispitivanju novih antifungalnih lijekova *in vitro* i *in vivo* prijavljena je zadnjih godina za *Aspergillus fumigatus* (Papon i sur., 2014), *Candida albicans* (Dorsaz i sur., 2017) i *Mucor circinelloides* (Binder i sur., 2018).

Bioluminiscencijski geni reporteri su revolucionarizirali i područje razvoja antiparazitskih lijekova jer su omogućili lakše razumijevanje biologije parazita i patogeneze infekcije praćenjem genetički modificiranih bioluminiscentnih parazita tijekom različitih stadija njihovih životnih ciklusa u različitim domaćinskim organizmima. Bioluminiscentnim su u zadnjih nekoliko godina pomoću FLuc uspješno učinjeni paraziti *Plasmodium falciparum* (Stone i sur., 2014), *Leishmaniamexicana* (Cardiha i sur., 2017), *Trypanosoma cruzi* (Taylor i Kelly, 2014), *Trypanosoma brucei* (Calvo-Alvarez i sur., 2018), *Giardia lamblia* i *Cryptosporidium parvum* (Hennessey i sur., 2018) te su njihov rast i razmnožavanje praćeni u staničnim kulturama ili životinjskim modelima u odgovoru na farmakološku terapiju čime je dokazano da se bioluminiscencijski testovi mogu koristiti u HTS-u opsežnih knjižnica kemijskih spojeva za identifikaciju i procjenu djelotvornosti novih antiparazitika.

Glavni izazov u BLI parazitskih infekcija bila je nemogućnost vizualizacije malog broja parazita koji su često povezani s kroničnim stadijima bolesti. Primjena FLuc s emisijskim maksimumom pomaknutim prema crvenom području spektra riješila je ovaj problem (Branchini i sur., 2010). Na mišjim modelima infekcije s *Trypanosoma cruzi* pokazano je da

se u razdobljima duljim od 6 mjeseci može kontinuirano pratiti opterećenje organizma parazitom te tkivna raspodjela i djelotvornost lijekova (Taylor i Kelly, 2014).

Iako se bioluminiscencijska tehnologija najviše iskorištava za studije antitumorskih i antimikrobnih lijekova, postoje primjeri nedavne primjene FLuc u HTS-u za identifikaciju novih lijekova kandidata za liječenje osteoporoze (Gong i sur., 2016), reumatoidnog artritisa (Balkrishna i sur., 2019), upalnih bolesti crijeva (Tambuwalla i sur., 2015) te Alzheimerove bolesti (Chen i sur., 2018; Wang i sur., 2018a) i dr.

#### **4.4.2 Luciferaze klišnjaka**

CBRLuc i CBGLuc su kao i FLuc luciferaze ovisne o ATP-u, pa se mogu koristiti u ispitivanju vijabilnosti stanica. Doduše, FLuc je prikladnija za ovaj tip ispitivanja zbog svoje veće aktivnosti, ali su CBLuc u prednosti za mjerenja koncentracije ATP-a u okolišu koji njime nije bogat zbog veće KM vrijednosti (Branchini i sur., 2017).

CBRLuc je poslužila za razvoj HTS za detekciju inhibitora translokacije transkripcijskog faktora p53 u mitohondrije (Noda i sur., 2017). p53 je tumorski supresor koji se aktivira pri oštećenju DNA i oksidacijskom stresu i aktiviran premješta iz citosola u matriks mitohondrija da bi pokrenuo nekrotičnu smrt stanice pa se navedeno HTS ispitivanje može koristiti za otkrivanje lijekova protiv bolesti u kojima nekroza stanica ima značajnu ulogu.

Također, na temelju CBRLuc i CBGLuc su razvijeni PCA konstrukti Simer-R i Simer-G koji sadrže domene estrogenskih receptora za vezanje liganda (Kim i Umezawa, 2016). Mjerenjem intenziteta crvene i zelene bioluminiscencije moguće je pomoću ovih reportera procijeniti agonističko i antagonističko djelovanje određenog spoja nakon njegovog vezanja na estrogenski receptor.

U obliku PCA testa za ispitivanje PPI CBLuc su uključene u stanične biosenzore koji izvještavaju o aktivnosti protein kinaze G (Schramm i sur., 2018) te kemokinskoj signalizaciji (Luker i Luker, 2016).

Na području razvoja novih antiparazitika, CBRLuc i CBGLuc su iskorištene u dvostrukom luciferaznom testu za identifikaciju novih antimalarika usmjerenih na različite razvojne stadije parazita *Plasmodium falciparum*, a posebice gametocita, oblika zaslužnih za transmisiju parazita iz ljudi u komarce i širenje bolesti (Cevenini i sur., 2014).



Također, s CBRLuc je provedena studija *in vivo* mišjeg modela infekcije središnjeg živčanog sustava parazitom *Trypanosoma brucei*, uzročnikom bolesti spavanja (Van Reet i sur., 2014). Dokazana je preferabilnost bioluminiscencijskih sustava koji koriste D-luciferin nad onima koji koriste koelenterazin, uslijed niže cijene i veće bioraspoloživosti D-luciferina, za primjenu u studijama tripanosomijaze i ispitivanju antiparazitika. Koelenterazin, naime, za razliku od luciferina, ne prelazi krvno-moždanu barijeru u dovoljnoj količini (Kaskova i sur., 2016).

U posljednjih nekoliko godina probiotici su postali jedan od obećavajućih oblika terapije različitih bolesti. Ipak, praćenje bakterijskih sojeva nakon njihovog uvođenja u kompleksne ekosustave gastrointestinalnog trakta i procjena učinkovitosti određenog probiotika i dalje predstavlja izazov. U literaturi postoji nekoliko primjera u kojima je bioluminiscencijska tehnologija omogućila praćenje bakterijskih sojeva unutar crijeva te pridonijela boljem razumijevanju interakcija između probiotika i domaćinskog organizma. Za stvaranje bioluminiscentnih sojeva bakterija *Lactobacillus plantarum* i *Lactococcus lactis* iskorišteni su CBRLuc, GLuc i *lux* bakterijska luciferaza (Daniel i sur., 2013), ali je nedugo nakon dokazano da je primjena dvostrukog luciferaznog testa s CBRLuc i CBG99Luc najučinkovitija za simultano praćenje dvaju sojeva bioluminiscentnih mliječnih bakterija u crijevima miševa *in vivo* i *ex vivo* u mišjem fecesu (Daniel i sur., 2015). Također, BRET metodom koja iskorištava CBRLuc u kombinaciji s fluorescentnim proteinom mCherry praćeni su sojevi bakterije *Lactobacillus reuteri* (Karimi i sur., 2016).

Prijavljena je i primjena CBRLuc za transformaciju određenih sojeva mikobakterija na kojima je moguće provesti pretraživanje novih antibiotika te procjenu učinkovitosti antibiotičke terapije na miješane mikobakterijske infekcije u kombinaciji CBRLuc s FLuc (Chang i sur., 2014). Također, kodon optimizirana CBRLuc za ekspresiju u *Lysteria monocytogenes* pokazala je veću osjetljivost za BLI bakterijskih infekcija od bakterijske luciferaze (Ur Rahman i sur., 2017).

U gljivicu *Candida albicans* CBRLuc i CBGLuc se uspješno uvedeni pod kontrolu genskih promotora gljivice koji su aktivni tijekom morfogeneze hifa čime je dokazano da se bioluminiscencijsko ispitivanje u u jednostavnoj izvedbi genskog reporterstva može koristiti za identifikaciju novih antifungalnih lijekova te procjenu njihove učinkovitosti (Kapitan i sur., 2016).

#### 4.4.3 *Luciola* luciferaza

U zadnjih 5 godina u literaturi je zabilježena samo jedna studija koja iskorištava *Luciola* luciferazu, a može se primjeniti u razvoju lijekova. U njoj je procijenjena učinkovitost kapecitabina i fotodinamičke terapije u mišjem modelu karcinoma dojke (Anand i sur., 2019). Ranije studije koje uključuju *Luciola* luciferazu popisane su drugdje (Kaskova i sur., 2016).

#### 4.4.4 *Renilla* luciferaza

Najčešća primjena RLuc je u BRET sustavima. S RLuc su razvijeni su različiti stanični senzori temeljeni na BRET-ukoji su primjenjivi u HTS-u, npr. za praćenje autofagije *in vivo* i *in vitro* (Woo i sur., 2017) ili dimerizacije opioidnih receptora (Baiula, 2015).

Među brojnim BRET sustavima za proučavanje GPCR-ova (Unal, 2019), razvijen je i konformacijski biosenzor temeljen na intramolekularnom BRET-u s RLuc koji se može koristiti za identifikaciju ortosteričkih i alosteričkih liganda GPCR-ova (Sleno i sur., 2016). BRET s RLuc8 i mVenus korišten je za proučavanje vezanja liganda na GPCR histaminske receptore H<sub>1</sub> (Bosma i sur., 2016).

U proučavanju GPCR signalizacije RLuc je našao primjenu i u obliku PCA testa, primjerice, spajanje jednog proteinskog fragmenta RLuc s GPCR-om, a drugog s  $\beta$ -arestinom2 ili Rab5 omogućilo je kvantitativnu analizu internalizacije GPCR-a (Lu i sur., 2016).

RLuc se često koristi i u obliku PCA testa za razne namjene, npr. za pretraživanje spojeva koji utječu na pravilno smatanje proteina (Sheahan i sur., 2016) ili potiču apoptozu tumorskih stanica posredovanu aktivacijom kaspaze-3 u mišjem modelu humanog glioma (Singh i sur., 2016). Također, pomoću RLuc PCA HTS testa su dekvalinijev klorid i klofoktol identificirani kao inhibitori Cdc7 (eng. cell division cycle 7) serin/reonin kinaze pretjerano eksprimirane u tumorskim stanicama s važnom ulogom u inicijaciji DNA-replikacije i toleranciji na oštećenja DNA (Cheng i sur., 2018).

Nadalje, RLuc je uklopljena u znatan broj HTS pretraga antivirusika, posebice za viruse protiv kojih još nisu razvijeni učinkoviti lijekovi. PCA test s RLuc iskorišten je za HTS antivirusika usmjerenih protiv koronavirusa koji uzrokuje respiratorni sindrom srednjeg Istoka (eng. Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV). Nafamostat je među 1000 pretraženih spojeva identificiran kao potentni inhibitor transmembranske serinske proteaze u stanicama domaćina zadužene za aktivaciju virusnog S-proteina (Yamamoto i sur., 2016).

Virusni S-protein se nalazi u ovojnici virusa i posreduje ulazak virusa u stanice domaćina nakon aktivacije proteazama.

Dengue virus i virus Zapadnog Nila uzrokuju tešku hemoragijsku vrućicu i oko 25 000 smrti godišnje. Pomoću HTS-a s RLuc pretražena je knjižnica 120 000 kemijskih spojeva u potrazi za inhibitorima virusnih proteaza koji bi zaustavljali replikaciju ovih virusa te je 8 spojeva pobliže analizirano kako bi se utvrdilo njihovo djelovanje na replikaciju virusa i citotoksičnost, a 3 spoja su se pokazala potentnim inhibitorima virusnih proteaza zadovoljavajućih svojstava (Balasubramanian i sur., 2016). Također, u *in vivo* ispitivanju učinkovitosti lijekova protiv virusa Rift Valley groznice, među 727 spojeva je dokazano da mitoksantron može ublažiti težinu bolesti u mišjim modelima, iako ni jedan spoj nije potpuno suzbio infekciju (Lang i sur., 2019).

U dvostrukom luciferaznom testu s FLuc je RLuc omogućila praćenje replikacije virusa HIV-a i evaluaciju antiretrovirotika (Shin i sur., 2017; Mitsuki i sur., 2016), pretragu inhibitora replikacije Zika virusa (Li i sur., 2018) i praćenje patogeneze Ebola virusa te identifikaciju spojeva koji djeluju na virusni protein 24 (VP24) koji inhibira signalizaciju potaknutu interferonom i imunski odgovor na virusnu infekciju (Fanunza i sur., 2018).

Dvostruki luciferazni test s RLuc je uključen u otkriće lijekova protiv hemoglobinopatija poput bolesti srpastih stanica. Omogućio je, npr. identifikaciju oko 1000 potencijalnih lijekova kandidata koji djeluju na aktivaciju  $\gamma$ -globin gena (Xie i sur., 2016) te u drugoj studiji 232 spoja koja induciraju ekspresiju  $\gamma$ -globina od koji je 7 odabrano za potencijalne buduće lijekove i pušteno u daljnji razvoj (Peterson i sur., 2014).

Još neke od primjena dvostrukog luciferaznog testa s FLuc i RLuc su HTS onkofetalnih kromatinskih faktora bitnih za transformaciju tumorskih stanica i metastaziranje, koji bi mogli biti mete novih antitumorskih lijekova za agresivne maligne bolesti (Peter i sur., 2016) i praćenje genske ekspresije upalnih procesa u astrocitima posredovanih sfingozin-1-fosfatom (Dusaban i sur., 2017).

#### **4.4.5 *Gaussia* luciferaza**

Luciferaze koje se izlučuju iz stanica danas se široko koriste kao osjetljivi reporteri u različitim *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima uključujući PCA i imunološke analize, HTS i BLI *in vivo*. Najpopularnija je ipak njihova primjena u HTS-u za pretraživanje modulatora genske ekspresije jer se korištenjem luciferaza koje se izlučuju iz stanice može izbjeći korak lize

stanica prije mjerenja bioluminiscentnog signala (Auld i sur., 2018). GLuc je čak uspješno iskorištena kao reporter izlučen u krv za neinvazivno *ex vivo* praćenje bioloških procesa u životinjama (progresiju tumora čak i u nepristupačnim mjestima, metastaza, odgovora na farmakološku terapiju, transfer gena i aktivaciju transkripcijskih faktora), a za detekciju njezine aktivnosti bilo je potrebno samo nekoliko mikrolitara krvi (Bovenberg i sur., 2013; Wurdinger i sur., 2008).

Veliki broj studija posvećen je istraživanju PPI pomoću PCA testa (Luker i Luker, 2014). Budući da prostorna struktura GLuc još nije otkrivena, parovi za PCA test izabrani su između fragmenata GLuc podijeljenih na različitim mjestima na temelju svoje sposobnosti da ponovnim spajanjem obnove aktivnost luciferaze (Remy i sur., 2006). Izabrani su parovi fragmenata od 1-109. i 110-169. aminokiseline GLuc s molekulskom masom od 9-10 kDa, a njihova komplementacija je uzrokovala obnavljanje samo 10% početne aktivnosti GLuc, ali je ta vrijednost ipak premašila specifičnu aktivnost intaktnih RLuc i FLuc (Auld i sur., 2018; Tannous i sur., 2005).

Različite nedavne primjene GLuc fragmenata u PCA uključuju povezivanje kemokina sa specifičnim receptorima *in vivo* (Luker i Luker, 2014), dimerizaciju prekursora amiloidnih peptida (Decock i sur., 2015), otkrivanje mehanizma lipidne regulacije u *Drosophila* i miševima detekcijom interakcija između 487 droplet-asociiranih proteinskih parova (Kolkhof i sur., 2017), otkrivanje PPI tijekom apoptoze (Gilad i sur., 2014), ciljanje fragmenata  $\alpha$ -sinukleina za otkriće lijekova za sinukleinopatije (Moussaud i sur., 2015) itd.

Također, za *in vitro* ispitivanje, GLuc je konjugirana s protutijelom za detekciju interferona- $\gamma$  (Moutsopoulos i sur., 2017). Genetičkim spajanjem GLuc s transportnim proteinom cinka (ZnT8) koji je identificiran kao autoimuna meta u šećernoj bolesti tipa 1 stvoren je protein koji se izlučuje iz stanica insekata u kojima je eksprimiran i može biti primjenjen bez pročišćavanja za određivanje autoantitijela na ZnT8 u serumu pacijenata (Ustinova i sur., 2014). Metoda se pokazala osjetljivijom nego ELISA.

HTS s GLuc iskorišten je za pretraživanje antivirotika protiv virusa Zapadnog Nila ubacivanjem GLuc u pseudo-infektivni reporterski virusni vektor (Zhang i sur., 2017b) i antivirotika protiv virusa gripe koji inhibiraju nastajanje kompleksa virusne polimeraze (Li i sur., 2017b).

GLuc mutant (M60L/M127L) s produljenom emisijom svjetlosti spojen je s humanim inzulinom te je pomoću njega pretražena knjižnica prirodnih produkata u potrazi za modulatorima izlučivanja inzulina (Kalwat i sur., 2016).

Od svih luciferaza veslonožaca u BLI se uglavnom koriste GLuc i MLuc164 izoforma iz *M. longa*.

Primjeri novijih primjena GLuc u BLI *in vivo* uključuju praćenje izlučenih proteinskih terapijskih meta spojenih s GLuc, npr. humanog inzulina (Suzuki i sur., 2017; Kalwat i sur., 2016), izlučenih intrapulmonarnih i cirkulatornih proteina u miševima za procjenu ishoda genske terapije (Paul-Smith i sur., 2018), pretkliničke mišje modele leukemije mastocita (Bibi i sur., 2016), malignog glioma (Alessandrini i sur., 2016) itd.

Za procjenu učinka antimikrobnih lijekova pomoću GLuc u bioluminiscentne sojeve transformirani su *Candida albicans* (Delarze i sur., 2015), *E. coli* (Liu i sur., 2014), *Mycoplasma sp.* (Degeling i sur., 2014), enterovirus 71 (Xu i sur., 2015), influenza A virus (Eckert i sur., 2014) i dr.

GLuc je i jedna od luciferaza u razvijenim trostrukim luciferaznim testovima uz FLuc i CLuc za kvantifikaciju aktivnosti Src kinaze u živim stanicama i *in vivo* u miševima (Leng i sur., 2016) i uz FLuc i RLuc u *in vivo* optičkom oslikavanju NF- $\kappa$ B aktivnosti i apoptoze u karcinomu dojke (Mezzanotte i sur., 2014).

#### **4.4.6 *Metridia* luciferaza**

HTS ispitivanja koja iskorištavaju MLuc stvorena su s ciljem identifikacije spojeva koji će aktivirati gensku ekspresiju faktora induciranih hipoksijom (eng. hypoxia-inducible factors, HIFs) jer su oni potencijalne terapijske mete za sprječavanje progresije ishemijskih bolesti srca, bubrega i mozga (Tsujita i sur., 2015). Primjerice, jedna je studija prijavila da aminokiselinski derivati s furanom i tiofen-2-karbonilom u strukturi aktiviraju HIFs inhibicijom faktora koji inhibiraju HIF-1 (FIH-1) (Kawaguchi i sur., 2018).

Također, prijavljena je primjena MLuc u HTS-u za identifikaciju spojeva s protuvirusnim djelovanjem usmjerenim na citomegalovirus (Koshizuka i sur., 2018).

*In vivo* primjena MLuc uključuje detekciju bioluminiscentnih stanica, npr. živih cirkulirajućih stanica karcinoma prostate u krvi pomoću reporterskog adenovirusa selektivnog za tumore označenog s MLuc (Wu i sur., 2014) te praćenje diferencijacije stanica skeletnih mišića

(Öztürk-Kaloglu i sur., 2017) i hondrocita (Oberbauer i sur., 2016) u stvarnom vremenu. Pomoću MLuc je također istražen signalni put u koji je uključen aneksin A6 eksprimiran u velikim količinama u artikularnim hondrocitima za koji je zaključeno da završava aktivacijom NF- $\kappa$ B transkripcijskog faktora (Minashima i Kirsch, 2018) te da bi aneksin A6 mogao biti potencijalna meta protuupalnih lijekova. NF- $\kappa$ B signalni put je ispitan pomoću MLuc i u patogenu *Porphyromonas gingivalis* uključenom u kronični periodontitis (Tada i sur., 2016).

Zbog visoke termostabilnosti MLuc je uspješno iskorištena u studijama stanične hipertermije uzrokovane zagrijavanjem nanočesticama (Mukherjee i sur., 2014).

