

Bioluminescencija

Kuridža, Bojan

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:573453>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Bojan Kuridža

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

BIOLUMINESCENCIJA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2020.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

5. svibnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

24. srpnja 2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. BIOLUMINESCENCIJA.....	4
2.1. Bioluminescentni sustavi	4
2.1.1. <i>D-luciferin</i>	4
2.1.2. <i>Bakterijski luciferin</i>	8
2.1.3. <i>Koelenterazin</i>	12
2.1.4. <i>Vargulin</i>	15
2.2. Promjena svojstava bioluminescentnih sustava i emitirane svjetlosti.....	16
2.2.1. <i>D-luciferin i njegove luciferaze</i>	16
2.2.2. <i>Bakterijski luciferin i njegove luciferaze</i>	19
2.2.3. <i>Koelenterazin i njegove luciferaze te fotoproteini</i>	21
2.3. Iskorištenje bioluminescencije u istraživačke svrhe	23
2.3.1. <i>BRET</i>	24
2.3.2. <i>Podijeljena luciferaza</i>	28
2.3.3. <i>Zarobljeni luciferin</i>	29
2.3.4. <i>Dvobojni testovi s dvije luciferaze i ortogonalni parovi</i>	31
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXXII

§ Sažetak

Bioluminescencija je prirodna pojava emisije svjetlosti do koje dolazi katalitičkom oksidacijom luciferina molekulskim kisikom ili aktivacijom fotoproteina reguliranih Ca^{2+} ionima. Mehanizmi bioluminescencije D-luciferina, bakterijskog luciferina, koelenterazina i vargulina, s obzirom da im se posvećuje najviše pažnje, polako bivaju razjašnjeni do najsitnijih detalja. Ipak, iznad pojma bakterijske bioluminescencije, unatoč tome što se najviše proučava, još je uvijek mnogo upitnika. Nekoliko je pretpostavljenih načina formacije C4a-hidroksiflavina, no nijedan ne daje konkretno rješenje. Dostupno znanje o bioluminescenciji omogućilo je variranje boje emitirane svjetlosti, kao i promjene svojstava luciferina, luciferaza i fotoproteina. Uspješno su povezane modifikacije luciferina s njihovim posljedicama na emisijski spektar, kao i promjene na luciferazi s promjenom njene aktivnosti i prinosa bioluminescencije. Modifikacije svojstava, uz već poželjna svojstva koja bioluminescencija posjeduje, omogućile su njenu primjenu u istraživanjima ekspresije gena, interakcija stanica i proteina, kontroli analita u organizmu, razvoju lijekova i mnogo više. Razvijene su metode koje precizno i pravovremeno odašilju informaciju o ispitivanoj problematici te na taj način omogućuju bolje razumijevanje procesa i pojava u organizmu, kao npr. razvoja tumora i metastaze. BRET je metoda koja nudi mogućnost ispitati širok spektar interakcija *in vivo* uz istovremenu regulaciju emisijskog spektra. Iako već dobro razumijevanje svih pojedinih komponentni koje doprinose ostvarenju bioluminescencije omogućava njenu iskoristivost, još ima dovoljno mjesta za napredak.

§ 1. UVOD

Pojam luminescencije stvoren je 1888. godine iz potrebe da se opiše davno uočena i povijesno često proučavana pojava emisije hladne svjetlosti, tj. svjetlosti do čije emisije dolazi bez zagrijavanja izvora zračenja. Prvi put je pojam bioluminescencije najvjerojatnije upotrijebio 1916. godine Edmund Newton Harvey opisujući luminescentna svojstva živih organizama.¹

Pretpostavka je da su mnoge priče i mitovi iz antičkih vremena motivirane upravo prirodnim pojavama kojima su ljudi pripisali neko značenje. Tako su i uz fenomen bioluminescencije vezani razni mitovi, poput onih koji govore o ognjenim morskim nemanima. Poznata je pojava u kojoj se uslijed razbijanja valova na morskoj površini može uočiti isijavanje svjetlosti, što je posljedica bioluminescencije prisutnih morskih mikroorganizama. U toj i sličnim pojavama pronalazimo objašnjenje zabilježenih mitova. Mitologija je ostala dugo ukorijenjena, pa je tako i u Talmudu moguće pronaći vezu s fenomenom u opisu Levijatana, čije tijelo, a posebice oči, posjeduje veliku osvjetljavajuću moć.²

Bioluminescencija značajno utječe na ponašanje i dinamiku ekosustava. Omogućuje komunikaciju i djeluje na parenje, privlačenje plijena, mehanizme obrane i prikrivanja na razinama od bakterija do viših organizama, a jedna je procjena da oko 76 % morskih organizama u dubokim vodama posjeduje sposobnost bioluminescencije u nekom obliku.³

Prirodoslovci su dugo pokušavali ući u suštinu same pojave pa je tako u 17. st. Robert Boyle izgradnjom vakuumske pumpe prvi pokazao potrebu za zrakom u luminescenciji mesa i gljiva. Danas znamo da je kisik iz zraka ključ opisane pojave koja odgovara bakterijskoj bioluminescenciji.¹⁻³ Godine 1885. Raphaël Dubois napravio je pokus koristeći kornjaše roda *Pyrophorus* tako da je iz svjetlećih organa kornjaša načinio dvije vodene suspenzije; hladnu i vruću. Rastvaranjem svjetlećih organa u hladnoj vodi došlo je do postepenog gašenja svjetlosti, dok je djelovanje vruće vode automatski ugasilo svjetlost. Hlađenjem vruće suspenzije nije došlo do ponovne bioluminescencije, ali miješanje tako ohlađene i hladne suspenzije rezultiralo je pojavom svjetlosti. Slično je pokazao i pokusom iz 1887. koristeći ekstrakt školjke *Pholas dactylus* te zaključio da se u hladnoj suspenziji nalazi spoj enzimskih svojstava osjetljiv na toplinu koji je nazvao luciferaza, a da je u vrućoj suspenziji (u kojoj se nalazi toplinom denaturirani enzim) relativno stabilan supstrat nazvan luciferin.¹ Luciferin bi u prijevodu s latinskog jezika značilo „nosilac svjetla“. Ipak, danas znamo da su u hladnom ekstraktu kornjaša

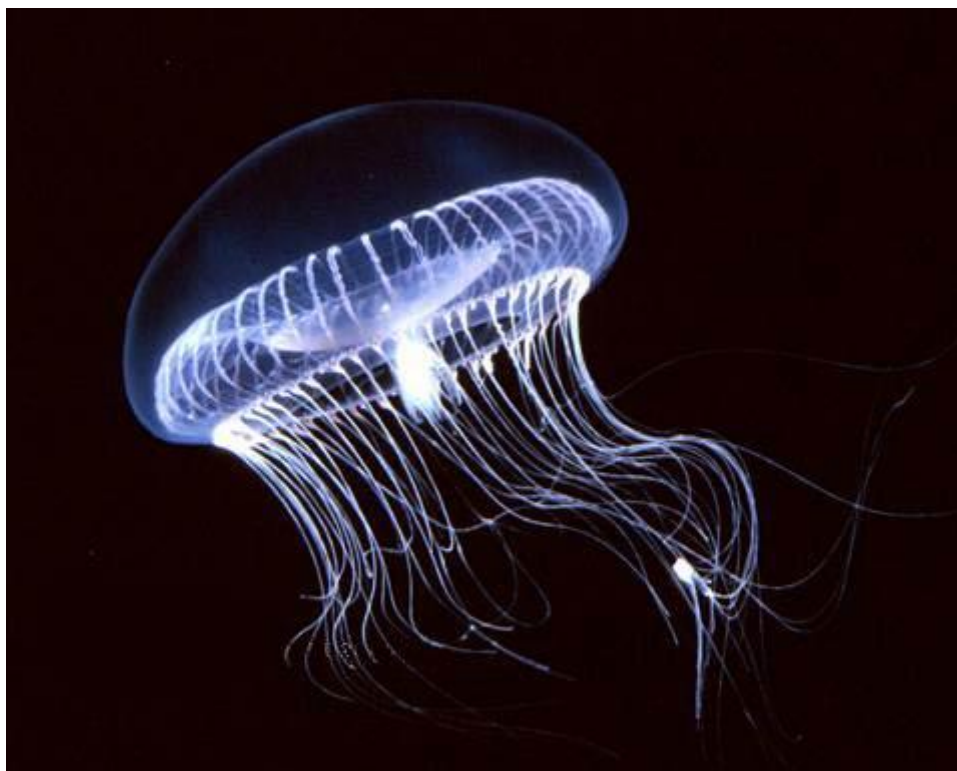
bili prisutni i luciferaza i luciferin (koji nije stabilan u mjeri u kojoj je to bilo pretpostavljeno), a da se u vrućem ekstraktu nalazio ATP koji je nužan da bi bioluminescencija kornjaša bila moguća.² Dakle, vremenom je došlo do izmjene prvotno postavljenih definicija luciferina i luciferaze.

U prirodi je neovisno evoluiralo mnogo bioluminescentnih sustava koji su, ovisno o organizmima u kojima ih nalazimo, uglavnom slijedili zasebne razvojne putove. Među organizmima nailazimo na različite luciferine i još raznolikije luciferaze. Zbog slabije raznolikosti prirodnih luciferina znalo je doći i do konvergencije različitih evolucijskih putova prema iskorištenju istog luciferina među različitim organizmima i različitim luciferazama. Poznato je 30-ak različitih prirodnih bioluminescentnih sustava temeljenih na enzimskoj oksidaciji luciferina od kojih je značajnije proučavano njih devet.⁴ Kemijske strukture trenutno poznatih luciferina uglavnom nisu međusobno povezane, što je postalo jasno već otkrićem prva tri (bakterijski, luciferin krijesnice i vargulin).² To objašnjava zašto je križanje komponenti različitih sustava u svrhu ostvarenja bioluminescencije rijetko ostvarivo. Uz navedene, postoje sustavi poznati kao fotoproteini koji se temelje na nešto drugačijem reakcijskom mehanizmu, a čiji je predstavnik ekvorin meduze *Aequorea victoria* (slika 1). Ta dva tipa bioluminescentnih sustava predstavljaju osnovnu podjelu bioluminescencije u živim organizmima, a između ostaloga razlikuju se u tome što je količina emitirane svjetlosti u prvom slučaju proporcionalna količini dostupnog luciferina, a u drugom slučaju količini dostupnog fotoproteina.³

Bioluminescencija je omogućila razvoj mnogih metoda za praćenje stanica, ekspresije gena, prisutnih molekula, međustaničnih i molekulskih interakcija te raznih drugih procesa i pojava u tkivima i organizmima. Testovi su temeljeni na fotoproteinima ili enzimskoj aktivnosti luciferaza koje kataliziraju oksidaciju luciferina s posljedičnom emisijom svjetlosti. Razvoju ovih metoda znatno je pridonijela neinvazivnost prema proučavanim organizmima, mogućnost kontrole i mogućnost odvijanja bioluminescencije bez potrebe za vanjskim pobudnim izvorom svjetlosti (kao što je to npr. slučaj kod relativno sličnih metoda razvijenih na bazi fluorescencije), što gotovo potpuno uklanja pozadinske smetnje potekle od svjetlosnog raspršenja i autofluorescencije te osigurava izvanrednu osjetljivost s visokim omjerom signala prema šumu (eng. *signal-to-background ratio*). Također, uklanja nepoželjne efekte poput fototoksičnosti i svjetlosnog izbjeljivanja fluorofora.^{5,6} Raznim modifikacijama luciferina, luciferaza i svojstava emitirane svjetlosti, kao i poboljšanjem aparature korištene u

istraživanjima, nastoji se povećati mogućnosti koje bioluminescencija nudi u proučavanju bioloških procesa i promjena, djelovanju lijekova i njihova razvoja te mnogočega drugoga.

Kao modelni organizmi u istraživanjima često se koriste laboratorijski miševi i riba zebrića koja uz nisku cijenu ima jedno vrlo korisno svojstvo za istraživanja temeljena na svjetlosnom signalu; prozirnost u ranom stadiju života. Također, visoka sposobnost regeneracije tkiva zebriće pridonijela je njezinu iskorištenju u proučavanju mehanizama regeneracije i matičnih stanica.⁷

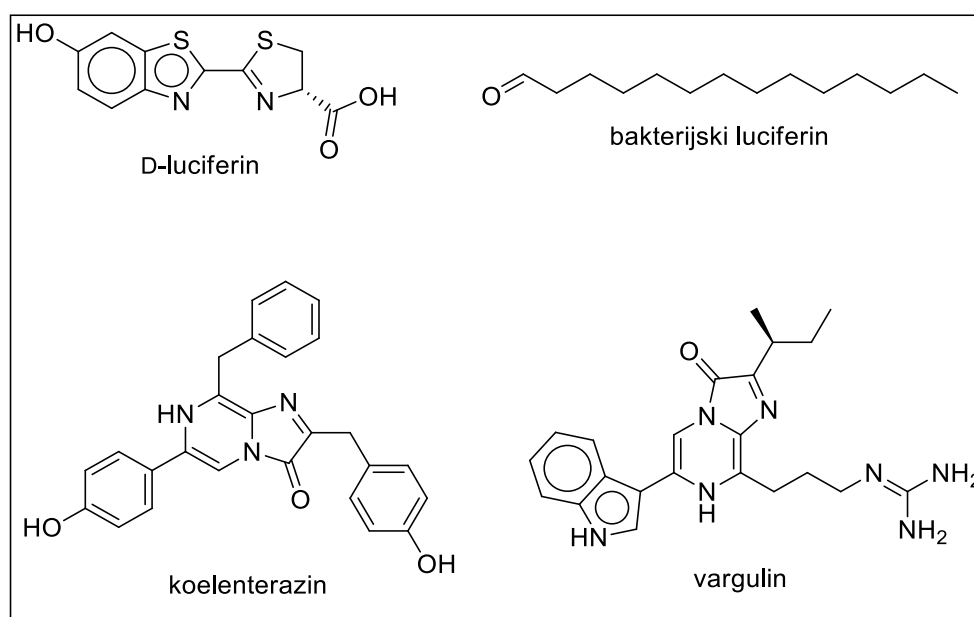


Slika 1. *Aequorea victoria*, poznata i kao „kristalna meduza“. Preuzeto iz [8].

