

# Kemijske i fizikalne osnove bioluminiscencije

---

**Bach-Rojecky, Helena**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:235558>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-09**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

**Helena Bach-Rojecky**

**ZAVRŠNI RAD**

**Zagreb, rujan 2020.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

**Helena Bach-Rojecky**

**KEMIJSKE I FIZIKALNE OSNOVE BIOLUMINISCENCIJE**

**ZAVRŠNI RAD**

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Vladimir Dananić

**Članovi ispitnog povjerenstva:**

izv. prof. dr. sc. Vladimir Dananić

dr. sc. Andrej Vidak

prof. dr. sc. Igor Sutlović

**Zagreb, rujan 2020.**

# SAŽETAK

## Kemijske i fizikalne osnove bioluminiscencije

Cilj ovog rada je opisati kemijske i fizikalne osnove bioluminiscencije te potencijal primjene u različitim vrstama istraživanja.

Bioluminiscencija (BL) je fenomen emisije svjetlosti živih organizama, a najpoznatiji BL sustavi su iz krijesnica, različitih morskih organizama, određenih vrsta bakterija i gljivica. BL je kemijski proces u prirodi uzrokovan interakcijom enzima luciferaze i njegovog supstrata luciferina. Emitirana svjetlost ima različite maksimume valnih duljina te se zbog toga mogu primijetiti različite boje emitirane svjetlosti. Bioluminiscencija se temelji, u osnovi, na istim principima kao kemiluminiscencija. Kao i kod svake kemijske reakcije, poželjno je znati kinetiku BL reakcije, koja se slaže s kinetikom biokemijskih reakcija, odnosno prati Michaelis-Mentenovu kinetiku. Poznavanje kvantnih prinosa (kvantne učinkovitosti) je od velike važnosti u primjeni BL jer s povećanjem kvantnog prinosa granica detekcije se snizuje. Glavna bioluminiscentna komponenta ne mora biti par luciferaza-luciferin nego i fotoproteini, od kojih su najbitniji obelin i aequorin. Luciferaze su danas od velike važnosti za primjenu u medicini pa je poželjno poznavati njihovu strukturu, prednosti i nedostatke, te ako je potrebno i modificirati njihove supstrate luciferine kako bi reakcije bile što učinkovitije i primjenjivije. Bioluminiscencija najveću primjenu nalazi u tehnikama oslikavanja u medicini, kojim se olakšava pronalazak tumora, promatranje napredovanja bolesti i djelotvornosti lijekova.

**Ključne riječi:** bioluminiscencija, luciferaza, luciferin, fotoprotein, svjetlost, kinetika, bioluminiscentno oslikavanje

## **ABSTRACT**

### **Chemical and physical basis of bioluminescence**

The aim of this paper is to show the chemical and physical basis of bioluminescence.

Bioluminescence (BL) is a phenomenon of light emission of living organisms, such as fireflies, different sea creatures, bioluminescent bacterias and fungi. BL is a chemical process in nature caused by the interaction of a protein, luciferase, and its substrate luciferin. The emitted light has different maximum wavelengths and therefore different colors of emitted light can be noticed. Bioluminescence contains, in essence, the same principles as chemiluminescence. As with any chemical reaction, it is desirable to know the kinetics of the BL reaction, which agrees with the kinetics of biochemical reactions, ie follows the Michaelis-Menten kinetics. Knowledge of quantum yields (quantum efficiency) is of great importance in the application of BL because with increasing quantum yield the limit of detection decreases. The structures of 9 luciferins are known, and five BL systems, along D-luciferin metabolism have been described. The main bioluminescent component does not have to be a luciferase-luciferin pair but also photoproteins, of which obelin and aequorin are the most important. Luciferases are of great importance today for application in medicine, so it is desirable to know their structure, advantages and disadvantages, and if necessary, modify their luciferins to be as effective as possible. Bioluminescence finds its greatest application in bioluminescent imaging, which facilitates tumor detection, observation of disease progression, and drug efficacy.

**Key words:** Bioluminescence, luciferase, luciferin, photoprotein, light, kinetics, bioluminescent imaging

*“Apparently there is no rhyme or reason in the distribution of luminescence throughout the plant or animal kingdom. It is as if the various groups had been written on a blackboard and a handful of sand cast over the names. Where each grain of sand strikes, a luminous species appears.” E. Newton Harvey (1927).*

*Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Vladimiru Dananiću na predloženoj temi, stručnom vođenju i sugestijama prilikom izrade završnog rada.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO.....	3
2.1. Emisija svjetlosti .....	3
2.2. Kemiluminiscencija (CL) .....	5
2.2.1. Kemiluminofor .....	7
2.3. Kinetika enzimske reakcije .....	8
2.4. Kvantni prinos .....	10
3.1. Bioluminiscentni sustavi .....	12
3.1.1. Bioluminiscentni sustav bakterija .....	12
3.1.2. Bioluminiscentni sustav insekata (krijesnice) .....	13
3.1.3. Koelenterazinski bioluminescentni sustav .....	14
3.1.4. Vargulinski bioluminiscentni sustav .....	16
3.1.5. Bioluminiscentni sustav svjetlećih bičaća .....	16
3.1.6. Ostali bioluminiscentni sustavi .....	17
3.2. Biosinteza D-luciferina.....	18
3.3. Fotoproteini .....	18
3.3.1. Osnovna strategija ekstrakcije i pročišćavanja fotoproteina .....	19
3.3.2. Svojstva reakcije katalizirane aequorinom.....	20
4. REZULTATI.....	21
4.1. Kinetika bioluminiscentnih reakcija.....	21
4.1.1. Kinetika reakcija fotoproteina .....	22
4.1.2. Kinetika bioluminiscencije krijesnica .....	24
4.1.3. Kinetika bioluminiscencije bakterija.....	25
4.2. Mjerenje kvantnih prinosa.....	26
5. RASPRAVA.....	29
5.1. Razvoj i primjena luciferaza.....	29
5.1.1. Razvoj i primjena luciferaza D-luciferina .....	30
5.1.2. Razvoj i primjena luciferaza koelenterazina .....	30
5.1.3. Razvoj i primjena bakterijskih luciferaza.....	32
5.2. CANARY .....	33
5.3. Bioluminiscentno oslikavanje .....	34
5.3.1. Otkrivanje interakcija protein-protein .....	34
5.3.2. <i>In vivo</i> bioluminiscentno oslikavanje .....	35
6. ZAKLJUČAK .....	37
7. POPIS SIMBOLA I KRATICA.....	38
8. LITERATURA .....	40

## 1. UVOD

Bioluminiscencija (BL) je fenomen emisije svjetlosti živih organizama (Slika 1.). To je kemijski proces u prirodi uzrokovan interakcijom proteina (enzima), luciferaze i njegovog supstrata luciferina. S obzirom na to da je emisija svjetlosti uzokovana kemijskom reakcijom, bioluminiscencija je zapravo vrsta kemiluminiscencije. Uz sustave luciferin-luciferaza proučavaju se i kompleksi s fotoproteinima, za čiju luminiscenciju nije potreban kisik, već metalni ion. U prirodi postoji 30 različitih bioluminiscentnih sustava, no poznati su reakcijski mehanizmi od samo 9. Zbog visokih kvantnih prinosa bioluminiscentnih reakcija i relativne netoksičnosti luciferina, razvijen je veliki broj *in vitro* i *in vivo* analitičkih tehnika, uključujući testove za utvrđivanje različitih analita i imunološke testove. Trenutno se BL koristi u ispitivanju tumora i zaraznih bolesti te u praćenju zagađenja okoliša. Promatranje BL ne zahtijeva osvjjetljenje uzorka vanjskim svjetlom (za razliku od fluorescencije) pa se mjerenja provode u tamnoj sredini. Stoga u eksperimentalnim uvjetima ne postoje komplikacije povezane sa zagrijavanjem uzorka i skretanjem izvora svjetlosti, smetnjama raspršivanjem svjetla i pozadinskom fluorescencijom. Metode temeljene na BL su visoko osjetljive i pružaju dobru prostornu razlučivost, širok dinamički raspon i jednostavnu kvantitativnu procjenu signala.[1]

U počecima proučavanja bioluminiscencije pretpostavljalo se da je za emisiju svjetlosti živih organizama bio zaslužan fosfor ili njegovi spojevi. Za novu pretpostavku da neki organski spoj može emitirati svjetlost zaslužan je Macaire (1821.), francuski kemičar, sugerirajući da je tvar slična albuminu odgovorna za svjetlost. R. Dubois (1885.) je prvi dokazao da je u luminiscenciju uključen enzim te ga je nazvao luciferaza (lat. lucifer – „jutarnja zvijezda”). W. D. McElroy (1947.) otkrio je ulogu adenzin-trifosfata (ATP) i magnezijevih iona u svjetlucanju krijesnica. Fizikalno istraživanje BL u 18. i 19. stoljeću, odnosno promatranje njezinog spektra dovelo je do zaključka da se radi o monokromatskoj svjetlosti koja se ne raspada. Ives i Coblentz (1909.) su prvi izmjerili maksimume emisijskih spektara koristeći prizmički spektrometar s fotografskom detekcijom. Pokazali su da se spektralna raspodjela svjetlosti kod različitih vrsta krijesnica u stvarnoj količini razlikuje, što je uzrok varijacije boja.[2]



