

Primjena bioluminiscencije u istraživanju i razvoju lijekova

Tekić, Tea; Maravić Vlahoviček, Gordana

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2020, 76, 185 - 196**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:863195>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

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



Primjena bioluminiscencije u istraživanju i razvoju lijekova

TEA TEKIĆ¹, GORDANA MARAVIĆ VLAHOVIČEK²

¹Tea Tekić je kao studentica sudjelovala u izradi ovog rada, odnedavno je mag. pharm.

²Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju, Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb

Bioluminiscencija

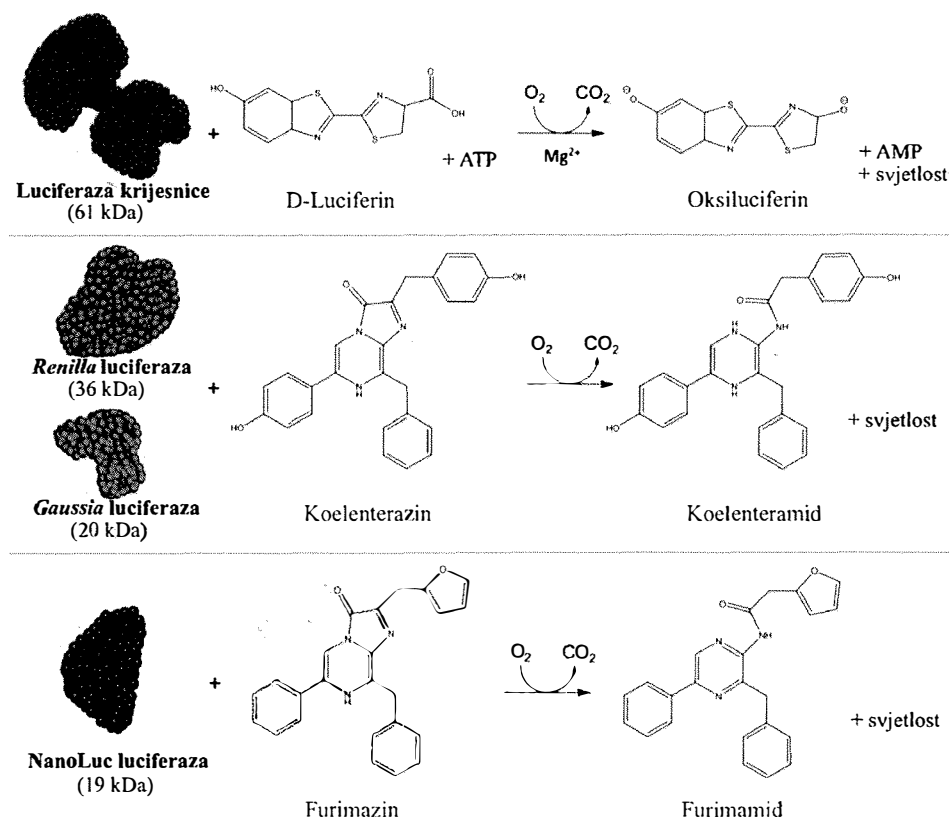
Bioluminiscencija je zapanjujuća prirodna pojava koja nastaje kada živi organizam emitira vidljivo svjetlo. Različiti bioluminiscencijski sustavi za emitiranje svjetlosti dijele zajedničke komponente, no na temelju njihove velike raznolikosti procijenjeno je da su se razvili oko 30–40 puta u različitim vrstama organizama neovisnim evolucijskim putevima (1). Bakterije ih, primjerice, koriste za međustaničnu komunikaciju, krijesnice u svojim precizno koordiniranim svjetlucavim ophođenjima prije parenja, svjetleći crvi i ličinke kukaca zelenom ili crvenom svjetlošću upozoravaju na svoju otrovnost, a plava se svjetlost u morskim dubinama koristi za privlačenje plijena posebnim svjetlosnim organima u obliku udica ili za skrivanje vlastite sjene te stapanje s okolnim plavetnilom u bijegu od predatora.