MLuc je jedna od luciferaza korištenih u novom Matador ispitivanju citotoksičnosti koje iskorištava svojstva novijih morskih luciferaza jakog intenziteta bioluminiscencije i dugog poluvremena života, a može se primjeniti za razvoj novih citostatika i imunostatika (Matta i sur., 2018).

#### **4.4.7 *Cypridina* luciferaza**

Prethodne primjene CLuc luciferaze sažete su u preglednom radu (Kaskova i sur., 2016), a u zadnjih nekoliko godina postoji tek nekolicina primjera iskorištenja CLuc luciferaze, posebice u razvoju lijekova.

U dvostrukom luciferaznom testu je CLuc iskorištena za *ex vivo* kontinuirano praćenje tumorske progresije u miševima (Morita i sur., 2016). Po potrebi su informacije dobivene s CLuc upotpunjene *in vivo* BLI za analizu prostorne raspodjele tumorskih stanica u mišjem organizmu. Ovakvim oblikom ispitivanja se postižu uštede luciferina i smanjuje stres kojem su izložene male životinje u eksperimentu te omogućuje dugoročno nadziranje tumorske progresije.

U HTS ispitivanju modulatora interleukin-6 (IL-6) signalnog puta u stanicama jetre uz pomoć CLuc je ustanovljena potencijalna terapijska vrijednost određenih mikroRNA za liječenje kronične jetrene bolesti i nekih tumora (Servais i sur., 2019). IL-6 i ostali njemu slični citokini dijele zajednički receptor glikoprotein 130 (gp130) koji aktivira signalnu kaskadu koja uključuje Janus kinaze (JAK) i transkripcijske faktore za provođenje signala i aktivaciju transkripcije (eng. signal transducer and activator of transcription, STAT). CLuc je uvedena u reporterski vektor pod kontrolu STAT-elemenata odgovora pa se ovaj stanični sustav može koristiti i za identifikaciju drugih spojeva koji utječu na JAK/STAT signalni put narušen u nizu bolesti.

#### 4.4.8 NanoLuc® luciferaza

Primjena NLuc omogućila je napredak u praćenju vijabilnosti stanica korištenjem luciferinskog prosupstrata. Luciferinski prosupstrat sintetiziran je tako da ga samo žive stanice mogu prevesti u aktivni supstrat za NLuc luciferazu koji će polučiti bioluminiscentni signal. Izravnim dodatkom NLuc i luciferinskog prosupstrata u medij stanične kulture omogućena je detekcija živih stanica tijekom 96 h bez narušavanja staničnih funkcija (Duellman i sur., 2015).

U razvoju antitumorskih lijekova NLuc je uspješno iskorišten za identifikaciju spojeva koji inhibiraju HIF-1 signalizaciju pa time i ekspresiju vaskularnog endotelnog faktora rasta (eng. vascular endothelial growth factor, VEGF) odgovornog za rast tumora zbog pojačanog dotoka krvi u tumorske stanice uslijed angiogeneze (Hsu i sur., 2016) te za razjašnjavanje signalnih puteva u koje je VEGF uključen u dječjem hemangiomu (Kilpatrick i sur., 2019).

NLuc je zbog svoje male veličine našao široku primjenu u proučavanju patogeneze virusnih infekcija i razvoju antivirusika. Uklopljen je, primjerice, u ekspresijske vektore za virus bjesnoće (Anindita i sur., 2016), Sindbis, Chikungunya i istočni i venecuelanski konjski virus encefalitisa (Sun i sur., 2014) te u nekoliko rodova virusa iz porodice *Flaviviridae* (Tamura i sur., 2018). Za razliku od većih reportera kojima se tijekom virusne replikacije smanjivala razina ekspresije, NLuc je pokazao veću stabilnost, a virusni vektori koji su eksprimirali NLuc uzrokovali su infekcije slične težine kao njihovi nemođificirani roditeljski virusi. Iskorišten je i za konstrukciju reportera za virus hepatitisa B (Nishitsuji i sur., 2015) i virus HIV-a (Thomas i sur., 2016; Seay i sur., 2015) pri čemu je njegova velika osjetljivost omogućila kvantifikaciju replikacije virusa pri niskim razinama na početku infekcije.

Osim u virusima, eksprimiran je u *Plasmodium falciparum* (Azevedo i sur., 2014) i *Plasmodium berghei* (De Niz i sur., 2016) za praćenje parazita tijekom njihovih životnih ciklusa i u HTS-u za identifikaciju novih spojeva s antimalarijskim djelovanjem. Također, amastigoti *Leishmania mexicana* uspješno su uz NLuc vizualizirani slobodni i unutar makrofaga, a ujedno je otkriveno da određeni spojevi aktivni protiv *Mycobacterium tuberculosis* pokazuju i djelovanje protiv *L. mexicana* (Berry i sur., 2018).

Pomoću NLuc transformirani su sojevi bakterije *Streptococcus A* koji proizvode puno intenzivniju bioluminiscenciju nego sojevi s FLuc, no FLuc se u ovom slučaju ipak pokazao

boljim jer može razlikovati metabolički aktivne i neaktivne bakterije što NLuc ne može jer je njegova bioluminiscencijska reakcija ATP-neovisna (Loh i Proft, 2014).

Agregacija proteina se smatra ključnim faktorom u nekoliko bolesti od Huntingtonove do Alzheimerove pa ipak još uvijek ne postoji dovoljno testova kojima bi se *in vitro* i *in vivo* ispitivala agregacija proteina. U tu svrhu je NLuc iskorišten u obliku PCA testa (Zhao i sur., 2016). Jedan fragment NLuc (N64) spojen je na protein za koji je poznato da stvara agregate, a drugi fragment NLuc korišten je za mjerenje razine agregacije proteina. Ako protein od interesa ne podliježe agregaciji, dodatak drugog fragmenta NLuc luciferaze obnovit će aktivnost NLuc nakon dodatka furimazina, dok je u suprotnom smanjenje intenziteta bioluminiscencije proporcionalno razini proteinske agregacije. Klasični oblik PCA testa s NLuc, tzv. NanoBit korišten je za istraživanje PPI u patogenezi amiotrofične lateralne skleroze i za identifikaciju spojeva koji djeluju na dimerizaciju superoksid dismutaze 1 (SOD1) (Oh-Hashi i sur., 2016) te za proučavanje interakcija između  $\beta$ -arestina2 i humanog A3 adenozienskog receptora, podvrste GPCR eksprimiranog u velikim količinama u upalnim i tumorskim stanicama, kao potencijalne mete za liječenje reumatoidnog artritisa, psorijaze i hepatocelularnog karcinoma (Storme i sur., 2018).

NLuc je u BRET-u kombiniran s fluorescentnim antagonistima histaminskih H<sub>1</sub> receptora za proučavanje kinetike vezanja liganada na histaminske receptore i razvoj HTS-a za identifikaciju novih antihistaminika (Stoddart i sur., 2018). Histaminski receptori spadaju u GPCR-ove, a NanoBRET je često korišten za njihovo proučavanje (Stoddart i sur., 2015) jer je u zadnjih nekoliko godina sve jasnija važna uloga GPCR signalizacije u razvoju tumora (Nieto Gutierrez i McDonald, 2018). Primjerice, konstruiran je mišji model humanog karcinoma dojke koji eksprimira  $\beta_2$ -adrenoceptore vezane na NLuc te omogućuje vizualizaciju signalizacije  $\beta_2$ -adrenoceptorima uz pomoć fluorescentnog analoga propranolola (Alcobia i sur., 2018). Propranolol je klasični antagonist  $\beta_2$ -adrenoceptora čija je djelotvornost u nekim vrstama karcinoma potvrđena klinički, ali nije mu još u potpunosti razjašnjen mehanizam djelovanja u tumorskim stanicama.

NanoBRET je primjenjiv i za proučavanje signalizacije receptorskim tirozin kinazama (Kilpatrick i sur., 2017) i unutarstaničnim kinazama (Robers i sur., 2015).

Također, BRET s NLuc i žutim fluorescentnim proteinom za vizualizaciju procesa od vezanja inzulina za receptore (Shigeto i sur., 2015) i s posebnim fluorescentnim konstruktima LumiFlours za detekciju mikrometastaza u limfnim čvorovima (Schaub i sur., 2015).



U obliku dvostrukog luciferaznog testa NLuc je korišten s FLuc za vizualizaciju tumora mozga i sistemskih metastaza u mišjim modelima (Germain-Genevois i sur., 2016). NLuc je pokazao veću aktivnost *ex vivo*, ali je *in vivo* FLuc imao veći bioluminiscentni signal zbog boljih svojstava prodiranja svjetlosti kroz tkivo. Slična studija s NLuc i FLuc je provedena i za praćenje virusne infekcije u miševima (Sun i sur., 2014), a pokazalo se da iako je FLuc jačeg signala u individualnim zaraženim tkivima, signal na razini cijelog tijela od NLuc se mogao detektirati tijekom 48 h nakon injekcije supstrata i bio je intenzivniji od ukupnog signala s FLuc u istom trenutku.

Na temelju NLuc razvijena su bioluminiscentna protutijela na lijekove koja se mogu detektirati snimanjem jeftinom kamerom spojenom na pametni telefon (Xue i sur., 2017). Stoga protutijela na lijekove označena NLuc mogu biti iskorištena za dijagnostiku uz bolesnika (eng. point of care, PoC)– primjerice, terapijsko praćenje doze (eng. therapeutic drug monitoring, TDM) kvantifikacijom lijekova u krvi ili serumu na papiru. Na takav je način iskorištena primjerice yNLuc pod kontrolom humanog  $\alpha$ -estrogenskog receptora u NanoYes platformi u *S. cerevisiae* za otkrivanje endokrinih disruptora s estrogenskim djelovanjem (Cevenini i sur., 2017).

Također, NLuc je iskorišten za bioluminiscencijski stanični biosenzor koji se može detektirati pametnim telefonom, a učinkovitost sustava potvrđena je ispitivanjem antiupalne aktivnosti i toksičnosti spojeva iz ekstrakta komine bijelog grožđa (Cevenini i sur., 2016). Ovakav bi sustav mogao zadovoljiti potrebe malih poduzeća kojima nedostaje potpuno opremljen laboratorij za sigurnosne testove prvog stupnja i brzu pretragu novih bioaktivnih produkata.

#### **4.4.9 Bakterijske luciferaze**

Bakterijski *lux* geni optimizirani su za primjenu u eukariotskim stanicama (Gupta i sur., 2003) i stanicama sisavaca (Patterson i sur., 2005), no i dalje je najkorištenija i najpouzdanija njihova primjena u stvaranju bioluminiscentnih sojeva bakterija, posebice u onim studijama koje su primjenjive u procesu otkrivanja i razvoja lijekova. Transformirani bioluminiscentni sojevi bakterija se zatim mogu koristiti npr. za identifikaciju novih antimikrobnih lijekova ili procjenu učinkovitosti već poznatih protiv višestruko rezistentnih (eng. multi drug resistant, MDR) bakterija. Također, česta je njihova primjena u otkrivanju mogućnosti prenamjene postojećih antimikrobnih lijekova za liječenje infekcija nekim drugim mikroorganizmima.

Veliki broj primjena bakterijske luciferaze uključuje bioluminiscentne sojeve *M. tuberculosis* za HTS pretraživanje prijekopotrebnih novih antituberkulotika. Primjerice, razvijeni su *in vitro* i *in vivo* testovi za ispitivanje potentnosti lijekova protiv *M. tuberculosis* u njezinom dormantnom stadiju (Vocat i sur., 2015) te za istraživanje mehanizma djelovanja antituberkulotika za koje se pretpostavlja da inhibiraju sintezu stanične stijenke bakterija (Naran i sur., 2016). U jednoj je studiji HTS-om knjižnice 4400 prirodnih produkata iz morskih organizama otkriven jedan spoj koji potentno i selektivno djeluje i na aktivnu i dormantnu fazu razvoja *M. tuberculosis*, a ujedno su puupehenonski spojevi identificirani kao inhibitori dormantne faze (Rodrigues Felix i sur., 2017). Nadalje, na temelju farmakofora iz lijeka celekoksiba sintetizirana su 64 spoja od kojih se 6 pokazalo potencijalnim kandidatima za lijek protiv tuberkuloze (Salunke i sur., 2015).

HTS proveden s 645 000 spojeva identificirao je 8 potencijalnih inhibitora rezistencije *P. aeruginosa* na  $\beta$ -laktamske antibiotike (Collia i sur., 2018), a u mišjim modelima cistične fibroze dokazano je da klaritromicin i inhibitori proteaza inhibiraju različite faktore virulencije *P. aeruginosa* i stoga su poželjna dodatna terapija u ublažavanju upale pluća uzrokovane infekcijom ovim patogenom kod pacijenata s cističnom fibrozom (Sandri i sur., 2018).

Uvođenjem *lux* gena i *Brucella melitensis* (Kassem i sur., 2016), *Streptococcus A* (Lamb i sur., 2018) te *S. aureus* preinačeni su za razvoj bioluminiscentnih mišjih modela bakterijske sepse i infekcije opeklinških rana (Ogunniyi i sur., 2018).

Pomoću bioluminiscentnog MDR soja *Streptococcus pneumoniae* otkrivena su 4 nova spoja izolirana iz rijetkih aktinomiceta sa 16 puta jačim antimikrobnih djelovanjem od levofloksacina (Tiwari i sur., 2015).

Vrijednost biljke *Asphodelus microcarpus* u razvoju novih antimikrobnih lijekova dokazana je nakon ispitivanja na 13 različitih mikroorganizama (Di Petrillo i sur., 2017). Etanolni ekstrakt njezinih listova je pokazao jaku inhibiciju rasta Gram negativnih bakterija, umjerenu Gram pozitivnih bakterija, a protiv kvasaca nije ispoljio djelovanje. Također, pokazao se djelotvornim za zaustavljanje replikacije Ebola virusa te je inhibirao stvaranje biofilma *E. coli*, *S. aureus*, *S. haemolyticus* i *Bacillus clausii*.

Za ispitivanje djelotvornosti antibiotika i njihovog međusobnog sinergijskog djelovanja razvijen je robustan, brz i cijenovno isplativ HTS koji među 39 MDR sojeva uključuje i *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* i *Acinetobacter baumannii* (Kim i sur., 2016).

Iako je prethodno uspješno provedeno BLI tumora uz pomoć bioluminiscentnih bakterija usmjerenih na tumore (Yu i sur., 2004), posljednjih godina nisu prijavljene slične studije. Jedan od načina na koji bakterijska luciferaza može biti iskorištena u razvoju antitumorskih lijekova je metoda inducirano metaboličkog bioluminiscentnog oslikavanja (imBI). imBI se temelji na detekciji spojeva uključenih u proces glikolize - laktata, piruvata, glukoze i ATP-a u tumorima. Ova metoda omogućuje metaboličku klasifikaciju tumora te praćenje promjena u glikolizi u tumorskim stanicama i na taj način doprinosi boljem razumijevanju progresije tumora i poboljšanju antitumorske terapije (Indraccolo i Mueller-Klieser, 2016).

Bioluminiscentne humane stanice koje sadrže *lux* gene stvorene su s ciljem detekcije djelovanja prolijekova prije i poslije metabolizma u uvjetima koji odgovaraju onima u ljudskom organizmu (Xu i sur., 2017). Time se može smanjiti veliki postotak neuspjeha spojeva kandidata za lijekove u kliničkoj fazi razvoja. Također, za procjenu citotoksičnosti spojeva stvoren je stanični biosenzor s HEK293 stanicama koje eksprimiraju bakterijsku luciferazu i ne zahtijevaju dodatak egzogenog supstrata (Class i sur., 2015) koji može biti iskorišten za procjenu sigurnosti potencijalnih lijekova prije njihove daljnje optimizacije.

## 5. ZAKLJUČCI

Bioluminiscencijski reporterski geni uspješno su izolirani i klonirani iz raznih vrsta organizama i već se dugi niz godina upotrebljavaju u procesu razvoja lijekova.

Luciferaze za koje kodiraju bioluminiscencijski geni reporteri razlikuju se svojom veličinom, proteinskim strukturama, vrstom luciferina koje koriste za bioluminiscencijsku reakciju te fizikalno-kemijskim svojstvima. Stoga svaka luciferaza ima svoje prednosti i nedostatke za primjenu u određenim vrstama ispitivanja.

U ranim fazama razvoja lijekova bioluminiscencijska tehnologija može ponuditi najveći doprinos u vidu pojednostavljenja, povećanja osjetljivosti te ubrzanja i smanjenja troškova HTS ispitivanja koja se koriste u otkrivanju novih spojeva kandidata za lijekove, razjašnjavanju mehanizma djelovanja i procjeni djelotvornosti lijekova.

U pretkliničkoj fazi razvoja lijekova bioluminiscentno biološko oslikavanje *in vivo* omogućuje osjetljivo, neinvazivno, kvantitativno praćenje patogeneze bolesti i odgovora na farmakološku terapiju u životinjskim modelima. Također, u skladu s etičkim zahtjevima omogućuje korištenje manjeg broja životinja u istraživanjima i smanjene njihove patnje. Najčešće je korišteno za praćenje infekcije ili progresije tumora te procjenu učinkovitosti antiinfektivnih i antitumorskih lijekova.

U kliničku fazu razvoja lijekova nije vjerojatno da će se bioluminiscencijski geni reporteri uspješno uključiti, ali zato u ranijim fazama razvoja lijeka nude bitne prednosti pred konvencionalno korištenim metodama.

Iako primjena bioluminiscencijskih metoda nailazi na određena ograničenja, većini se nedostataka može doskočiti usavršavanjem luciferaza genetičkim inženjerstvom ili kemijskom sintezom novih luciferinskih supstrata s boljim svojstvima.

Sve ubrzanijim napretkom tehnologije, molekularne biologije, genetičkog inženjerstva i sintetske kemije otkrivaju se novi načini na koje se može iskoristiti veliki potencijal primjene bioluminiscencijskih gena reportera.

## 6. LITERATURA

- Adams PP, Flores Avile C, Jewett MW. A Dual Luciferase Reporter System for *B. burgdorferi* Measures Transcriptional Activity during Tick-Pathogen Interactions. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017,7, 225.
- Adrio JL, Demain AL. Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered bugs*, 2010, 1, 116-131.
- Ajit D, Simonyi A, Li R, Chen Z, Hannink M, Fritsche KL, Mossine VV, Smith RE, Dobbs TK, Luo R, Folk WR, Gu Z, Lubahn DB, Weisman GA, Sun GY. Phytochemicals and botanical extracts regulate NF- $\kappa$ B and Nrf2/ARE reporter activities in DI TNC1 astrocytes. *Neurochem Int*, 2016, 97, 49-56.
- Alam R, Karam LM, Doane TL, Zylstra J, Fontaine DM, Branchini BR, Maye MM. Near infrared bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase--quantum dot bionanoconjugates. *Nanotechnology*, 2014, 25(49), 495606.
- Alcobia DC, Ziegler AI, Kondrashov A, Comeo E, Mistry S, Kellam B, Chang A, Woolard J, Hill SJ, Sloan EK. Visualizing ligand binding to a GPCR *in vivo* using NanoBRET. *iScience*, 2018, 6, 280-288.
- Alessandrini F, Ceresa D, Appolloni I, Marubbi D, Malatesta P. Noninvasive monitoring of glioma growth in the mouse. *J Cancer*, 2016, 7, 1791–1797.
- Allard STM i Kopish K. Luciferase reporter assays: Powerful, adaptable tools for cell biology research. *Cell Notes*, 2008, 21, 23–6.
- Allen MS, Wilgus JR, Chewning CS, Saylor GS, Simpson ML. A destabilized bacterial luciferase for dynamic gene expression studies. *Syst Synth Biol*, 2007, 1, 3-9.
- Almeida PE, van Rappard JRM, Wu JC. *In vivo* bioluminescence for tracking cell fate and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301, H663–H671.
- Almond B, Hawkings E, Stecha P, Garvin D, Paguio A, Butler B, Beck M, Wood M, Wood K. A New Luminescence: not your average click beetle. *Promega Notes*, 2003, str. 11–14.
- Anand S, Yasinchak A, Bullock T, Govande M, Maytin EV. A non-toxic approach for treatment of breast cancer and its metastases: capecitabine enhanced photodynamic therapy in a murine breast tumor model. *J Cancer Metastasis Treat*, 2019, 5, 6.
- Anderson JC, Grounds H, Jathoul AP, Murray JAH, Pacman SJ, Tisi L. Convergent synthesis and optical properties of near-infrared emitting bioluminescent infra-luciferins. *RSC Adv*, 2017, 7, 3975-3982.
- Ando Y, Niwa K, Yamada N, Enomoto T, Irie T, Kubota H, Ohmiya Y, Akiyama H. Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission. *Nat Photonics*, 2008, 2, 44–47.
- Andreu N, Zelmer A, Fletcher T, Elkington PT, Ward TH, Ripoll J, Parish T, Bancroft GJ, Schaible U, Robertson BD, Wiles S. Optimisation of bioluminescent reporters for use with mycobacteria. *PLoS One*, 2010, 5(5), e10777.