§ 2. BIOLUMINESCENCIJA

2.1. Bioluminescentni sustavi

Kao što je već napomenuto, devet prirodnih bioluminescentnih sustava proučavano je više od svih ostalih. Tako su određene i strukture devet pripadajućih luciferina od kojih su bitniji prikazani slikom 2.



Slika 2. Strukture četiri prirodna luciferina važnijih bioluminescentnih sustava: D-luciferin, bakterijski luciferin, koelenterazin i vargulin.

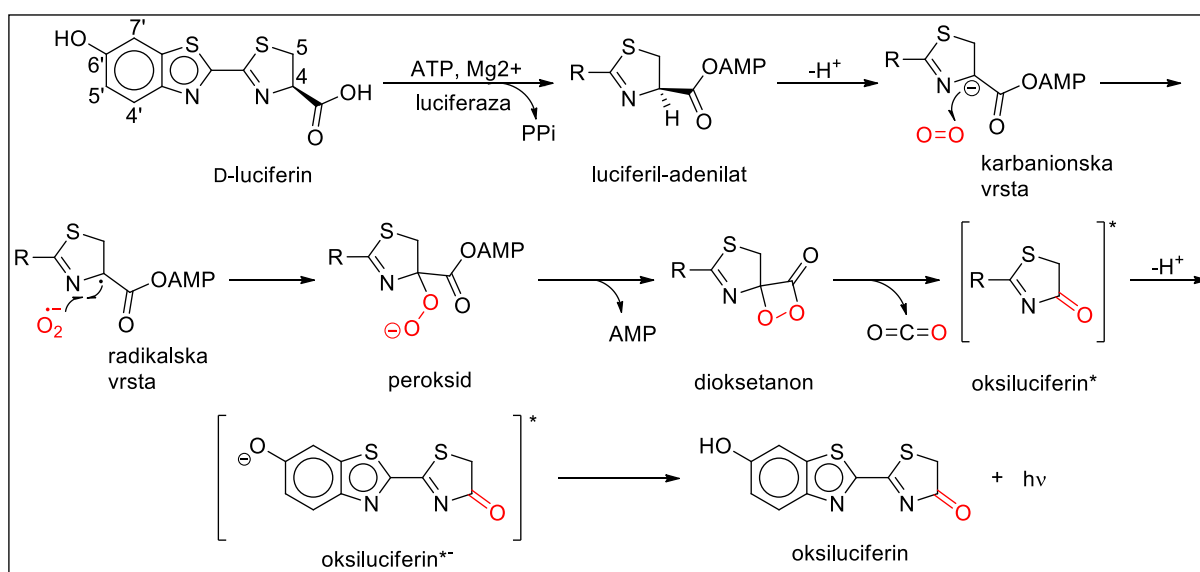
2.1.1. D-luciferin

D-luciferin prisutan je u mnogim kopnenim organizmima, a između ostaloga i u krijesnicama (eng. *firefly*). Prvi je otkriveni i u primjenama najčešće korišteni luciferin. Najpoznatija luciferaza sa sposobnošću katalize bioluminescentne reakcije D-luciferina, a ima ih mnogo, ujedno je i prva otkrivena luciferaza sjevernoameričke krijesnice *Photinus pyralis* (luciferaza FLuc). To je protein, monomer mase 61 kDa koji koristeći D-luciferin kao supstrat postiže bioluminescenciju s maksimumom na valnoj duljini $\lambda_{\max} = 560$ nm. Sljedeća je po popularnosti luciferaza klišnjaka (eng. *click beetle*) *Pyrophorus plagiophthalmus*, a odmah i ona

željezničkih crva (eng. *railroad worm*). Ovisno o korištenoj luciferazi, kataliza D-luciferina obuhvaća maksimume valnih duljina emitirane svjetlosti između 536 i 630 nm.⁴

Ove luciferaze pripadaju superporodici ANL enzima koja obuhvaća acil- i aril-CoA sintetaze, neribosomske peptidne sintetaze te luciferaze. Svi enzimi ove superporodice koriste zajednički mehanizam aktivacije karboksilata stvaranjem adenilata, koji se potom mogu zamijeniti biološkim tiolima poput CoA ili, kao u slučaju FLuc i ostalih luciferaza kopnenih organizama, mogu reagirati s elementarnim kisikom. Luciferaze za reakciju bioluminescencije koriste D-luciferin kao supstrat te ATP, O₂ i metalni kation, najčešće Mg²⁺ kao kofaktore. Većina enzima iz ANL superporodice sa svojim prirodnim supstratima ne provodi reakcije emisije svjetlosti, ali se pokazalo da je zamjena supstrata kod nekih enzima nekim drugim supstratom dovela do bioluminescencije.⁹ Modifikacije aktivnog mjesta acil-CoA-sintetaze masne kiseline (eng. *fatty acyl-CoA synthetase*) neluminescentnih klišnjaka kojima je postignuta bioluminescencija, kao i strukturna sličnost te bliskost u slijedu aminokiselina daju sugerirati da je Fluc potekla upravo od dugolančane acil-CoA sintetaze masne kiseline.^{6,10}

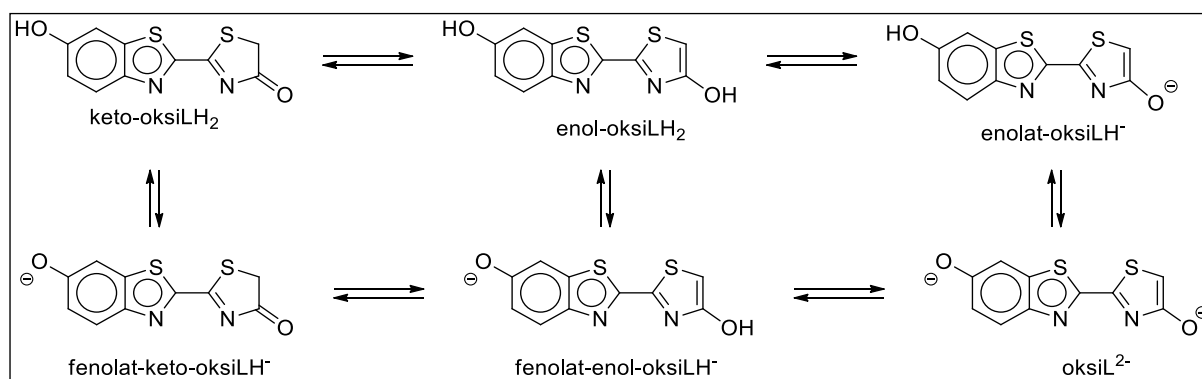
Enzim FLuc sastoji se od veće N-krajnje i manje C-krajnje domene povezanih pomičnom regijom s aktivnim mjestom smještenim u N-krajnjoj domeni na dodirnoj površini u blizini pomične regije.¹⁰ Usporedba strukture apoenzima FLuc sa strukturom srodne luciferaze na koju je vezan međuprodukt bioluminescentne reakcije luciferil-adenilat daje zaključiti da vezanjem supstrata dolazi do konformacijske promjene luciferaze kojom se smanjuje procijep između dvije domene, što za posljedicu ima povećanje katalitičke efikasnosti.⁶



Slika 3. Shematski prikaz slijeda reakcija bioluminescencije D-luciferina prema [4,6,10].

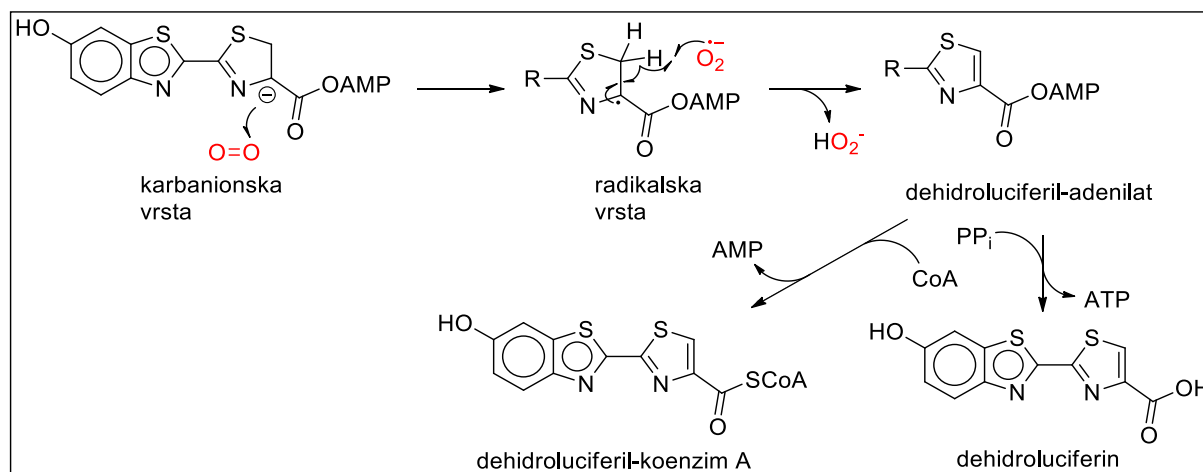
Prvi korak u mehanizmu bioluminescencije, kao što je prikazano slikom 3, jest aktivacija D-luciferina (D-LH₂) reakcijom bimolekulske nukleofilne supstitucije⁶ (S_N2) kojom karboksilat tiazolidinskog prstena luciferina napada α-fosfatnu skupinu ATP-a. Nastaje ester luciferil-adenilat (LH₂-AMP) uz konformacijsku promjenu² luciferaze i otpuštanje pirofosfata (PP_i). Deprotonacijom LH₂-AMP na C4 atomu nastaje karbanionski međuprodukt stabiliziran keto-enolnom tautomerijom kojega oko 80 %⁴ biva oksidirano molekulskim kisikom mehanizmom prijenosa jednog elektrona¹⁰ (eng. *single electron-transfer mechanism*). Reakcijom nastalih radikala dolazi do stvaranja kratkoživućeg 4-peroksi međuprodukta. Peroksid se dalje unutarnjim nukleofilnim napadom uz izdvajanje AMP-a zatvara u nestabilni međuprodukt dioksetanon, odnosno supstituirani dioksetanon koji posjeduje nestabilni četveročlani prsten visoke energije sastavljen od dva atoma kisika i dva atoma ugljika. Dekarboksilacijom nestabilnog dioksetanona oslobađaju se CO₂ i oksiluciferin u elektronski pobuđenom singletnom stanju S₁.^{2,6} Neutralna molekula oksiluciferina izgubi proton mehanizmom prijenosa protona u pobuđenom stanju (ESPT, eng. *excited state proton transfer*).⁴ Spontanom radijativnom relaksacijom³ energije pobuđenog oksiluciferina do osnovnog elektronskog stanja oslobađaju se fotoni zelene i crvene svjetlosti.

Nestabilnost dioksetanona za posljedicu ima nemogućnost njegovog izravnog promatranja, no njegovo postojanje kao reakcijskog međuprodukta ipak je potvrđeno reakcijom u kojoj je korišten kisik ¹⁸O₂. Raspadom nastalog dioksetanona u oslobođenom CO₂ prisutan je jedan atom kisika ¹⁸O, što je na slici 3 označeno crveno. Još uvijek nije jasno kako sustav iz dioksetanona u prijelaznom stanju, umjesto očekivanog egzotermnog prelaska u osnovno stanje oksiluciferina, energiju pohrani u pobuđeno singletno stanje produkta bez oslobađanja topline.²



Slika 4. Oblici oksid-luciferina mogući u otopini prema [11].

Oksiluciferin je također vrlo nestabilan spoj i dugo je trebalo da se njegova spektroskopska i kemijska svojstva pouzdano odrede. U vodenoj otopini, ovisno o pH u rasponu fizioloških vrijednosti, može postojati u 2 neutralna i 4 anionska oblika¹¹ prikazana slikom 4. Postavilo se pitanje koja je od mogućih struktura oksiluciferina odgovorna za emisiju zelene i crvene svjetlosti, a do odgovora se pokušalo doći usporedbom spektralnih svojstava fluorescencije mogućih struktura s opaženom bioluminescencijom. Fluorescencija neutralnih oblika plave je boje, što sugerira da je svakako anionski oblik odgovoran za bioluminescenciju.² Sada znamo da bioluminescencijom nastaje 6'-fenolat-keto-oksiluciferin koji je odgovoran za emisiju zelene svjetlosti,¹¹ dok se za crvenu emisiju pretpostavlja struktura enolat-oksiluciferina,² no to i nije posve sigurno.



Slika 5. Slijed tamnih reakcija D-luciferina prema [4, 6, 10].

Oko 20 % LH_2 -AMP biva oksidirano molekulskim kisikom, također djelovanjem FLuc luciferaze, u reakcijskom slijedu prikazanom slikom 5 u kojemu nema emisije svjetlosti, tzv. slijedu „tamnih“ reakcija (eng. *dark side oxidation*).¹⁰ Oksidacijom nastaje dehidroluciferil-adenilat (L-AMP), koji je snažan FLuc inhibitor, uz izdvajanje vodikova peroksida. Pretpostavka je da su blijesci krijesnica koje je moguće vidjeti ljeti posljedica upravo moćne i brze inhibicije bioluminescencije stvaranjem dehidroluciferil-adenilata koji ostaje snažno vezan u aktivnom mjestu.⁶ L-AMP može reagirati s pirofosfatom, dajući kao produkt dehidroluciferin (L) uz regeneraciju ATP-a,⁴ ili s CoA dajući dehidroluciferil-koenzim A (L-CoA) uz oslobođeni AMP. I L-CoA i L slabije su vezani u aktivnom mjestu nego L-AMP, što

ih čini slabijim inhibitorima i olakšava luciferinu vezanje za aktivno mjesto.⁶ Time je zapravo regeneriran aktivni oblik enzima.