Bioluminiscencija je vrsta kemiluminiscencije, što znači da emisiji svjetlosti prethodi kemijska reakcija. Ona se odvija između molekule supstrata (luciferina) i enzima (luciferaze). Luciferini i luciferaze su generički pojmovi i moraju biti pobliže opisani vrstom organizma iz kojeg su izolirani kako bi se znali njihova točna struktura i svojstva te boja bioluminiscენტne svjetlosti koja se njihovom reakcijom oslobađa. Iako su strukture luciferina i luciferaza različite, mehanizam bioluminiscencijske reakcije u svim je poznatim sustavima sličan (vidi sliku 1.). Luciferaza katalizira reakciju aktivacije i oksidacije luciferina pri čemu preko međuprodukata bogatih energijom nastaje oksiluciferin u pobuđenom elektronskom stanju. Pri povratku u osnovno elektronsko stanje oksiluciferin

emitira fotone na određenoj valnoj duljini. Neke luciferaze za reakciju zahtijevaju dodatak kofaktora poput ATP-a ili magnezijevih kationa, dok je drugima za reakciju potreban samo kisik (2).

Raznolikost bioluminiscencijskih sustava

Luciferaze se mogu podijeliti na temelju luciferinskih supstrata koje iskorištavaju za svoje reakcije pa razlikujemo luciferaze ovisne o D-luciferinu, koelenterazinu, *Cypridina* luciferinu (vargulinu), furimazinu i dr. Još neke od značajki koje su bitne pri opisu luciferaza su njihova molekulska masa, valna duljina emisijskog maksimuma bioluminiscencije i njezin intenzitet, vrijeme poluživota u stanicama te podatak izlučuje li se luciferaza iz stanice nakon ekspresije ili se zadržava u citoplazmi (slika 1.).



Slika 1. ► Sažeti prikaz bioluminiscencijskih reakcija oksidacije različitih luciferinskih supstrata kataliziranih pripadnim luciferazama (prilagođeno prema 12)

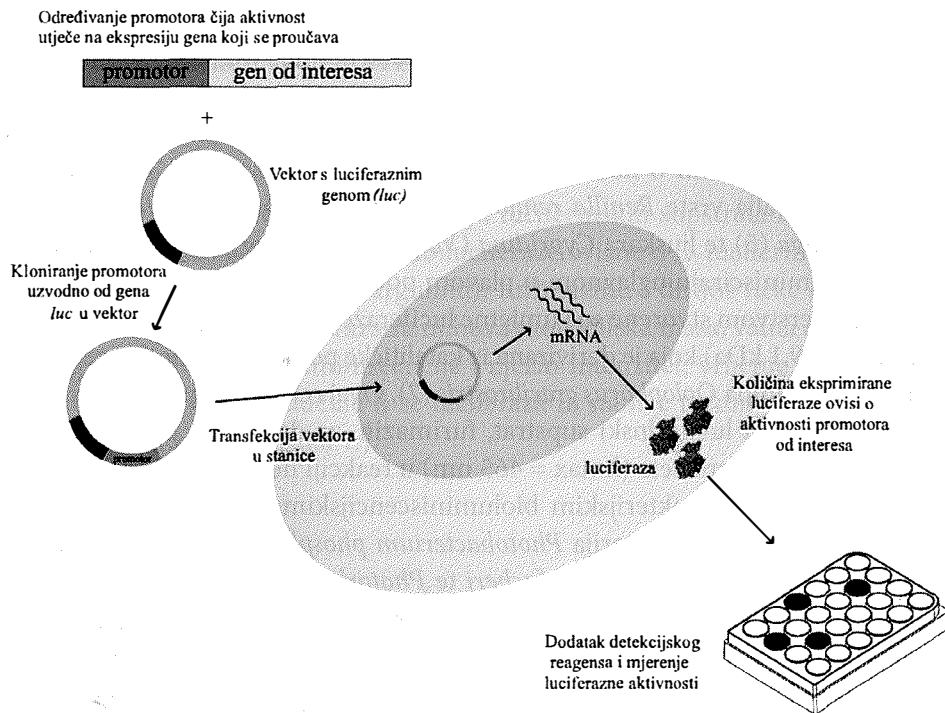
Najpoznatija i najčešće korištena luciferaza izolirana je iz sjevernoameričke krijesnice vrste *Photinus pyralis* (3). Luciferaza krijesnice (62 kDa) bioluminiscencijskom reakcijom oksidacije D-luciferina u prisutnosti kisika, ATP-a i magnezijevih kationa proizvodi svjetlost zelene boje (550–570 nm). Neke od poznatijih luciferaza ovisnih o koelenterazinu izolirane su iz morskih organizama, primjerice koralja vrste *Renilla reniformis* (4), veslonožaca *Gaussia princeps* i *Metridia longa* (5) te ljuskara *Cypridina* (*Vargula hilgendorfi*) (6). Morske luciferaze bioluminisciraju uglavnom u plavom području spektra. Nadalje, genetičkim inženjerstvom stvorene su i umjetne luciferaze poboljšanih svojstava poput NanoLuc* (19,1 kDa) koja je derivirana iz katalitičke podjedinice luciferaze dubokomorskog škampa *Oplophorus gracilirostris* (7). Ovaj rekombinantni enzim koristi novi sintetički luciferinski supstrat, furimazin, za dobivanje plave luminescencije visokog intenziteta ($\lambda_{\max} = 465$ nm) u reakciji neovisnoj o ATP-u.