- Anindita PD, Sasaki M, Nobori H, Sato A, Carr M, Ito N, Sugiyama M, Orba Y, Sawa H. Generation of recombinant rabies viruses encoding NanoLuc luciferase for antiviral activity assays. *Virus Res*, 2016, 215, 121-8.
- Arai R, Nakagawa H, Kitayama A, Ueda H, Nagamune T. Detection of protein-protein interaction by bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase to red fluorescent protein. *J Biosci Bioeng*, 2002, 94(4), 362-4.
- Arranz A i Ripoll J. Advances in optical imaging for pharmacological studies. *Front Pharmacol*, 2015, 6, 189.
- Aron AT, Heffern MC, Lonergan ZR, Vander Wal MN, Blank BR, Spangler B, Zhang Y, Park HM, Stahl A, Renslo AR, Skaar EP, Chang CJ. *In vivo* bioluminescence imaging of labile iron accumulation in a murine model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114, 12669-12674.
- Aswendt M, Adamczak J, Couillard-Despres S, Hoehn M. Boosting bioluminescence neuroimaging: an optimized protocol for brain studies. *PLoS One*, 2013, 8(2), e55662.
- Auld DS, Narahari J, Ho P, Casalena D, Nguyen V, Cirbaite E, Webb B. Characterization and use of TurboLuc luciferase as a reporter for high-throughput assays. *Biochemistry*, 2018, 57(31), 4700–4706.
- Avci P, Karimi M, Sadasivam M, Antunes-Melo WC, Carrasco E, Hamblin MR. *In-vivo* monitoring of infectious diseases in living animals using bioluminescence imaging. *Virulence*, 2018, 9(1), 28-63.
- Azevedo MF, Nie CQ, Elsworth B, Charnaud SC, Sanders PR, Crabb BS, Gilson PR. *Plasmodium falciparum* transfected with ultra bright NanoLuc luciferase offers high sensitivity detection for the screening of growth and cellular trafficking inhibitors. *PLoS One*, 2014, 9, e112571.
- Azimzadeh P, Olson JA, Balenga N. Reporter gene assays for investigating GPCR signaling. *G Protein-Coupled Receptors Part A*, 2017, 89–99.
- Bacart J, Corbel C, Jockers R, Bach S, Couturier C. The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol J*, 2008, 3, 311-324.
- Bacterial Bioluminescence, 2009., <http://www.photobiology.info/Lin.html>, pristupljeno 19. 6. 2019.
- Badr CE, Tannous BA. Bioluminescence imaging: progress and applications. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29 (12), 624-633.
- Badr CE, Wurdinger T, Tannous BA. Functional drug screening assay reveals potential glioma therapeutics. *Assay Drug Dev Technol*, 2011, 9, 281-289.
- Baiula M. Monitoring opioid receptor dimerization in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Methods Mol Biol*, 2015, 1230, 105-13.
- Bakhtiarova A1, Taslimi P, Elliman SJ, Kosinski PA, Hubbard B, Kavana M, Kemp DM. Resveratrol inhibits firefly luciferase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 481-4.

- Balasubramanian A, Manzano M, Teramoto T, Pilankatta R, Padmanabhan R. High-throughput screening for the identification of small-molecule inhibitors of the flaviviral protease. *Antiviral Res*, 2016, 134, 6-16.
- Baldwin TO. Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains. *Structure*, 1996, 4 (3), 223–28.
- Balkrishna A, Sakat SS, Joshi K, Paudel S, Joshi D, Joshi K, Ranjan R, Gupta A, Bhattacharya K, Varshney A. Herbo-mineral formulation 'Ashwashila' attenuates rheumatoid arthritis symptoms in collagen-antibody-induced arthritis (CAIA) mice model. *Sci Rep*, 2019, 9(1), 8025.
- Becker JP, Clemens JR, Theile D, Weiss J. Bortezomib and ixazomib protect firefly luciferase from degradation and can flaw respective reporter gene assays. *Anal Biochem*, 2016, 509, 124-129.
- Beckmann N, Laurent D, Tigani B, Panizzutti R, Rudin M. Magnetic resonance imaging in drug discovery: lessons from disease areas. *Drug Discov Today*, 2004, 9, 35–42.
- Belas R, Mileham A, Cohn D, Hilman M, Simon M, Silverman M. Bacterial bioluminescence: isolation and expression of the luciferase genes from *Vibrio harveyi*. *Science*, 1982, 218, 791-3.
- Berggård T, Linse S, James P. Methods for the detection and analysis of protein–protein interactions. *Proteomics*, 2007, 7, 2833–2842.
- Berry SL, Hameed H, Thomason A, Maciej-Hulme ML, Saif Abou-Akkada S, Horrocks P, Price HP. Development of NanoLuc-PEST expressing *Leishmania mexicana* as a new drug discovery tool for axenic- and intramacrophage-based assays. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2018, 12(7), e0006639.
- Bertrand L, Parent S, Caron M, Legault M, Joly E, Angers S, Bouvier M, Brown M, Houle B, Ménard L. The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: A platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRS). *J Recept Signal Transduct Res*, 2002, 22, 533–541.
- Bhaumik S, Gambhir SS. Optical imaging of *Renilla* luciferase reporter gene expression in living mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(1), 377-82.
- Bibi S, Zhang Y, Hugonin C, Mangean MD, He L, Wedeh G, Launay JM, Van RS, Würdinger T, Louache F, Arock M. A new humanized *in vivo* model of KIT D816V+ advanced systemic mastocytosis monitored using a secreted luciferase. *Oncotarget*, 2016, 7, 82985–83000.
- Biggley WH, Lloyd JE, Seliger HH. The spectral distribution of firefly light II. *J Gen Physiol*, 1967, 50, 1681-1692.
- Binder U, Navarro-Mendoza MI, Naschberger V, Bauer I, Nicolas FE, Pallua JD, Garre V. Generation of A *Mucor circinelloides* Reporter Strain—A Promising New Tool to Study Antifungal Drug Efficacy and Mucormycosis. *Genes*, 2018, 9(12), 613.
- Bioluminescent Firefly Luciferase Assays, 2019., <https://www.sigmaaldrich.com>, pristupljeno 30. 4. 2019.

Bioluminescent reporters, 2019., <https://www.worldwide.promeqa.com>, pristupljeno 5. 5. 2019.

Bosma R, Moritani R, Leurs R, Vischer HF. BRET-based  $\beta$ -arrestin2 recruitment to the histamine H<sub>1</sub>receptor for investigating antihistamine binding kinetics. *Pharmacological Research*, 2016, 111, 679–687.

Boucher N, Wu Y, Dumas C, Dube M, Sereno D, Breton M, Papadopoulou B. A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 30-untranslated region element. *J Biol Chem*, 2002, 277, 19511–19520.

Boute N, Jockers, R, Issad T. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, 23, 351–354.

Bovenberg MS, Degeling MH, Hejazi S, Amante RJ, van Keulen M, Jeuken JW, Akbaripanihi S, Vleggeert-Lankamp CL, Tannous M, Wesseling P, Wurdinger T, Tannous BA. Multiplex blood reporters for simultaneous monitoring of cellular processes. *Anal Chem*, 2013, 85, 10205–10210.

Branchini BR, Southworth TL. A highly sensitive biosensor for ATP using a chimeric firefly luciferase. *Enzymes as Sensors*, 2017, 351–364.

Branchini BR, Southworth TL, Khattak NF, Michelini E, Roda A. Red- and green-emitting firefly luciferase mutants for bioluminescent reporter applications. *Anal Biochem*, 2005, 345, 140–148.

Branchini BR, Southworth TL, DeAngelis JP, Roda A, Michelini E. Luciferase from the Italian firefly *Luciola italica*: molecular cloning and expression. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2006, 145(2), 159-67.

Branchini BR, Southworth TL, Fontaine DM, Davis AL, Behney CE, Murtiashaw MH. A *Photinus pyralis* and *Luciola italica* Chimeric Firefly Luciferase Produces Enhanced Bioluminescence. *Biochemistry*, 2014, 53(40), 6287–6289.

Branchini BR, Southworth TL, Fontaine DM, Kohrt D, Talukder M, Michelini E, Cevenini L, Roda A, Grossel MJ. An enhanced chimeric firefly luciferase-inspired enzyme for ATP detection and bioluminescence reporter and imaging applications. *Anal Biochem*, 2015, 484, 148-53.

Branchini BR, Southworth TL, Fontaine DM, Murtiashaw MH, McGurk A, Talukder MH, Qureshi R, Yetil D, Sundlov JA, Gulick AM. Cloning of the orange light-producing luciferase from *Photinus scintillans* — a new proposal on how bioluminescence color is determined. *Photochem Photobiol*, 2017, 93, 479-485.

Branchini BR, Southworth TL, Fontaine DM, Kohrt D, Florentine CM, Grossel MJ. A Firefly Luciferase Dual Color Bioluminescence Reporter Assay Using Two Substrates To Simultaneously Monitor Two Gene Expression Events. *Sci Rep*, 2018, 8(1), 5990.

Brasier AR i Ron D. Luciferase reporter gene assay in mammalian cells. *Methods Enzymol*, 1992, 216, 386-97.

Brodli E, Winkler A, Macheroux P. Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2018, 16, 551-564.



Brückner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int J Mol Sci*, 2009, 10, 2763–2788.

Cali JJ, Ma D, Sobol M, Simpson DJ, Frackman S, Good TD, Daily WJ, and Liu D. Luminogenic cytochrome P450 assays. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006, 2, 629–645.

Calvo-Alvarez E, Cren-Travaillé C, Crouzols A, Rotureau B. A new chimeric triple reporter fusion protein as a tool for *in vitro* and *in vivo* multimodal imaging to monitor the development of African trypanosomes and Leishmania parasites. *Infection, Genetics and Evolution*, 2018, 63, 391–403.

Charbonneau H, Cormier MJ. Ca<sup>2+</sup>-induced bioluminescence in *Renilla reniformis*. Purification and characterization of calcium triggered luciferin-binding protein. *J Biol Chem*, 1979, 254, 769-780.

Caridha D, Parriot S, Hudson TH, Lang T, Ngundam F, Leed S, Grogl M. Use of optical imaging technology in the validation of a new, rapid, cost-effective drug screen as part of a tiered *in vivo* screening paradigm for development of drugs to treat cutaneous leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(4).

Carceles-Cordon M, Rodriguez-Fernandez I, Rodriguez-Bravo V, Cordon-Cardo C, Domingo-Domenech J. *In vivo* Bioluminescence Imaging of Luciferase-labeled Cancer Cells. *Bio-protocol*, 2016, 6(6), e1762.

Caysa H, Jacob R, Müther N, Branchini B, Messerle M, Söling A. A redshifted codon-optimized firefly luciferase is a sensitive reporter for bioluminescence imaging. *Photochem PhotobiolSci*, 2009, 8(1), 52-6.

Cevenini L, Calabretta MM, Lopreside A, Tarantino G, Tassoni A, Ferri M, Roda A, Michelini E. Exploiting NanoLuc luciferase for smartphone-based bioluminescence cell biosensor for (anti)-inflammatory activity and toxicity. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(30), 8859-8868.

Cevenini L, Camarda G, Michelini E, Siciliano G, Calabretta MM, Bona R, Kumar TR, Cara A, Branchini BR, Fidock DA, Roda A, Alano P. Multicolor bioluminescence boosts malaria research: quantitative dual-color assay and single-cell imaging in *Plasmodium falciparum* parasites. *Anal Chem*, 2014, 86(17), 8814-21.

Cevenini L, Lopreside A, Calabretta MM, D'Elia M, Simoni P, Michelini E, Roda A. A novel bioluminescent NanoLuc yeast-estrogen screen biosensor (nanoYES) with a compact wireless camera for effect-based detection of endocrine-disrupting chemicals. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(4), 1237-1246.

Cevenini L, Michelini E, D'Elia M, Guardigli M, Roda A. Dual-color bioluminescent bioreporter for forensic analysis: evidence of androgenic and anti-androgenic activity of illicit drugs. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405, 1035–1045.

Chaffey N, Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4th edn. *Annals of Botany*, 2003, 91(3), 401–401.

Chang M, Anttonen KP, Cirillo SL, Francis KP, Cirillo JD. Real-time bioluminescence imaging of mixed mycobacterial infections. *PLoS One*, 2014, 9(9), e108341.

Chang MH, Cirillo SLG, Cirillo JD. Using Luciferase to Image Bacterial Infections in Mice. *J Vis Exp*, 2011, 48, 2547.

Chemistry of firefly bioluminescence, 2013., <http://www.photobiology.info>, pristupljeno 28. 4. 2019.

Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(2), 93-103.

Chen F, Sun H, Liu H, Li D, Li Y, Hou T. Prediction of luciferase inhibitors by the high-performance MIEC-GBDT approach based on interaction energetic patterns. *Phys Chem Chem Phys*, 2017, 19(15), 10163-10176.

Chen CD, Zeldich E, Li Y, Yuste A, Abraham CR. Activation of the anti-aging and cognition-enhancing gene *klotho* by CRISPR-dCas9 transcriptional effector complex. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2018, 64(2), 175–184.

Cheng KC, Inglese J. A coincidence reporter-gene system for high-throughput screening. *Nat Methods*, 2012, 9, 937.

Cheng AN, Lo YK, Lin YS, Tang TK, Hsu CH, Hsu JT, Lee AY. Identification of novel Cdc7 kinase inhibitors as anti-cancer agents that target the interaction with Dbf4 by the fragment complementation and drug repositioning approach. *EBioMedicine*, 2018, 36, 241-251.

Choi YJ, Oh SG, Singh TD, Ha JH, Kim DW, Lee SW, Jeong SY, Ahn BC, Lee J, Jeon YH. Visualization of the biological behavior of tumor-associated macrophages in living mice with colon cancer using multimodal optical reporter gene imaging. *Neoplasia*, 2016, 18(3), 133-41.

Chung E, Yamashita H, Au P, Tannous BA, Fukumura D, Jain RK. Secreted *Gaussia* luciferase as a biomarker for monitoring tumor progression and treatment response of systemic metastases. *PLoS One*, 2009, 4, e8316.

Class B, Thorne N, Aguisanda F, Southall N, McKew JC, Zheng W. High-throughput viability assay using an autonomously bioluminescent cell line with a bacterial Lux reporter. *J Lab Autom*, 2015, 20(2), 164-74.

Close DM, Patterson SS, Ripp S, Baek SJ, Sanseverino J, Sayler GS. Autonomous bioluminescent expression of the bacterial luciferase gene cassette (*lux*) in a mammalian cell line. *PLoS One*, 2010, 5(8), e12441.

Close DM, Xu T, Sayler GS, Ripp S. *In vivo* bioluminescent imaging (BLI): noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals. *Sensors (Basel)*, 2011, 11(1), 180-206.

Close D, Xu T, Smartt A, Rogers A, Crossley R, Price S, Ripp S, Sayler G. The evolution of the bacterial luciferase gene cassette (*lux*) as a real-time bioreporter. *Sensors (Basel)*, 2012, 12(1), 732-52.

Collia D, Bannister TD, Tan H, Jin S, Langae T, Shumate J, Scampavia L, Spicer TP. A rapid phenotypic whole-cell screening approach for the identification of small-molecule inhibitors that counter  $\beta$ -lactamase resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *SLAS Discov*, 2018, 23(1), 55-64.

Comley, J. Assay Interference, a limiting factor in HTS? *Drug Discov World*, 2003, 4, 91–98.

- Contag CH, Contag PR, Mullins JI, Spilman SD, Stevenson DK, Benaron DA. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol Microbiol*, 1995, 18, 593-603.
- Contag CH, Jenkins D, Contag PR, Negrin RS. Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease *in vivo*. *Neoplasia*, 2000, 2, 41–52.
- Conti E, Franks NP, Brick P. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure*, 1996, 4(3), 287–98.
- Coriano C, Powell E, Xu W. Monitoring ligand-activated protein–protein interactions using bioluminescent resonance energy transfer (BRET) assay. *High-Throughput Screening Assays in Toxicology*, 2016, 3–15.
- Coulon V, Audet M, Homburger V, Bockaert J, Fagni L, Bouvier M, Perroy J. Subcellular imaging of dynamic protein interactions by bioluminescence resonance energy transfer. *Biophys J*, 2008, 94, 1001-1009.
- Cronin M, Morrissey D, Rajendran S, El Mashad SM, van Sinderen D, O’Sullivan GC. Orally administered bifidobacteria as vehicles for delivery of agents to systemic tumors. *Mol Ther*, 2010, 18, 1397-407.
- Cui B, Zhang L, Song Y, Wei J, Li C, Wang T, Wang Y, Zhao T, Shen X. Engineering an enhanced, thermostable, monomeric bacterial luciferase gene as a reporter in plant protoplasts. *PLoS One*, 2014, 9(10), e107885.
- Cui B, Wang Y, Song Y, Wang T, Li C, Wei Y, Luo ZQ, Shen X. Bioluminescence resonance energy transfer system for measuring dynamic protein-protein interactions in bacteria. *M Bio*, 2014, 5(3), e01050-14.
- Cunha L, Horvath I, Ferreira S, Lemos J, Costa P, Vieira D, Veres DS, Szigeti K, Summavielle T, Máthé D, Metello LF. Preclinical imaging: an essential ally in modern biosciences. *Mol Diagn Ther*, 2014, 18(2), 153-73.
- Daniel C, Poiret S, Dennin V, Boutillier D, Pot B. Bioluminescence imaging study of spatial and temporal persistence of *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* in living mice. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(4), 1086-94.
- Daniel C, Poiret S, Dennin V, Boutillier D, Lacorre DA, Foligné B, Pot B. Dual-Color Bioluminescence Imaging for Simultaneous Monitoring of the Intestinal Persistence of *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* in Living Mice. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(16), 5344-9.
- Davenport J, Galam L, Matts RL. A High-Throughput Screen for Inhibitors of the Hsp90-Chaperone Machine. *Methods Mol Biol*, 2018, 1709, 87-96.
- Davis RE, Zhang Y-Q, Southall N. A cell-based assay for I $\kappa$ B $\alpha$  stabilization using a two-color dual luciferase-based sensor. *Assay Drug Dev Technol*, 2007, 5, 85-103.
- De A. The new era of bioluminescence resonance energy transfer technology. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12, 558-568.
- De A, Jasani A, Arora R, Gambhir SS. Evolution of BRET Biosensors from Live Cell to Tissue-Scale *In vivo* Imaging. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 4, 131.