2.1.2. Bakterijski luciferin

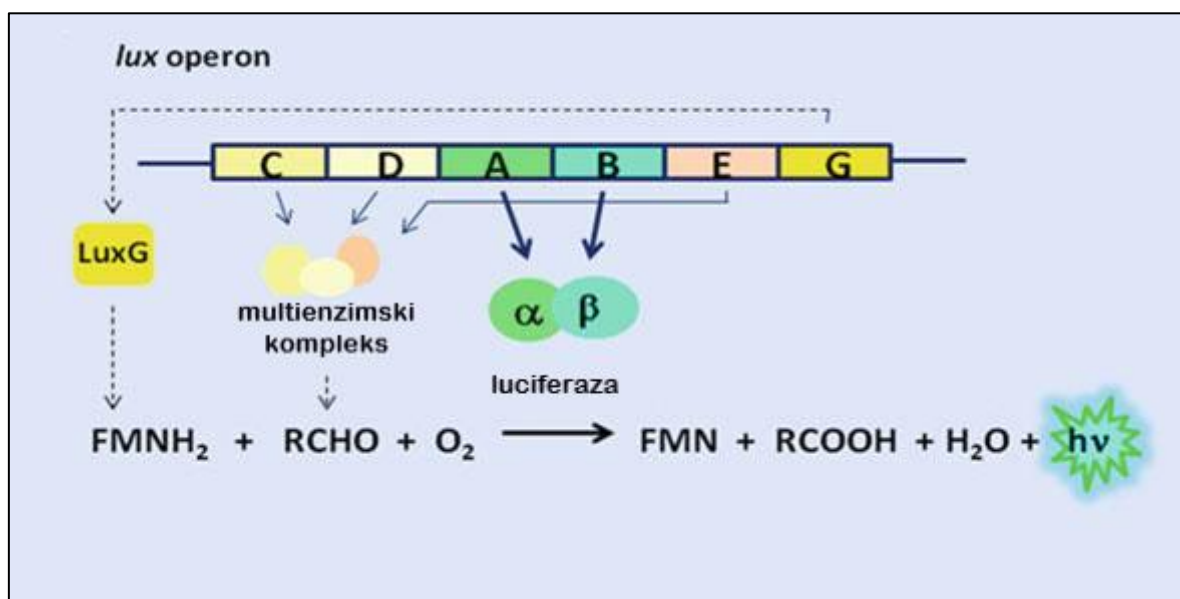
Za razliku od ostalih bioluminescentnih sustava, bakterijski se nešto razlikuje time što luciferin zapravo nije pravi izvor svjetlosti, a da bi mehanizam bioluminescencije bio moguć, izravno su potrebna ne jedan, nego dva enzima; oksidoreduktaza i luciferaza. Zahtjevi bakterijske luciferaze za odvijanje bioluminescencije su FMNH₂ i dugolančani alifatski aldehid. I iako je bioluminescencija ostvariva s bilo kojim dugolančanim aldehidom između tetradekanala i oktanala, tetradekanal (miristinski aldehid) je u stanicama bioluminescentnih bakterija najzastupljeniji i stoga je upravo on imenovan bakterijskim luciferinom.^{2,12}

Bakterijska luciferaza je monooksigenaza ovisna o flavinu, tj. flavin-mononukleotidu. Ovisno o bakterijskoj vrsti, enzim je mase u rasponu od 77 do 80 kDa. Heterodimer je sastavljen od dvije asimetrične α - i β -podjedinice, gdje je α -podjedinica, koja je ovisno o vrsti mase između 40 i 42 kDa, veća od β -podjedinice čiji se raspon masa kreće između 36 i 37,5 kDa. Reakcijski centar smješten je u α -podjedinici koja sadrži mobilnu petlju, dok je β -podjedinica odgovorna za stabilizaciju i održavanje konformacije α -podjedinice u aktivnom obliku. Naime, stvaranjem α_2 -homodimera ustanovljena je značajno niža aktivnost u usporedbi s originalnim $\alpha\beta$ -heterodimerom te time dokazana važnost β -podjedinice u katalizi bakterijske bioluminescencije.^{12,13}

Najproučavaniji bakterijski bioluminescentni sustavi i odgovarajuće bakterijske luciferaze dolaze iz tri roda; morski *Vibrio* i *Photobacterium* te kopneni *Photobacterium* (*Xenorhabdus*). Neke od važnijih vrsta su *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*, *Photobacterium* (*Xenorhabdus*) *luminescens*, *Photobacterium phosphoreum* i *Photobacterium leiognathi*.^{4,12}

Sve navedene bakterijske vrste koriste slične luciferaze, a zanimljivo je da samo jedan operon ima sposobnost u potpunosti upravljati procesom bioluminescencije. Operon *luxCDABEG* (slika 6) kodira luciferazu i enzime odgovorne za sintezu svih ostalih komponentni reakcijskog mehanizma. Bakterijska luciferaza kodirana je susjednim *luxA* i *luxB* genima *lux* operona, gdje je svaki od gena odgovoran za sintezu odgovarajuće podjedinice $\alpha\beta$ -heterodimera. Za sintezu luciferina (aldehida) odgovorni su geni *luxD* koji kodira transferazu, *luxE* koji kodira sintetazu i *luxC* koji kodira reduktazu, a sva tri enzima čine multienzimski kompleks. Transferaza katalizira hidrolizu miristilne skupine vezane za protein nosač acila

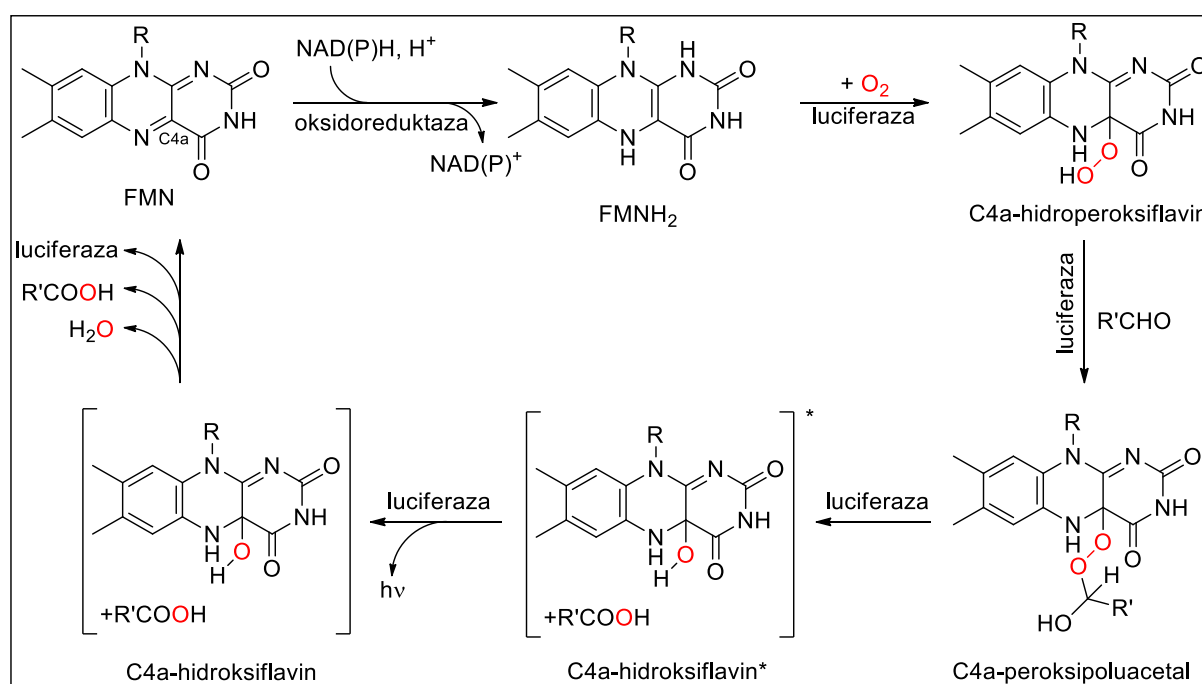
(ACP, eng. *acyl carrier protein*) i oslobađa miristinsku kiselinu čiju aktivaciju u obliku adenilata u svrhu kovalentnog vezanja za reduktazu katalizira sintetaza. Reduktaza katalizira redukciju do dugolančanog miristinskog aldehida koji je supstrat luciferaze u bakterijskoj bioluminescenciji. Gen *luxG* kodira specifičnu NAD(P)H:FMN-oksido-reduktazu (LuxG) odgovornu za stvaranje reduciranog oblika FMNH₂, o čijoj će specifičnoj ulozi u reakcijskom mehanizmu bakterijske bioluminescencije biti riječi.^{4,12,13}



Slika 6. Geni operona *luxCDABEG* odgovorni za sintezu svih enzima koji zajedničkim djelovanjem omogućuju bakterijsku bioluminescenciju. Preuzeto i prilagođeno prema [12].

Reakcijska shema bakterijske bioluminescencije prikazana slikom 7 kreće redukcijom flavina. Redukcija FMN pomoću NAD(P)H katalizirana je specifičnom flavin-oksido-reduktazom (LuxG) odakle nastali FMNH₂ u reduciranom obliku disocira i slobodnom difuzijom (bez stvaranja kompleksa između oksido-reduktaze i luciferaze)^{12,13} prelazi u aktivno mjesto luciferaze.⁴ Luciferaza katalizira oksidaciju reduciranog flavin-mononukleotida molekulskim kisikom do C4a-hidroperoksiflavina, čija je struktura zbog relativne stabilnosti (pri temperaturi od 2 °C vrijeme poluživota oko 1 h) određena ¹³C NMR spektroskopijom.^{2,12} Budući da luciferaza katalizira reakciju C4a-hidroperoksiflavina u kojoj se on prema luciferinu (aldehidu) odnosi kao nukleofil, pretpostavlja se da u enzimu zapravo postoji kao C4a-peroksiflavin. Kao produkt te reakcije nastaje vrlo nestabilan međuprodukt C4a-peroskipoluacetal čijim raspadom nastaju odgovarajuća miristinska kiselina (koja ostaje na enzimu) i C4a-hidroksiflavin u

pobuđenom stanju, čije je postojanje također potvrđeno njegovom izolacijom (pri temperaturi od 2 °C vrijeme poluživota o 33 min). Iz pobuđenog međuprodukta oslobađa se plavo-zelena svjetlost ($\lambda_{\max} = 485 - 490 \text{ nm}$)³, a odmah slijedi i eliminacija vode.¹² Ovdje treba napomenuti da iako često prikazivano kao da je pobuđeni međuprodukt emiter i izvor bioluminescencije (primjer direktne bioluminescencije), sama pojava nije posve sigurna i potrebno je obaviti dodatna istraživanja kako bi se razjasnilo koja je točno vrsta odgovorna za emisiju. Naime, na temelju dosad obavljenih istraživanja izglednije je da pobuđeni međuprodukt prenosi energiju na vezanu fluorescirajuću molekulu koja ne sudjeluje u reakciji i koja posljedično emitira svjetlost (primjer indirektna bioluminescencije).^{2,13} Iako sam mehanizam nije posve siguran, jasno je da je emisija na bilo koji način vezana uz strukturu FMN. Otpuštanjem kiseline i disocijacijom kompleksa FMN i luciferaze regenerira se oksidirani FMN, a nakon konformacijske promjene koju mora proći i luciferaza.¹²

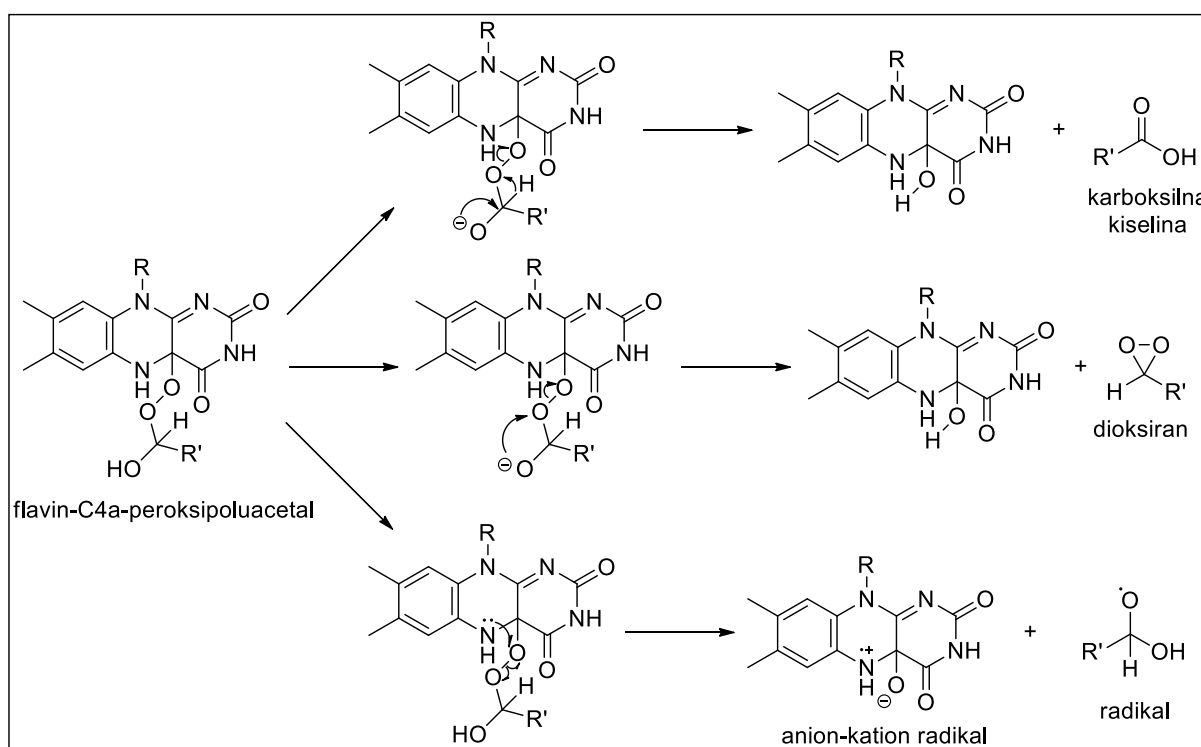


Slika 7. Shematski prikaz slijeda reakcija bakterijske bioluminescencije prema [4,12,13].