Među brojnim bakterijskim bioluminiscencijskim sustavima najbolje su proučene luciferaze iz bakterija *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium leiognathi*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri* te *Photobacterium* (*Xenorhabdus*) *luminescens* (8–10). Bakterijske su luciferaze posebne po tome što za luciferaznu reakciju ne zahtijevaju dodatak egzogenog luciferina nego ga bakterije same sintetiziraju. Svi bakterijski bioluminiscencijski sustavi kodirani su operonom *luxCDABE*, u kojemu se osim gena za samu luciferazu nalaze i geni koji kodiraju enzime potrebne za sintezu supstrata i obnavljanje aktivnosti luciferaze (11).

Osim iz navedenih, luciferaze i njima pripadni luciferini uspješno su izolirani iz brojnih drugih kopnenih i morskih organizama. Također, izolirani su i klonirani bioluminiscencijski geni koji kodiraju luciferaze.

Primjena bioluminiscencije

Jedna od glavnih primjena bioluminiscencije podrazumijeva korištenje bioluminiscencijskih reporterskih gena u ispitivanjima genske ekspresije i staničnih događaja povezanih s ekspresijom gena u farmaceutskim i biomedicinskim istraživanjima, kao i u molekularnoj biologiji i biokemiji. Općenito, reporterski geni omogućuju praćenje ekspresije ciljnog gena (vrijeme, mjesto, razina i sl.) tako da se reporterski gen klonira s DNA slijedom od interesa u ekspresijski vektor koji se zatim unosi u stanice domaćina. Nakon unosa rekombinantnog vektora, prisutnost reportera u stanicama analizira se izravnim određivanjem koncentracije samog reporterskog proteina ili mjerenjem enzimске aktivnosti reportera, a dobar reporterski gen može se nakon ekspresije lako identificirati i kvantitativno mjeriti. Pri korištenju bioluminiscencijskih reporterskih gena, aktivnost reporterskog proteina (luciferaze) detektira se mjerenjem intenziteta bioluminiscencije (slika 2.).



Slika 2. ► Primjer jednostrukog luciferaznog testa u kojem se koristi plazmidni vektor s genom luciferaze krijesnice (*luc*) (prilagođeno prema 13).

Bioluminiscencijska reakcija u laboratoriju

Luciferazni testovi su jednostavni za izvođenje – dodatkom luciferina u medij stanica koje ekspimiraju luciferazu dolazi do reakcije popraćene emisijom svjetlosti, koju detektira uređaj za detekciju svjetlosti, tzv. luminometar s fotomultiplikatorom. Napredna bioluminiscencijska tehnologija omogućuje kvantitativnu vizualizaciju staničnih događaja na razini pojedinačne stanice u stvarnom vremenu korištenjem visoko osjetljivih kamera u koje je ugrađen nabojem sprengnuti uređaj (engl. *charge coupled device*, CCD) (14).