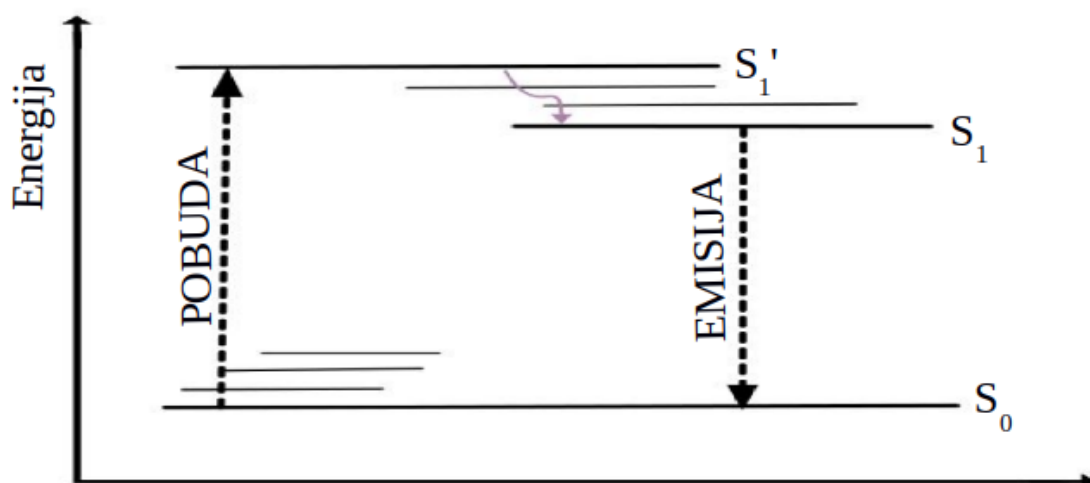


Slika 1. Bioluminiscentni organizmi. [3]

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Emisija svjetlosti

Emisija energije u obliku vidljive svjetlosti tijekom biokemijske reakcije nije rijedak fenomen u prirodi. Dvije glavne vrste biokemijskih reakcija koje dovode do bioluminiscencije uključuju enzime koji se nazivaju luciferaze, koji kataliziraju oksidaciju supstrata (luciferina) kisikom ili vodikovim peroksidom; i takozvane fotoproteine koji sami prolaze kroz transformaciju tijekom bioluminiscentne reakcije. Potrebno je ispuniti dva uvjeta da dođe do emisije svjetlosti u biokemijskoj reakciji: (1) energija koja se oslobađa u reakciji treba biti veća od energije elektronski pobuđenog konačnog ili intermedijarnog produkta; i (2) produkt reakcije mora biti fluorescentna molekula tako da transformaciju pobuđenog stanja u osnovno stanje prati emisija vidljive svjetlosti, ili reakcijska smjesa mora uključivati molekulu s fluorescentnim svojstvima koja će primiti energiju.

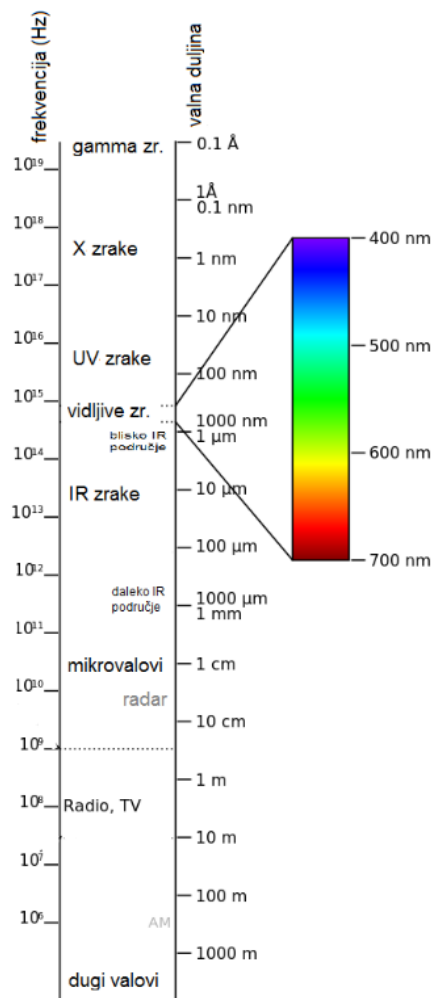


Slika 2. Jablonski dijagram u kojem je  $S_0$  osnovno stanje, a  $S_1$  i  $S_1'$  pobuđeno stanje.

Opći energetska profil bioluminiscentne reakcije može se predstaviti kao pojednostavljeni Jablonski dijagram (Slika 2.). U prvom koraku molekula se pobuđuje iz osnovnog stanja utjecajem elektromagnetskog polja ili energije izrazito egzotermičkih kemijskih reakcija. Ovisno o strukturi pobuđene molekule, ona se prevodi nazad u osnovno stanje, oslobađajući dodatnu energiju u obliku topline ili svjetlosti. Energija koja se oslobađa u obliku vidljive svjetlosti naziva se luminiscencija. Ako se energija pobude daje u obliku svjetlosti, emisija se naziva fluorescencija (ili fotoluminiscencija). Ako je izvor energije pobude kemijska reakcija, emisija se naziva kemiluminiscencija (CL).

Ako je u toj kemijskoj reakciji uključen enzim (luciferaza) ili fotoprotein, proces emisije svjetlosti naziva se bioluminiscencija (BL). CL i BL uključuju nekoliko uzastopnih procesa, od kojih je prvi stvaranje produkata čije su sljedeće transformacije dovoljno egzotermne da nastanu produkti u pobuđenom stanju koji nakon deaktivacije emitiraju vidljivu svjetlost (valne duljine 400 - 700 nm) (Slika 3.). Odgovarajuća energija je 40 i 70 kcal/mol za emisiju crvene i plave boje. Iz tog razloga, reakcijska entalpija ( $\Delta H$ ) mora biti veća od 40 kcal/mol da bi se osiguralo dovoljno energije.

Drugi proces je prijelaz nekog međuprodukta reakcije u elektronski pobuđeno stanje, tj. transformacija kemijske potencijalne energije u energiju pobuđivanja elektrona. Treći proces je emisija svjetlosti iz pobuđenog stanja.[4]



Slika 3. Spektar elektromagnetskog zračenja. [4]

## 2. 2. Kemiluminiscencija (CL)

CL se definira kao emisija elektromagnetskog zračenja proizvedenog kemijskom reakcijom. Kako je intenzitet emisije ovisan o koncentracijama kemijskih spojeva uključenih u reakciju CL, mjerenje intenziteta emisije može se upotrijebiti u analitičke svrhe. Prednost CL tehnika je u tome što je moguće koristiti prilično jednostavne osnovne instrumente, jer optički sustav ne zahtijeva vanjski izvor svjetla.

Općenito, CL reakcija može se odvijati pomoću dva osnovna mehanizma. U izravnoj reakciji, dva reagensa, obično supstrat i oksidans u prisutnosti nekih kofaktora, a ponekad i katalizatora, reagiraju tako da formiraju produkt ili međuprodukt. Pritom će neki dio produkta ili međuprodukta nastati u elektronski pobuđenom stanju, te će moći prijeći nazad u osnovno stanje emisijom fotona. Supstrat je CL prethodnik koji se pretvara u elektronski pobuđenu molekulu koja je konačno odgovorna za emitiranje svjetlosti ili supstrat ima funkciju prijenosa energije u neizravnoj CL reakciji. Katalizator, enzimi ili metalni ioni smanjuju aktivacijsku energiju i pružaju odgovarajuće okruženje za ostvarenje CL visoke učinkovitosti. Kofaktori (najčešće metalni ioni) su ponekad potrebni za pretvorbu jednog ili više supstrata u oblik koji može reagirati s katalizatorom ili osigurati učinkovitu odlazeću skupinu ako je potrebno cijepanje veze za proizvodnju pobuđenog emitera. Suprotno tome, neizravna CL temelji se na procesu prijenosa oslobođene energije na fluorofor. Taj proces omogućuje onim molekulama koje nisu u mogućnosti biti izravno uključene u reakcije CL da svoj višak energije prenesu na fluorofor koji se zauzvrat pobuđuje, vraćajući se u svoje osnovno stanje emisijom fotona. CL, zbog svojih svojstava, ima veliki broj praktičnih primjena u krutim, plinskim i tekućim fazama.[5]

Za kemijsku reakciju stvaranja svjetlosti treba ispuniti neke bitne uvjete:

I. Reakcija mora biti egzotermna da se proizvede dovoljno energije za stvaranje elektronski pobuđenog stanja. Entalpija je stvarni izvor energije za stvaranje elektronski pobuđenog stanja produkta. Za pokretanje kemijske reakcije apsorbira se energija aktivacije. Dostupna energija za stvaranje pobuđenog stanja mora biti jednaka razlici reakcijske energije i energije aktiviranja. Ako je ta razlika jednaka ili veća od energije potrebne za stvaranje pobuđenog stanja, odvijat će se proces CL. Ovo egzotermno stanje povezano je s redoks reakcijama u kojima sudjeluju kisik i vodikov peroksid ili slični potencijalni oksidansi.