- De A, Ray P, Loening AM, Gambhir SS. BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein–protein interactions from single live cells and living animals. *FASEB J*, 2009, 23, 2702–2709.
- Decock M, Haylani L, Stanga S, Dewachter I, Octave JN, Smith SO, Constantinescu SN, Kienlen-Campard P. Analysis by a highly sensitive split luciferase assay of the regions involved in APP dimerization and its impact on processing. *FEBS Open Bio*, 2015, 5, 763–673.
- Dedecker P, De Schryver FC, Hofkens J. Fluorescent proteins: shine on, you crazy diamond. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(7), 2387–402.
- Degeling MH, Bovenberg MS, Lewandrowski GK, de Gooijer MC, Vleggeert-Lankamp CL, Tannous M, Maguire CA, Tannous BA. Directed molecular evolution reveals *Gaussia* luciferase variants with enhanced light output stability. *Anal Chem*, 2013, 85, 3006–3012.
- Degeling MH, Bovenberg MS, Tannous M, Tannous BA. *Gaussia* luciferase-based mycoplasma detection assay in mammalian cell culture. *Methods Mol Biol*, 2014, 1098, 47–55.
- De Niz M, Stanway RR, Wacker R, Keller D, Heussler VT. An ultrasensitive NanoLuc-based luminescence system for monitoring *Plasmodium berghei* throughout its life cycle. *Malar J*, 2016, 15, 232.
- Delarze E, Ischer F, Sanglard D, Coste AT. Adaptation of a *Gaussia princeps* luciferase reporter system in *Candida albicans* for *in vivo* detection in the *Galleria mellonella* infection model. *Virulence*, 2015, 6, 684–693.
- de Wet JR, Wood KV, Helinski DR, DeLuca M. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82, 7870–7873.
- Dimri S, Basu S, De A. Use of BRET to study protein-protein interactions *in vitro* and *in vivo*. *Methods Mol Biol*, 2016, 1443, 57–78.
- Di Petrillo A, Fais A, Pintus F, Santos-Buelga C, González-Paramás AM, Piras V, Orrù G, Mameli A, Tramontano E, Frau A. Broad-range potential of *Asphodelus microcarpus* leaves extract for drug development. *BMC Microbiol*, 2017, 17(1), 159.
- Dixon AS, Schwinn MK, Hall MP, Zimmerman K, Otto P, Lubben TH, Butler BL, Binkowski BF, Machleidt T, Kirkland TA, Wood MG, Eggers CT, Encell LP, Wood KV. NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(2), 400–8.
- Dragulescu-Andrasi A, Chan CT, De A, Massoud TF, Gambhir SS. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein–protein interactions within deep tissues of living subjects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108, 12060–12065.
- Dorsaz S, Coste AT, Sanglard D. Red-shifted firefly luciferase optimized for *Candida albicans* *In vivo* Bioluminescence Imaging. *Front Microbiol*, 2017, 8, 1478.
- Dothager RS, Flentie K, Moss B, Pan MH, Kesarwala A, Piwnica-Worms D. Advances in bioluminescence imaging of live animal models. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20, 45–53.

- Doyle TC, Burns SM, Contag CH. *In vivo* bioluminescence imaging for integrated studies of infection. *Cell Microbiol*, 2004, 6, 303–317.
- Duclos C, Lavoie C, Denault JB. Caspases rule the intracellular trafficking cartel. *FEBS J*, 2017, 284(10), 1394-1420.
- Duellman SJ, Zhou W, Meisenheimer P, Vidugiris G, Cali JJ, Gautam P, Wennerberg K, Vidugiriene J. Bioluminescent, Nonlytic, Real-Time Cell Viability Assay and Use in Inhibitor Screening. *Assay Drug Dev Technol*, 2015, 13(8), 456-65.
- Dusaban SS, Chun J, Rosen H, Purcell NH, Brown JH. Sphingosine 1-phosphate receptor 3 and RhoA signaling mediate inflammatory gene expression in astrocytes. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1), 111.
- Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Nealson KH, Oppenheimer NJ. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*, 1981, 20, 2444-9.
- Eckert N, Wrensch F, Gärtner S, Palanisamy N, Goedecke U, Jäger N. Influenza A virus encoding secreted *Gaussia* luciferase as useful tool to analyze viral replication and its inhibition by antiviral compounds and cellular proteins. *PLoS One*, 2014, 9, e97695.
- Emamzadeh R, Nazari M, Najafzadeh S. Adherent state apoptosis assay (ASA): a fast and reliable method to detect apoptosis in adherent cells. *Anal Methods*, 2014, 6, 4199-4204.
- Engbrecht J, Nealson K, Silverman M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*, 1983, 32, 773-81.
- Engbrecht J, Silverman M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81, 4154-8.
- England CG, Ehlerding EB, Cai W. NanoLuc: A small luciferase is brightening up the field of bioluminescence. *Bioconjug Chem*, 2016, 27(5), 1175-1187.
- Enomoto T, Kubota H, Mori K, Shimogawara M, Yoshita M, Ohmiya Y, Akiyama H. Absolute bioluminescence imaging at the single-cell level with a light signal at the Attowatt level. *Biotechniques*, 2018, 64(6), 270-274.
- Evans MS, Chaurette JP, Adams ST, Reddy GR, Paley MA, Aronin N, Prescher JA, Miller SC. A synthetic luciferin improves bioluminescence imaging in live mice. *Nat Methods*, 2014, 11, 393–395.
- Fan F, Wood KV. Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol*, 2007, 5(1), 127-36.
- Fan F, Binkowski BF, Butler BL, Stecha PF, Lewis MK, Wood KV. Novel genetically encoded biosensors using firefly luciferase. *ACS Chemical Biology*, 2008, 3(6), 346–351.
- Fanunza E, Frau A, Sgarbanti M, Orsatti R, Corona A, Tramontano E. Development and validation of a novel dual luciferase reporter gene assay to quantify Ebola virus VP24 inhibition of IFN signaling. *Viruses*, 2018, 10(2), 98.
- Farzannia A, Roghanian R, Zarkesh-Esfahani S, Nazariand M, Emamzadeh R. FcUni-RLuc:

an engineered *Renilla* luciferase with Fc binding ability and light emission activity. *Analyst*, 2015, 140, 1438-1441.

Feng Y, Mitchison TJ, Bender A, Young DW, Tallarico JA. Multiparameter phenotypic profiling: using cellular effects to characterize small-molecule compounds. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8, 567-578.

Feng L, Lu W, Ma Y, Guo W, Wang Y, Sun Q, Zhang X. A novel dual-luciferase assay for anti-HIV drug screening based on the CCR5/CXCR4 promoters. *Journal of Virological Methods*, 2018, 256, 17-23.

Firefly luciferase assay, 2019., <http://www.merckmilipore.com>, pristupljeno 7. 5. 2019.

Fleiss A, Sarkisyan KS. A brief review of bioluminescent systems. *Curr Genet*, 2019, 3, 1-6.

Frackman S, Anhalt M, Neelson KH. Cloning, organization and expression of the bioluminescence genes of *Xenorhabdus luminescens*. *J Bacteriol*, 1990, 172, 5767-73.

Fraga H. Firefly luminescence: A historical perspective and recent developments. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2008, 7(2), 146.

Fraga H, Esteves da Silva JC, Fontes R. Identification of luciferyl adenylate and luciferyl coenzyme a synthesized by firefly luciferase. *Chembiochem*, 2004, 5(1), 110-5.

Fraga H, Fernandes D, Novotny J, Fontes R, and Esteves da Silva JC. Firefly luciferase produces hydrogen peroxide as a coproduct in dehydroluciferyl adenylate formation. *ChemBioChem*, 2006, 7, 929-935.

Francis KP, Joh D, Bellinger-Kawahara C, Hawkinson MJ, Purchio TF, Contag PR. Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in living mice using a novel lux-ABCDE construct. *Infect Immun*, 2000, 68, 3594-3600.

Francis WR, Shaner NC, Christianson LM, Powers ML, Haddock SH. Occurrence of isopenicillin-N-synthase homologs in bioluminescent ctenophores and implications for coelenterazine biosynthesis. *PLOS ONE*, 2015, 10, e0128742.

Fujii H, Noda K, Asami Y, Kuroda A, Sakata M, and Tokida A. Increase in bioluminescence intensity of firefly luciferase using genetic modification. *Anal Biochem*, 2007, 366, 131-136.

Gambino YP, Maymó JL, Pérez-Pérez A, Dueñas JL, Sánchez-Margalet V, Calvo JC, Varone CL. 17-Beta-estradiol enhances leptin expression in human placental cells through genomic and nongenomic actions. *Biol Reprod*, 2010, 83(1), 42-51.

Gambhir S, Barrio J, Herschman H, Phelps M. Assays for noninvasive imaging of reporter gene expression. *Nucl Med Biol*, 1999, 26, 481-490.

Gammon ST, Leevy MT, Gross S. Spectral unmixing of multicolored bioluminescence emitted from heterogeneous biological sources. *Anal Chem*, 2006, 78, 1520-7.

Gammon ST, Villalobos VM, Roshal M, Samrakandi M, Piwnica-Worms D. Rational design of novel red-shifted BRET pairs: Platforms for real-time single-chain protease biosensors. *Biotechnol Prog*, 2009, 25, 559-569.

- Gaur S, Bhargava-Shah A, Hori S, Afjei R, Sekar TV, Gambhir SS, Massoud TF, Paulmurugan R. Engineering Intracellularly Retained *Gaussia* Luciferase Reporters for Improved Biosensing and Molecular Imaging Applications. *ACS Chem Biol*, 2017, 12(9), 2345-2353.
- Gaussia* and *Cypridina* luciferases, 2019., <http://www.international.neb.com>, pristupljeno 10. 6. 2019.
- Germain-Genevois C, Garandeau O, Couillaud F. Detection of brain tumors and systemic metastases using NanoLuc and Fluc for dual reporter imaging. *Mol Imaging Biol*, 2016, 18, 62–69.
- Ghosh D, Koch U, Hadian K, Sattler M, Tetko IV. Luciferase Advisor: High-Accuracy Model To Flag False Positive Hits in Luciferase HTS Assays. *J Chem Inf Model*, 2018, 58(5), 933-942.
- Gibbons AE, Luker KE, Luker GD. Dual Reporter Bioluminescence Imaging with NanoLuc and Firefly Luciferase. *Methods Mol Biol*, 2018, 1790, 41-50.
- Gilad Y, Shiloh R, Ber Y, Bialik S, Kimchi A. Discovering protein-protein interactions within the programmed cell death network using a protein-fragment complementation screen. *Cell Rep*, 2014, 8, 909–921.
- Goerke AR, Loening AM, Gambhir SS, Swartz JR. Cell-free metabolic engineering promotes high-level production of bioactive *Gaussia princeps* luciferase. *Metab Eng*, 2008, 10, 187–200.
- Gong S, Han X, Li X, Yang J, He X, Si S. Development of a High-Throughput Screening Strategy for Upregulators of the OPG/RANKL Ratio with the Potential for Antiosteoporosis Effects. *J Biomol Screen*, 2016,21(7), 738-48.
- Gould SJ, Keller GA, Subramani S. Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J Cell Biol*, 1988, 107(3), 897-905.
- Gould SJ, Subramani S. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Analytical Biochemistry*, 1988, 175(1), 5–13.
- Goyet E, Bouquier N, Ollendorff V, Perroy J. Fast and high resolution single-cell BRET imaging. *Sci Rep*, 2016, 6, 28231.
- Greer LF, III, Szalay AA. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence*, 2002, 17, 43-74.
- Gregor C, Gwosch KC, Sahl SJ, Hell SW. Strongly enhanced bacterial bioluminescence with the *ilux* operon for single-cell imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115, 962-967.
- Groskreutz DJ. Promega notes, 1994, 49, str. 14.
- Gupta RK, Patterson SS, Ripp S, Simpson ML, Saylor GS. Expression of the *Photobacterium luminescens lux* genes (*luxA*, *B*, *C*, *D*, and *E*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2003, 4(3), 305-13.
- Gupta R, Kasturi P, Bracher A, Loew C, Zheng M. Firefly luciferase mutants as sensors of proteome stress. *Nature methods*, 2011, 8, 879–884.

Hall MP, Unch J, Binkowski BF, Valley MP, Butler BL, Wood MG, Otto P, Zimmerman K, Vidugiris G, Machleidt T, Robers MB, Benink HA, Eggers CT, Slater MR, Meisenheimer PL, Klaubert DH, Fan F, Encell LP, Wood KV. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol*, 2012, 7(11), 1848-57.

Hall MP, Woodrooffe CC, Wood MG, Que I, Van't Root M, Ridwan Y, Shi C, Kirkland TA, Encell LP, Wood KV, Lowik C, Mezzanotte L. Click beetle luciferase mutant and near infrared naphthyl-luciferins for improved bioluminescence imaging. *Nat Commun*, 2018, 9, 132.

Halliwell LM, Jathoul AP, Bate, JP, Worthy HL, Anderson JC, Jones DD, Murray JAH.  $\Delta$ Flucs: Brighter *Photinus pyralis* firefly luciferases identified by surveying consecutive single amino acid deletion mutations in a thermostable variant. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 115(1), 50–59.

Hardy J, Francis KP, DeBoer M, Chu P, Gibbs K, Contag CH. Extracellular replication of *Listeria monocytogenes* in the murine gall bladder. *Science*, 2004, 303, 851-3.

Hardy J, Chu P, Contag CH. Foci of *Listeria monocytogenes* persist in the bone marrow. *Dis Model Mech*, 2009, 2, 39-46.

Hart RC, Stempel KE, Boyer PD, Cormier MJ. Mechanism of the enzyme-catalyzed bioluminescent oxidation of coelenterate-type luciferin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978, 81, 980–986.

Hart RC, Matthews JC, Hori K, Cormier MJ. *Renilla reniformis* bioluminescence: luciferase-catalyzed production of nonradiating excited states from luciferin analogues and elucidation of the excited state species involved in energy transfer to *Renilla* green fluorescent protein. *Biochemistry*, 1979, 18, 2204–2210.

Harwood KR, Mofford DM, Reddy GR, Miller SC. Identification of mutant firefly luciferases that efficiently utilize aminoluciferins. *Chem Biol*, 2011, 18, 1649–1657.

Hattori M, Ozawa T. High-throughput Live Cell Imaging and Analysis for Temporal Reaction of G Protein-coupled Receptor Based on Split Luciferase Fragment Complementation. *Analytical Sciences*, 2015, 31(4), 327-330.

Heffern MC, Park HM, Au-Yeung HY, Van de Bittner GC, Ackerman CM, Stahl A, Chang CJ. *In vivo* bioluminescence imaging reveals copper deficiency in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113, 14219-14224.

Heise K, Oppermann H, Meixensberger J, Gebhardt R, Gaunitz F. Dual Luciferase Assay for Secreted Luciferases Based on *Gaussia* and NanoLuc. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2013, 11(4), 244–252.

Helmfors H, Eriksson J, Langel Ü. Optimized luciferase assay for cell-penetrating peptide-mediated delivery of short oligonucleotides. *Analytical Biochemistry*, 2015, 484, 136–142.

Hennessey KM, Rogiers IC, Shih HW, Hulverson MA, Choi R, McCloskey MC, Ojo KK. Screening of the Pathogen Box for inhibitors with dual efficacy against *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2018, 12(8), e0006673.



Hiblot J, Yu Q, Sabbadini MDB, Reymond L, Xue L, Schena A, Sallin O, Hill N, Griss R, Johnsson K. Luciferases with tunable emission wavelengths. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56, 14556-14560.

Hida N, Awais M, Takeuchi M. High-sensitivity real-time imaging of dual protein-protein interactions in living subjects using multicolor luciferases. *PLoS ONE*, 2009, 4, e5868

Higa A, Hoshi H, Yanagisawa Y, Ito E, Morisawa G, Imai JI, Watanabe S, Takagi M. Evaluation system for arrhythmogenic potential of drugs using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and gene expression analysis. *J Toxicol Sci*, 2017, 42(6), 755-761.

Hill SJ, Baker JG, Rees S. Reporter-gene systems for the study of G-protein coupled receptors. *Current Opinion in Pharmacology*, 2001, 1(5), 526–532.

Hilpert K i Hancock REW. Use of luminescent bacteria for rapid screening and characterization of short cationic antimicrobial peptides synthesized on cellulose using peptide array technology. *Nat Protocol*, 2007, 2, 1652–1660.

Hirokawa K, Kajiyama N, Murakami S. Improved practical usefulness of firefly luciferase by gene chimerization and random mutagenesis. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol*, 2002, 1597, 271–279.

Hirano T, Hasumi Y, Ohtsuka K, Maki S, Niwa H, Yamaji M, Hashizume D. Spectroscopic Studies of the Light-Color Modulation Mechanism of Firefly (Beetle) Bioluminescence. *J Am Chem Soc*, 2009, 131, 2385–2396.

Ho PI, Yue K, Pandey P, Breault L, Harbinski F, McBride AJ, Webb B, Narahari J, Karassina N, Wood KV, Hill A, Auld DS. Reporter enzyme inhibitor study to aid assembly of orthogonal reporter gene assays. *ACS Chem Biol*, 2013, 8, 1009–1017.

Hosseinkhani S. Molecular enigma of multicolor bioluminescence of firefly luciferase. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(7), 1167-82.

Hoshino H. Current advanced bioluminescence technology in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 2009, 4(4), 373-89.

Hoshino H, Nakajima Y, Ohmiya Y. Luciferase-YFP fusion tag with enhanced emission for single-cell luminescence imaging. *Nat Methods*, 2007, 4, 637–639.

Hsu CW, Huang R, Khuc T, Shou D, Bullock J, Grooby S, Griffin S, Zou C, Little A, Astley H, Xia M. Identification of approved and investigational drugs that inhibit hypoxia-inducible factor-1 signaling. *Oncotarget*, 2016, 7(7), 8172-83.

Huang MTF, Gorman CM. Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(4), 937–947.

Huang Y, Yang H, Borg BB, Su X, Rhodes SL, Yang K, Liang TJ. A functional SNP of interferon- $\gamma$  gene is important for interferon- $\alpha$ -induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 104(3), 985–990.

Hunke S, Müller VS. Approaches to analyze protein–protein interactions of membrane proteins. Cai J., editor. Protein Interactions. *InTech*, Rijeka, Croatia, 2012, 327–348.

- Hunt EA, Moutsiopoulou A, Broyles D, Head T, Dikici E, Daunert S, Deo SK. Expression of a soluble truncated *Vargula* luciferase in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2017, 132, 68-74.
- Hutchens M, Luker GD. Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. *Cell Microbiol*, 2007, 9, 2315–2322.
- Imamura T, Saitou T, Kawakami R. *In vivo* optical imaging of cancer cell function and tumor microenvironment. *Cancer Sci*, 2018, 109(4), 912-918.
- Indraccolo S, Mueller-Klieser W. Potential of induced metabolic bioluminescence imaging to uncover metabolic effects of antiangiogenic therapy in tumors. *Front Oncol*, 2016, 6, 15.
- Inglese J, Johnson RL, Simeonov A, Xia M, Zheng W, Austin CP, Auld DS. High-throughput screening assays for the identification of chemical probes. *Nat Chem Biol*, 2007, 3, 466.
- Inouye S. Firefly luciferase: an adenylate-forming enzyme for multicatalytic functions. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67, 387–404.
- Inouye S, Sahara Y. Identification of two catalytic domains in a luciferase secreted by the copepod *Gaussia princeps*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 365, 96–101.
- Inouye S, Sasaki S. Overexpression, purification and characterization of the catalytic component of *Oplophorus* luciferase in the deep-sea shrimp, *Oplophorus gracilirostris*. *Protein Expr Purif*, 2007, 56(2), 261-8.
- Inouye S, Watanabe K, Nakamura H, Shimomura O. Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase(1). *FEBS Lett*, 2000, 481(1), 19-25.
- Ishibashi M, Kawanabe R, Amaba N, Arai S, Laksmi FA, Komori K, Tokunaga M. Expression and characterization of the *Renilla* luciferase with the cumulative mutation. *Protein Expr Purif*, 2018, 145, 39-44.
- Iwano S, Obata R, Miura C, Kiyama M, Hama K, Nakamura M, Amano Y, Kojima S, Hirano T, Maki S, Niwa H. Development of simple firefly luciferin analogs emitting blue, green, red, and near-infrared biological window light. *Tetrahedron*, 2013, 69(19), 3847-3856.
- Iwano S, Sugiyama M, Hama H, Watakabe A, Hasegawa N, Kuchimaru T, Tanaka KZ, Takahashi M, Ishida Y, Hata J, Shimozone S, Namiki K, Fukano T, Kiyama M, Okano H, Kizaka-Kondoh S, McHugh TJ, Yamamori T, Hioki H, Maki S, Miyawaki A. Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. *Science*, 2018, 359(6378), 935-939.
- Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(2), 113-27.
- Jansson V i Jansson K. An enzymatic cycling assay for adenosine 50-monophosphate using adenylate kinase, nucleoside-diphosphate kinase, and firefly luciferase. *Anal Biochem*, 2003, 321, 263–265.
- Jathoul AP, Grounds H, Anderson JC, Pule MA. A dual-color far-red to near-infrared firefly luciferin analogue designed for multiparametric bioluminescence imaging. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(48), 13059-63.