Također, u luciferaznim testovima moguće je kombinirati dva reporterska gena ili više njih. Testovi temeljeni na jednom reporterskom genu pružaju najbrži i najjeftiniji način za stjecanje podataka o genskoj ekspresiji iz stanica, no, zbog složene građe stanica, informacije prikupljene korištenjem jednog reporterskog gena mogu biti nedovoljne za dobivanje detaljnih i točnih rezultata. Promjene u intenzitetu bioluminiscenog signala nekada mogu biti uzrokovane drugim čimbenicima osim eksperimentalnog tretmana, a tada je prikladno koristiti

dvostruke luciferazne testove. Dvostruki reporterski sustavi podrazumijevaju simultanu ekspresiju i mjerenje eksperimentalnog i kontrolnog reporterskog enzima unutar jednog sustava. Ekspresija eksperimentalnog reportera korelira s djelovanjem specifičnih eksperimentalnih uvjeta, dok aktivnost kontrolnog reportera predstavlja unutarnju kontrolu. Vektor s kontrolnim genom reporterom unosi se u stanicu zajedno s eksperimentalnim vektorom, a njegovu ekspresiju pokreće konstitutivni promotor, npr. citomegalovirusni (CMV) promotor (15).

Signali različitih luciferaza mogu se razdvojiti na temelju toga što one koriste različite luciferine za svoje reakcije, pokazuju različitu kinetiku emisije svjetlosti ili imaju drugačije valne duljine emisijskih maksimuma pa se svjetlosni signali mogu razdvojiti optičkim filtrima. Također, mogu se kombinirati luciferaze koje se nakon ekspresije zadržavaju u stanicama i one koje se izlučuju u stanični medij (16).

Najčešće je primjena dvostrukog luciferaznog testa potrebna za otklanjanje 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. (17).

U luciferaznom ispitivanju moguće je koristiti i više od dvije luciferaze da bi se omogućilo istodobno praćenje više bioloških procesa unutar jedne stanice (18, 19).

Primjena bioluminiscencije u razvoju lijekova

Korisnost bioluminiscencijske tehnologije u osnovnim i primijenjenim znanstvenim istraživanjima potvrđuje ogromna količina znanstvenih publikacija, patenata, proizvoda na tržištu i namjenske instrumentacije. Na razne načine koristi u ekološkim studijama, agrikulturi, prehrambenoj industriji, a određene skupine znanstvenika ulažu napore u razvijanje bioluminiscencijskih sustava prikladnih za primjenu u rasvjeti. Ipak, bioluminiscencija je zasad najviše iskorištena u biomedicini, a otkrivanje i razvoj lijekova je bez sumnje jedno od područja koje primjena bioluminiscencije može značajno unaprijediti.

Dobro je poznato koliki se naponi 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 omogućuje smanjenje troškova i ubrza 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.

Visokoprotočna pretraživanja

Zbog jednostavnosti, omjera cijene i učinkovitosti, lakog rukovanja, visoke osjetljivosti i velikog dinamičkog opsega bioluminiscencijske metode su metode izbora za primjenu u visokoprotočnim pretraživanjima (engl. *high-throughput screening*, HTS) (20). Bioluminiscencijskim HTS-om moguće je pretraživanje opsežnih knjižnica kemijskih spojeva u potrazi za spojevima kandidatima za lijek te proučavanje mehanizma djelovanja kandidata lijekova u svrhu njihove optimizacije.

Glavni smjerovi istraživanja za koje se bioluminiscencijski HTS prilagođava su pretraživanja modulatora genske ekspresije i pretraživanja modulatora protein-protein interakcija (PPI) (20). Pomoću bioluminiscencijskih reporter-skih gena moguće je detektirati biološki aktivne spojeve koji utječu na gensku ekspresiju, posttranslacijske modifikacije, staničnu signalizaciju i druge stanične događaje. Primjerice, među najvažnijim metama lijekova su receptori povezani s G-proteinima (engl. *G-protein coupled receptors*, GPCR). Procijenjeno je da je više od 50 % lijekova usmjereno upravo na GPCR-ove (21). Vezanje liganda na GPCR potiče signalnu kaskadu koja završava aktivacijom transkripcije gena što omogućuje povezivanje bioluminiscencije s receptorskom aktivnošću.

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 potpunog 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. Za istraživanje PPI moguće je spojiti bioluminiscencijske reporterske gene s genima koji kodiraju proteine čija se interakcija želi istražiti na dva načina.