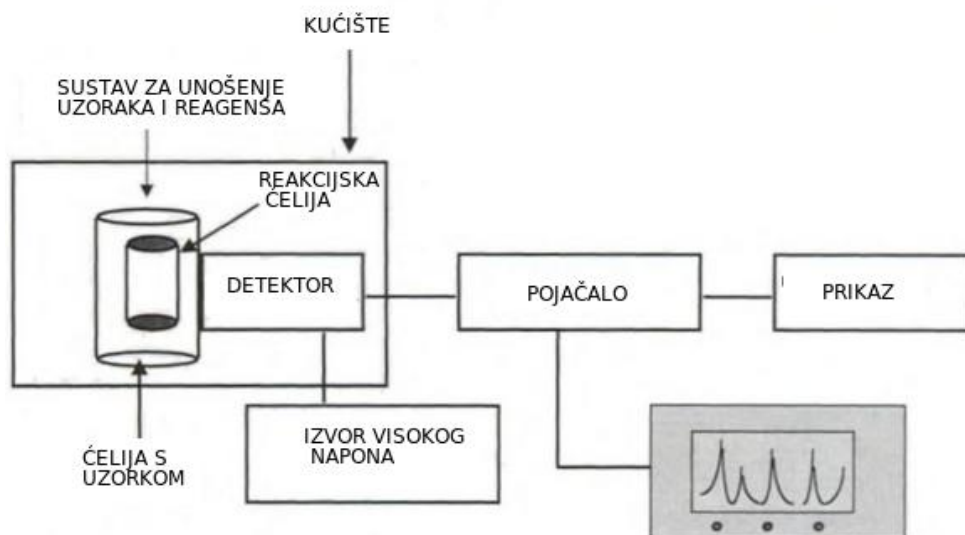
II. Reakcijski put mora biti povoljan za usmjeravanje energije za stvaranje elektronski pobuđenog stanja. U slučaju da se kemijska energija izgubi kao toplina, npr. vibracijskim i rotacijskim energijama, reakcija neće biti kemiluminescentna.

III. Emisija fotona mora omogućiti deaktivaciju pobuđenog produkta u odnosu na ostale konkurentne procese koji se mogu odvijati u manjoj mjeri. Intenzitet nastale emisije ovisi o učinkovitosti generiranja molekula u pobuđenom stanju, što je predstavljeno kvantnom učinkovitošću (kvantnim prinosom) i brzinom reakcije. Veće vrijednosti kvantnih prinosa obično su povezane s reakcijama BL dok se u većini reakcija CL koje se koriste u analitičke svrhe oni kreću od 0,001 do 0,1. Ultra slaba CL nastaje iz oksidativnih reakcija u živim organizmima, a odašiljani su signali uglavnom 10<sup>3</sup>-10<sup>6</sup> puta manje intenzivni od onih koji nastaju u svjetlećim organizmima. Glavna je karakteristika ultra slabe emisije CL da je nevidljiva golim okom.[5]

Intenzitet CL ovisi o mnogim faktorima, kao što su kemijska struktura molekula prekursora, priroda i koncentracija ostalih supstrata, katalizator, prisutnost metalnih iona, temperatura, pH i hidrofobnost reakcijske otopine.

Količina svjetlosti emitirana iz kemijskih ili biokemijskih reakcija proporcionalna je koncentraciji određene molekula koje u njima sudjeluju. Iz tog razloga, mjerenje svjetlosti je pokazatelj količine analita i osnovni instrument za takva mjerenja se naziva luminometar (Slika 4.). Jedna od najvažnijih prednosti CL kao analitičke tehnike je jednostavnost mjerenja pomoću luminometra koji kao glavne komponente sadrži: reakcijsku ćeliju, kućište, uređaj za unošenje i miješanje reagensa i / ili uzorka, detektor svjetlosti i sustav obrade signala.

Dodatna ogledala, leće i drugi uređaji mogu se koristiti za poboljšanje kuta sakupljanja i postizanje visoke optičke učinkovitosti, što je poželjno za optimalan signal. Funkcija kućišta je održavanje smjese uzoraka i CL reagensa na odgovarajućoj temperaturi i u potpunom mraku za izoliranje detektora od vanjske svjetlosti. Obično nije potreban monokromator za razdvajanje polikromatske svjetlosti jer je CL svjetlost monokromatska budući da proizlazi iz jednog spoja, a ostali spojevi rijetko utječu na spektralnu raspodjelu svjetlosti. [5]



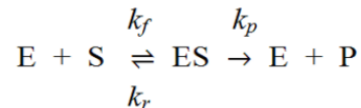
Slika 4. Jednostavni luminometar. [5]

### 2. 2. 1. Kemiluminofor

Gotovo svi trenutno poznati CL supstrati imaju peroksidnu vezu, -O-O-. Ovaj kemijski sustav olakšava glavni mehanizam kemiluminiscencije - osiguravanje puta za toplinski aktiviranu kemijsku reakciju osnovnog stanja za proizvodnju produkata u elektronski pobuđenom stanju. Osnove ovog postupka mogu se razumjeti promatranjem 1,2-dioksetana i dioksetanona. Dok se dvije molekule fragmentiraju kroz nešto drugačije reakcijske puteve, dijele isto podrijetlo CL, – degeneraciju 2p neveznih orbitala nakon pucanja peroksidne veze. Prije pucanja peroksidne veze dva elektrona su lokalizirana u  $\sigma$  vezi O-O i dva elektrona u svakoj od orbita atoma kisika. Kako peroksidna veza puca,  $\sigma$  i  $\sigma^*$  orbitale se degeneriraju i miješaju u dvije atomske 2p orbitale u ravnini. Međutim, geometrijske smetnje i anizotropni utjecaj okoline uzrokuju okupaciju drugih orbitala koje se energetske degeneriraju da bi bile što sličnije izvornim orbitalama.[6]

### 2. 3. Kinetika enzimske reakcije

Standardna shema kinetike enzimske reakcije je model zasićenja kemijskom ravnotežom, koji su 1912. prilagodili Michaelis i Menten. Smatra se da enzim (E) prvo veže supstrat (S) u bimolekularnoj reakciji te formira kompleks (ES). Kompleks (ES) se naziva kompleks Michaelis-Menten i reagira s produktom (P), a potom disocijacijom od E omogućuje enzimu da se "odvoji" i bude dostupan za drugi katalitički ciklus.



Bimolekularne reakcije obično slijede kinetiku drugog reda, što znači da brzina nestanka reaktanata ili pojava produkta ES u kinetičkom modelu Michaelis-Menten ovdje ovisi o produktu dviju koncentracija, izraženom diferencijalnom jednačbom:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_f[E] \cdot [S]$$

gdje je  $k_f$  konstanta brzine drugog reda,  $\frac{d[ES]}{dt}$  diferencijal promjene koncentracije ES po vremenu,  $[E]$  koncentracija enzima i  $[S]$  koncentracija supstrata.

Brzina monomolekularne reakcije ovisi samo o jednoj koncentraciji i slijedi kinetiku prvog reda:

$$\frac{d[ES]}{dt} = -k_p \cdot [ES],$$

gdje je  $k_p$  konstanta brzine formiranja produkta.