Jia K, Ionescu RE. Measurement of bacterial bioluminescence intensity and spectrum: current physical techniques and principles. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2016, 154, 19–45.

Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*, 2017, 24(8), 1380-1389.

Kajiyama N i Nakano E. Thermostabilization of firefly luciferase by a single amino acid substitution at position 217. *Biochemistry*, 1993, 32, 13795–13799.

Kalwat MA, Wichaidit C, Nava Garcia AY, McCoy MK, McGlynn K, Hwang IH, MacMillan JB, Posner BA, Cobb MH. Insulin promoter-driven *Gaussia* luciferase-based insulin secretion biosensor assay for discovery of  $\beta$ -cell glucose-sensing pathways. *ACS Sens*, 2016, 1, 1208-1212.

Kanzaki S, Watanabe K, Fujioka M, Shibata S, Nakamura M, Okano HJ, Ogawa K. Novel *in vivo* imaging analysis of an inner ear drug delivery system: Drug availability in inner ear following different dose of systemic drug injections. *HearingResearch*, 2015, 330, 142–146.

Kapitan M, Eichhof I, Lagadec Q, Ernst JF. Click beetle luciferases as dual reporters of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology*, 2016, 162(8), 1310-1320.

Karimi S, Ahl D, Vågesjö E, Holm L, Phillipson M, Jonsson H, Roos S. *In vivo* and *in vitro* detection of luminescent and fluorescent *Lactobacillus reuteri* and application of red fluorescent mCherry for assessing plasmid persistence. *PLoS One*, 2016,11(3), e0151969.

Kassem II, Splitter GA, Miller S, Rajashekara G. Let There Be Light! Bioluminescent imaging to study bacterial pathogenesis in live animals and plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2016, 154, 119-45.

Kawaguchi SI, Gonda Y, Yamamoto T, Sato Y, Shinohara H, Kobiki Y, Ichimura A, Dan T, Sonoda M, Miyata T, Ogawa A, Tsujita T. Furan- and thiophene-2-carbonyl amino acid derivatives activate hypoxia-inducible factor via inhibition of factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1. *Molecules*, 2018, 23(4), 885.

Ke D, Tu SC. Activities, kinetics and emission spectra of bacterial luciferase-fluorescent protein fusion enzymes. *PhotochemPhotobiol*, 2011, 87(6), 1346–1353.

Ke B, Wu W, Liu W, Liang H, Gong D, Hu X, Li M. Bioluminescence probe for detecting hydrogen sulfide *in vivo*. *AnalChem*, 2016, 88, 592-595.

Kilpatrick LE, Friedman-Ohana R, Alcobia DC, Riching K, Peach CJ, Wheal AJ, Briddon SJ, Robers MB, Zimmerman K, Machleidt T. Real-time analysis of the binding of fluorescent VEGF165a to VEGFR2 in living cells: effect of receptor tyrosine kinase inhibitors and fate of internalized agonist-receptor complexes. *Biochem Pharmacol*, 2017, 136, 62–75.

Kilpatrick LE, Alcobia DC, White CW, Peach CJ, Glenn JR, Zimmerman K, Kondrashov A, Pflieger KDG, Ohana RF, Robers MB, Wood KV, Sloan EK, Woolard J, Hill SJ. Complex Formation between VEGFR2 and the  $\beta$ 2-Adrenoceptor. *Cell Chem Biol*, 2019, 26(6), 830-841.

Kim SB, Umezawa Y, Kanno KA, Tao H. An integrated-molecule-format multicolor probe for monitoring multiple activities of a bioactive small molecule. *ACS Chem Biol*, 2008, 3, 359-71.

Kim SB, Sato M, Tao H. Split *Gaussia* luciferase-based bioluminescence template for tracing protein dynamics in living cells. *Anal Chem*, 2009, 81, 67–74.

Kim SB, Suzuki H, Sato M, Tao H. Superluminescent variants of marine luciferases for bioassays. *Anal Chem*, 2011, 83, 8732–8740.

Kim HW, Rhee YM. On the pH Dependent Behavior of the Firefly Bioluminescence: Protein Dynamics and Water Content in the Active Pocket. *J Phys Chem B*, 2013, 117, 7260–7269.

Kim SH, Park C, Chun HS, Lee DG, Choi JK, Lee HJ, Cho SY, Park SH, Choi SM, Choi JH, Yoo JH. Pilot screening to determine antimicrobial synergies in a multidrug-resistant bacterial strain library. *Microb Drug Resist*, 2016, 22(5), 372-8.

Kimura T, Hiraoka K, Kasahara N, Logg CR. Optimization of enzyme-substrate pairing for bioluminescence imaging of gene transfer using *Renilla* and *Gaussia* luciferases. *J Gene Med*, 2010, 12(6), 528-37.

Klabunde T i Hessler G. Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *Chembiochem*, 2002, 3(10), 928-44.

Kleinovink JW, Mezzanotte L, Zambito G, Franssen MF, Cruz LJ, Verbeek JS, Chan A, Ossendorp F, Löwik C. A Dual-Color Bioluminescence Reporter Mouse for Simultaneous *in vivo* Imaging of T Cell Localization and Function. *Front Immunol*, 2019, 9, 3097.

Klerk CP, Overmeer RM, Niers TM, Versteeg HH, Richel DJ, Buckle T. Validity of bioluminescence measurements for noninvasive *in vivo* imaging of tumor load in small animals. *Biotechniques*, 2007, 43, 7-13.

Kobayashi M, Murakami T, Uchibori R, Chun NA, Kobayashi E, Morita T, Ozawa K. Establishment and characterization of transplantable, luminescence labeled rat renal cell carcinoma cell lines. *J Urol*, 2010, 183(5), 2029-35.

Kocan M, See HB, Seeber RM, Eidne KA, Pflieger KD. Demonstration of improvements to the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technology for the monitoring of G protein-coupled receptors in live cells. *J Biomol Screen*, 2008, 13, 888–898.

Kojima R, Takakura H, Ozawa T, Tada Y, Nagano T, Urano Y. Rational design and development of near-infrared-emitting firefly luciferins available *in vivo*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(4), 1175-9.

Kojima R, Takakura H, Kamiya M, Kobayashi E, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Hanaoka K, Nagano T, Urano Y. Development of a sensitive bioluminogenic probe for imaging highly reactive oxygen species in living rats. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54, 14768-14771.

Kolkhof P, Werthebach M, van de Venn A, Poschmann G, Chen L, Welte M, Stühler K, Beller M. A luciferase-fragment complementation assay to detect lipid droplet-associated protein-protein interactions. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16, 329–345.

Koshizuka T, Sato Y, Kobiyama S, Oshima M, Suzutani T. A two-step culture method utilizing secreted luciferase recombinant virus for detection of anti-cytomegalovirus compounds. *Microbiol Immunol*, 2018, 62(10), 651-658.

Kricka LJ, DeLuca M. Effect of solvents on the catalytic activity of firefly luciferase. *Arch Biochem Biophys*, 1982, 217, 674-681.

- Kubota SI, Takahashi K, Nishida J, Morishita Y, Ehata S, Tainaka K, Miyazono K, Ueda HR. Whole-Body Profiling of Cancer Metastasis with Single-Cell Resolution. *Cell Rep*, 2017, 20(1), 236-250.
- Kuchimaru T, Iwano S, Kiyama M, Mitsumata S, Kadonosono T, Niwa H, Maki S, Kizaka-Kondoh S. A luciferin analogue generating near-infrared bioluminescence achieves highly sensitive deep-tissue imaging. *Nat Commun*, 2016, 7, 11856.
- Kulahin N, Sanni SJ, Slaaby R, Nøhr J, Gammeltoft S, Hansen JL, Jorgensen R. A BRET assay for monitoring insulin receptor interactions and ligand pharmacology. *J Recept Signal Transduct Res*, 2012, 32(2), 57-64.
- Kumar M, Zhang D, Broyles D, Deo SK. A rapid, sensitive, and selective bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based nucleic acid sensing system. *Biosens Bioelectron*, 2011, 30(1), 133-9.
- Kumar BA, Kumari P, Sona C, Yadav PN. GloSensor assay for discovery of GPCR-selective ligands. *G Protein-Coupled Receptors Part A*, 2017, 27–50.
- LaBaer J, Ramachandran N. Protein microarrays as tools for functional proteomics. *Curr Opin Chem Biol*, 2005, 9, 14–19.
- Lamb LE, Zhi X, Alam F, Pyzio M, Scudamore CL, Wiles S, Sriskandan S. Modelling invasive group A streptococcal disease using bioluminescence. *BMC Microbiol*, 2018, 18(1), 60.
- Lang T, Goyard S, Lebastard M, Milon G. Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. *Cell Microbiol*, 2005, 7, 383–392.
- Lang Y, Li Y, Jaspersen D, Henningson J, Lee J, Ma J, Li Y, Duff M, Liu H, Bai D, McVey S, Richt JA, Ikegami T, Wilson WC, Ma W. Identification and evaluation of antivirals for Rift Valley fever virus. *Vet Microbiol*, 2019, 230, 110-116.
- Larionova MD, Markova SV, Vysotski ES. The novel extremely psychrophilic luciferase from *Metridia longa*: properties of a high-purity protein produced in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483, 772–778.
- Larionova MD, Markova SV, Vysotski ES. Bioluminescent and structural features of native folded *Gaussia* luciferase. *J Photochem Photobiol B*, 2018, 183, 309–317.
- Leblond F, Davis SC, Valde's PA, Pogue BW. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: review of instruments, methods and applications. *J Photochem Photobiol B*, 2010, 98(1), 77–94.
- Leclerc GM, Boockfor FR, Faught WJ, Frawley LS. Development of a destabilized firefly luciferase enzyme for measurement of gene expression. *Biotechniques*, 2000, 29, 590–591.
- Lee CY, Szittner RB, Meighen EA. The *lux* genes of the luminous bacterial symbiont, *Photobacterium leiognathi*, of the ponyfish. Nucleotide sequence, difference in gene organization and high expression in mutant *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 1991, 201, 161-7.

- Lee J, Vysotski ES. Structure and Spectra in Bioluminescence. Photobiological Sciences Online, 2014., <http://www.photobiology.info/>, pristupljeno 5. 6. 2019.
- Lee J. Bioluminescence, the Nature of the Light. Photobiological Sciences Online, 2016., <http://www.photobiology.info/>, pristupljeno 5. 6. 2019.
- Lee BK, Tiong KH, Chang JK, Liew CS, Abdul Rahman ZA, Tan AC6, Khang TF, Cheong SC. DeSigN: connecting gene expression with therapeutics for drug repurposing and development. *BMC Genomics*, 2017a, 18, 934.
- Lee JC, Tseng CK, Lin CK, Tseng CH. Discovery of novel diarylpyrazolylquinoline derivatives as potent anti-dengue virus agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017b, 141, 282–292.
- Leng W, Li D, Chen L, Xia H, Tang Q, Chen B, Gong Q, Gao F, Bi F. Novel bioluminescent activatable reporter for Src tyrosine kinase activity in living mice. *Theranostics*, 2016, 6, 594–609.
- Levi J, De A, Cheng Z, Gambhir SS. Bisdeoxycoelenterazine derivatives for improvement of bioluminescence resonance energy transfer assays. *J Am Chem Soc*, 2007, 129, 11900-11901.
- Li X, Zhao X, Fang Y, Jiang X, Duong T, Fan C, Huang CC, Kain SR. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem*, 1998, 273(52), 34970-5.
- Li F, Yu J, Zhang Z, Cui Z, Wang D, Wei H, Zhang XE. Buffer enhanced bioluminescence resonance energy transfer sensor based on *Gaussia* luciferase for *in vitro* detection of protease. *Anal Chim Acta*, 2012, 724, 104-10.
- Li D, Chen T, Hu Y, Zhou Y, Liu Q, Zhou D, Huang Z. An ebola virus-like particle-based reporter system enables evaluation of antiviral drugs *in vivo* under non-biosafety level 4 conditions. *Journal of Virology*, 2016, 90(19), 8720–8728.
- Li G, Chi C, Shao XF, Fang CH. Application of molecular imaging technology in evaluating the inhibiting effect of apigenin *in vivo* on subcutaneous hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017a, 487(1), 122–127.
- Li C, Wang Z, Cao Y, Wang L, Ji J, Chen Z, Deng T, Jiang T, Cheng G, Qin FX. Screening for novel small-molecule inhibitors targeting the assembly of influenza virus polymerase complex by a bimolecular luminescence complementation-based reporter system. *J Virol*, 2017b, 91, e02282.
- Li JQ, Deng CL, Gu D, Li X, Shi L, He J, Zhang QY, Zhang B, Ye HQ. Development of a replicon cell line-based high throughput antiviral assay for screening inhibitors of Zika virus. *Antiviral Res*, 2018, 150, 148-154.
- Liang L, Yue Z, Du W, Li Y, Tao H, Wang D, Wang R, Huang Z, He N, Xie X, Han Z, Liu N, Li Z. Molecular Imaging of Inducible VEGF Expression and Tumor Progression in a Breast Cancer Model. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(1), 407-415.

- Licata L, Briganti L, Peluso D, Perfetto L, Iannuccelli M, Galeota E, Sacco F, Palma A, Nardoza AP, Santonico E. MINT, the molecular interaction database: 2012 update. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40, D857–D861.
- Lichtman JW, Conchello JA. Fluorescence microscopy. *Nat Methods*, 2005, 2(12), 910-9.
- Lin X, David CA, Donnelly JB, Michaelides M, Chandel NS, Huang X, Shen Y. A chemical genomics screen highlights the essential role of mitochondria in HIF-1 regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(1), 174–179.
- Liu J, Escher A. Improved assay sensitivity of an engineered secreted *Renilla* luciferase. *Gene*, 1999, 237(1), 153-9.
- Liu M, Blinn C, McLeod SM, Wiseman JW, Newman JV. Secreted *Gaussia* princeps luciferase as a reporter of *Escherichia coli* replication in a mouse tissue cage model of infection. *PLoS One*, 2014, 9, e90382.
- Liu Q, Fan C, Zhou S, Guo Y, Zuo Q, Ma J, Liu S, Wu X, Peng Z, Fan T, Guo C, Shen Y, Huang W, Li B, He Z, Wang Y. Bioluminescent imaging of vaccinia virus infection in immunocompetent and immunodeficient rats as a model for human smallpox. *Sci Rep*, 2015, 5, 11397.
- Liu B, Tang L, Zhang X, Ma J, Sehgal M, Cheng J, Zhang X, Zhou Y, Du Y, Kulp J, Guo JT, Chang J. A cell-based high throughput screening assay for the discovery of cGAS-STING pathway agonists. *Antiviral Res*, 2017, 147, 37-46.
- Loening AM, Fenn TD, Wu AM, Gambhir SS. Consensus guided mutagenesis of *Renilla* luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Eng Des Sel*, 2006, 19, 391-400.
- Loening AM, Wu AM, Gambhir SS. Red-shifted *Renilla reniformis* luciferase variants for imaging in living subjects. *Nat Methods*, 2007, 4, 641-643.
- Loening AM, Dragulescu-Andrasi A, Gambhir SS. A red-shifted *Renilla* luciferase for transient reporter-gene expression. *Nat Methods*, 2010, 7, 5-6.
- Loh JM, Proft T. Comparison of firefly luciferase and NanoLuc luciferase for biophotonic labeling of group A *Streptococcus*. *Biotechnol Lett*, 2014, 36, 829–834.
- Lorenz WW, McCann RO, Longiaru M, Cormier MJ. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88, 4438–4442.
- Lorenz WW, Cormier MJ, O'Kane DJ, Hua D, Escher AA, Szalay AA. Expression of the *Renilla reniformis* luciferase gene in mammalian cells. *J Biolumin Chemilumin*, 1996, 11(1), 31-7.
- Loria R, Giliberti C, Bedini A, Palomba R, Caracciolo G, Ceci P, Strigari L. Very low intensity ultrasounds as a new strategy to improve selective delivery of nanoparticles-complexes in cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2019, 38(1).
- Low JC, Tu SC. Energy transfer evidence for *in vitro* and *in vivo* complexes of *Vibrio harveyi* flavin reductase P and luciferase. *Photochem Photobiol*, 2003, 77(4), 446-52.

- Lowell AN, Santoro N, Swaney SM, McQuade TJ, Schultz PJ, Larsen MJ, Sherman DH. Microscale adaptation of *in vitro* transcription/translation for high-throughput screening of natural product extract libraries. *Chem Biol Drug Des*, 2015, 86(6), 1331-8.
- Lu B, Chen L, Zhang Y, Shi Y, Zhou N. Quantitative analysis of G-protein-coupled receptor internalization using DnaE intein-based assay. *G Protein-Coupled Receptors - Signaling, Trafficking and Regulation*, 2016, 293–318.
- Lucantoni L, Fidock DA, Avery VM. Luciferase-based, high-throughput assay for screening and profiling transmission-blocking compounds against *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(4), 2097-107.
- Luciferase reporters, 2019., <http://www.thermofisher.com>, pristupljeno 5. 5. 2019.
- Luker KE, Luker GD. Split *Gaussia* luciferase for imaging ligand-receptor binding. *Methods Mol Biol*, 2014, 1098, 59–69.
- Luker KE, Luker GD. Dual-color luciferase complementation for chemokine receptor signaling. *Methods Enzymol*, 2016, 570, 119-29.
- Lyons SK. Advances in imaging mouse tumour models *in vivo*. *J Pathol*, 2005, 205(2), 194-205.
- Machleidt T, Woodroffe CC, Schwinn MK, Méndez J, Robers MB, Zimmerman K, Otto P, Daniels DL, Kirkland TA, Wood KV. NanoBRET—A novel BRET platform for the analysis of protein–protein interactions. *ACS Chem Biol*, 2015, 10, 1797–1804.
- Maggi A, Ciana P. Reporter mice and drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(3), 249-55.
- Maguire CA, Deliolanis NC, Pike L, Niers JM, Tjon-Kon-Fat LA, Sena-Esteves M, Tannous BA. *Gaussia* luciferase variant for high-throughput functional screening applications. *Anal Chem*, 2009, 81, 7102–7106.
- Maguire CA, van der Mijl JC, Degeling MH, Morse D, Tannous BA. Codon-optimized *Luciola italica* luciferase variants for mammalian gene expression in culture and *in vivo*. *Mol Imaging*, 2012, 11(1), 13-21.
- Maguire CA, Bovenberg MS, Crommentuijn MH, Niers JM, Kerami M, Teng J. Triple bioluminescence imaging for *in vivo* monitoring of cellular processes. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, 2, e99.
- Manni I, de Latouliere L, Gurtner A, Piaggio G. Transgenic animal models to visualize cancer-related cellular processes by bioluminescence imaging. *Front Pharmacol*, 2019, 10, 235.
- Marines F. On-line monitoring of growth of *Escherichia coli* in batch cultures by bioluminescence. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 53, 536-41.
- Markova SV, Golz S, Frank LA, Kalthof B, Vysotski ES. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme. *J Biol Chem*, 2004, 279(5), 3212-7.