Prvi je način da se dva proteina od interesa, koji se nazivaju »mamac« i »plijen«, odvojeno spoje s luciferazom i fluorescentnim proteinom. Fluorescentni proteini također su molekule koje mogu emitirati svjetlost, ali im je za to potrebna vanjska svjetlosna pobuda. Ako dođe do interakcije proteina »mamac« i »plijena«, luciferaza i fluorescentni protein nađu se u neposrednoj blizini i dolazi do prijenosa energije proizvedene luciferaznom reakcijom na fluorescentni protein koji onda emitira svjetlost na drugačijoj valnoj duljini. Ova promjena u boji emitirane svjetlosti ukázat će na interakcije proteina, a fenomen se naziva

bioluminiscentni rezonantni prijenos energije (engl. *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*, BRET) (22).

Metoda razdvojene luciferaze drugi je način izučavanja protein-protein interakcija pomoću bioluminiscencije. Metoda razdvojene luciferaze je jedna od metoda komplementacije proteinskih fragmenata pa se u literaturi može naći i pod tim nazivom. U ovom pristupu luciferaza je rastavljena na dva dijela, što uzrokuje gubitak njezine aktivnosti. Svaki je dio spojen s jednim proteinom od interesa pa u slučaju interakcije proteina od interesa dolazi do ponovnog spajanja dvaju fragmenata razdvojene luciferaze i obnavljanja njezine aktivnosti što se očituje kao bioluminiscentni signal (23).

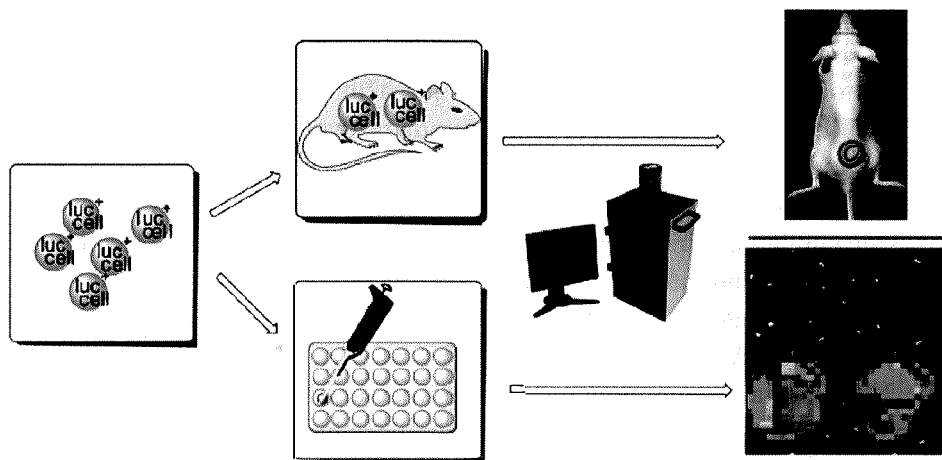
Najjednostavniji pak oblik primjene je ispitivanje vijabilnosti stanica detekcijom i određivanjem koncentracije ATP-a pomoću luciferaze krijesnice. Ovaj se luciferazni test temelji na tome da je luciferazi krijesnice za proizvodnju svjetlosti potreban ATP, a njegova razina naglo opada nakon smrti stanice pa je intenzitet bioluminiscentnog signala proporcionalan broju živih stanica. Stoga je ovaj oblik ispitivanja posebice primjenjiv u praćenju rasta tumora te infekcija, odnosno razvoju citostatskih i antimikrobnih lijekova, a često se primjenjuje i u ispitivanju citotoksičnosti spojeva u razvoju lijekova (24).

Bioluminiscentno biološko oslikavanje *in vivo*

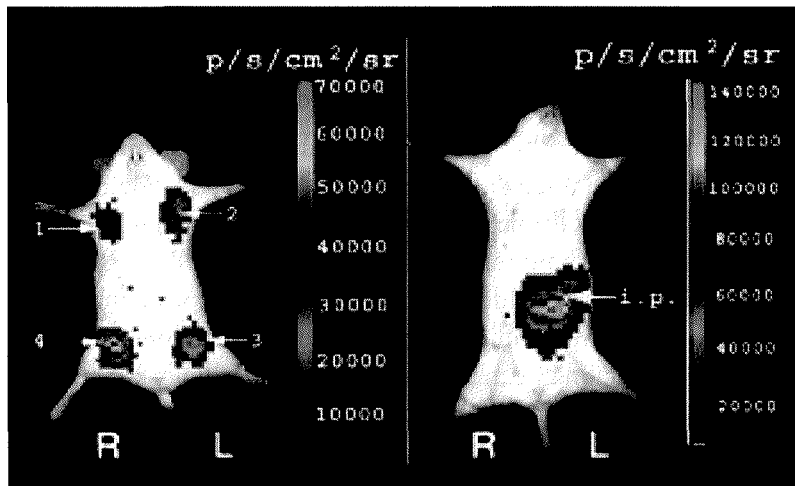
Injektiranjem bioluminiscentnih tumorskih, imunskih, matičnih ili drugih tipova stanica u male životinje moguće je pratiti broj i prostornu raspodjelu tih stanica u životinjskim modelima. Na taj način mogu se proučavati patološki mehanizmi određenih bolesti i odgovor organizma na tretman lijekovima pa je bioluminiscentno biološko oslikavanje (engl. *bioluminescence imaging*, BLI) prikladno za primjenu u pretkliničkom razvoju lijekova (slike 3. i 4.).