Pri određivanju ukupne brzine reakcije pretpostavlja se da je reakcija disocijacije najsporiji stupanj koji stoga ograničava brzinu. Zbog uvjeta stacionarnog stanja pretpostavljeno je da je koncentracija kompleksa ES približno konstantna:

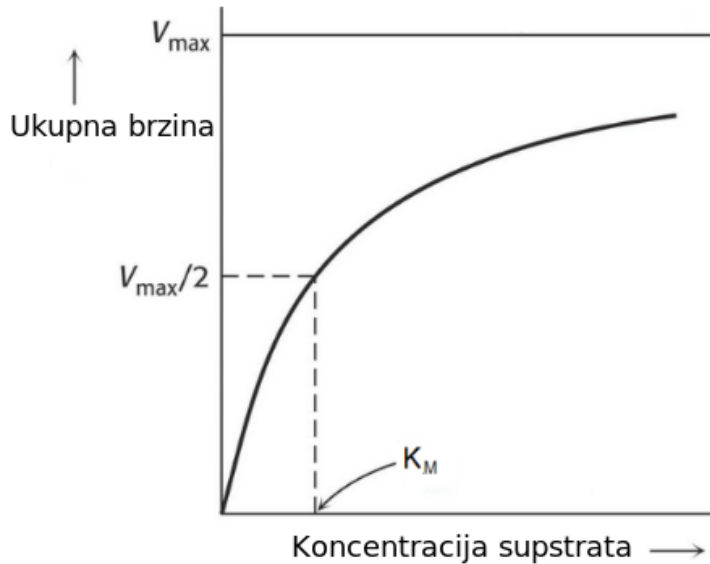
$$k_f[E] \cdot [S] = k_r[ES] + k_p[ES],$$

gdje je  $k_f$  konstanta brzine formiranja kompleksa ES, a  $k_r$  konstanta raspadanja kompleksa ES na E i S.

Jednačba Michaelis-Menten kinetike u sebi sadrži koncentraciju supstrata i dva karakteristična parametra, maksimalnu brzinu reakcije,  $V_{max}$  i Michaelisovu konstantu,  $K_m$ :

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{(K_M + S)}$$

Maksimalna brzina reakcije je umnožak katalitičke konstante enzima ( $k_p$ ) i njegove koncentracije, iz čega proizlazi da se na maksimalnu brzinu reakcije može utjecati promjenom koncentracije enzima.



Slika 5. Grafički prikaz koncentracijske ovisnosti ukupne brzine Michaelis-Menten kinetike[8]

Michaelisova konstanta ( $K_M$ ) predstavlja omjer kinetičkih konstanti, a ako je jako velika, to znači da enzim nema dobar afinitet prema supstratu.[8]

Na Slici 5. je vidljivo da se krivulja može podijeliti u tri dijela: područje kinetike prvog reda kod niskih koncentracija supstrata, područje kinetike nultog reda kod visokih koncentracija supstrata te Michaelis-Menteničino područje između toga. Također se može vidjeti da Michaelisova konstanta ( $K_M$ ) predstavlja koncentraciju supstrata kod koje je brzina reakcije jednaka polovini maksimalne.



## 2. 4. Kvantni prinos

Kvantni prinos (kvantna učinkovitost) je omjer molova svjetlosti, tj. Einsteina (fizikalna jedinica mjere kvantnog prinosa), prema reaktantima ili produktima uključenim u kemijsku reakciju.

Mjerenje kvantnog prinosa od temeljne je važnosti za razumijevanje mehanizma kemijske reakcije koja uključuje apsorpciju ili emisiju svjetlosti. Važnost ovog mjerenja izravna je posljedica dvaju "zakona fotokemije", prvi - „Grotthus-Draper zakon“ govori da je samo svjetlost apsorbirana u kemijskom sustavu učinkovita za pojavu fotokemijske reakcije. Drugi - "Stark-Einsteinov zakon" ili "Zakon fotokemijske ekvivalencije", govori da se za svaki apsorbirani foton aktivira samo jedna molekula u kemijskoj reakciji. To znači da foton koji sudjeluje u reakciji sa svjetlosti, bilo u emisiji, bilo u apsorpciji, je ekvivalentan molekulama u slijedu kemijskih koraka, i zbog toga se mora uzeti u obzir u ukupnoj stehiometriji, baš kao što se moraju i reaktanti i produkti. Ta se ekvivalentnost mjeri kvantnim prinosom,

Za čistu fotokemijsku reakciju fotokemijski kvantni prinos ( $\Phi_P$ ) je:



$$\Phi_P = \frac{\text{molovi potrošenog A ili proizvedenog C}}{\text{apsorbirani einsteini}} = \frac{\text{molekule A ili C}}{\text{apsorbirani fotoni}}$$

Jedan einstein je definiran kao mol fotona, odnosno  $6,6 \times 10^{23}$  hv.

Ako je  $\Phi_P = 1,0$ , to znači da se za svaki mol A, potrošen apsorpcijom jednog einsteina, stvori jedan mol produkta C. Kvantni prinos manji od jedan ukazuje na mogućnost dobivanja drugih produkata zbog visoko energiziranog stanja A, odnosno zbog velike reaktivnosti. Neke fotokemijske reakcije imaju kvantne prinose veće od jedan, što se interpretira kao rezultat pobude nastale radikalnim lančanim reakcijama. Kvantni prinos CL ( $\Phi_C$ ) ili BL ( $\Phi_B$ ) definiran je obrnuto od onog za fotokemijsku reakciju u kojoj se apsorbiraju fotoni.

Ukupna svjetlost tada je jedan produkt reakcije, a poznavanje kvantnog prinosa opet je neophodno za uspostavljanje stehiometrije.

$$\Phi_C = \frac{\text{ukupno emitiranih einsteina}}{\text{potrošeni molovi A ili proizvedeni molovi C}} = \frac{\text{emitirani fotoni}}{\text{molekule A ili C}} = \Phi_Y \cdot \Phi_E \cdot \Phi_F < 1$$

Ukupni kvantni prinos CL smatra se rezultatom kemijskog prinosa, prinosa pobude i prinosa fluorescencije. Da bi se stvorila vidljiva svjetlost, reakcija mora osloboditi energiju od 75 kcal/mol ili više, i pohraniti je u produkt koji nastaje u istom koraku, da bi se stvorilo njegovo pobuđeno stanje. Za tako visokoenergetsku reakciju vjerojatno je da će kemijski prinos ( $\Phi_Y$ )

biti manji od 1 uslijed ostalih reakcija visoko energiziranog produkta C\*. Smatra se da prinos pobude ( $\Phi_E$ ), udio produkta u pobuđenom stanju, također neće biti jedan.

Nekoliko molekula ima prinos fluorescencije ( $\Phi_F$ ) koja se približava jedinici, jer se neradijacijski procesi uglavnom natječu s fluorescentnom emisijom. Kvantni prinos za svjetlosni put u CL( $\Phi_C$ ) ili BL ( $\Phi_B$ ), stoga, kao rezultat ova tri prinosa, mora biti manji od jedan. Neke reakcije BL imaju kvantni prinos i do 0,6, nekoliko kemiluminescentnih reakcija ima iznad 0,25, ali većina je ispod 0,01.

Da bi se mjerila kemijska ekvivalentnost einsteina, mora postojati način mjerenja fotona u "apsolutnim jedinicama". Referentni foton definiran je emisijom zračenja iz "savršenog crnog tijela". Uobičajeno je opažanje da grijani predmet isijava energiju, emitirajući i toplinu i svjetlost vidljivu oku. Već u 19. stoljeću spektroskopskim metodama utvrđeno je da je spektralna raspodjela svjetlosti porijeklom iz tako vrućih predmeta široka s maksimumom ovisnim o temperaturi.[8]

Elektromagnetsku valnu prirodu svjetlosti utvrdio je Maxwell 1860-ih. Do oko 1900. Maxwell-ove jednadžbe bile su osnova mnogih izvedenica za spektralnu raspodjelu crnih tijela, uglavnom računajući položaj maksimuma i raspodjelu energije na većim valnim duljinama.

Planck je 1901. godine postavio kvantnu teoriju u kojoj govori da užareno tijelo ne može emitirati ili apsorbirati energiju zračenja određene valne duljine u bilo kako malim količinama, već da može emitirati ili apsorbirati samo pakete (kvante) energije. Kvant energije dat je Planckovom jednadžbom:

$E = h\nu$ , gdje je E-energija, h-Planckova konstanta ( $6,626 \cdot 10^{-34} \text{m}^2 \text{kgs}^{-1}$ ), a  $\nu$ -frekvencija elektromagnetskog vala.