- Markova SV, Burakova LP, Vysotski ES. High-active truncated luciferase of copepod *Metridia longa*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417, 98–103.
- Markova SV, Larionova MD, Burakova LP, Vysotski ES. The smallest natural high-active luciferase: Cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod *Metridia longa*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 457, 77–82.
- Markova SV, Larionova MD, Vysotski ES. Shining Light on the Secreted Luciferases of Marine Copepods: Current Knowledge and Applications. *Photochem Photobiol*, 2019, 95(3), 705–721.
- Markova SV, Vysotski ES. Coelenterazine-dependent luciferases. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, 80(6), 714–732.
- Marques SM i Esteves da Silva JCG. An optimized luciferase bioluminescent assay for coenzyme A. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 391, 2161–2168.
- Marques SM i Esteves da Silva JCG. Firefly bioluminescence: A mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life*, 2009, 61(1), 6–17.
- Martins Lima A, Bragina ME, Burri O, Bortoli Chapalay J, Costa-Fraga FP, Chambon M, Fraga-Silva RA, Stergiopoulos N. An optimized and validated 384-well plate assay to test platelet function in a high-throughput screening format. *Platelets*, 2018, 5, 1–9.
- Masser AE, Kandasamy G, Kaimal JM, Andréasson C. Luciferase NanoLuc as a reporter for gene expression and protein levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2016, 33(5), 191–200.
- Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev*, 2003, 17(5), 545–80.
- Matta H, Gopalakrishnan R, Choi S, Prakash R, Natarajan V, Prins R, Gong S, Chitnis SD, Kahn M, Han X, Chaudhary V, Soni A, Sernas J, Khan P, Wang D, Chaudhary PM. Development and characterization of a novel luciferase based cytotoxicity assay. *Sci Rep*, 2018, 8(1), 199.
- Matthews JC, Hori K, Cormier MJ. Substrate and substrate analogue binding properties of *Renilla* luciferase. *Biochemistry*, 1977, 16, 5217–5220.
- Matta H, Gopalakrishnan R, Choi S. Development and characterization of a novel luciferase based cytotoxicity assay. *Sci Rep*, 2018, 8(1), 199.
- McElroy WD, DeLuca M, Travis J. Molecular uniformity in biological catalyses: the enzymes concerned with firefly luciferin, amino acid, and fatty acid utilization are compared. *Science* 1967, 157, 150–160.
- McKinnon E, Moore A, Dixit S, Zhu Y, Broome AM. Fluorescence and Bioluminescence Imaging of Orthotopic Brain Tumors in Mice. *Cancer Nanotechnology*, 2017, 283–305.
- McMahon M, Frangova TG, Henderson CJ, Wolf CR. Olaparib, monotherapy or with ionizing radiation, exacerbates DNA damage in normal tissues: insights from a new p21 reporter mouse. *Molecular Cancer Research*, 2016, 14(12), 1195–1203.

- McMahon M, Ding S, Acosta-Jimenez LP, Frangova TG, Henderson CJ, Wolf CR. Measuring *in vivo* responses to endogenous and exogenous oxidative stress using a novel haem oxygenase 1 reporter mouse. *The Journal of Physiology*, 2017, 596(1), 105–127.
- McNally JB, Kirkpatrick ND, Hariri LP, Tumlinson AR, Besselsen DG, Gerner EW, Utzinger U, Barton JK. Task-based imaging of colon cancer in the Apc(Min/+) mouse model. *Appl Opt*, 2006, 45(13), 3049-62.
- Meighen EA. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol Rev*, 1991, 55, 123-42.
- Meighen EA. Bacterial bioluminescence: organization, regulation and application of the *lux* genes. *FASEB J*, 1993,7, 1016-22.
- Merritt J, Senpuku H, Kreth J. Let there be bioluminescence: development of a biophotonic imaging platform for in situ analyses of oral biofilms in animal models. *Environ Microbiol*, 2016, 18(1), 174-90.
- Mezzanotte L, Fazzina R, Michelini E, Tonelli R, Pession A, Branchini B, Roda A. *In vivo* bioluminescence imaging of murine xenograft cancer models with a red-shifted thermostable luciferase. *Mol Imaging Biol*, 2010, 12(4), 406-14.
- Mezzanotte L, Que I, Kaijzel E, Branchini B, Roda A, Löwik C. Sensitive dual color *in vivo* bioluminescence imaging using a new red codon optimized firefly luciferase and a green click beetle luciferase. *PLoS One*, 2011, 6(4), e19277.
- Mezzanotte L, An N, Mol IM, Löwik CWGM, Kaijzel EL. A new multicolor bioluminescence imaging platform to investigate NF- $\kappa$ B activity and apoptosis in human breast cancer cells. *PLoS One*, 2014, 9, e85550.
- Mezzanotte L, van 't Root M, Karatas H, Goun EA, Löwik CWGM. *In Vivo* Molecular Bioluminescence Imaging: New Tools and Applications. *Trends Biotechnol*, 2017, 35(7), 640-652.
- Michelini E, Cevenini L, Mezzanotte L, Coppa A, Roda A. Cell-based assays: fuelling drug discovery. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398, 227-238.
- Michelini E, Cevenini L, Calabretta MM, Spinozzi S, Camborata C, Roda A. Field-deployable whole-cell bioluminescent biosensors: so near and yet so far. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405, 6155–6163.
- Michnick SW, Ear PH, Manderson EN, Remy I, Stefan E. Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007, 6(7), 569–582.
- Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2001,55, 165-99.
- Miloud T, Henrich C, Hämmerling GJ. Quantitative comparison of click beetle and firefly luciferases for *in vivo* bioluminescence imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 2007, 12(5), 054018.
- Minashima T, Kirsch T. Annexin A6 regulates catabolic events in articular chondrocytes via the modulation of NF- $\kappa$ B and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *PLoS One*, 2018, 13(5), e0197690.

- Mishra P, Rai S, Manjithaya R. A novel dual luciferase based high throughput assay to monitor autophagy in real time in yeast *S. cerevisiae*. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2017, 11, 138–146.
- Mitsuki Y, Yamamoto T, Mizukoshi F, Momota M, Terahara K, Yoshimura K, Tsunetsugu-Yokota Y. A novel dual luciferase assay for the simultaneous monitoring of HIV infection and cell viability. *Journal of Virological Methods*, 2016, 231, 25–33.
- Mofford DM, Reddy GR, Miller SC. Aminoluciferins extend firefly luciferase bioluminescence into the near-infrared and can be preferred substrates over D-luciferin. *J Am Chem Soc*, 2014, 136, 13277-13282.
- Momota H i Holland E. Bioluminescence technology for imaging cell proliferation. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 16(6), 681–686.
- Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev*, 2005, 11, 227-56.
- Morell M, Ventura S, Avilés FX. Protein complementation assays: Approaches for the *in vivo* analysis of protein interactions. *FEBS Lett*, 2009, 583, 1684–1691.
- Morita N, Haga S, Ohmiya Y, Ozaki M. Long-term *ex vivo* and *in vivo* monitoring of tumor progression by using dual luciferases. *Anal Biochem*, 2016, 497, 24-6.
- Motahari P, Sadeghizadeh M, Behmanesh M, Sabri S, Zolghadr F. Generation of stable ARE-driven reporter system for monitoring oxidative stress. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 23(1).
- Moussaud S, Malany SS, Mehta A, Vasile S, Smith LH, McLean PJ. Targeting alpha-synuclein oligomers by protein-fragment complementation for drug discovery in synucleinopathies. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 19, 589–603.
- Moutsopoulos A, Hunt E, Broyles D, Pereira CA, Woodward K, Dikici E, Kaifer A, Daunert S, Deo SK. Highly sensitive bioluminescent immunoassay for the detection of interferon- $\gamma$ . *Bioconjug Chem*, 2017, 28, 1749–1757.
- Mukherjee A, Castanares M, Hedayati M, Wabler M, Trock B, Kulkarni P, Rodriguez R, Getzenberg RH, DeWeese TL, Ivkov R, Lupold SE. Monitoring nanoparticle-mediated cellular hyperthermia with a high-sensitivity biosensor. *Nanomedicine Lond*, 2014, 18, 2729-43.
- Mullard A. 2018 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Disc*, 2019, 18, 85-89.
- Muranaka T, Kubota S, Oyama T. A single-cell bioluminescence imaging system for monitoring cellular gene expression in a plant body. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(12), 2085-93.
- Naik S, Piwnica-Worms D. Real-time imaging of beta-catenin dynamics in cells and living mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 17465-70.
- Nairne J, Iveson PB, Meijer A. Imaging in Drug Development. *Progress in Medicinal Chemistry*, 2015, 231–280.

- Nakajima Y, Kobayashi K, Yamagishi K, Enomoto T, Ohmiya Y. cDNA cloning and characterization of a secreted luciferase from the luminous Japanese ostracod, *Cypridina noctiluca*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(3), 565-70.
- Nakajima Y, Ohmiya Y. Bioluminescence assays: multicolor luciferase assay, secreted luciferase assay and imaging luciferase assay. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2010, 5(9), 835–849.
- Namkung Y, LeGouill C, Kumar S, Cao Y, Teixeira LB, Lukasheva V, Giubilaro J, Simões SC, Longpré JM, Devost D, Hébert TE, Piñeyro G, Leduc R, Costa-Neto CM, Bouvier M, Laporte SA. Functional selectivity profiling of the angiotensin II type 1 receptor using pathway-wide BRET signaling sensors. *Sci Signal*, 2018, 11, 559.
- Naran K, Moosa A, Barry CE 3rd, Boshoff HI, Mizrahi V, Warner DF. Bioluminescent reporters for rapid mechanism of action assessment in tuberculosis drug discovery. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(11), 6748-6757.
- Natashin PV, Markova SV, Lee J, Vysotski ES, Liu ZJ. Crystal structures of the F88Y obelin mutant before and after bioluminescence provide molecular insight into spectral tuning among hydromedusan photoproteins. *FEBS J*, 2014, 281, 1432–1445.
- Navizet I, Liu YJ, Ferré N, Xiao HY, Fang WH, Lindh R. Color-Tuning Mechanism of Firefly Investigated by Multi-Configurational Perturbation Method. *J Am Chem Soc*, 2010, 132, 706–712.
- Nazari M, Emamzadeh R, Hosseinkhani S, Cevenini L, Michelini E, Roda A. *Renilla* luciferase-labeled Annexin V: a new probe for detection of apoptotic cells. *Analyst*, 2012, 137, 5062-5070.
- Nieto Gutierrez A, McDonald PH. GPCRs: emerging anti-cancer drug targets. *Cell Signal*, 2018, 41, 65–74.
- Nijvipakul S, Wongratana J, Suadee C, Entsch B, Ballou DP, Chaiyen P. LuxG is a functioning flavin reductase for bacterial luminescence. *J Bacteriol*, 2008, 190, 1531-8.
- Ning S, Sekar TV, Scicinski J, Oronsky B, Peehl DM, Knox SJ, Paulmurugan R. Nrf2 activity as a potential biomarker for the pan-epigenetic anticancer agent, RRx-001. *Oncotarget*, 2015, 6(25), 21547-56.
- Nishitsuji H, Ujino S, Shimizu Y, Harada K, Zhang J, Sugiyama M, Mizokami M, Shimotohno K. Novel reporter system to monitor early stages of the hepatitis B virus life cycle. *Cancer Sci*, 2015, 106, 1616–1624.
- Niwa K, Ichino Y, Ohmiya Y. Quantum yield measurements of firefly bioluminescence reactions using a commercial luminometer. *Chem Lett*, 2010, 39, 291–293.
- Noda N, Awais R, Sutton R, Awais M, Ozawa T. Dynamic monitoring of p53 translocation to mitochondria for the analysis of specific inhibitors using luciferase-fragment complementation. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(12), 2818-2827.
- Ntziachristos V. Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. *Nat Methods*, 2010, 7(8), 603-14.

- Nyren P, Lundin A. Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Anal Biochem*, 1985, 151, 504–509.
- Oba Y, Kato S, Ojika M, Inouye S. Biosynthesis of coelenterazine in the deep-sea copepod, *Metridia pacifica*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 390(3), 684-8.
- Oba Y, Yoshida N, Kanie S, Ojika M, Inouye S. Biosynthesis of firefly luciferin in adult lantern: decarboxylation of L-cysteine is a key step for benzothiazole ring formation in firefly luciferin synthesis. *PLoS One*, 2013, 8(12), e84023.
- Oberbauer E, Steffenhagen C, Feichtinger G, Hildner F, Hacobian A, Danzer M, Gabriel C, Redl H, Wolbank S. A luciferase-based quick potency assay to predict chondrogenic differentiation. *Tissue Eng Part C Methods*, 2016, 5, 487–495.
- O’Connell MR, Gamsjaeger R, Mackay JP. The structural analysis of protein–protein interactions by NMR spectroscopy. *Proteomics*, 2009, 9, 5224–5232.
- O’Connell-Rodwell CE, Mackanos MA, Simanovskii D, Cao YA, Bachmann MH, Schwettman HA, Contag CH. *In vivo* analysis of heat-shock-protein-70 induction following pulsed laser irradiation in a transgenic reporter mouse. *J Biomed Opt*, 2008, 13, 1–3.
- Ogunniyi AD, Kopecki Z, Hickey EE, Khazandi M, Peel E, Belov K, Boileau A, Garg S, Venter H, Chan WY, Hill PB, Page SW, Cowin AJ, Trott DJ. Bioluminescent murine models of bacterial sepsis and scald wound infections for antimicrobial efficacy testing. *PLoS One*, 2018, 13(7), e0200195.
- Oh SG, Li X, Lee HW, Singh TD, Lee SB, Ji HD, Yoon G, Cho SJ, Lee IK, Jeong SY, Ahn BC, Lee J, Chang HW, Lee SW, Jeon YH. Non-invasive visualization of mast cell recruitment and its effects in lung cancer by optical reporter gene imaging and glucose metabolism monitoring. *Biomaterials*, 2017, 112, 192-203.
- Oh-Hashi K, Hirata Y, Kiuchi K. SOD1 dimerization monitoring using a novel split NanoLuc, NanoBit. *Cell Biochem Funct*, 2016, 34(7), 497-504.
- O’Neill K, Lyons SK, Gallagher WM, Curran KM, Byrne AT. Bioluminescent imaging: a critical tool in pre-clinical oncology research. *J Pathol*, 2010, 220(3), 317-27.
- Ozawa T, Umezawa Y. Detection of protein-protein interactions *in vivo* based on protein splicing. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5, 587-583.
- Ozeki Y, Igarashi M, Doe M, Tamaru A, Kinoshita N, Ogura Y, Iwamoto T, Sawa R, Umekita M, Enany S, Nishiuchi Y, Osada-Oka M, Hayashi T, Niki M, Tateishi Y, Hatano M, Matsumoto S. A new screen for tuberculosis drug candidates utilizing a luciferase-expressing recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guérén. *PLoS One*, 2015, 10(11), e0141658.
- Öztürk-Kaloglu D, Hercher D, Heher P, Posa-Markaryan K, Sperger S, Zimmermann A, Wolbank S, Redl H, Hacobian A. A noninvasive *in vitro* monitoring system reporting skeletal muscle differentiation. *Tissue Eng Part C Methods*, 2017, 23(1), 1 -11.
- Paguio A, Stecha P, Wood KV, Fan F. Improved dual luciferase reporter assays for nuclear receptors. *Curr Chem Genomics*, 2010, 4, 43–49.

- Pal A, Rehemtulla A. Imaging Proteolytic Activities in Mouse Models of Cancer. *Methods Mol Biol*, 2018, 1731, 247-260.
- Papon N, Courdavault V, Lanoue A, Clastre M, Brock M. Illuminating fungal infections with bioluminescence. *PLoS Pathog*, 2014, 10(7), e1004179.
- Patergnani S, Baldassari F, De Marchi E, Karkucinska-Wieckowska A, Wieckowski MR, Pinton P. Methods to monitor and compare mitochondrial and glycolytic ATP production. *Methods Enzymol*, 2014, 542, 313-32.
- Patterson SS, Dionisi HM, Gupta RK, Sayler GS. Codon optimization of bacterial luciferase (*lux*) for expression in mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, 32(3), 115-23.
- Patterson PA, Booth S, Saba R. The emerging use of *in vivo* optical imaging in the study of neurodegenerative diseases. *BioMed Research International*, 2014, 10.1155, 401306.
- Paulmurugan R, Gambhir SS. Monitoring protein–protein interactions using split synthetic *Renilla* luciferase protein-fragment-assisted complementation. *Anal Chem*, 2003, 75, 1584–1589.
- Paulmurugan R, Gambhir SS. Novel fusion protein approach for efficient high-throughput screening of small molecule-mediating protein-protein interactions in cells and living animals. *Cancer Res*, 2005, 6516, 7413–7420.
- Paul-Smith MC, Pytel KM, Gelinis JF, McIntosh J, Pringle I, Davies L, Chan M, Meng C, Bell R, Cammack L, Moran C, Cameron L, Inoue M, Tsugumine S, Hironaka T, Gill DR, Hyde SC, Nathwani A, Alton EFWF, Griesenbach U. The murine lung as a factory to produce secreted intrapulmonary and circulatory proteins. *Gene Ther*, 2018, 25, 345–358.
- Peter S, Yu H, Ivanyi-Nagy R, Dröge P. Cell-based high-throughput compound screening reveals functional interaction between oncofetal HMGA2 and topoisomerase I. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(22), e162.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*, 2011, 8, 785–786.
- Peterson KR, Costa FC, Fedosyuk H, Neades RY, Chazelle AM, Zelenchuk L, Fonteles AH, Dalal P, Roy A, Chaguturu R, Li B, Pace BS. A cell-based high-throughput screen for novel chemical inducers of fetal hemoglobin for treatment of hemoglobinopathies. *PLoS One*, 2014, 9(9), e107006.
- Pfleger KD, Dromey JR, Dalrymple MB, Lim EM, Thomas WG, Eidne KA. Extended bioluminescence resonance energy transfer (EBRET) for monitoring prolonged protein–protein interactions in live cells. *Cell Signal*, 2006, 18, 1664-1670.
- Phillips-Jones MK. Bioluminescence (*lux*) expression in the anaerobe *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 106, 265-70.
- Pibiri I, Lentini L, Tutone M, Melfi R, Pace A, Di Leonardo A. Exploring the readthrough of nonsense mutations by non-acidic Ataluren analogues selected by ligand-based virtual screening. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 122, 429–435.
- Pinto M, Morange M, Bensaude O. Denaturation of proteins during heat shock. *J Biol Chem*, 1991, 266, 13941.

Pohjala L, Barai V, Azhayevev A, Lapinjoki S, Ahola T. A luciferase-based screening method for inhibitors of alphavirus replication applied to nucleoside analogues. *Antivir Res*, 2008, 78, 215–222.

Porterfield WB, Prescher JA. Tools for visualizing cell–cell ‘interactomes’. *Curr Opin Chem Biol*, 2015, 24, 121-130.

Prescher JA, Contag CH. Guided by the light: visualizing biomolecular processes in living animals with bioluminescence. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, 14, 80-89.

Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*, 2014, 74(11), 2913-21.

Rahnama S, Saffar B, Kahrani ZF, Nazari M, Emamzadeh R. Super RLuc8: A novel engineered *Renilla* luciferase with a red-shifted spectrum and stable light emission. *Enzyme Microb Technol*, 2017, 96, 60-66.

Rao VS, Srinivas K, Sujini GN, Kumar GN. Protein–protein interaction detection: Methods and analysis. *Int J Proteom*, 2014, 147648.

Ratet G, Veyrier FJ, Fanton d’Andon M, Kammerscheit X, Nicola MA, Picardeau M, Werts C. Live Imaging of Bioluminescent *Leptospira interrogans* in Mice Reveals Renal Colonization as a Stealth Escape from the Blood Defenses and Antibiotics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014, 8(12), e3359.

Rathbun CM, Prescher JA., Bioluminescent probes for imaging biology beyond the culture dish. *Biochemistry*, 2017, 56, 5178-5184.

Rathnayaka T, Tawa M, Sohya S, Yohda M, Kuroda Y. Biophysical characterization of highly active recombinant *Gaussia* luciferase expressed in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804, 1902–1907.

Rathnayaka T, Tawa M, Nakamura T, Sohya S, Kuwajima K, Yohda M, Kuroda Y. Solubilization and folding of a fully active recombinant *Gaussia* luciferase with native disulfide bonds by using a SEP-Tag. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1814, 1775–1778.