Jedna od njegovih velikih prednosti je neinvazivnost – primjenom BLI izbjegava se upotreba specifičnih radioizotopa kratkog poluvremena raspada koji su neophodni za konvencionalne metode koje se koriste u biološkom oslikavanju animalnih modela (26). Također, postupak provođenja BLI je relativno jednostavan i ne zahtijeva skupocjenu opremu i posebno obučene stručnjake (27).

Također, BLI *in vivo* omogućuje smanjenje broja životinja koje se koriste u istraživanjima. Primjerice, jedna se životinja može višestruko snimati da bi se 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



Slika 3. ► 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 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 iz 25)



Slika 4. ► Primjeri slika dobivenih bioluminiscentnim biološkim oslikavanjem miševa *in vivo*. Lijevom je mišu implantiran potkožni ksenotransplantacijski tumor koji eksprimira luciferazu krijesnice, a desnom intraperitonealne tumorske stanice koje ekspimiraju luciferazu krijesnice. 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 ($p/s/cm^2/sr$) (preuzeto iz 28)

upotrebom manjeg broja životinja i smanjenjem njihove patnje tijekom eksperimenata (29).

Iako je potencijal za *in vivo* BLI u razvoju lijekova zanimljiv, postoje neki nedostaci te 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 nekralježnjakog gena u čovjekove stanice (20). Drugi je nedostatak 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 slabi prodor svjetlosti kroz kožu i tkiva jer se većina svjetlosti na valnim duljinama ispod 600 nm apsorbira uglavnom zbog prisutnosti hemoglobina u vaskulariziranom tkivu (30). Također, prostorna rezolucija BLI je relativno niska (3,0–5,0 mm) u usporedbi s drugim načinima snimanja (31).

Ipak, iako primjena bioluminiscencijskih metoda nailazi na određena ograničenja, većini se nedostataka može doskočiti usavršavanjem luciferaza genetičkim inženjerstvom, npr. stvaranjem luciferaza koje emitiraju svjetlost crvene boje koja se u manjoj količini apsorbira u tkivima (32) ili kemijskom sintezom novih luciferinskih supstrata koji polučuju veći intenzitet svjetlosti (33).

Sve ubrzanijim napretkom tehnologije, molekularne biologije, genetičkog inženjerstva i sintetske kemije širi se područje u kojem se može iskoristiti velik potencijal primjene bioluminiscentnih reportera. U području biomedicine zasigurno će biti zanimljivo pratiti na koje sve načine bioluminiscencija može osvijetliti dosad neistražene puteve razvoja lijekova.

Sažetak

Bioluminiscencija obuhvaća kemijske reakcije popraćene emisijom svjetlosti koje se odvijaju u živim organizmima. Bioluminiscentna reakcija odvija se između molekule luciferina i enzima luciferaze koji katalizira njegovu oksidaciju. Brojne luciferaze i luciferini različitih svojstava izolirani su iz raznih kopnenih i morskih organizama, a u posljednje je vrijeme stvoren i niz rekombinantnih luciferaza i sintetskih luciferina unaprijeđenih svojstava. Metode koje iskorištavaju bioluminiscentnu reakciju luciferaza i luciferina jednostavne su za izvođenje i neinvazivne, a pružaju visoku osjetljivost i linearnost ispitivanja. Zbog toga je primjena bioluminiscencije prikladna za određene faze razvoja lijekova. Primjena bioluminiscencije nudi brojne prednosti u otkrivanju novih spojeva kandidata za lijekove ako se iskoristi za visokoprotlačno pretraživanje opsežnih knjižnica kemijskih spojeva te u pretkliničkoj fazi procjene učinkovitosti lijekova na bioluminiscentnim životinjskim modelima.