Kvantni prinosi CL određuju se u apsolutnim jedinicama pomoću fotonskog detektora s kalibracijom koja se može izravno pratiti prema standardu crnog tijela. [8]

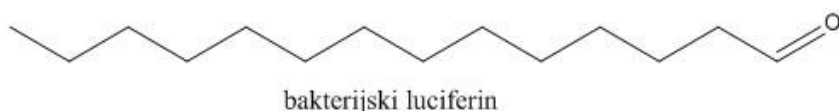
### 3. PREGLEDNI DIO

#### 3. 1. Bioluminiscentni sustavi

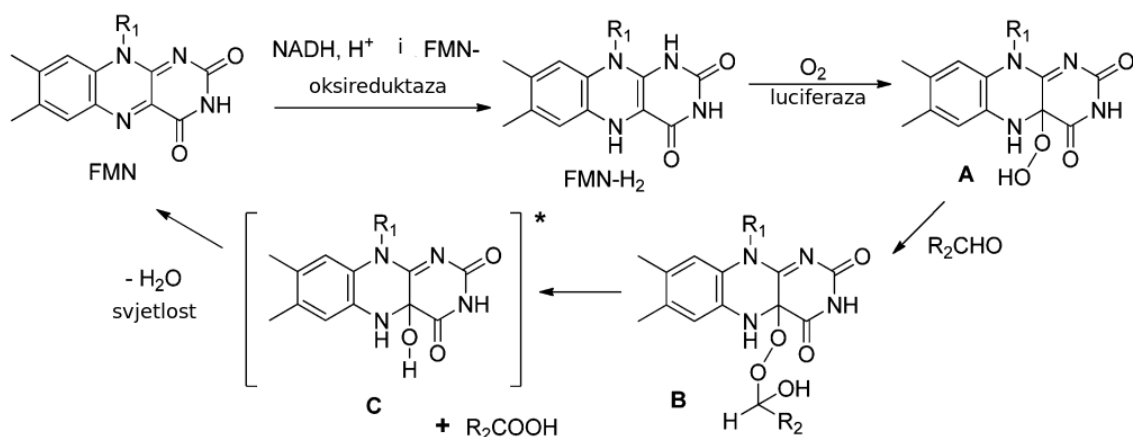
U posljednje vrijeme istražuju se mnogi kemijski različiti luciferini i luciferaze izolirani iz sasvim različitih svjetlosnih organizama. Potrebno je spomenuti najčešće BL sustave i strukture luciferina čija je primjena pronađena je u širokom rasponu analitičkih testova.

##### 3. 1. 1. Bioluminiscentni sustav bakterija

Enzimi koji su uključeni u BL sustav, luciferaze, kao i odgovarajući geni koji ih kodiraju, najčešće su proučavani iz bakterija roda *Vibrio*, *Photobacterium* i *Photorhabdus*. Bakterijska luciferaza je heterodimerna proteinska molekula, molekulske mase oko 80 000 Da, na čijoj se  $\alpha$ -podjedinici nalazi aktivni centar na koji se veže reducirana molekula flavina. [4] Redukcijom flavin mononukleotida (FMN) specifičnom reduktazom stvara se FMN-H<sub>2</sub>, koji se veže na luciferazu i brzo oksidira u hidroperoksid (A). Hidroperoksid zatim reagira s aldehidom (luciferin, Slika 6.), čime nastaje peroksihemiacetal (B). Ovaj intermedijer podliježe preuređivanju, što rezultira odgovarajućom kiselinom i spojem C u pobuđenom stanju. Nakon emisije plavo-zelene svjetlosti s maksimumom na 490 nm i uklanjanja vode, FMN se obnavlja (Slika 7.). [9]



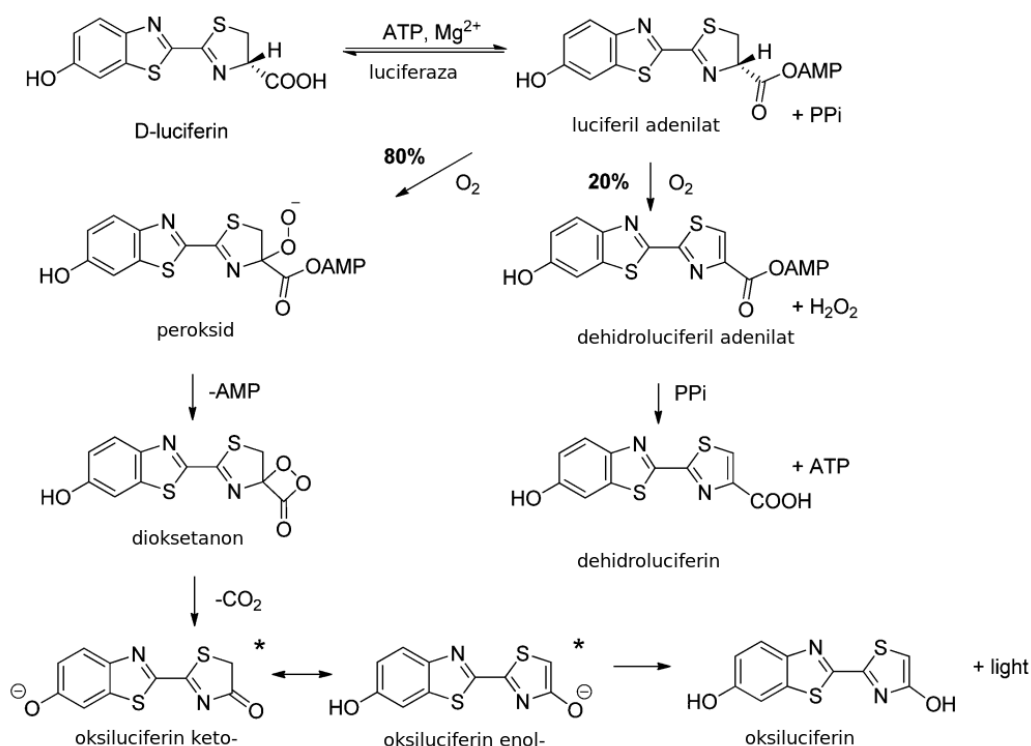
Slika 6. Bakterijski luciferin.



Slika 7. Mehanizam BL sustava bakterija. [9]

### 3. 1. 2. Bioluminiscentni sustav insekata (krijesnice)

Kemija reakcije i strukture supstrata su identične za sve luciferaze insekata. Glavna razlika je u boji BL: Krijesnice (porodica *Lampyridae*) emitiraju svjetlost u žuto-zelenom rasponu spektra (540—580 nm), klišnjaci emitiraju u širokom rasponu od zelene do narančaste (534-593 nm), a ličinke nekih insekata emitiraju svjetlost u rasponu od zelene do crvene (536-638 nm). Taj se fenomen objašnjava manjim razlikama u sekvencama aminokiselina koje uzrokuju različita mikro-okruženja za pobuđenu molekulu oksiluciferina. BL reakcija kod krijesnica vrlo je učinkovit enzimski sustav gdje luciferaza katalizira oksidaciju specifičnog supstrata luciferina krijesnice [(S)-4,5-dihidro-2-(6-hidroksi-1,3-benzotiazol-2-il)thiazol-4-karboksilna kiselina] kisikom iz zraka u prisutnosti magnezijeve soli adenzin-5'-trifosfata (MgATP).[4]



Slika 8. Mehanizam BL sustava krijesnica. [9]

Oba supstrata, D-luciferin i ATP tvore ternarni kompleks s luciferazom, luciferil adenilat. Oko 80% luciferil adenilata nastalog reakcijom ATP-a i metala s D-luciferinom oksidira se kisikom iz zraka u peroksid.

Otpuštanjem AMP-a dolazi do stvaranja cikličkog peroksida, dioksetanona čijom dekarboksilacijom dolazi do formiranja oksiluciferina [2-(6'-hidroksibenzotiazolil)-4-hidroksitiazol] u elektronski pobuđenom stanju. Mogući su različiti tautomerni oblici oksiluciferina u pobuđenom stanju, keto-ili enol-, ali oba emitiraju svjetlost.

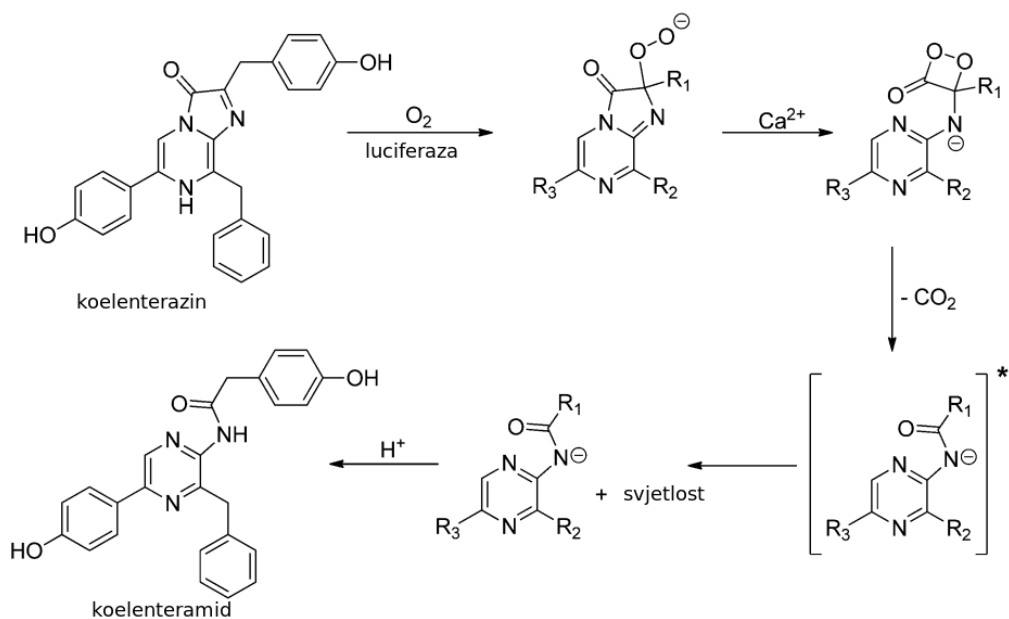
Deaktivaciju prati emisija svjetlosti (Slika 8.). Luciferaza krijesnice ima specifičnost prema svojim supstratima (luciferin i ATP), pri čemu čak i manje promjene u strukturi oba supstrata rezultiraju izostankom BL.[9]