Kao i za provjeru strukture dioksetanona u reakcijskom mehanizmu D-luciferina, i ovdje je napravljen test s kisikom ¹⁸O₂. Pokazano je da se jedan atom kisika ¹⁸O pripaja strukturi rezultirajuće karboksilne kiseline. Rezultat je potvrdio da reakcijom kisika i FMNH₂ nastaje kovalentni spoj, a kako CO₂ nije produkt, eliminirana je mogućnost postojanja dioksetanona

kao međuprodukta u bilo kojem koraku reakcijske sheme. Iako zbog nestabilnosti C4a-peroksidoluacetal nije izoliran, spektralne karakteristike srodnih vrsta upućuju na njegovo postojanje.^{2,12,13}

Vezanje reduciranog oblika FMNH⁻ za luciferazu spor je proces i kao takav utječe na brzinu cijele reakcije. Jednom kada je vezan, reakcija kompleksa FMNH⁻:luciferaza s kisikom događa se jako brzo, najvjerojatnije mehanizmom prijenosa jednog elektrona s flavina na kisik. Mehanizam rezultira parom radikala koji reakcijom formiraju C4a-peroksiflavin.¹²



Slika 8. Tri predložena mehanizma stvaranja pobuđenog C4a-hidroksiflavina u reakcijskom slijedu bakterijske bioluminescencije, odozgo prema dolje: Baeyer-Villigerov mehanizam / mehanizam dioksirana / mehanizam luminescencije kemijski potaknutom izmjenom elektrona (CIEEL) prema [12].

Mehanizam stvaranja pobuđenog C4a-hidroksiflavina također nije siguran i predloženo ih je nekoliko (slika 8) čija je osnovna razlika u mehanizmu raspada međuprodukta C4a-peroksidoluacetal. Baeyer-Villigerov mehanizam uključuje pucanje O–O veze C4a-peroksidoluacetal, a uzrokom pucanja te veze pretpostavlja delokalizaciju elektrona atoma kisika na C1 atomu aldehida. Produkti takvog mehanizma su C4a-hidroksiflavin i odgovarajuća

karboksilna kiselina. No taj mehanizam ne daje pouzdana objašnjenja uočenih pojava i nije uvjerljiv. Uzrok mehanizma dioksirana sličan je uzroku Baeyer-Villigerova mehanizma, a razlikuju se u predloženim produktima. Mehanizmom dioksirana nastaju C4a-hidroksiflavin i dioksiran. Drugi provedeni testovi dali su sugerirati da bi mogući mehanizam stvaranja pobuđenog C4a-hidroksiflavina bio mehanizam luminescencije kemijski potaknutom izmjenom elektrona (CIEEL, eng. *chemically initiated electron exchange luminescence*). U ovom mehanizmu flavinski prsten ponaša se kao donor elektrona i time uzrokuje pucanje O–O veze i stvaranje kiselinskog radikala te C4a-hidroksiflavin neutralnog radikala s podijeljenim nabojem. U zadnja dva mehanizma konačni produkti se od predloženih produkata dobiju radikalskim reakcijama i prijenosom protona. Nijedan od predloženih mehanizama nije posve siguran i potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se utvrdio točan mehanizam.^{12,13}

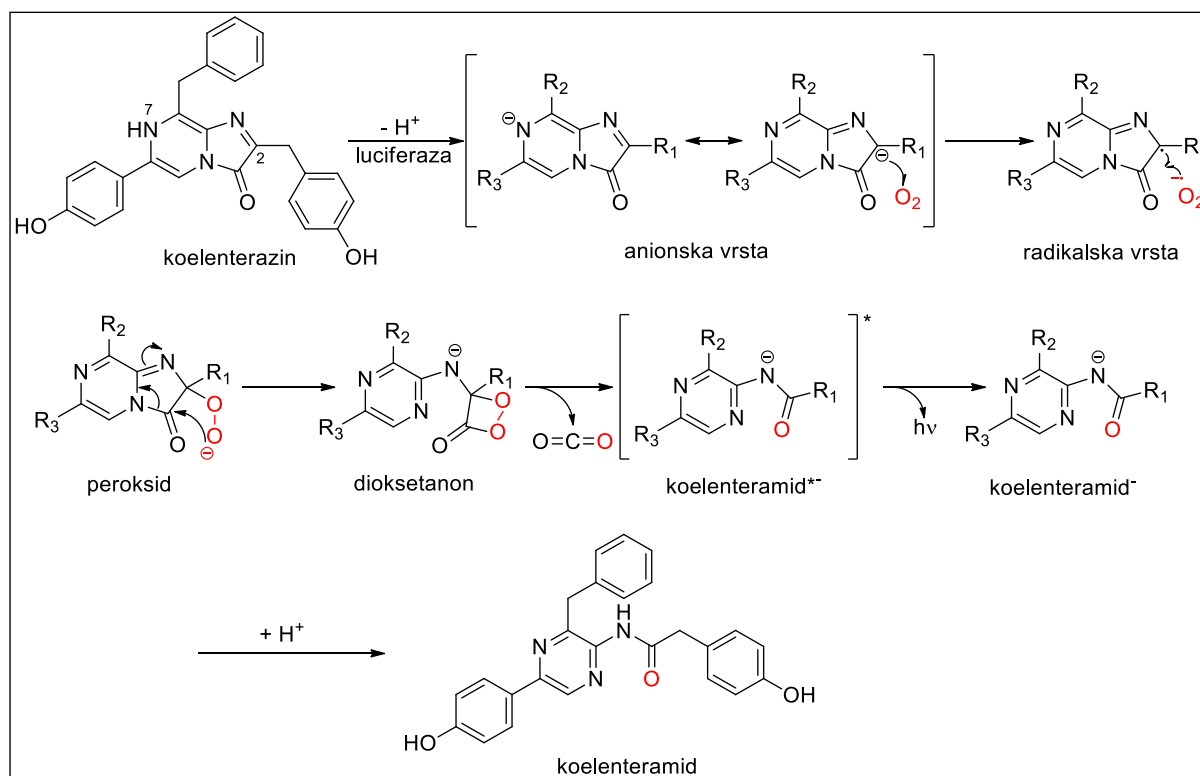
Proučavanjem kinetike bakterijske bioluminescencije upotrebom metode zaustavljenog protoka došlo se do zaključka da je oksidacija reduciranog FMNH₂ do FMN u vodenoj otopini jako brz proces, dok je u slučaju prisutnosti luciferaze stvaranje oksidiranog FMN usporeno. Dodatkom dugolančanog aldehida u otopinu FMNH₂ i luciferaze reakcija bioluminescencije je nastavljena i rezultira emisijom svjetlosti. Također je uočeno proporcionalno smanjenje intenziteta svjetlosti s povećanjem odgode dodatka aldehida u reakcijsku smjesu. To je objašnjeno postojanjem metastabilnog međuprodukta FMNH₂-O₂ u kompleksu s luciferazom koji u nedostatku aldehida biva oksidiran bez emisije svjetlosti.² Pretpostavlja se da je luciferazom vezani C4a-peroksiflavin u odsutnosti aldehida protoniran i da se raspada na H₂O₂ i oksidirani FMN, što je primjer „tamne“ reakcije kao i kod D-luciferina. Za luciferazu bakterijske vrste *Vibrio campbellii* praćena je brzina otpuštanja FMN s FMN:luciferaza kompleksa uslijed otpuštanja H₂O₂ i pokazalo se da je taj korak kojim se oslobađa luciferaza i regenerira FMN jako spor te time utječe i na ukupnu brzinu kojom se enzim može vratiti u aktivno stanje. Ispitana je i promjena konformacije luciferaze uslijed otpuštanja FMN, a rezultati su pokazali da je vrijeme za koje se polovica luciferaza nakon otpuštanja FMN vrati u aktivnu konformaciju 25 min pri 0 °C. Tako su se ova dva koraka pokazala značajnim ograničavajućim faktorima brzine reakcije.¹²

2.1.3. Koelenterazin

Koelenterazin je tip luciferina najzastupljeniji među morskim bioluminescentnim organizmima. Kao i većina drugih morskih luciferina, i koelenterazin je derivat imidazopirazinona. Prva

luciferaza koja kao supstrat koristi koelenterazin izolirana je 1978. godine iz škampa *Oplophorus gracilirostris*.⁴ Uz nju, značajnije luciferaze su one veslonožaca *Gaussia princeps* (GLuc) i *Metridia longa* (MLuc) te žarnjaka *Renilla reniformis* (RLuc).² RLuc je najbolje poznata od svih njih. To je monomerni protein mase 36 kDa s maksimumom bioluminescencije na 480 nm i jedan je od prvih uspješno kloniranih luciferaza. GLuc, čiji se maksimum emisije nalazi na 473 nm, je monomer koji je s masom od 19,9 kDa jedna od najmanjih luciferaza. MLuc je enzim mase 24 kDa s maksimumom emisije na 480 nm. Nedavno je klonirana nova MLuc izoforma mase 16,5 kDa, što predstavlja najmanju kloniranu prirodnu luciferazu.^{4,6}

Reakcijska shema bioluminescencije koelenterazina, kao što je moguće vidjeti na slici 9, slična je onoj D-luciferina. Započinje katalitičkom oksidacijom anionskog oblika koelenterazina, nastalog deprotonacijom atoma N7, molekulskim kisikom na poziciji C2, no sada bez aktivacije ATP-om. Oksidacijom nastaje odgovarajući 2-peroksikoelenterazin koji unutarnjim nukleofilnim napadom stvara dioksetanon. Slijedi dekarboksilacija eliminacijom ugljikova dioksida kojom nastaje anionski oblik oksiluciferina (koelenteramid) u pobuđenom S₁ elektronskom stanju. Prijelazom u osnovno elektronsko stanje emitira plavu svjetlost i prima proton čime nastaje neutralni koelenteramid.^{4,6,10} Bioluminescencija koelenterazina je kao i ona D-luciferina direktan proces, za razliku od bakterijske bioluminescencije.²



Slika 9. Shematski prikaz slijeda reakcija bioluminescencije koelenterazina prema [4,10].

Bioluminescencija temeljena na koelenterazinu, osim oksidacije katalizirane luciferazom, dolazi u još jednom obliku - fotoproteini regulirani kalcijem. Fotoproteini su sastavljeni od apoproteina i prostetičke skupine 2-hidroperoksikoelenterazina nekovalentno vezane i stabilizirane unutar šupljine proteina. Velika je prednost što sadrže stabilan hidroperoksikoelenterazin jer ga je moguće izravno promatrati kristalografijom X-zraka.⁴ Fotoproteini mogu biti shvaćeni kao luciferaze sa stabiliziranim reakcijskim međuproduktom. Već je godine 1962. predložena struktura u kojoj je kisik zajedno vezan sa supstratom (koelenterazinom) i stabiliziran u proteinskoj šupljini. Apoproteini su između različitih fotoproteina jako slični. Čak i ako stupanj homologije u slijedu aminokiselina nije toliko sličan (pr. samo oko 29 % između fotoproteina hidromeduza i ktenofora) strukturna svojstva i prostorni raspored ostaju zadržani. Apoprotein je monomer kojega čini relativno mali polipeptidni lanac, a pripada široj porodici kalcij-vezujućih proteina sa sekundarnom strukturom u kojoj pronalazimo tri vezna mjesta kalcija u obliku motiva EF-ruke. Primijećena je velika učestalost aminokiselina Trp, His, Cys i Pro koji imaju važnu ulogu u aktivnosti bioluminescencije fotoproteina.^{2,3}

Dosad je izolirano i opisano više od deset fotoproteina, a neki su od njih i uspješno klonirani. Bitniji fotoproteini su obelin (*Obelia longissima*, *Obelia geniculata*) sa $\lambda_{\max} = 495$ nm, berovin (*Beroe abyssicola*) sa $\lambda_{\max} = 491$ nm, klitin (*Clytia gregaria*) sa $\lambda_{\max} = 470$ nm i najčešći te prvi otkriveni ekvorin meduze *Aequorea victoria*. Otkrili su ga 1961. godine Shimomura i suradnici. To je protein mase 22 kDa s maksimumom emisije na 470 nm. Njegov polipeptidni lanac u različitim organizmima u kojima je prisutan zadržava visok stupanj homologije.^{3,4} Prvi je od svih klasificiran kao fotoprotein reguliran kalcijem jer je njegovim proučavanjem uočeno da je od kofaktora potrebnih za odvijanje bioluminescencije potreban jedino kalcij.² Nije potreban čak ni kisik. Vezanje Ca^{2+} potiče konformacijsku promjenu i time pokreće reakciju. Slobodno se može reći da zapravo nastavlja reakciju katalizirane oksidacije koelenterazina do koelenteramida počevši od stabiliziranog međuprodukta 2-hidroperoksikoelenterazina uz brzu emisiju svjetlosti u obliku bljeska.³