Remy I, Michnick SW. A highly sensitive protein–protein interaction assay based on *Gaussia* luciferase. *Nature Methods*, 2006, 3, 977–979.

Reporter gene assays, 2019., <http://www.biotium.com>, pristupljeno 6. 5. 2019.

Richter G, Krieger C, Volk R, Kis K, Ritz H, Gotze E. Biosynthesis of riboflavin: 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase. *Methods Enzymol*, 1997, 280, 374-82.

Riedel CU, Monk IR, Casey PG, Morrissey D, O’Sullivan GC, Tangney M. Improved luciferase tagging system for *Listeria monocytogenes* allows realtime monitoring *in vivo* and *in vitro*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73, 3091-4.

Roberts MB, Dart ML, Woodroffe CC, Zimprich CA, Kirkland TA, Machleidt T, Kupcho CR, Levin S, Hartnett JR, Zimmerman K. Target engagement and drug residence time can be observed in living cells with BRET. *Nat Commun*, 2015, 6, 10091.

Roberts CM, Shahin SA, Loeza J, Dellinger TH, Williams JC, Glackin C A. Disruption of TWIST1-RELA binding by mutation and competitive inhibition to validate the TWIST1 WR domain as a therapeutic target. *BMC Cancer*, 2017, 17(1).

Roda A. Chemiluminescence and Bioluminescence; Past, Present and Future, Royal Society of Chemistry, 2011., str. 163., 444., 469-470., 473-475.

Roda A, Guardigli M, Michelini E, Mirasoli M. Bioluminescence in analytical chemistry and *in vivo* imaging. *Trends Analyt Chem*, 2009, 28, 307–322.

Roda A, Guardigli M, Pasini P, Mirasoli M. Bioluminescence and chemiluminescence in drug screening. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2003, 377, 826-33.

Roda A, Pasini P, Mirasoli M, Michelini, Guardigli M. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *TRENDS Biotechnol*, 2004, 22, 295–303.

Rodrigues Felix C, Gupta R, Geden S, Roberts J, Winder P, Pomponi SA, Diaz MC, Reed JK, Wright AE, Rohde KH. Selective killing of dormant *Mycobacterium tuberculosis* by marine natural products. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(8), e00743-17.

Roos A, Dhruv HD, Mathews IT, Inge LJ, Tuncali S, Hartman LK, Chow D, Millard N, Yin HH, Kloss J, Loftus JC, Winkles JA, Berens ME, Tran NL. Identification of aurintricarboxylic acid as a selective inhibitor of the TWEAK-Fn14 signaling pathway in glioblastoma cells. *Oncotarget*, 2017, 8(7), 12234-12246.

Rossi M, Massai L, Diamanti D, Fiengo P, De Rosa A, Magrini R, Porcari V. Multimodal molecular imaging system for pathway-specific reporter gene expression. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 86, 136–142.

Rovithi M, Avan A, Funel N, Leon LG, Gomez VE, Wurdinger T, Giovannetti E. Development of bioluminescent chick chorioallantoic membrane (CAM) models for primary pancreatic cancer cells: a platform for drug testing. *Sci Rep*, 2017, 7(1), 44686.

Rowe L, Combs K, Deo S, Ensor C, Daunert S, Qu X. Genetically modified semisynthetic bioluminescent photoprotein variants: simultaneous dual-analyte assay in a single well employing time resolution of decay kinetics. *Anal Chem*, 2008, 80, 8470–8476.

Rowe L, Dikici E, Daunert S. Engineering bioluminescent proteins: Expanding their analytical potential. *Anal Chem*, 2009, 81, 8662–8668.

Rumyantsev KA, Turoverov KK, Verkhusha VV. Near-infrared bioluminescent proteins for two-color multimodal imaging. *Sci Rep*, 2016, 6, 36588.

Salahpour A, Espinoza S, Masri B, Lam V, Barak LS, Gainetdinov RR. BRET biosensors to study GPCR biology, pharmacology, and signal transduction. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012, 3, 105.

Saleh N, Suwaid ARB, Alhalabi A, Abuibaid AZA, Maltsev OV, Hintermann L, Naumov P. Bioinspired Molecular Lantern: Tuning the Firefly Oxyluciferin Emission with Host–Guest Chemistry. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2016, 120(31), 7671–7680.

Salomonson E, Stacer AC, Ehrlich A, Luker KE, Luker GD. Imaging CXCL12-CXCR4 signaling in ovarian cancer therapy. *PLoS One*, 2013, 8(1), e51500.



- Salunke SB, Azad AK, Kapuriya NP, Balada-Llasat JM, Pancholi P, Schlesinger LS, Chen CS. Design and synthesis of novel anti-tuberculosis agents from the celecoxib pharmacophore. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23(9), 1935-43.
- Sandhu GS, Solorio L, Broome AM, Salem N, Kolthammer J, Shah T, Flask C, Duerk JL. Whole animal imaging. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2010, 2(4), 398-421.
- Sandri A, Ortombina A, Boschi F, Cremonini E, Boaretti M, Sorio C, Melotti P, Bergamini G, Lleo M. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* secreted virulence factors reduces lung inflammation in CF mice. *Virulence*, 2018, 9(1), 1008-1018.
- Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, Donadi RS, Bologa CG. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 2017, 16(1), 19–34.
- Schaefer AL, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE Jr, Greenberg EP. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93, 9505-9.
- Schagat T, Gaguio A, Kopish K. Normalizing genetic reporter assays: approaches and considerations for increasing consistency and statistical significance. *Cell Notes*, 2007, 9–12.
- Schaub FX, Reza MS, Flaveny CA, Li W, Musicant AM, Hoxha S, Guo M, Cleveland JL, Amelio AL. Fluorophore-NanoLuc BRET reporters enable sensitive *in vivo* optical imaging and flow cytometry for monitoring tumorigenesis. *Cancer Res*, 2015, 75, 5023–5033.
- Schramm A, Mueller-Thuemen P, Littmann T, Harloff M, Ozawa T, Schlossmann J. Establishing a Split Luciferase Assay for Protein Kinase G (PKG) Interaction Studies. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4), pii: E1180.
- Schulz RB, Semmler W. Fundamentals of optical imaging. *Handb Exp Pharmacol*, 2008, 185, 3-22.
- Seay K, Khajouejinejad N, Zheng JH, Kiser P, Ochsenbauer C, Kappes JC, Herold B, Goldstein H. The vaginal acquisition and dissemination of HIV-1 infection in a novel transgenic mouse model is facilitated by coinfection with herpes simplex virus 2 and is inhibited by microbicide treatment. *J Virol*, 2015, 89, 9559–9570.
- Secreted luciferases, 2012., <http://www.invivogen.com>, pristupljeno 30. 4. 2019.
- Sekar TV, Foygel K, Devulapally R, Kumar V, Malhotra S, Massoud TF, Paulmurugan R. Molecular Imaging Biosensor Monitors p53 Sumoylation in Cells and Living Mice. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(23), 11420–11428.
- Seliger HH, Buck B, Fastie WG, McElroy WD. The spectral distribution of firefly light. *J Gen Physiol*, 1964, 48, 95-104.
- Servais FA, Kirchmeyer M, Hamdorf M, Minoungou NWE, Rose-John S, Kreis S, Haan C, Behrmann I. Modulation of the IL-6-signaling pathway in liver cells by miRNAs targeting gp130, JAK1, and/or STAT3. *Mol Ther Nucleic Acids*, 16, 419-433.
- Sever JL. Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J Immunol*, 1962, 88, 320–329.

Sewing ACP, Lagerweij T, van Vuurden DG, Meel MH, Veringa SJE, Carcaboso AM, Hulleman E. Preclinical evaluation of convection-enhanced delivery of liposomal doxorubicin to treat pediatric diffuse intrinsic pontine glioma and thalamic high-grade glioma. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 2017, 19(5), 518–530.

Shakhmin A, Hall MP, Machleidt T, Walker JR, Wood KV, Kirkland TA. Coelenterazine analogues emit red-shifted bioluminescence with NanoLuc. *Org Biomol Chem*, 2017, 15(40), 8559-8567.

Sharifian S, Homaei A, Hemmati R, B Luwor R, Khajeh K. The emerging use of bioluminescence in medical research. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101, 74-86.

Sheahan AV, Sekar TV, Chen K, Paulmurugan R, Massoud TF. A molecular imaging biosensor detects *in vivo* protein folding and misfolding. *Journal of Molecular Medicine*, 2016, 94(7), 799–808.

Shen L, Li Y, Chen J, Li C, Huang J, Luo Y, Qiu HJ. Generation of a recombinant classical swine fever virus stably expressing the firefly luciferase gene for quantitative antiviral assay. *Antiviral Research*, 2014, 109, 15–21.

Shifera AS, Hardin JA. Factors modulating expression of *Renilla* luciferase from control plasmids used in luciferase reporter gene assays. *Anal Biochem*, 2010, 396, 167-172.

Shigehisa M, Amaba N, Higashi C, Kawanabe R, Matsunaga A, Laksmi FA, Tokunaga M, Ishibashi M. Stabilization of luciferase from *Renilla reniformis* using random mutations. *Protein Eng Des Sel*, 2017, 30, 7-13.

Shigeto H, Ikeda T, Kuroda A, Funabashi H. A BRET-based homogeneous insulin assay using interacting domains in the primary binding site of the insulin receptor. *Anal Chem*, 2015, 87, 2764–2770.

Shimomura O. Bioluminescence:chemical principles and methods. Singapore, World Scientific Publishing Co. Pty. Ltd., 2006, str. 3-5., 30-46., 51-62., 82-83.

Shimomura O, Masugi T, Johnson FH, Haneda Y. Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilorostris*. *Biochemistry*, 1978, 17(6), 994-8.

Shin Y, Choi BS, Kim KC, Kang C, Kim K, Yoon CH. Development of a dual reporter screening assay for distinguishing the inhibition of HIV Tat-mediated transcription from off-target effects. *Journal of Virological Methods*, 2017, 249, 1–9.

Siddiqui KS. Some like it hot, some like it cold: Temperature dependent biotechnological applications and improvements in extremophilic enzymes. *Biotechnol Adv*, 2015, 33, 1912–1922.

Silva Neto AJ, Scorsato V, Arnoldi FGC, Viviani VR. Pyrearinus termitilluminans larval click beetle luciferase: active site properties, structure and function relationships and comparison with other beetle luciferases. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2009, 8(12), 1748.

Simeonov A, Jadhav J, Thomas CJ, Wang Y, Huang R, Southall NT, Shinn P, Smith J, Austin CP, Auld DS, Inglese J. Fluorescence Spectroscopic Profiling of Compound Libraries. *J Med Chem*, 2008, 51, 2363–2371.

Singh TD, Lee J, Jeon YH. Noninvasive imaging of natural killer cell-mediated apoptosis in a mouse tumor model. *Methods Mol Biol*, 2016, 1441, 297-306.

Sleno R, Pétrin D, Devost D, Goupil E, Zhang A, Hébert TE. Designing BRET-based conformational biosensors for G protein-coupled receptors. *Methods*, 2016, 92, 11-8.

Smirnova DV i Ugarova NN. Firefly Luciferase-based Fusion Proteins and their Applications in Bioanalysis. *Photochemistry and Photobiology*, 2016, 93(2), 436–447.

Solntsev KM, Laptinok SP, Naumov P. Photoinduced Dynamics of Oxyluciferin Analogues: Unusual Enol “Super”photoacidity and Evidence for Keto–Enol Isomerization. *J Am Chem Soc*, 2012, 134, 16452–16455.

Soly RR, Mancini JA, Ferri SR, Boylan M, Meighen EA. A new *lux* gene in bioluminescent bacteria codes for a protein homologous to the bacterial luciferase subunits. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 155, 351-8.

Song WC, Sung HJ, Park KS, Choi JW, Cho JY, Um SH. Novel functional *Renilla* luciferase mutant provides long-term serum stability and high luminescence activity. *Protein Expr Purif*, 2013, 91, 215-220.

Spronken MI, Short KR, Herfst S, Bestebroer TM, Vaes VP, van der Hoeven B3, Koster AJ, Kremers GJ, Scott DP, Gulyaev AP, Sorell EM, de Graaf M, Bárcena M, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA. Optimisations and challenges involved in the creation of various bioluminescent and fluorescent influenza A virus strains for *in vitro* and *in vivo* applications. *PLoS One*, 2015, 10(8), e0133888.

Stacer AC, Nyati S, Moudgil P, Iyengar R, Luker KE, Rehemtulla A, Luker GD. NanoLuc reporter for dual luciferase imaging in living animals. *Mol Imaging*, 2013, 12(7), 1-13.

Stathopoulos GT, Sherrill TP, Han W, Sadikot RT, Polosukhin VV, Fingleton B, Yull FE, Blackwell TS. Use of bioluminescent imaging to investigate the role of nuclear factor- $\kappa$ B in experimental non-small cell lung cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25, 43–51.

Stefan E, Aquin S, Berger N, Landry CR, Nyfeler B, Bouvier M, Michnick SW. Quantification of dynamic protein complexes using *Renilla* luciferase fragment complementation applied to protein kinase A activities *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(43), 16916-21.

Stepanyuk GA, Liu ZJ, Markova SV, Frank LA, Lee J, Vysotski ES, Wang BC. Crystal structure of coelenterazine-binding protein from *Renillamuelleri* at 1.7 Å: why it is not a calcium-regulated photo protein. *Photochem Photobiol Sci*, 2008a, 7, 442-447.

Stepanyuk GA, Xu H, Wu CK, Markova SV, Lee J, Vysotski ES, Wang BC. Expression, purification and characterization of the secreted luciferase of the copepod *Metridia longa* from Sf9 insect cells. *Protein Expr Purif*, 2008b, 61, 142–148.

Stepanyuk GA, Liu ZJ, Vysotski ES, Lee J, Rose JP, Wang BC. Structure based mechanism of the Ca<sup>2+</sup>-induced release of coelenterazine from the *Renilla* binding protein. *Proteins*, 2009, 74, 583-593.

Støchkel K, Nygaard Hansen C, Houmøller J, Munksgaard Nielsen L, Anggara K, Linares M, Norman P, Nogueira F, Maltsev OV, Hintermann L. On the Influence of Water on the

Electronic Structure of Firefly Oxyluciferin Anions from Absorption Spectroscopy of Bare and Monohydrated Ions in Vacuo. *J Am Chem Soc*, 2013, 135, 6485–6493.

Stoddart LA, Johnstone EKM, Wheal AJ, Goulding J, Robers MB, Machleidt T, Wood KV, Hill SJ, Pflieger KDG. Application of BRET to monitor ligand binding to GPCRs. *Nat Methods*, 2015, 12(7), 661-663.

Stoddart LA, Vernall AJ, Bouzo-Lorenzo M, Bosma R, Kooistra AJ, de Graaf C, Vischer HF, Leurs R, Briddon SJ, Kellam B, Hill SJ. Development of novel fluorescent histamine H<sub>1</sub>receptor antagonists to study ligand-binding kinetics in living cells. *Sci Rep*, 2018,8(1), 1572.

Stone WJR, Churcher TS, Graumans W, van Gemert GJ, Vos MW, Lanke KHW, Bousema T. A scalable assessment of *Plasmodium falciparum* transmission in the standard membrane-feeding assay, using transgenic parasites expressing green fluorescent protein–luciferase. *The Journal of Infectious Diseases*, 2014, 210(9), 1456–1463.

Storme J, Cannaert A, Van Craenenbroeck K, Stove CP. Molecular dissection of the human A3 adenosine receptor coupling with  $\beta$ -arrestin2. *Biochem Pharmacol*, 2018, 148, 298-307.

Subramanian C, Woo J, Cai X, Xu X, Servick S, Johnson CH, Nebenführ A, von Arnim AG. A suite of tools and application notes for *in vivo* protein interaction assays using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Plant J*, 2006, 48, 138–152.

Sun Y, Jacobson KB, Golovlev V. A multienzyme bioluminescent time-resolved pyrophosphate assay. *Anal Biochem*, 2007, 367, 201–209.

Sun C, Gardner CL, Watson AM, Ryman KD, Klimstra WB. Stable, high-level expression of reporter proteins from improved alphavirus expression vectors to track replication and dissemination during encephalitic and arthritogenic disease. *J Virol*, 2014, 88(4), 2035-46.

Sun S, Yang X, Wang Y, Shen X. *In vivo* analysis of protein–protein interactions with bioluminescence resonance energy transfer (BRET): Progress and Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(10), 1704.

Suzuki K, Kimura T, Shinoda H, Bai G, Daniels MJ, Arai Y, Nakano M, Nagai T. Five colour variants of bright luminescent protein for real-time multicolour bioimaging. *Nat Commun*, 2016, 7, 13718.

Suzuki T, Kanamori T, Inouye S. Quantitative visualization of synchronized insulin secretion from 3D-cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486, 886–892.

Swartzman E, Miyamoto C, Graham A, Meighen E. Delineation of the transcriptional boundaries of the *lux* operon of *Vibrio harveyi* demonstrates the presence of two new *lux* genes. *J Biol Chem*, 1990, 265, 3513-7.

Szittner R, Meighen E. Nucleotide sequence, expression and properties of luciferase coded by *lux* genes from a terrestrial bacterium. *J Biol Chem*, 1990, 265, 16581-7.

Szyska M, Herda S, Althoff S, Heimann A, Russ J, D'Abundo D, Dang TM, Durieux I, Dörken B, Blankenstein T, Na IK. A transgenic dual-luciferase reporter mouse for longitudinal and functional monitoring of t cells *in vivo*. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6(1), 110-120.

- Tada H, Matsuyama T, Nishioka T, Hagiwara M, Kiyoura Y, Shimauchi H, Matsushita K. *Porphyromonas gingivalis* gingipain-dependently enhances IL-33 production in human gingival epithelial cells. *PLoS One*, 2016, 11(4), e0152794.
- Chu E. Identification of a cis-acting element of human dihydrofolate reductase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 369, 795–800.
- Takenaka Y, Masuda H, Yamaguchi A, Nishikawa S, Shigeri Y, Yoshida Y, Mizuno H. Two forms of secreted and thermostable luciferases from the marine copepod crustacean, *Metridia pacifica*. *Gene*, 2008, 425, 28–35.
- Tambuwalla MM, Manresa MC, Cummins EP, Aversa V, Coulter IS, Taylor CT. Targeted delivery of the hydroxylase inhibitor DMOG provides enhanced efficacy with reduced systemic exposure in a murine model of colitis. *Journal of Controlled Release*, 2015, 217, 221–227.
- Tamura T, Fukuhara T, Uchida T, Ono C, Mori H, Sato A, Fauzyah Y, Okamoto T, Kurosu T, Setoh YX, Imamura M, Tautz N, Sakoda Y, Khromykh AA, Chayama K, Matsuura Y. Characterization of recombinant flaviviridae viruses possessing a small reporter tag. *J Virol*, 2018, 92(2), e01582-17.
- Tanaka S, Kuroda A, Kato J, Ikeda T, Takiguchi N, Ohtake H. A sensitive method for detecting AMP by utilizing polyphosphate-dependent ATP regeneration and bioluminescence reactions. *Biochem Eng J*, 2001, 9, 193–197.
- Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: The need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2015, 54, 120–132.
- Tannous BA, Kim DE, Fernandez JL, Weissleder R, Breakefield XO. Codon-optimized *Gaussia* luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and *in vivo*. *Mol Ther*, 2005, 11(3), 435–43.
- Taylor MC, Kelly JM. Optimizing bioluminescence imaging to study protozoan parasite infections. *Trends in Parasitology*, 2014, 30(4), 161–162.
- Terracina KP, Aoyagi T, Huang WC, Nagahashi M, Yamada A, Aoki K, Takabe K. Development of a metastatic murine colon cancer model. *Journal of Surgical Research*, 2015, 199(1), 106–114.
- Tessler M, Gaffney JP, Crawford JM, Trautman E, Gujarati NA, Alatalo P, Pieribone VA, Gruber DF. Luciferin production and luciferase transcription in the bioluminescent copepod *Metridia lucens*. *PeerJ*, 2018, 6, e5506.
- Thomas T, Seay K, Zheng JH, Zhang C, Ochsenbauer C, Kappes JC, Goldstein H. High-throughput humanized mouse models for evaluation of HIV-1 therapeutics and pathogenesis. *Methods Mol Biol*, 2016, 1354, 221–235.
- Thompson EM, Nagata S, Tsuji F. Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorffii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86, 6567–6571.
- Thompson JF, Hayes LS, Lloyd DB. Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene*, 1991, 103, 171–177.