Reakcija D-luciferin-luciferaza klasično se primjenjuje za određivanje koncentracije ATP-a kao univerzalnog izvora energije u stanicama. Budući da je potreban za različite enzimske procese, u funkcionalnim stanicama se održava visoka razina ATP-a. Dizajnirani su različiti testovi temeljeni na reakciji D-luciferin-luciferaza za određivanje vijabilnosti stanica. Njima se određuje koncentracije ATP-a unutar stanica, što ukazuje na staničnu proliferaciju ili odumiranje. U medicini se takvi testovi mogu koristiti za ispitivanje proliferacije tumorskih stanica i učinkovitosti citostatskih lijekova. Primjerice, ATP-TCA test (engl. ATP-based tumor chemosensitivity assay) za mjerenje razine ATP-a u tumorskim stanicama razvijen je 1990-ih. Ova metoda omogućuje ocjenjivanje učinaka različitih lijekova i njihovih kombinacija u tumorskim stanicama nakon biopsije tumora, a koristi se za odabir optimalnih lijekova za kemoterapiju u liječenju karcinoma jajnika, maternice, dojke, kao i melanoma i hepatoma. [9]

### 3. 1. 3. Koelenterazinski bioluminescentni sustav

Postoje dvije vrste koelenterazinskih sustava koji su sveprisutni u morskim organizmima: **luciferin (koelenterazin, CTZ)-luciferaza sustavi** iz razreda koralja vrste *Renilla reniformas* (morska maćuhica) i škampi iz reda Decapoda *Styellaspis debilis*, te **sustav fotoproteina** poput aequorina (izoliran iz morske vrste *Aequorea victoria*), obelina (iz vrste *Obelia longissima*) i klitina, u kojima je molekula luciferina koelenterazina kovalentno vezana na fotoprotein. Fotoproteini mogu emitirati svjetlost neovisno o kemijskoj ili enzimskoj reakciji. Prije emisije svjetlosti CTZ vezan na *Aequorea* luciferazu reagira s kisikom vezanim na 2-C ugljikov atom te tvori stabilan peroksid. Nastali kompleks aequirin (fotoprotein), emitira svjetlost u prisutnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iona (Slika 9.). *Renilla* luciferaza emitira plavu svjetlost s maksimumom na 480 nm. Međutim, ispitivanjem BL spektra *in vivo* otkrivena je emisija zelene svjetlosti s maksimumom na 509 nm. Ovaj se spektralni pomak događa zbog prisutnosti zelenog fluorescentnog proteina (engl. green fluorescent protein, GFP).

GFP tvori kompleks s luciferazom, a koristeći mehanizam prijenosa rezonantne energije, prenosi energiju pobuđenog stanja iz luciferina na GFP fluorofor, koji zauzvrat emitira zelenu svjetlost.[4]



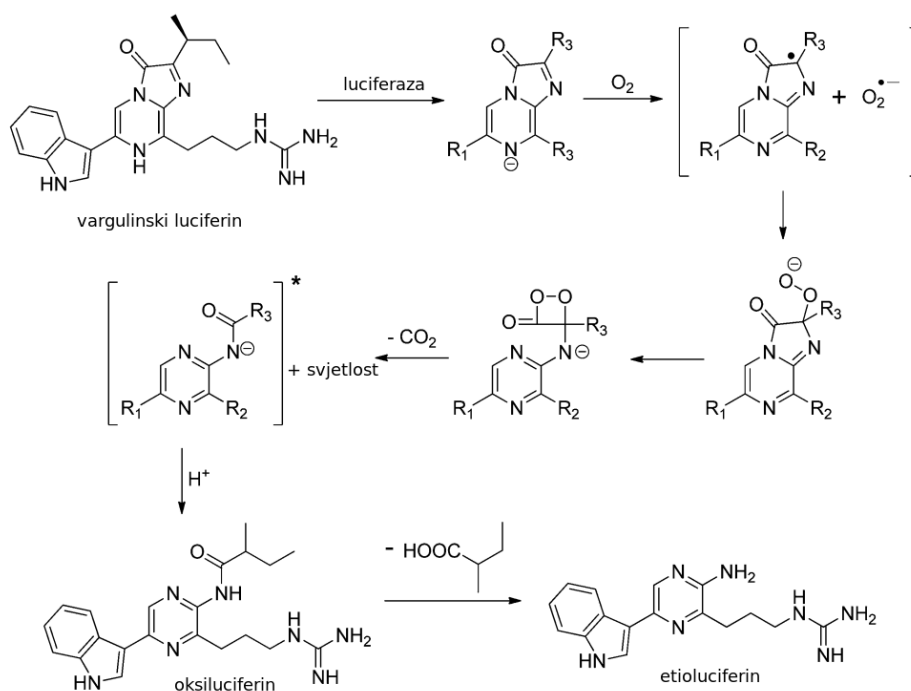
Slika 9. Mehanizam koelenterazinskog BL sustava. [9]

Reakcija s CTZ-om slijedi klasičnu shemu: molekula luciferina oksidira se kisikom s luciferazom kao katalizatorom, formirajući oksiluciferin (koelenteramid) kao produkt. Za razliku od reakcije s D-luciferinom, BL reakcija oksidacije koelenterazina neovisna je o ATP-u i ostalim kofaktorima. Godine 2012. razvijena je umjetnu luciferaza NanoLuc™, koristeći sintetički analog CTZ-a, furimazin, kao luciferin.

Iz koelenterazinskih BL sustava izoliran je i sekvencioniran niz prirodnih luciferaza. *Renilla* luciferaza bila je među prvima koja je klonirana. Ovaj se sustav široko primjenjuje u ispitivanju novih antitumorskih i antivusnih lijekova. [9]

### 3. 1. 4. Vargulinski bioluminiscentni sustav

Bioluminescentni sustav iz morskog ljuskara vrste *Cypridina (Vargula) hilgendorffii* sličan je koelenterazinu i krijesnicama. Struktura vargulinskog (cypridina) luciferina slična je onoj koelenterazina te je mehanizam reakcije sličan mehanizmu koju katalizira luciferaze krijesnice. Reakcija uključuje stvaranje prstena peroksida nakon čega slijedi oksidativna dekarboksilacija, a zatim formiranje pobuđenih oksiluciferina uz emisiju plave svjetlosti s maksimumom na 460 nm (Slika 10.). Kinetika gašenja bioluminiscencije kroz vrijeme puno je sporija nego kod ostalih luciferaza izoliranih iz morskih organizama, zbog čega se koristi u ispitivanjima gdje je potrebno promatranje stanica kroz duže vrijeme. [4]



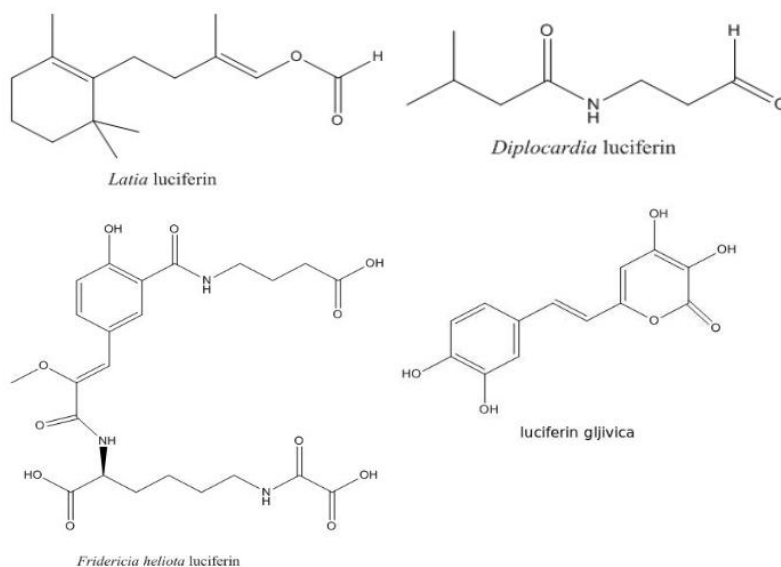
Slika 10. Mehanizam vargulinskog BL sustava. [9]

### 3. 1. 5. Bioluminiscentni sustav svjetlećih bičaša

Uzburkavanje morske vode u kojoj se nalaze svjetleći bičaši uzrokuje emisiju svjetlosti. Luciferin se skladišti vezan za protein, nazvan luciferin vezujući protein (engl. luciferin binding protein, LBP) u citoplazmi stanica svjetlećih bičaša. Mehanički podražaji dovode do pada pH u citoplazmi. Nakon pada pH, luciferin se odvajaju od LBP i povezuje se s enzimom, luciferazom. Luciferaza katalizira oksidaciju luciferina pri čemu dolazi do stvaranja pobuđenog stanja, nakon čega slijedi otpuštanje energije emisijom plavo-zelene svjetlosti s maksimumom na 472 nm. BL sustav svjetlećih bičaša je jedini BL sustav kojeg potiče promjena pH.[4]

### 3. 1. 6. Ostali bioluminiscentni sustavi

Četiri manje poznata i primjenjiva BL sustava su oni iz vrsta *Latia*, *Diplocardia longa*, *Fridericia heliota* i BL sustav gljivica, s poznatim strukturama luciferina (Slika 11.).