Application of bioluminescence in drug research and development

T. Tekić, G. Maravić Vlahoviček

Abstract Bioluminescence involves chemical reactions accompanied by light emission that take place in living organisms. A bioluminescent reaction takes place between the luciferin molecule and the luciferase enzyme that catalyzes its oxidation. Numerous luciferases and luciferins of different properties have been isolated from various terrestrial and marine organisms, and recently several recombinant luciferases and synthetic luciferin with enhanced features have been created. Methods that utilize the bioluminescent reaction of luciferase and luciferins are easy to perform and non-invasive, providing high sensitivity and linearity of the assay. Therefore, the application of bioluminescence is appropriate for specific stages of drug development. The use of bioluminescence offers numerous advantages in discovering new drug candidate compounds if used for high-throughput screening of extensive chemical compound libraries and in the preclinical phase of drug efficacy assessment in bioluminescent animal models.

1. Hastings JW. Biological diversity, chemical mechanisms and evolutionary origins of bioluminescent systems. *J. Molecular Evolution*. 1983; 19:309-321.
2. Roda A. Chemiluminescence and Bioluminescence; Past, Present and Future, Royal Society of Chemistry, 2011; 163., 444., 469–470., 473–475.
3. Shimomura O. Bioluminescence: chemical principles and methods. Singapore, World Scientific Publishing Co. Pty. Ltd., 2006; 3–5., 30–46., 51–62., 82–83.
4. 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.
5. Markova SV, Vysotski ES. Coelenterazine-dependent luciferases. *Biochemistry (Moscow)*. 2015; 80(6): 714–732.
6. Thompson EM, Nagata S, Tsuji F. Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorfii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989; 86:6567–6571.
7. 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):1848–1857.
9. Frackman S, Anhalt M, Nealsen KH. Cloning, organization and expression of the bioluminescence genes of *Xenorhabdus luminescens*. *J. Bacteriol.* 1990; 172:5767–5773.
 10. Engebrecht J, Nealsen K, Silverman M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell.* 1983; 32:773–781.
 11. 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; 218:791–793.
 12. 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.
 13. England CG, Ehlerding EB, Cai W. NanoLuc: A small luciferase is brightening up the field of bioluminescence. *Bioconjug. Chem.* 2016; 27(5):1175–1187.
 14. Bioluminescent reporters, 2019., <https://www.worldwide.promeiga.com>, pristupljeno 5.5.2019.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Michelini E, Cevenini L, Calabretta MM, Calabria D, Roda A. Exploiting *in vitro* and *in vivo* bioluminescence for the implementation of the three Rs principle (replacement, reduction, and refinement) in drug discovery. *Anal Bioanal Chem.* 2014; 406(23):5531–5539.
 18. Schagat T, Gaguio A, Kopish K. Normalizing genetic reporter assays: approaches and considerations for increasing consistency and statistical significance. *Cell Notes.* 2007; 17:9–12.
 19. Michelini E, Cevenini L, Mezzanotte L, Ablamsky D, Southworth T, Branchini BR, Roda A. Combining intracellular and secreted bioluminescent reporter proteins for multicolor cell-based assays. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008; 7(2):212–217.
 20. 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.
 21. Kelkar M, De A. Bioluminescence based *in vivo* screening technologies. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2012; 12(5):592–600.
 22. Klabunde T i Hessler G. Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *ChemBiochem.* 2002; 3(10):928–944.

23. 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.
24. Kaskova ZM, Tsarkova AS, Yampolsky IV. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chem. Soc. Rev.* 2016; 45(21):6048–6077.
25. 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; 484:148–153.
26. 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; 724:104–110.
27. Nairne J, Iveson PB, Meijer A. Imaging in Drug Development. *Progress in Medicinal Chemistry.* 2015; 54:231–280.
28. 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.
29. Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev.* 2003; 17(5):545–580.
30. 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.
31. Weissleder R i Ntziachristos V. Shedding light onto live molecular targets. *Nat. Med.* 2003; 9:123–128.
32. 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):103–115.
33. 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.
34. 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.

Primljeno 31. listopada 2019.