Thompson JF, Geoghegan KF, Lloyd DB, Lanzetti AJ, Magyar RA, Anderson SM, Branchini BR. Mutation of a protease-sensitive region in firefly luciferase alters light emission properties. *J Biol Chem*, 1997, 272, 18766–18771.

Thorne N, Inglese J, Auld DS. Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry & Biology*, 2010, 17(6), 646–657.

Thorne N, Shen M, Lea WA, Simeonov A, Lovell S, Auld DS, Inglese J. Firefly luciferase in chemical biology: a compendium of inhibitors, mechanistic evaluation of chemotypes, and suggested use as a reporter. *Chem Biol*, 2012, 19, 1060–1072.

Tinikul R, Chaiyen P. Structure, Mechanism, and Mutation of Bacterial Luciferase. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2014, 154, 47–74.

Tiwari K, Raj VS, Upadhyay DJ, Gupta RK. *In vitro* activity of bioactive extracts from rare actinomycetes against multi-drug resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Appl Microbiol*, 2015, 118(6), 1306-14.

TokeOni: Properties and Applications, 2019., <http://www.sigmaaldrich.com>, pristupljeno 30. 5. 2019.

Tomabechi Y, Hosoya T, Ehara H, Sekine S, Shirouzu M, Inouye S. Crystal structure of nanoKAZ: The mutated 19 kDa component of *Oplophorus* luciferase catalyzing the bioluminescent reaction with coelenterazine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 470(1), 88–93.

Trzaskowski B, Latek D, Yuan S, Ghoshdastider U, Debinski A, Filipek S. Action of molecular switches in GPCRs-theoretical and experimental studies. *Curr Med Chem*, 2012, 19(8), 1090-109.

Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67, 509-44.

Tsujita T, Kawaguchi S, Dan T, Baird L, Miyata T, Yamamoto M. Hypoxia-sensitive reporter system for high-throughput screening. *Tohoku J Exp Med*, 2015, 235(2), 151-9.

Turcano L, Visaggio D, Frangipani E, Missineo A, Andreini M, Altamura S, Bresciani A. Identification by High-Throughput Screening of Pseudomonas Acyl-Coenzyme A Synthetase Inhibitors. *Slas Discov*, 2017, 22(7), 897–905.

Unal H. Luciferase reporter assay for unlocking ligand-mediated signaling of GPCRs. *Methods Cell Biol*, 2019, 149, 19-30.

Ur Rahman S, Stanton M, Casey PG, Spagnuolo A, Bensi G, Hill C, Francis KP, Tangney M, Gahan CGM. Development of a Click Beetle Luciferase Reporter System for Enhanced Bioluminescence Imaging of *Listeria monocytogenes*: Analysis in Cell Culture and Murine Infection Models. *Front Microbiol*, 2017, 8, 1797.

Ustinova J, Zusinaite E, Utt M, Metsküla K, Reimand K, Huchaiah V, Merits A, Uibo R. Development of a luciferase-based system for the detection of ZnT8 autoantibodies. *J Immunol Methods*, 2014, 405, 67–73.

- Vande Velde G, Kucharíková S, Van Dijck P, Himmelreich U. Bioluminescence imaging increases *in vivo* screening efficiency for antifungal activity against device-associated *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*, 2018, 52(1), 42-51.
- Van Reet N, Van de Vyver H, Pyana PP, Van der Linden AM, Büscher P. A panel of *Trypanosoma brucei* strains tagged with blue and red-shifted luciferases for bioluminescent imaging in murine infection models. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014, 8(8), e3054.
- Veloria JR, Devkota AK, Cho EJ, Dalby KN. Optimization of a Luminescence-Based High-Throughput Screening Assay for Detecting Apyrase Activity. *SLAS Discov*, 2017, 22(1), 94-101.
- Velten J, Pogson B, Cazzonelli CI. Luciferase as a reporter of gene activity in plants. *Transgenic Plant J*, 2008, 2, 1–13.
- Verhaegent M, Christopoulos TK. Recombinant *Gaussia* luciferase: Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization. *Anal Chem*, 2002, 74(17), 4378-85.
- Vidal M, Cusick ME, Barabási AL. Interactome networks and human disease. *Cell*, 2011, 144(6), 986-98.
- Viviani VR, Arnoldi FG, Venkatesh B, Neto AJ, Ogawa FG, Oehlmeyer AT, Ohmiya Y. Active-site properties of *Phrixotrix* railroad worm green and red bioluminescence-eliciting luciferases. *J Biochem*, 2006, 140, 467–474.
- Vocat A, Hartkoorn RC, Lechartier B, Zhang M, Dhar N, Cole ST, Sala C. Bioluminescence for assessing drug potency against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(7), 4012-9.
- Walker JR, Hall MP, Zimprich CA, Robers MB, Duellman SJ, Machleidt T, Zhou W. Highly Potent Cell-Permeable and Impermeable NanoLuc Luciferase Inhibitors. *ACS Chemical Biology*, 2017, 12(4), 1028–1037.
- Wang G, Cong W, Durairaj K, Qian X, Shen H, Sinn P, Hoffman E, McLennan G, Henry M. *In vivo* mouse studies with bioluminescence tomography. *Opt Express*, 2006, 14, 7801-7809.
- Wang Y, Akiyama H, Terakado K, Nakatsu T. Impact of sitedirected mutant luciferase on quantitative green and orange/red emission intensities in firefly bioluminescence. *Sci Rep*, 2013, 3, 2490.
- Wang D, Zhao Y, Wang Y, Rong Y, Qin H, Bao Y, Song Z, Yu C, Sun L, Li Y. 25-methoxydammarane-3 $\beta$ , 12 $\beta$ , 20-triol and artemisinin synergistically inhibit MDA-MB-231 cell proliferation through downregulation of testes-specific protease 50 (TSP50) expression. *Tumour Biol*, 2016, 37(9), 11805-11813.
- Wang BJ, Wu PY, Chen YW, Chang YT, Bhore N, Wu PF, Liao YF. Quantitative measurement of  $\gamma$ -secretase-mediated amyloid precursor protein and notch cleavage in cell-based luciferase reporter assay platforms. *Journal of Visualized Experiments*, 2018a, (131).

Wang X, Chi H, Li Q, Li W, Li J, Li B, Gao W, Zhang D, Sun Y, Yi L, Qu H, Wang Y, Li Z, Xia Z. Influence of Antibiotic Pressure on Five Plasmid-based Bioluminescent Gram-negative Bacterial Strains. *Mol Imaging Biol*, 2018b, 20(1), 21-26.

Warburg O. The metabolism of carcinoma cells. *J Cancer Res*, 1925, 9, 148-163.

Ward WW, Cormier MJ. An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the *Renilla* green fluorescent protein. *J Biol Chem*, 1979, 254, 781-788.

Wehr MC, Rossner MJ. Split protein biosensor assays in molecular pharmacological studies. *Drug Discovery Today*, 2016, 21(3), 415-429.

Weissleder R i Ntziachristos V. Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med*, 2003, 9, 123-128.

Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA. Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol*, 2004, 14, 2289-2295.

Welsh JP, Patel KG, Manthiram K, Swartz JR. Multiply mutated *Gaussia* luciferases provide prolonged and intense bioluminescence. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 389, 563-568.

Wiles S, Ferguson K, Stefanidou M, Young DB, Robertson BD. Alternative luciferase for monitoring bacterial cells under adverse conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71, 3427-3432.

Wilson T, Hastings JW. Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998, 14, 197-230.

Woo J, von Arnim AG. Mutational optimization of the coelenterazine-dependent luciferase from *Renilla*. *Plant methods*, 2008, 4, 23.

Woo J, Hong J, Dinesh-Kumar SP. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based synthetic sensor platform for drug discovery. *Curr Protoc Protein Sci*, 2017, 88, 19.30.1-19.30.12.

Wood KV, Lam YA, McElroy WD. Introduction to beetle luciferases and their applications. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 1989a, 4(1), 289-301.

Wood KV, Lam YA, McElroy WD, Seliger HH. Bioluminescent click beetles revisited. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 1989b, 4(1), 31-39.

Wu C, Kawasaki K, Ohgiya S, Ohmiya Y. Syntheses and evaluation of the bioluminescent activity of (S)-*Cypridina* luciferin and its analogs. *Tetrahedron Lett*, 2006, 47, 753-6.

Wu P, Sokoll LJ, Kudrolli TA, Chowdhury WH, Ma R, Liu MM, Rodriguez R, Lupold SE. A novel approach for detecting viable and tissue-specific circulating tumor cells through an adenovirus-based reporter vector. *Prostate*, 2014, 74, 1286-1296.

Wu N, Rathnayaka T, Kuroda Y. Bacterial expression and re-engineering of *Gaussia princeps* luciferase and its use as a reporter protein. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1854(10 Pt A), 1392-9.

Wurdinger T, Badr C, Pike L. A secreted luciferase for *ex-vivo* monitoring of *in vivo* processes. *Nat Methods*, 2008, 5, 171-3.



- Xie Q, Soutto M, Xu X, Zhang Y, Johnson CH. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging in plant seedlings and mammalian cells. *Methods Mol Biol*, 2011, 680, 3–28.
- Xie W, Silvers R, Ouellette M, Wu Z, Lu Q, Li H, Gallagher K, Johnson K, Montoute M. A Luciferase Reporter Gene System for High-Throughput Screening of  $\gamma$ -Globin Gene Activators. *Methods Mol Biol*, 2016, 1439, 207-26.
- Xing Y, Xia Z, Rao J. Semiconductor quantum dots for biosensing and *in vivo* imaging. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 2009, 8(1), 4-12.
- Xu Y, Piston DW, Johnson CH. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(1), 151-6.
- Xu X, Soutto M, Xie Q, Servick S, Subramanian C, von Arnim AG, Johnson CH. Imaging protein interactions with bioluminescence resonance energy transfer (BRET) in plant and mammalian cells and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 10264-10269.
- Xu T, Ripp S, Sayler GS, Close DM. Expression of a humanized viral 2A-mediated lux operon efficiently generates autonomous bioluminescence in human cells. *PLoS One*, 2014, 9(5), e96347.
- Xu LL, Shan C, Deng CL, Li XD, Liu SQ, Yuan ZM, Wang QY, Shi PY, Zhang B. Development of a stable *Gaussia* luciferase enterovirus 71 reporter virus. *J Virol Methods*, 2015, 219, 62–66.
- Xu T, Conway M, Frank A, Ripp S, Sayler G, Close D. Co-cultured continuously bioluminescent human cells as bioreporters for the detection of prodrug therapeutic impact pre- and post-metabolism. *Sensors (Basel)*, 2017, 17(12), 2827.
- Xue L, Yu Q, Griss R, Schena A, Johnsson K. Bioluminescent Antibodies for Point-of-Care Diagnostics. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(25), 7112-7116.
- Yamamoto M, Matsuyama S, Li X, Takeda M, Kawaguchi Y, Inoue JI, Matsuda Z. Identification of nafamostat as a potent inhibitor of Middle East respiratory syndrome coronavirus s protein-mediated membrane fusion using the split-protein-based cell-cell fusion assay. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(11), 6532-6539.
- Yao Z, Zhang BS, Prescher JA. Advances in bioluminescence imaging: new probes from old recipes. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 45, 148-156.
- Yasuno R, Mitani Y, Ohmiya Y. Effects of N-Glycosylation Deletions on *Cypridina* Luciferase Activity. *Photochem Photobiol*, 2018, 94(2), 338-342.
- Yeh HW, Karmach O, Ji A, Carter D, Martins-Green MM, Ai HW. Red-shifted luciferase-luciferin pairs for enhanced bioluminescence imaging. *Nat Methods*, 2017, 14, 971-974.
- Yu YA, Shabahang S, Timiryasova TM, Zhang Q, Beltz R, Gentschev I. Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. *Nat Biotechnol*, 2004, 22, 313-20.

- Yu X, Wen K, Wang Z, Zhang X, Li C, Zhang S, Shen J. General bioluminescence resonance energy transfer homogeneous immunoassay for small molecules based on quantum dots. *Anal Chem*, 2016, 88(7), 3512-20.
- Zeng Y, Zhu J, Wang J, Parasuraman P, Busi S, Nauli S, Wang Y, Pala R, Liu G. Functional probes for cardiovascular molecular imaging. *Quantitative Imaging In Medicine And Surgery*, 2018, 8(8), 838-852.
- Zhang Y, Robertson JB, Xie Q, Johnson CH. Monitoring Intracellular pH Change with a Genetically Encoded and Ratiometric Luminescence Sensor in Yeast and Mammalian Cells. *Methods Mol Biol*, 2016, 1461, 117-30.
- Zhang H, Su J, Lin Y, Bai H, Liu J, Chen H, Li M. Inhibiting Firefly Bioluminescence by Chalcones. *Anal Chem*, 2017a, 89(11), 6099–6105.
- Zhang HL, Ye HQ, Deng CL, Liu SQ, Shi PY, Qin CF, Yuan ZM, Zhang B. Generation and characterization of West Nile pseudo-infectious reporter virus for antiviral screening. *Antiviral Res*, 2017b, 141, 38–47.
- Zhang BS, Jones KA, McCutcheon DC, Prescher JA. Pyridone luciferins and mutant luciferases for bioluminescence imaging. *ChemBioChem*, 2018, 19, 470-477.
- Zhao H, Doyle TC, Coquoz O, Kalish F, Rice BW, Contag CH. Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection *in vivo*. *J Biomed Opt*, 2005, 10, 041210.
- Zhao J, Nelson TJ, Vu Q, Truong T, Stains CI. Self-assembling NanoLuc luciferase fragments as probes for protein aggregation in living cells. *ACS Chem Biol*, 2016, 11, 132–138.
- Zheng W, Carroll SS, Inglese J, Graves R, Howells L, Strulovici B. Miniaturization of a hepatitis C virus RNA polymerase assay using a -102 degrees C cooled CCD camera-based imaging system. *Anal Biochem*, 2001, 290, 214–220.
- Zhivotovsky B. Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem*, 2003; 39, 25-40.
- Zhu X, Yuan C, Tian C, Li C, Nie F, Song X, Li L. The plant sesquiterpene lactone parthenolide inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by blocking synthesis of the transcriptional regulators TCF4/LEF1. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(14), 5335–5344.
- Zinn KR, Chaudhuri TR, Szafran AA, O'Quinn D, Weaver C, Dugger K, Lamar D, Kesterson RA, Wang X, Frank SJ. Noninvasive bioluminescence imaging in small animals. *ILAR J*, 2008, 49(1), 103-15.

## 7. SAŽETAK

Bioluminiscencijski reporterski geni kodiraju enzime luciferaze koji kataliziraju oksidaciju luciferina popraćenu emisijom svjetlosti. Brojne prirodne i rekombinantne luciferaze različitih svojstava komercijalno su dostupne u testnim kompletima za određenu namjenu. Luciferazni test se može izvesti kao jednostruki, dvostruki ili višestruki za praćenje više staničnih događaja istovremeno kombiniranjem luciferaza koje emitiraju svjetlost različitih boja. Bioluminiscencijski reporterski geni široko se koriste za istraživanje genske ekspresije, protein-protein interakcija, signalnih puteva i drugih staničnih događaja. Zbog jednostavnosti izvođenja, neinvazivnosti, visoke osjetljivosti i linearnosti ispitivanja te pogodnog omjera cijene i učinkovitosti bioluminiscencijske metode su jedne od najprikladnijih za primjenu *in vitro* i *in vivo* postupcima u razvoju lijekova. Glavni načini na koje se bioluminiscencija iskorištava u razvoju lijekova su visokoprotočno pretraživanje opsežnih knjižnica kemijskih spojeva u potrazi za novim spojevima kandidatima za lijek i bioluminiscentno biološko oslikavanje pretkliničkih životinjskih modela za procjenu učinkovitosti lijekova.

## 8. SUMMARY

Bioluminescent reporter genes encode luciferases - enzymes that catalyze the reaction of luciferin oxidation accompanied by light emission. Numerous wild type and recombinant luciferases of different properties are commercially available in test kits for a particular purpose. Bioluminescent assay can be performed as a single, double or multiple luciferase assay for monitoring multiple cellular events simultaneously by combining luciferases emitting light of a different colour. Bioluminescent reporter genes are widely used to study gene expression, protein-protein interactions, cell signaling pathways, and other cellular events. Due to simplicity of performance, noninvasiveness, high sensitivity and linearity of the assay and good cost-efficacy ratio bioluminescent methods are among the most suitable for drug development *in vitro* and *in vivo*. The main ways in which bioluminescence is used in drug development are high throughput screening of extensive chemical libraries in search of a new drug candidate and bioluminescence molecular imaging in preclinical animal models for the assessment of drug efficacy.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### BIOLUMINISCENCIJSKI REPORTERSKI GENI I NJIHOVA PRIMJENA U RAZVOJU LIJEKOVA

Tea Tekić

#### SAŽETAK

Bioluminiscencijski reporterski geni kodiraju enzime luciferaze koji kataliziraju oksidaciju luciferina popraćenu emisijom svjetlosti. Brojne prirodne i rekombinantne luciferaze različitih svojstava komercijalno su dostupne u testnim kompletima za određenu namjenu. Luciferazni test se može izvesti kao jednostruki, dvostruki ili višestruki za praćenje više staničnih događaja istovremeno kombiniranjem luciferaza koje emitiraju svjetlost različitih boja. Bioluminiscencijski reporterski geni široko se koriste za istraživanje genske ekspresije, protein-protein interakcija, signalnih puteva i drugih staničnih događaja. Zbog jednostavnosti izvođenja, neinvazivnosti, visoke osjetljivosti i linearnosti ispitivanja te pogodnog omjera cijene i učinkovitosti bioluminiscencijske metode su jedne od najprikladnijih za primjenu u *in vitro* i *in vivo* postupcima u razvoju lijekova. Glavni načini na koje se bioluminiscencija iskorištava u razvoju lijekova su visokoprotlačno pretraživanje opsežnih knjižnica kemijskih spojeva u potrazi za novim spojevima kandidatima za lijek i bioluminiscencijno biološko oslikavanje pretkliničkih životinjskih modela za procjenu učinkovitosti lijekova.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 151 stranicu, 70 grafičkih prikaza, 4 tablice i 546 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: bioluminiscencija, luciferaza, reporterski geni, razvoj lijekova

Mentor: **Dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Sanja Dabelić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Erim Bešić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Biochemistry and Molecular Biology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### BIOLUMINESCENT REPORTER GENES AND THEIR APPLICATION IN DRUG DEVELOPMENT

Tea Tekić

#### SUMMARY

Bioluminescent reporter genes encode luciferases - enzymes that catalyze the reaction of luciferin oxidation accompanied by light emission. Numerous wild type and recombinant luciferases of different properties are commercially available in test kits for a particular purpose. Bioluminescent assay can be performed as a single, double or multiple luciferase assay for monitoring multiple cellular events simultaneously by combining luciferases emitting light of a different colour. Bioluminescent reporter genes are widely used to study gene expression, protein-protein interactions, cell signaling pathways, and other cellular events. Due to simplicity of performance, noninvasiveness, high sensitivity and linearity of the assay and good cost-efficacy ratio bioluminescent methods are among the most suitable for drug development *in vitro* and *in vivo*. The main ways in which bioluminescence is used in drug development are high throughput screening of extensive chemical libraries in search of a new drug candidate and bioluminescent molecular imaging in preclinical animal models for the assessment of drug efficacy.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 151 pages, 70 figures, 4 tables and 546 references. Original is in Croatian language.

Keywords: bioluminescence, luciferase, reporter genes, drug development

Mentor: **Gordana Maravić Vlahoviček, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Gordana Maravić Vlahoviček, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Sanja Dabelić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Erim Bešić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2019.