Slika 11. Strukture luciferina ostalih BL sustava.

*Latia* luciferin je oblik terpen aldehida koji tijekom oksidacije s *Latia* luciferin monooksigenazom emitira žuto-zelenu svjetlost s maksimumom na 536 nm. U reakciji uz kisik sudjeluje i kofaktor flavoprotein. Nije poznato što je izvor svjetlosti u *Latia* BL sustavima.

*Diplocardia longa* luciferin je N-izovaleril-3-aminopropanal koji uz reakciju s vodikovim peroksidom emitira zelenu svjetlost s maksimumom na 500 nm. Struktura peroksidazi-slične luciferaze nije poznata, ali poznato je da u sebi sadrži  $\text{Cu}^{2+}$  ione .

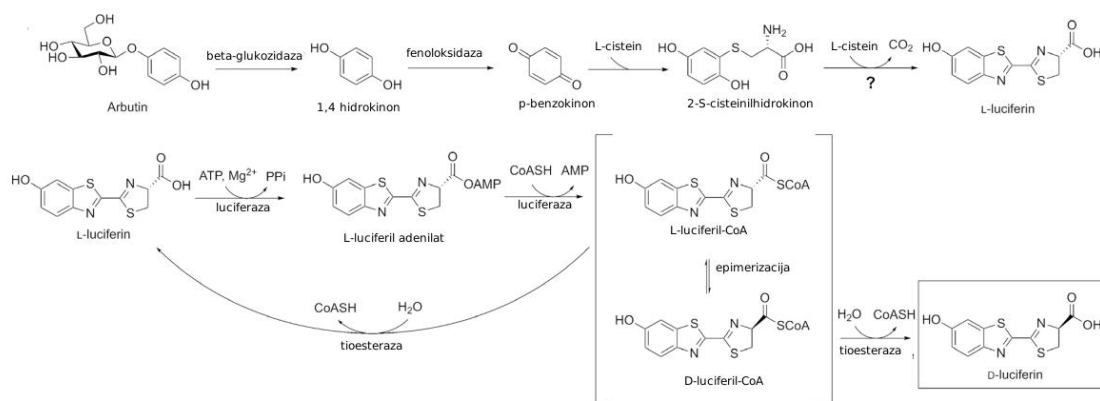
*Fridericia heliota* luciferin je netoksičan i stabilan peptid koji u svojoj strukturi sadrži  $\gamma$ -aminomaslačnu kiselinu, modificirani ostatak tirozina, lizin i ostatak oksalne kiseline. Maksimum emitirane svjetlosti je na 478 nm. Slično kao kod luciferina krijesnice, *Fridericia heliota* također koristi ATP u BL reakciji.

Maksimum emitirane svjetlosti BL gljivica je na 530 nm. Reakcija BL gljivica se odvija u dva koraka, prvi je konverzija prekursora (hispidina) u luciferin (3-hidroksihispidin) uz pomoć topljivog enzima i NAD(P)H, a drugi korak je sama BL reakcija. Luciferaza BL sustava gljivica još nije klonirana. [9]



### 3.2. Biosinteza D-luciferina

Sinteza D-luciferina u laboratoriju obično koristi reakciju kondenzacije 2-cijano-6-hidroksibenzotiazola s D-cisteinom u posljednjem koraku (Slika 12).



Slika 12. Mehanizam biosinteze D-luciferina. [10]

*De novo* biosintetički put sinteze D-luciferina uključuje uklanjanje šećera iz arbutina, pri čemu nastaje 1,4-hidrokinon. 1,4-hidrokinon se oksidira u para-benzokinon te se dodatkom L-cisteina i dekarboksilacijom dobije L-luciferin. Jednom formiran, L-luciferin mora epimerizirati kako bi došlo do inverzije C4 kiralnog centra u D izomer. Da bi se to postiglo, L-izomer luciferina se mora esterificirati pomoću luciferaze iz krijesnica (Fluc) te nastaje L-luciferil-CoA koji može epimerizirati u D-izomer te se tioesterazom konvertirati u D-luciferin. L-luciferin se može sintetizirati *in vivo* u neutralnom puferu, pri atmosferskom tlaku i sobnoj temperaturi uz posredovanje enzima. [10]

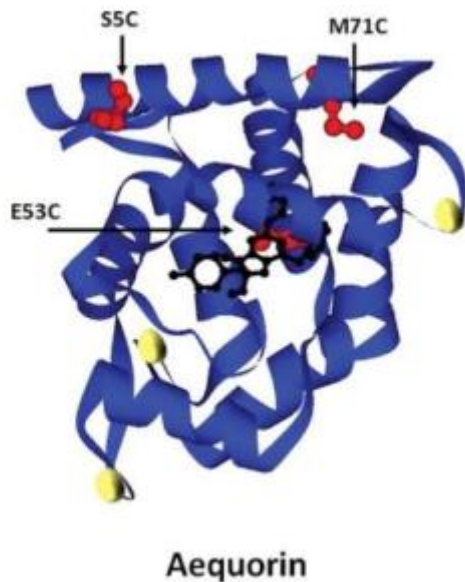
### 3. 3. Fotoproteini

Godine 1961. pronađen je neobičan BL protein u meduzi roda *Aequorea* i nazvan je "aequorin" (Slika 13.). Protein je imao mogućnost emitiranja svjetlosti u reakciji s luciferinom u vodenim otopinama samo dodavanjem traga Ca<sup>2+</sup>. Svjetlost je posljedica intramolekularne reakcije koja se odvija unutar molekule proteina, a ukupna emitirana svjetlost proporcionalna je količini fotoproteina, zbog čega je kratkog trajanja (bljesak). Godine 1966. pronađen je još jedan neobičan BL protein u morskom crvu iz porodice *Chaetopterus*.

Ovaj protein emitira svjetlost u reakciji s luciferinom kada su dodani peroksid i trag  $\text{Fe}^{2+}$  u prisutnosti kisika. Ukupna emitirana svjetlost je opet proporcionalna količini proteina.

"Fotoprotein" je zajednički naziv za BL proteine koji se pojavljuju u svjetlosnim organizmima svjetlosnih organizama kao glavne luminescentne komponente koji imaju funkciju enzima i sposobni su emitirati svjetlost proporcionalnu količini proteina. [3]

Proporcionalnost emisije svjetla jasno razlikuje fotoprotein i luciferazu. U luciferin-luciferaza reakcijama luminiscencije ukupna količina emitirane svjetlosti proporcionalna je količini luciferina, ali ne i količini luciferaze. Fotoprotein bi mogao predstavljati izuzetno stabilan oblik enzim-supstrat kompleksa, stabilniji od disociranih oblika enzima i supstrata. Zbog svoje visoke stabilnosti, fotoprotein se, umjesto disociranog oblika, pojavljuje kao primarna komponenta koja emitira svjetlost u svjetlosnim organizmima. [3]



Slika 13. Struktura fotoproteina aequorina. [11]

### 3. 3. 1. Osnovna strategija ekstrakcije i pročišćavanja fotoproteina

Pri izoliranju aktivnih fotoproteina, izuzetno je važno obratiti posebnu pozornost kako bi se spriječio gubitak luminiscencijske aktivnosti. Osnovni princip je ekstrahiranje fotoproteina u vodenoj otopini i pročišćavanje fotoproteina raznim načinima, a sve pod uvjetima koji sprečavaju luminiscenciju i denaturaciju proteinskih molekula. Prema tome, sustav luminiscencije mora se reverzibilno inhibirati tijekom ekstrakcije i pročišćavanja fotoproteina. Metoda reverzibilne inhibicije razlikuje se ovisno o prirodi i uvjetima kofaktora sustava koji treba izolirati. Na primjer, kelator kalcija EDTA ili EGTA koristi se za inhibiranje luminiscencije na  $\text{Ca}^{2+}$  osjetljivih fotoproteina kao što su aequorin, obelin i mnemiopsin.