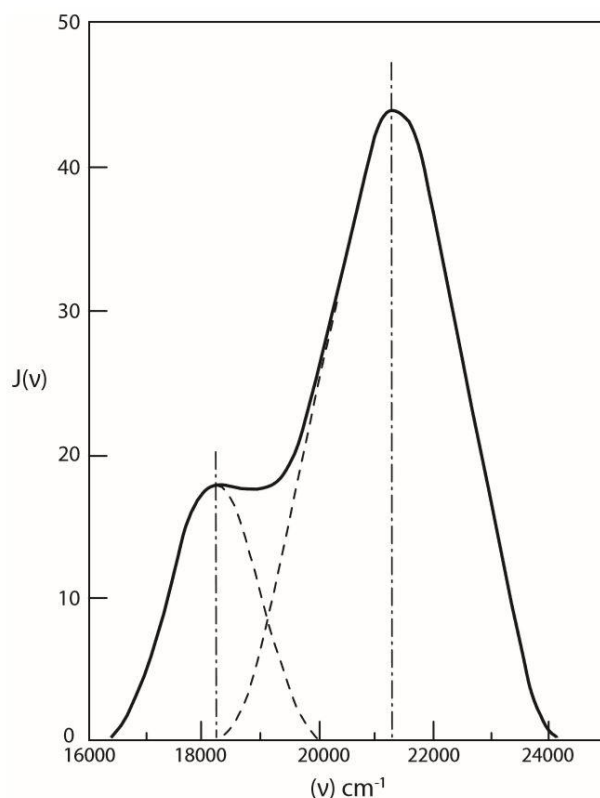
Nakon završene bioluminescencije, koelenteramid ostaje vezan za ekvorin i kao takav postaje fluorescentan s intenzivnom emisijom fluorescencije plave boje koju karakterizira $\lambda_{\max} = 469$ nm. Iz tog razloga je ekvorin poznat i kao plavi fluorescentni protein. Može se primijetiti da se maksimumi spektara bioluminescencije i fluorescencije ekvorina poklapaju, dok kod pr. obelina to nije slučaj. Obelin pokazuje zelenu fluorescenciju sa $\lambda_{\max} = 510$ ili 520 nm, što se

razlikuje od plavog spektra bioluminescencije. Uklanjanje kalcija s potrošenog ekvorina ima sposobnost disocirati kompleks apoekvorina i koelenteramida, dok u slučaju obelina oni ostaju čvrsto povezani i bez kalcija.^{3,15} Oporavak aktivnog fotoproteina jako je spor proces⁴ i tu leži bitnija razlika između fotoproteina i enzimski katalizirane reakcije oksidacije luciferina.

2.1.4. Vargulin

Poznat i kao cipridinid, vargulin je prvi put izoliran iz raka *Cypridina (Vargula) hilgendorfi* i opisan 1957. godine, što nije bio nimalo lak posao s obzirom da je nestabilan u kontaktu sa zrakom.⁴ Poput koelenterazina i većine drugih morskih luciferina, vargulin je također derivat imidazopirazinona, a od svih je luciferina iz te skupine određen prvi.²

Mehanizam bioluminescencije isti je mehanizmu bioluminescencije koelenterazina i ne zahtijeva ništa drugo osim luciferaze, luciferina i kisika. Ovisno o ionskoj jakosti otopine maksimum bioluminescencije varira između 448 i 463 nm,⁴ a specifično je da u spektru pronalazimo još jedan maksimum nešto slabijeg intenziteta na oko 548 nm (slika 10). Došlo se do zaključka da je osnovni maksimum posljedica emisije neutralnog produkta, dok je maksimum slabijeg intenziteta rezultat emisije produkta u anionskom obliku.²



Slika 10. Spektar raspodjele energije bioluminescencije vargulina. Preuzeto iz [2].

2.2. Promjena svojstava bioluminescentnih sustava i emitirane svjetlosti

Bioluminescencija je kao pojava zbog svojih povoljnih svojstava naišla na široku primjenu u istraživanjima i razvoju analitičkih metoda. Međutim, kako bi njen potencijal bio maksimalno iskorišten, javila se potreba za poboljšanjem svojstava samih sustava, kao i spektara emitirane svjetlosti. Napravljene su modifikacije na prirodnim luciferinima i luciferazama te tako sintetski stvoreni novi tipovi. Ispitivane su im karakteristike poput stabilnosti *in vitro* i *in vivo*, intenziteta i kinetike emisije svjetlosti, valne duljine maksimuma emisije i iskorištenja same reakcije. Nova svojstva moraju zadovoljiti kriterije koje uvjetuju sustavi za čije je ispitivanje metoda namijenjena.

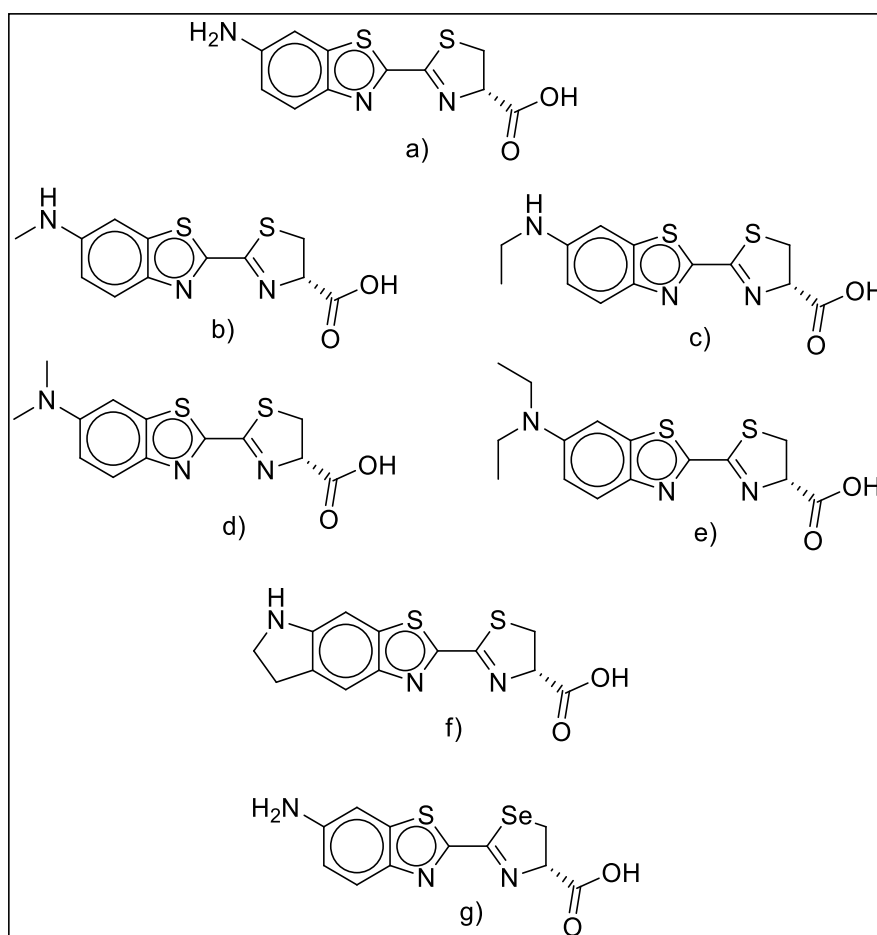
Promjena maksimuma valne duljine emitirane svjetlosti jedan je od važnijih faktora na koji se nastoji utjecati. Maksimum emisije nastoji se približiti optičkom prozoru (eng. *transparency window*), odnosno rasponu valnih duljina koje najdublje prodiru kroz slojeve živih tkiva, a koji se nalazi u crvenom i bliskom infracrvenom području valnih duljina od 650 do 900 nm.^{4,5} Optimalan raspon bio bi između 700 i 900 nm.⁷

2.2.1. D-luciferin i njegove luciferaze

Pokazalo se da je moguće zamijeniti 6'-hidroksi skupinu benzotiazola D-luciferina amino skupinom (slika 11-a) bez gubitka bioluminescencije. Pokazalo se da su i N-supstituirani aminoluciferini bioluminescentno aktivni. U istraživanju varijacija aminoluciferina u bioluminescenciji korisna je prirodna luciferaza sjevernoameričke krijesnice koja podnosi značajnije promjene luciferina bez gubitka aktivnosti. Iako s nešto smanjenim intenzitetom emisije *in vitro*, derivati aminoluciferina (slika 11-b do 11-e) pokazali su pomak prema većim valnim duljinama i nešto bolji afinitet prema samoj luciferazi u usporedbi s D-luciferinom i aminoluciferinom. No intenzitet emisije N-alkiliranih analoga aminoluciferina pokazao je u testovima *in vivo* značajno poboljšanje, kako s prirodnom tako i s modificiranom FLuc luciferazom. Značajno poboljšanje uočeno je i s cikličkim aminoluciferinom CycLuc1 (slika 11-f) u testovima *in vivo* koji su koristili luciferazu Luc2. Takvo povećanje intenziteta u odnosu na aminoluciferin i D-luciferin primijećeno u ispitivanjima *in vivo*, unatoč smanjenju intenziteta u ispitivanjima *in vitro*, ipak nije pripisano crvenom pomaku, već povećanju propusnosti staničnih membrana ispitivanih tkiva prema analogima luciferina.^{4,7} CycLuc1 bio je ujedno i

prvi analog koji je, unatoč smanjenju izlazne svjetlosti *in vitro*, pokazao napredak u istraživanjima *in vivo* u odnosu na prirodni D-luciferin.⁵

Zamjena atoma sumpora na poziciji jedan tiazolnog prstena aminoluciferina selenijem (slika 11-g) nije utjecala na promjenu u odnosu luciferaze prema luciferinu, ali je kombinacija već postojeće elektron-donirajuće amino skupine i polarizabilnog atoma selenija utjecala na dodatan crveni pomak prema 600 nm u uvjetima *in vivo*.^{4,7}



Slika 11. Strukture analoga D-luciferina temeljenih na zamjeni 6'-hidroksi skupine amino skupinom: a) aminoluciferin, b)-e) N-alkilirani aminoluciferini, f) CycLuc1 g) derivat aminoluciferina s atomom selenija na mjestu sumpora.

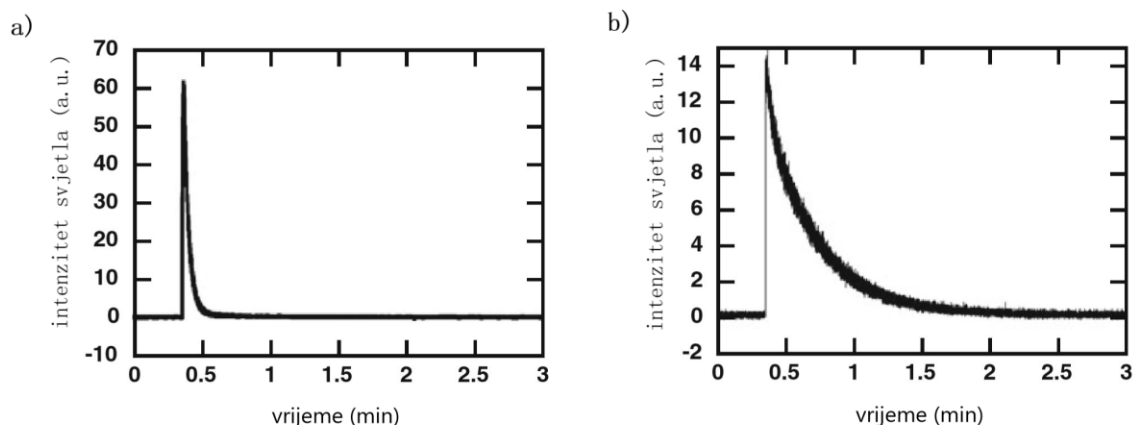
Jedan od obećavajućih načina pomaka spektra bioluminescencije u blisko infracrveno područje (NIR, eng. *near-infrared*) povećanje je konjugiranog π sustava luciferina. To je u slučaju D-luciferina moguće postići npr. dodatkom poveznice temeljene na konjugaciji dvostrukih veza između benzotiazolne i tiazolne polovice, kao na slici 12. Analog infra-LH₂ (iLH₂) pokazao je

bioluminescencije. Napravljeni su testovi s luciferazom FLuc koji su pokazali da bioluminescencija *in vitro* s prirodnom luciferazom poprima crvenu boju s povećanjem temperature, sniženjem pH vrijednosti ili dodatkom kationa Hg^{2+} ili Cd^{2+} . Pretpostavka je da je opseg valnih duljina od 546 do 594 nm (boje od zeleno-žute do narančaste) koje postižu luciferaze 35 različitih vrsta krijesnica posljedica upravo različitih polarnosti unutar veznih šupljina koje se očituju u različitim perturbacijama pobuđenog elektronskog stanja oksiluciferina, i posljedično različitim valnim duljinama emitirane svjetlosti.^{7,11,12}

2.2.2. Bakterijski luciferin i njegove luciferaze

Različite luciferaze pokazuju različite kinetike i intenzitete emitirane svjetlosti te su prema tome klasificirane u dva tipa: one s kinetikom brze relaksacije (eng. *fast decay kinetics*) kao što su luciferaze bakterija roda *Vibrio* i *Photorhabdus* i one s kinetikom spore relaksacije (eng. *slow decay kinetics*) poput luciferaza bakterija roda *Photobacterium* (slika 13). Površina ispod krivulje predstavlja kvantni prinos (eng. *quantum yield*) reakcije. Svojstva svjetlosti, osim o tipu luciferaze, ovise i o faktorima poput duljine lanca aldehida, odnosno luciferina. Tako je u slučaju luciferaze vrste *Vibrio campbellii* zamjenom dodekanala dekanalom došlo do promjene iz kinetike spore relaksacije niskog intenziteta u kinetiku brze relaksacije s visokim intenzitetom. Kvantni prinos je pritom ostao očuvan, a sam mehanizam koji potiče ovakvu promjenu uslijed izmjene supstrata nije poznat. Pretpostavka je da duljina lanca utječe na brzinu stvaranja i raspada nestabilnog C4a-peroksidoluacetala. Isto je postignuto i zamjenom dijela α -podjedinice luciferaze *Photobacterium phosphoreum* dugog 67 aminokiselina odgovarajućom regijom luciferaze *Photorhabdus luminescens*, gdje je kinetika enzima iz spororelaksirajućeg tipa promijenjena u brzorelaksirajući.¹²

Primijećeno je da aldehyd stvaranjem kompleksa s luciferazom ima sposobnost njene inhibicije. Istraživanja su pokazala nemogućnost vezanja $FMNH_2$ za kompleks luciferaze i aldehida u aerobnom mediju, već dolazi do njegove spontane i brze oksidacije do FMN bez emisije svjetlosti. Razrjeđenjem otopine aldehida i luciferaze inhibicija se smanjuje, što je pokazatelj da nema kovalentne interakcije između njih, niti je enzim denaturiran. Također je primijećeno da nema inhibicije pri niskim koncentracijama aldehida, što se pokušalo objasniti postojanjem dva vezna mjesta za aldehyd; prvo s većim afinitetom koje ne pokazuje efekt inhibicije (što bi bilo mjesto supstrata) i drugo s manjim afinitetom (inhibicijsko mjesto) koje inhibira vezanje $FMNH_2$ pri većim koncentracijama aldehida.¹²



Slika 13. Kinetika emisije svjetlosti (a) brze relaksacije luciferaze vrste *Photobacterium leiognathi* i (b) spore relaksacije vrste *Vibrio campbellii*. Preuzeto i prilagođeno prema [12].

Napravljeni su testovi koji su ispitali iskoristivost alifatskih α,β -nezasićenih aldehida sa 8, 10, 12 i 14 ugljikovih atoma u bioluminescenciji. Najbolje iskorištenje pokazao je (E)-tetradek-2-enal koji je u uvjetima *in vitro* sačuvao više od 50 % intenziteta bioluminescencije tetradekanala. Ispitivanje je provedeno pomoću tri različite luciferaze od kojih je najbolji prinos pokazala luciferaza vrste *Photobacterium leiognathi*. Također, uočena je promjena kinetike reakcije na način da je nešto više vremena bilo potrebno da emisija dosegne maksimum, ali je ujedno i trajala duže. Istraživanje je pokazalo da je raspon iskoristivih luciferaza bakterijske bioluminescencije ipak širi nego se isprva mislilo, a možda se i dodatno povećava stvaranjem novih luciferaza s promijenjenim strukturama aktivnih mjesta.¹⁴

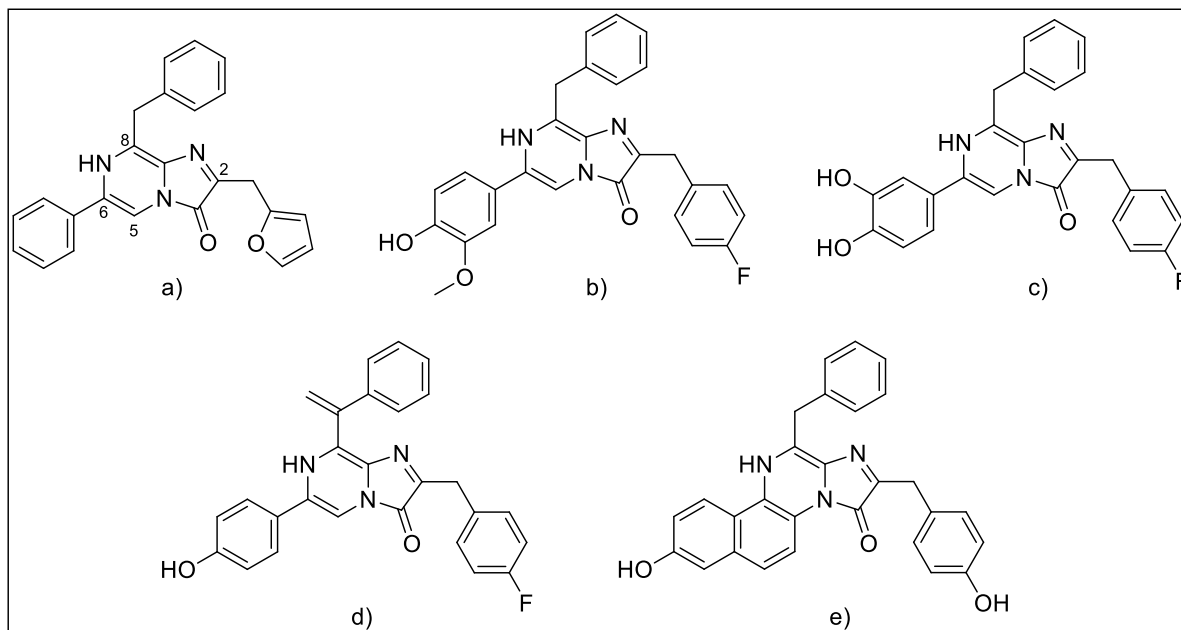
S obzirom na oblik bakterijskog luciferina za modifikacije svojstava bakterijske bioluminescencije ipak je više prostora za napredak u izmjeni luciferaze. U početku su kemijskim putem stvoreni mutirani tipovi sa smanjenim intenzitetom, crvenim pomakom ili promijenjenom osjetljivošću na toplinu, a kasnije se sekvenciranjem aminokiselina nastojalo objasniti koje su specifične aminokiseline u strukturi luciferaze odgovorne za uočene promjene i njihovim izmjenama doći do ciljanih svojstava. Tako je uočena važnost aminokiseline α Cys106 (cistein na položaju 106 α -podjedinice) čiji bočni ogranak gleda prema C4a poziciji flavina na kojoj luciferaza katalizira formaciju peroksi skupine i koja je važna za uspješno vezanje aldehida. Mutacije te aminokiseline destabiliziraju stvoreni C4a-peroksiflavin, što u konačnici umanjuje kvantni prinos reakcije, ali reakcija je i dalje moguća. Primijećeno je da je α His44 očuvan u luciferazama različitih bakterijskih vrsta, a njegova mutacija, iako nema većeg

utjecaja na stabilnost C4a-peroksiflavina, ima potencijal značajno umanjiti kvantni prinos bioluminescencije. Pretpostavlja se da je uloga dijela mobilne petlje α -podjedinice zaštititi međuprodukte reakcijskog mehanizma, a uočen je gubitak kvantnog prinosa za do dva reda veličine njenim uklanjanjem. Jedina aminokiselina β -podjedinice čijom je mutacijom uočena značajnija promjena aktivnosti luciferaze je β Tyr151 koja se nalazi na dodirnoj površini α - i β -podjedinica i za koju se smatra da stvara hidrofobne interakcije s aminokiselinama α -podjedinice. Njenom mutacijom umanjen je integritet aktivne konformacije luciferaze, došlo je do povećanja utjecaja toplinske inaktivacije, smanjena je sposobnost vezanja flavina, a kvantni prinos pao je na manje od 1 % početnog prinosa.^{12,14}

Smatra se da su ključne aminokiseline u strukturi luciferaze koje utječu na promjenu valne duljine emitirane svjetlosti one koje interagiraju s C4a-hidroksiflavinom, a da je promjena posljedica izmjene dielektričnog polja veznog mjesta, što mijenja snagu interakcije između luciferaze i vezane vrste. Prva bakterijska luciferaza s crvenim pomakom bila je luciferaza s mutacijom α Asp113Asn (zamjena aspartata na poziciji 113 α -podjedinice asparaginom) koja je pokazala crveni pomak od 12 nm, no uz značajan gubitak intenziteta. Bilo je još pokušaja mutacija luciferaze, ali uglavnom s veoma malim pomakom i uz smanjenje intenziteta emisije. Kombinacijom različitih mutacija uspješno je formirana luciferaza s manjim crvenim pomakom, no s povećanjem intenziteta u odnosu na luciferazu s jednom mutacijom. Dodatkom mutacije α Ala75Gly na luciferazu s već postojećom mutacijom α Cys106Val ublažene su steričke promjene izazvane prvom mutacijom te je tako vraćen dio izgubljenog intenziteta.¹²

2.2.3. Koelenterazin i njegove luciferaze te fotoproteini

Godine 2012. sintetizirana je nova luciferaza NanoLuc koja kao supstrat koristi furimazin (slika 14-a), sintetski derivat koelenterazina. Razlika u odnosu na koelenterazin je furilni supstituent na poziciji 2 imidazopirazinona umjesto fenolne skupine. NanoLuc je mala luciferaza (19,1 kDa)⁷ izvedena iz škampa *Oplophorus gracilirostris*. Povećanje intenziteta u odnosu na izvorni par luciferina i luciferaze je 2,5 milijuna puta⁴ s maksimumom emisije na 460 nm.⁵ Poboljšanje stabilnosti i povećanje intenziteta emisije svjetlosti, uz dugotrajno osvjetljenje (eng. *glow-type luminescence*)⁷ utjecali su na široku rasprostranjenost ovog para u oslikavanju *in vivo* i za istraživanja u raznim poljima.⁹ Prema ishodišnoj GLuc luciferazi stvorena je mutirana luciferaza Monsta koja s koelenterazinom pokazuje crveni pomak od 33 nm uz deseterostruko povećanje intenziteta.⁴



Slika 14. Strukture analoga koelenterazina: a) furimazin, b) i c) analozi s elektrondonirajućom skupinom na C6 fenolu i *p*-fluorobenzilom na poziciji C2, d) analog s produženim konjugiranim sustavom na C8 atomu i *p*-fluorobenzilom na poziciji C2, e) analog s vinilnim premoštenjem.

Zamjena postojeće prostetičke skupine fotoproteina sa sintetskim analogima koelenterazina rezultirala je stvaranjem polusintetskih fotoproteina s promijenjenim svojstvima. Analozi koelenterazina koji na C6 fenolu posjeduju elektron-donirajuću skupinu (slika 14-b i 14-c) ili na poziciji C8 imaju produženi konjugirani sustav (slika 14-d) pokazali su u testovima s fotoproteinima ekvorinom i obelinom crveni pomak. Sva tri analoga umjesto *p*-hidroksibenzil skupine na poziciji C2 posjeduju *p*-fluorobenzilnu skupinu, za što je u slučaju koelenterazina dokazano da doprinosi crvenom pomaku. Od navedenih, samo je analog (14-d) s α -stirilnim supstituentom na C8 poziciji pokazao značajniji crveni pomak s maksimumom emisije na 499 nm s ekvorinom i 518 nm s obelinom uz očuvanje aktivnosti (30 % s ekvorinom) dostatno za daljnja istraživanja. Dodatna prednost analoga 14-d u kombinaciji s ekvorinom za istraživačke svrhe je otprilike tri puta sporija faza relaksacije bioluminescencije u odnosu na originalni ekvorin.^{4,7,15}

Kako se ovisnost fotoproteina o kalciju može iskoristiti za proučavanje kalcija u stanicama, došlo je do potrebe za sintezom fotoproteina s promijenjenom osjetljivošću na kalcij.

Sintetizirani su mutirani oblici ekvorina sa smanjenom osjetljivošću kako bi se mogli proučavati organeli poput endoplazmatskog retikuluma, mitohondrija, Golgijevog tijela i peroksisoma s velikom koncentracijom kalcija. Analog koelenterazina v-koelenterazin (slika 14-e), koji posjeduje vinilnu prenosnicu između *o*-položaja *p*-hidroksilbenzila na C6 poziciji i atoma ugljika C5 koelenterazina, pokazuje u polusintetskom ekvorinu crveni pomak od 20 nm, no uz samo 3,5 % aktivnosti u odnosu na originalni ekvorin. Zanimljivo je da isti analog kataliziran luciferazom RLuc emitira svjetlost šest puta jačeg intenziteta uz crveni pomak od 40 nm.^{3,15}

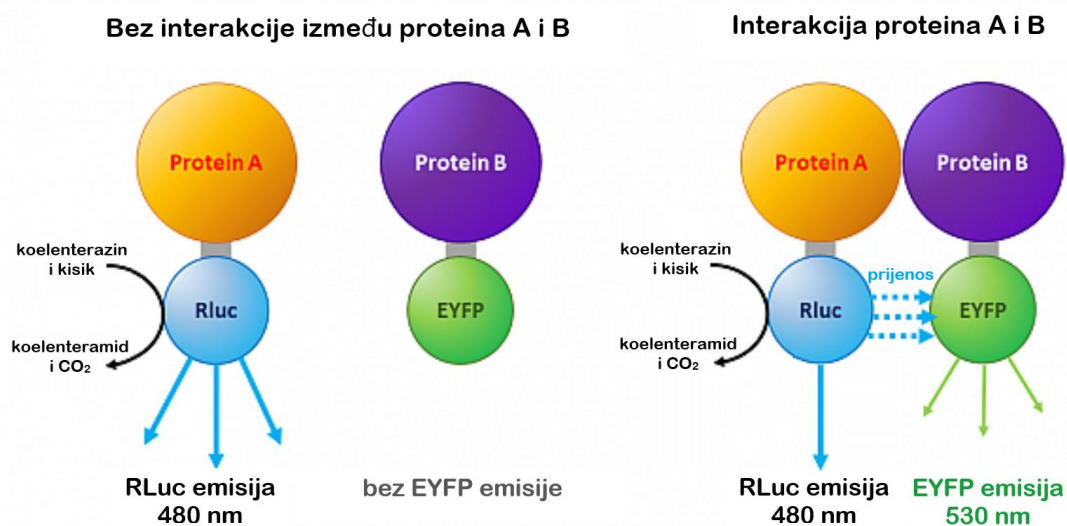
2.3. Iskorištenje bioluminescencije u istraživačke svrhe

Povoljna svojstva bioluminescentne svjetlosti, kao i neotrovnost luciferina te uglavnom visoko kvantno iskorištenje bioluminescencije omogućili su razvoj širokog spektra tehnika *in vitro* i *in vivo* iskorištenih za dokazivanje prisutnosti različitih analita, pretraživanje lijekova (eng. *drug screening*), biološko oslikavanje (eng. *bioimaging*), kao testovi ekspresije gena i mnogo više. Bioluminescentno oslikavanje (BLI, eng. *bioluminescent imaging*) primjer je tehnike *in vivo* biološkog oslikavanja upotrebom bioluminescencije gdje je cilj dobiti slike živih tkiva i staničnih procesa te pratiti njihove sudbine proučavajući utjecaje različitih tvari i poremećaja na organizam. Postupak BLI sastoji se od tri ključna koraka: 1) sekvenciranje luciferaze te genetski inženjering gena reportera bioluminescencije (sekvenciranih gena) u stanice i vektore gena te njihova heterologna ekspresija u proučavanom organizmu, 2) unos luciferina u organizam, 3) hvatanje i obrada svjetlosnog signala pomoću posebnog sustava za oslikavanje pri niskom osvjetljenju kao što je npr. osjetljiva CCD (eng. *charge-coupled device*) kamera. Transgene životinje koje proizvode svjetlo (LPTAs, eng. *light-producing transgenic animals*) dizajnirane su za proučavanje *in vivo* transkripcijske aktivnosti specifičnih gena, na način da promotor promatranog gena svojom transkripcijom pokreće transkripciju gena reportera bioluminescencije, odnosno ekspresiju luciferaze.^{4,7}

Osvrnut ćemo se na neke od načina regulacije i primjene bioluminescentnih sustava, kako prirodnih tako i sintetskih, u svrhu istraživanja temeljenih na poznavanju svojstava te ograničenja i mogućnosti fenomena bioluminescencije.

2.3.1. BRET

Kako je emitirana svjetlost sama po sebi uglavnom relativno slaba, bioluminescencija se često kombinira s fluorescentnim proteinima koji imaju ulogu reportera bioluminescencije. Metodom rezonantnog prijenosa energije bioluminescencije (BRET, eng. *bioluminescence resonance energy transfer*) pobuda se prenosi na fluorofor, obično fluorescentni protein. Pobudom fluorofora koji apsorbira svjetlost jedne valne duljine i emitira svjetlost druge valne duljine ujedno se mijenja i emisijski spektar. Time BRET predstavlja još jednu od metoda kojom se nastoji postići crveni pomak emitirane svjetlosti bioluminescencije. Metoda se temelji na metodi rezonantnog prijenosa energije fluorescencije (FRET, eng. *Förster/fluorescence resonance energy transfer*) gdje se prijenos energije događa između dviju molekula osjetljivih na svjetlo, od kojih prva biva pobuđena vanjskim izvorom svjetlosti i ima ulogu donora energije, a druga prima energiju pobuđene molekule te ima ulogu akceptora i emitira primljene energiju u obliku svjetlosti. U BRET metodi luciferaza predstavlja donora, a fluorescentni protein akceptora energije uz prednost nad FRET metodom što nema potrebe za vanjskom pobudnom svjetlošću koja ima potencijal interferirati s rezultatima ispitivanja.^{4,7,9,16}

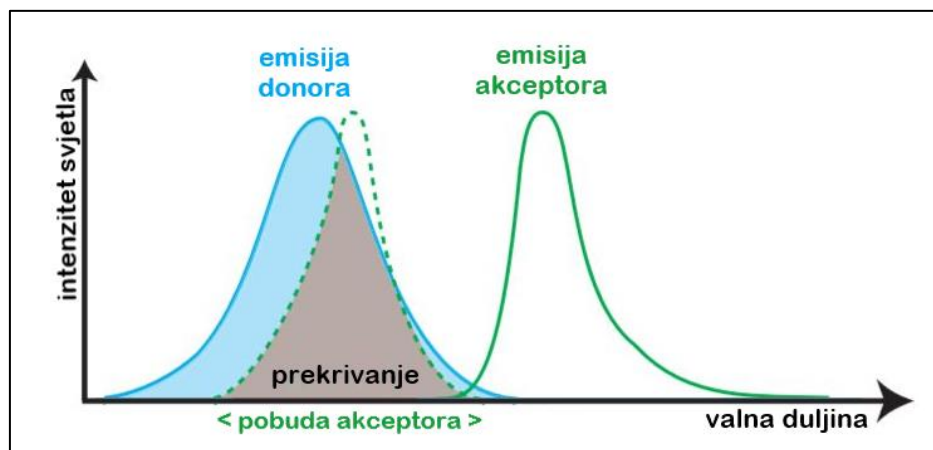


Slika 15. Shematski prikaz BRET metode iskorištene za proučavanje interakcija proteina na primjeru RLuc kao donora i eYFP kao akceptora i emitera BRET signala uz iskorištenje koelenterazina kao supstrata. Preuzeto i prilagođeno prema [17].

BRET je, uz metodu podijeljene luciferaze (eng. *split luciferase*) o kojoj će biti riječi, jedna od dvije metode u kojoj je bioluminescencija namijenjena proučavanju protein-protein interakcija.

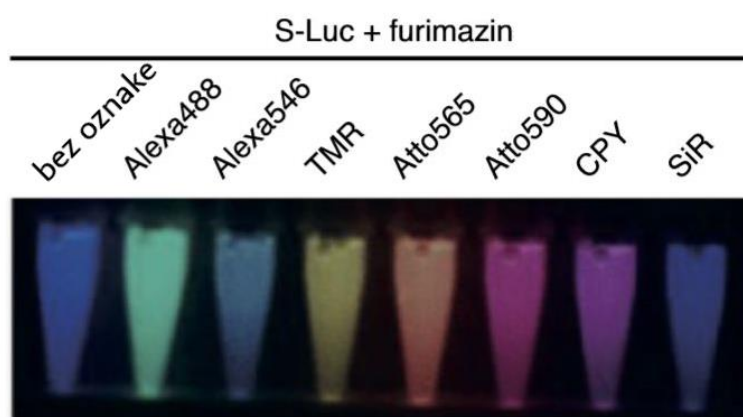
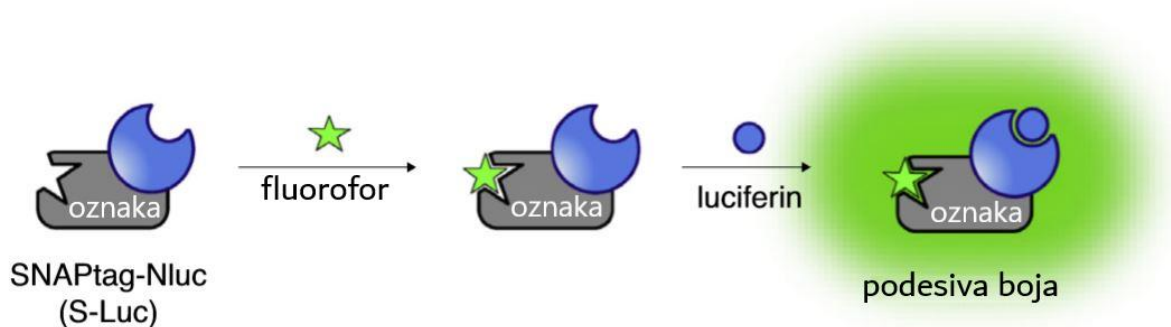
Luciferaza i fluorescentni protein prikvačeni su svaki za jedan od dva proteina čija se interakcija proučava. Ako se BRET signal pojavi, do prijenosa energije je došlo i interakcija između dva proteina je potvrđena. Shema je prikazana na slici 15. Opisana metoda osmišljena je 1999. godine koristeći par RLuc ($\lambda_{\max} = 480$ nm) i eYFP (poboljšani žuti fluorescentni protein, eng. *enhanced yellow fluorescent protein*, $\lambda_{\max} = 530$ nm), koji je mutirana inačica često korištenog GFP-a (zeleni fluorescentni protein, eng. *green fluorescent protein*). Par je nazvan BRET1 i kao luciferin koristi koelenterazin. Luciferaza NanoLuc pronašla je široku primjenu u razvoju BRET metoda. Par nazvan NanoBRET sastavljen od NanoLuc i fluorescentnog proteina HaloTag, čiji se maksimumi razlikuju za 175 nm, osigurava posebno veliku osjetljivost te se kao i NanoLuc-Venus par nazvan BRETⁿ koristi za proučavanje interakcija proteina.^{4,16,17} No moguće je promatrati i drukčiji tip interakcije. NanoLuc je pronašla mjesto u parovima NanoLuc-eGFP ($\lambda_{\max} = 509$ nm) i NanoLuc-LSSmOrange ($\lambda_{\max} = 572$ nm) koji su upotrijebljeni u proučavanju interakcija receptora spregnutih s G-proteinom i njihovih liganada, kao i za promatranje sposobnosti vezanja lijekova na ciljane proteine, na način da se na protein veže luciferaza, a na odgovarajući supstrat fluorescentna komponentna. Koriste se i za promatranje razvoja tumorskih tkiva *in vivo*.^{4,7}

Da bi BRET bio ostvariv, prvenstveno je potrebno da se emisijski spektar donora (luciferaze uz korištenje odgovarajućeg luciferina) i pobudni spektar akceptora (fluorofora) dijelom prekrivaju (slika 16). Ako je prvi uvjet zadovoljen i odgovarajući par je pronađen, BRET se može koristiti u proučavanju interakcije proteina. Na jačinu BRET signala utječe udaljenost donora i akceptora, odnosno blizina proteina koji interagiraju. Maksimalna udaljenost na kojoj je prijenos energije i dalje moguć iznosi 10 nm, uz značajno povećanje intenziteta signala sa smanjenjem udaljenosti. Sljedeći faktor koji utječe na jačinu signala je međusobna orijentacija donora prema akceptoru, kao i njihova koncentracija te njihov omjer unutar ispitivanog prostora. Naime, spontane interakcije između donora i akceptora vjerojatnije su što je njihova koncentracija veća. Značajnije povećanje koncentracija naposljetku može dovesti i do primjetnog signala. Tako pojava signala može biti znak spontane, odnosno nespecifične interakcije proteina. No takvi su signali općenito jako slabog intenziteta i teško se mogu zamijeniti sa signalom specifične interakcije. Također, izostanak signala ne znači nužno da do interakcije proteina nije došlo, već je moguće da je zbog navedenih faktora poput relativnog položaja donora prema akceptoru prijenos energije onemogućen.¹⁶



Slika 16. Preklapanje emisijskog spektra donora i pobudnog spektra akceptora u svrhu ostvarenja emisije BRET signala. Preuzeto i prilagođeno prema [16].

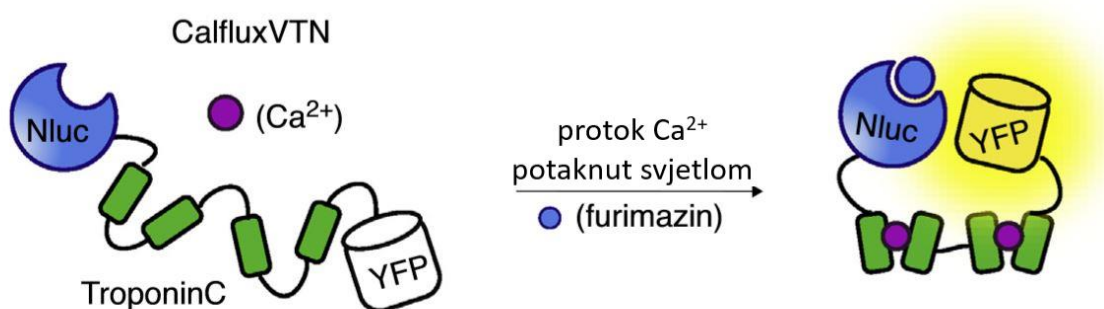
BRET je moguće upotrijebiti za promjenu svojstava emitirane svjetlosti na način da se formiraju konjugirani parovi luciferaze i fluorescentnog proteina. Takav pristup poznat je pod nazivom 'Nano-fenjeri' (eng. *Nano-lanterns*). Dobar primjer tako konjugiranog para je prvi Nano-fenjer koji uključuje poboljšanu RLuc i fluorescentni protein Venus. Njihova konjugacija rezultirala je povećanjem kvantnog prinosa i poboljšanjem izvedbe *in vivo* u odnosu na RLuc, a postignuta je i autofluorescencija.^{7,18} Paleta konjugiranih parova različitih fluorescentnih proteina i RLuc potaknula je stvaranje niza novih konjugiranih proteinskih kimer baziranih na fluorescentnim proteinima i NanoLuc. Razvijena je i metoda koja je omogućila dodavanje različitih fluorofora na NanoLuc koristeći SNAPtag i HaloTag tehnologiju prikazanu slikom 17. Ova tehnologija temelji se na proteinu (protein „oznaka“ na slici 17) kovalentno vezanom za luciferazu i supstratu tog proteina koji je modificiran tako da sadržava fluorofor po izboru. Protein i njegov supstrat kovalentno reagiraju i na taj način luciferaza biva obilježena željenim fluoroforom. Dodatkom luciferina pobuda se BRET mehanizmom prenosi na fluorofor i uočava se BRET signal. Prednost je metode što omogućava laku i brzu konjugaciju luciferaze sa željenim fluoroforom.^{9,19} Ovi pristupi oslikavanju omogućili su fluorescenciju bez štetnih utjecaja te su stoga postali praktična zamjena metodama temeljenim na fluorescenciji s vanjskom pobudom.



Slika 17. Shematski prikaz SNAPtag metode koja omogućava konjugaciju luciferaze sa fluoroforom po izboru na primjeru luciferaze NanoLuc skupa s paletom boja postignutih različitim oznakama. Preuzeto i prilagođeno prema [9].

BRET metodu moguće je ostvariti i modifikacijom luciferaze pomoću kvantnih točki (eng. *quantum dots*). Kvantne točke su poluvodljivi nanokristali čija je odlika učinkovito primanje energije. Pobuđuju se bilo kojom valnom duljinom u rasponu od UV do 530 nm i pokazuju visok kvantni prinos, a emisija im ovisi o promjeru i pokriva raspon od plave pa sve do NIR svjetlosti. Glavno im je ograničenje veličina (od 1,5 do 6 nm) i nemogućnost genetskog inženjeringa te proizvodnja u stanicama, zbog čega su ponajprije korisni u istraživanjima *in vitro*.^{7,16} Također, BRET je izvediv i na način da se fluorescentni akceptor konjugira s luciferinom, prvenstveno s namjerom izmjene spektra crvenim pomakom za upotrebu u istraživanjima *in vivo*. Primjeri tako modificiranih D-luciferina s konjugiranim NIR emiterima pokazuju nešto slabiju emisiju svjetlosti jer su zbog uvedene promjene nešto lošiji supstrati prirodnoj FLuc luciferazi.⁵

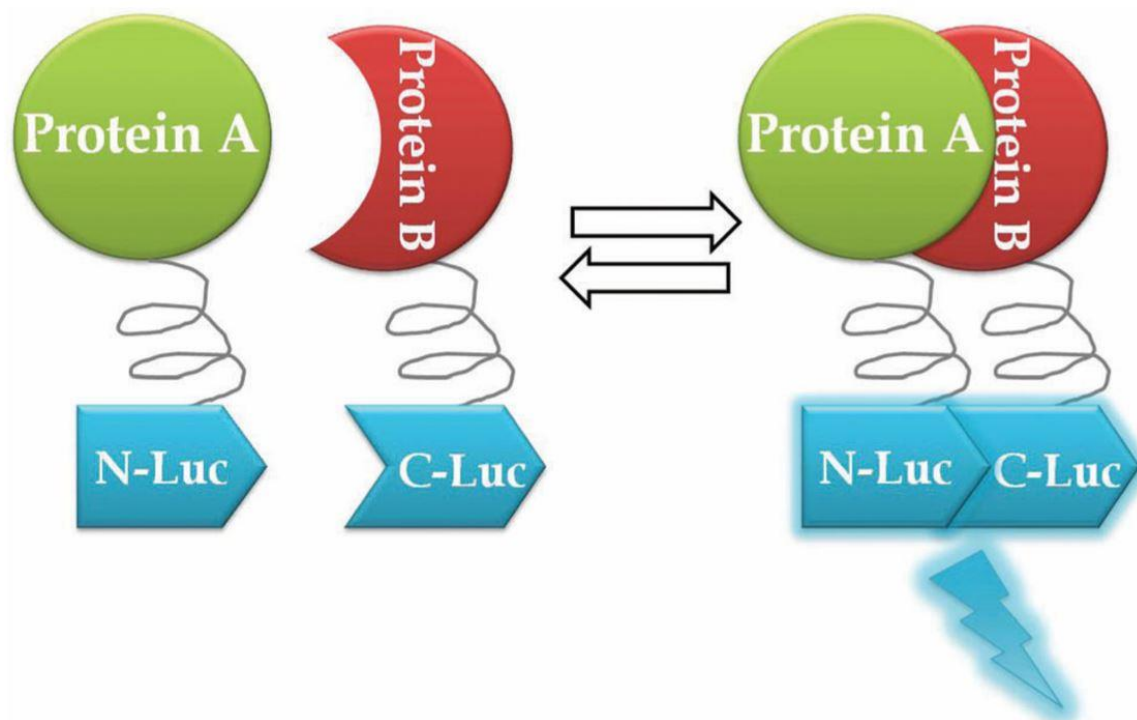
Senzor kalcija CalfluxVTN sastavljen od fluorescentnog proteina Venus, Ca^{2+} vezne domene Troponin C i luciferaze NanoLuc temeljen je na BRET pristupu. U odsustvu kalcija izražava bioluminescenciju, a vezanjem Ca^{2+} dolazi do konformacijske promjene i prijenosa energije te se uočava fluorescentni BRET signal (slika 18). Takav pristup omogućio je mjerenje protoka kalcija uslijed stimulacije rodopsina koji bi, kao fotoreceptor, bio pogođen pobudnom svjetlošću u slučaju proučavanja fluorescencijom.^{9,20} Protok kalcija unutar stanica moguće je mjeriti i BRET tehnikom postignutom konjugacijom fotoproteina s fluorescentnim proteinima. Redkvorin je tako sintetizirana kimera sastavljena od ekvorina i crvenog fluorescentnog proteina tdTomato koji emitira svjetlost na 573 nm s efikasnošću prijenosa energija od otprilike 73 %. Fotoproteini emitiraju plavu svjetlost, koju tkiva značajno apsorbiraju, pa je ovakav pristup temeljen na fluoroforima u crvenom dijelu spektra jako dobar za oslikavanje *in vivo*.^{3,7}



Slika 18. Shematski prikaz senzora kalcija CalfluxVTN koji kao posljedicu konformacijske promjene izazvane vezanjem kalcija odašilje BRET signal. Preuzeto i prilagođeno prema [9].

2.3.2. Podijeljena luciferaza

Metoda se još zove i oslikavanje upotpunjavanjem luciferaze (eng. *luciferase complementation imaging*), a ideja je u tome da se aktivna luciferaza rastavi u dva fragmenta, što rezultira gubitkom bioluminescentne aktivnosti. Svaki od dva dijela pripoji se proučavanim proteinima, što čini dva konjugirana proteina kao na slici 16. Sve modifikacije proteina odrađuju se na razini gena. Interakcijom proteina dijelovi luciferaze naprave cjelinu i aktivnost luciferaze se povraća. Dodatkom luciferina uočava se bioluminescentni signal i interakcija proteina je potvrđena. Primjer testa koji koristi ovu metodu je NanoBiT koji koristi luciferazu NanoLuc rastavljenu na dva polipeptida od 1,3 i 18 kDa.⁴



Slika 19. Shematski prikaz metode podijeljene luciferaze. Preuzeto iz [4].

2.3.3. Zarobljeni luciferin

Metoda zarobljenog luciferina (eng. *caged luciferin*) koristi se uglavnom za proučavanje staničnih funkcija, enzima i biološki aktivnih molekula *in vivo*, a temelji se na vezanju velike skupine s ulogom kaveza na luciferin, čime on postaje nekompatibilan odgovarajućoj luciferazi i reakcija bioluminescencije je onemogućena. Dodana skupina udaljava se nekom enzimskom reakcijom ili utjecajem prisutnog analita, luciferin postaje iskoristiv i luciferaza katalizira reakciju kojom dolazi do emisije svjetlosti.⁹

U slučaju D-luciferina ili njegova analoga aminoluciferina, metoda se provodi tako da se elektron-donirajuće OH- i NH₂- skupine na 6'- položaju zaštite od luciferaze dodatkom novih skupina, a uočeni signal proporcionalan je djelotvornosti odgradnje. Enzim kaspaza-3 povezan je s mehanizmima stanične smrti pa se za oslikavanje apoptoze koristi modificirani supstrat Z-DEVD-aminoluciferin (slika 20-a) koji nakon cijepanja spomenutom proteazom oslobađa aminoluciferin i pokreće reakciju. Za oslikavanje *in vivo* djelovanja β-galaktozidaze koristi se Lugal (slika 20-b), a aktivnost β-laktamaze prati se upotrebom supstrata Bluco (slika 20-c).

da kodira odgrađujući enzim koji koristi zarobljeni luciferin kao supstrat te kao produkt daje luciferin koji difundira u drugu populaciju stanica (reporteri) koje kodiraju luciferazu. Pojava bioluminescencije upućuje na blizinu proučavanih stanica.⁵

2.3.4. Dvobojni testovi s dvije luciferaze i ortogonalni parovi

Paralelno praćenje *in vivo* dvaju molekulskih događaja unutar stanica omogućeno je ekspresijom dvije različite luciferaze koje kataliziraju bioluminescentnu reakciju dodatkom zajedničkog luciferina. Uvjet je da se emisijski spektri dovoljno razlikuju kako bi se i odgovarajući signali mogli razlikovati. Otkrićem utjecaja strukture luciferaze na promjene spektralnih svojstava postalo je moguće oblikovati mutirane luciferaze koje iskazuju relativno dobro rastavljene spektre i maksimume emisije, što je omogućilo istovremeno praćenje molekulskih događaja. Različite varijante luciferaze CBLuc, koja koristi D-luciferin za emisiju žute svjetlosti, dijele preko 95 % sličnosti u slijedu aminokiselina, a kataliziraju emisiju zelene ili crvene svjetlosti. Velika je prednost srodnih luciferaza što različiti faktori prisutni u uvjetima *in vivo* podjednako utječu na obje luciferaze.^{6,7}

Ipak, razlikovanje valnih duljina često je zbog promjena s povećanjem dubine tkiva ili djelomičnog preklapanja spektara zahtjevno. Iz tog se razloga pribjegava korištenju luciferaza koje koriste različite supstrate. Dobar primjer su luciferaze FLuc i RLuc koje koriste dva posve različita luciferina, što omogućava oslikavanje u dvije uzastopne sesije i odvojeno prikupljanje signala. Takvi parovi luciferaza-luciferin koji međusobno ne interagiraju zovu se ortogonalni parovi. Modifikacijama luciferina i luciferaza nastoje se pronaći novi ortogonalni parovi koji bi se mogli koristiti u oslikavanju *in vivo*. Na nesreću, ni ova metoda nije bez mane. Osim što kataliziraju reakciju s različitim luciferinima, FLuc i RLuc posve se razlikuju slijedom aminokiselina i dijelom u mehanizmu odvijanja bioluminescencije. Zbog njihove različitosti i primjene testova u uvjetima *in vivo* postoji mogućnost neravnomjernog djelovanja interferirajućih i inhibirajućih molekula na dvije luciferaze, što posljedično dovodi do poremećaja u omjeru signala.^{6,7,9}

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. O. Shimomura, *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*, World Scientific, Singapur, 2006, str. xvii–xxvii.
2. J. Lee, Perspectives on Bioluminescence Mechanisms, *Photochem. Photobiol.* **93** (2017) 389–404.
3. S. Sharifian, A. Homaei, R. Hemmati, R. B. Luwor and K. Khajeh, The emerging use of bioluminescence in medical research, *Biomed. Pharmacother.* **101** (2018) 74–86.
4. Z. M. Kaskova, A. S. Tsarkova and I. V. Jampolsky, 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine, *Chem. Soc. Rev.* **45** (2016) 6048–6077.
5. N. Hananya and D. Shabat, A Glowing Trajectory between Bio- and Chemiluminescence: From Luciferin-Based Probes to Triggerable Dioxetanes, *Angew. Chem., Int. Ed.* **56** (2017) 16454–16463.
6. N. Thorne, J. Inglese and D. S. Auld, Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chem. Biol.* **17** (2010) 646–657.
7. L. Mezzanotte, M. van't Root, H. Karatas, E. A. Goun and C. W. G. M. Löwik, *In Vivo* Molecular Bioluminescence Imaging: New Tools and Applications, *Trends Biotechnol.* **35** (2017) 640–652.
8. <https://sites.google.com/site/jaimesjellyfish/species-of-jellyfish/aequorea-victoira> (datum pristupa 30. travnja 2020.)
9. Z. Yao, B. S. Zhang and J. A. Prescher, Advances in bioluminescence imaging: new probes from old recipes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **45** (2018) 148–156.
10. S. T. Adams Jr and S. C. Miller, Enzymatic promiscuity and the evolution of bioluminescence, *FEBS J.*, **287** (2020) 1369–1380.
11. J. Vieira, L. P. da Silva and J. C.G. E. da Silva, Advances in the knowledge of light emission by firefly luciferin and oxyluciferin, *J. Photochem. Photobiol., B* **117** (2012) 33–39.
12. R. Tinikul and P. Chaiyen, Structure, Mechanism, and Mutation of Bacterial Luciferase *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **154** (2014) 47–74.

13. E. Brodl, A. Winkler and P. Macheroux, Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **16** (2018) 551–564.
14. E. Brodl, J. Ivkovic, C. R. Tabib, R. Breinbauer and P. Macheroux, Synthesis of α,β -unsaturated aldehydes as potential substrates for bacterial luciferases, *Bioorg. Med. Chem.* **25** (2017) 1487–1495.
15. R. Gealageas, N. P. Malikova, S. Picaud, A. J. Borgdorff, L. P. Burakova, P. Brûlet, E. S. Vysotski and R. H. Dodd, Bioluminescent properties of obelin and aequorin with novel coelenterazine analogues, *Anal. Bioanal. Chem.* **406** (2014) 2695–2707.
16. J. Bacart, C. Corbel, R. Jockers, S. Bach and C. Couturier, The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol. J.* **3** (2008) 311–324.
17. <https://www.berthold.com/en/bioanalytic/knowledge/glossary/bret/> (datum pristupa 29. travnja 2020.)
18. <https://blog.addgene.org/plasmids-101-imaging-with-nano-lanterns> (datum pristupa 17. travnja 2020.)
19. <https://bitesizebio.com/38072/halo-snap-and-clip-tagging-powerful-technologies-for-protein-labeling/> (datum pristupa 24. travnja 2020.)
20. J. Yang, D. Cumberbatch, S. Centanni, S. Shi, D. Winder, D. Web band C. H. Johnson, Coupling optogenetic stimulation with NanoLuc-based luminescence (BRET) Ca^{++} sensing, *Nat. Commun.* **7**, 13268 (2016) Preuzeto s <https://www.nature.com/articles/ncomms13268> (datum pristupa 29. travnja 2020.)