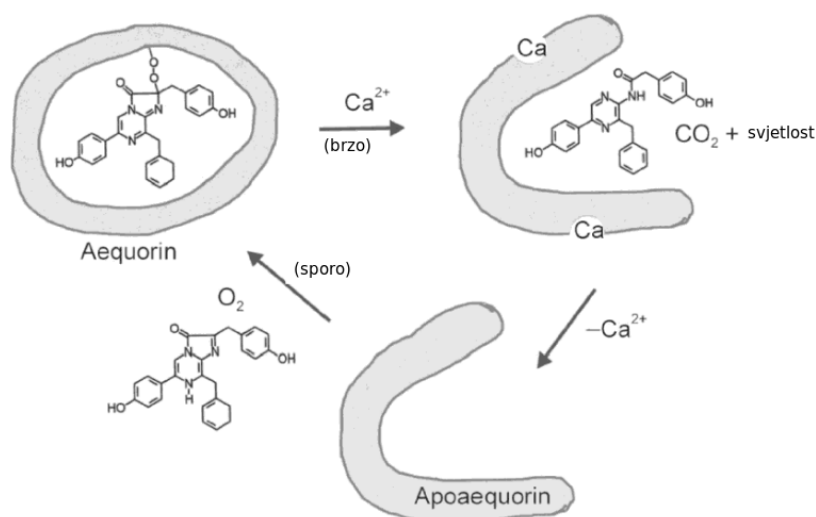
U slučaju luminiscencijskih sustava iz *Chaetopterus* i *Pholas*, upotrijebljeni su inhibitori metalnih iona 8-hidroksikinolin, odnosno dietilditiokarbamat.

Ionska snaga i pH pufera su također važni, pa bi ove uvjete trebalo ciljano odabrati i prilagoditi kako bi se optimizirao prinos aktivnog fotoproteina. Primjerice, upotreba kiselih pufera (pH 5,6-5,8) učinkovita je u suzbijanju spontane luminiscencije tijekom ekstrakcije fotoproteina iz rakova. [3]

### 3. 3. 2. Svojstva reakcije katalizirane aequorinom

Aequorin je konjugirani protein koji ima relativnu molekulsku masu od oko 20 000-21 000, a sadrži funkcionalni kromofor koji odgovara otprilike 2% ukupne molekulske težine. Koncentrirana otopina aequorina je žućkasta zbog njegovog maksimuma apsorpcije na oko 460 nm. Prirodni aequorin je spoj više od deset izoformnih sastojaka, označenih s A, B, C, itd.

Aequorinu su potrebni organski imidopirazinski supstrat, CTZ i prisustvo  $\text{Ca}^{2+}$  za emisiju svjetlosti. CTZ se veže unutar hidrofobnog džepa u strukturi proteina, dok se  $\text{Ca}^{2+}$  veže na tri očuvane E/F regije aequorina (Slika 14.). To vezanje uzrokuje konformacijsku promjenu proteina, što dovodi to toga da CTZ u prisustvu molekularnog kisika prođe kroz pobuđeno stanje iz kojeg se otpušta i stvara koelenteramid te emitira BL na 460-470 nm. Taj prvi korak reakcije je brz, dok je sljedeći korak oslobađanja oksiluciferina spori korak regeneracije fotoproteina koji omogućuje novu reakciju. [12]

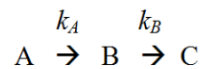


Slika 14. Mehanizam luminiscencije i regeneracije aequorina. [3]

## 4. REZULTATI

### 4. 1. Kinetika bioluminiscentnih reakcija

Za kemijsku kinetiku je poznato da matematička analiza kinetičkog modela s malim povećanjem broja koraka brzo postaje složena. Stoga se za analizu kinetike BL reakcija očekuje da bude složena pa se prvo prati jednostavni „ABC” model od tri nepovratna koraka u uzastopnoj reakciji:



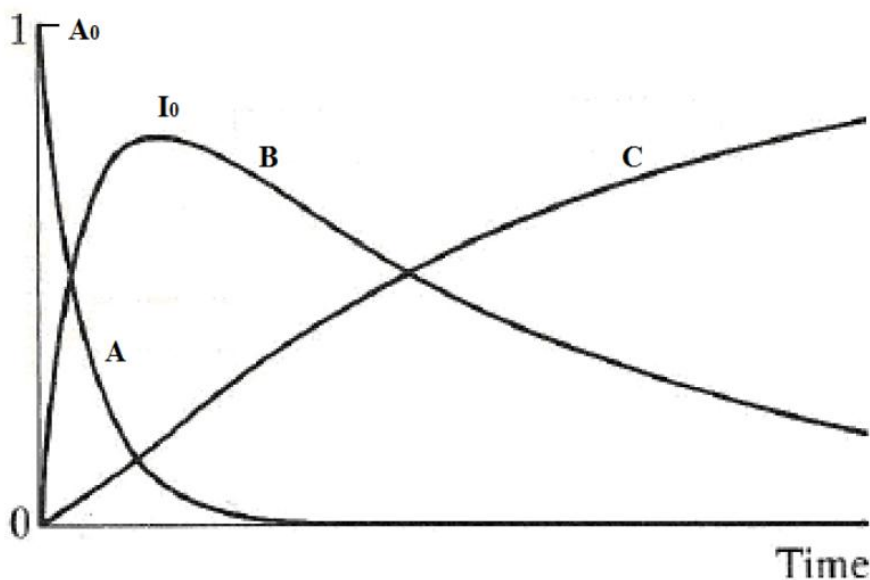
gdje su A, B i C parametri „ABC” modela, a  $k_A$  i  $k_B$  konstante brzine.

Pretpostavljajući da je svaki korak reakcija prvog reda s početnim koncentracijama B i C nula i početnom  $A = A_0$ , koncentracija reakcijskih komponenata u vremenu dobiva se rješavanjem diferencijalnih jednadžbi, uz uvjet da se u bilo kojem trenutku zbroje kao:  $A_0 = A + B + C$ :

$$\frac{-d[A]}{dt} = k_A \cdot [A] \text{ iz čega se integracijom dobije } [A] = [A_0]e^{-k_A t}$$

$$\frac{d[B]}{dt} = k_A \cdot [A] - k_B \cdot [B] \text{ iz čega se integracijom dobije } [B] = k_A [A_0] \frac{e^{-k_A t} - e^{-k_B t}}{k_B - k_A}$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_B \cdot [B] \text{ iz čega se integracijom dobije } [C] = k_A [A_0] \frac{e^{-k_A t} - e^{-k_B t}}{k_B - k_A}$$



Slika 15. Grafički prikaz vremenske ovisnosti koncentracija ABC modela. [8]

Koncentracija komponente B raste do maksimuma, a zatim eksponencijalno pada na C, koja raste istom brzinom u jedinici vremena (Slika 15.). U reakciji BL neposredni produkt iz B je pobuđeno stanje označeno kao C\*, ali ono je samo prolazno jer se emisija svjetla pri prelasku u osnovno stanje C odvija brzinom većom od  $10^9 \text{ s}^{-1}$ , mnogo brže od prethodnih kemijskih koraka. U vremenu kad je B maksimalan postiže se početni intenzitet BL,  $I_0$ , koncentracije se ne mijenjaju i to se naziva „ustaljeno stanje“. To znači da je u tom trenutku diferencijal B jednak nuli:

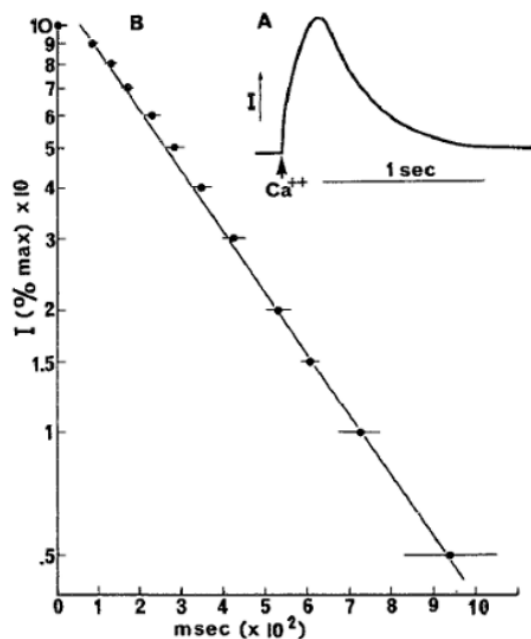
$$\frac{d[B]}{dt} = -k_A \cdot [A_0] \frac{(k_A e^{-k_A t} - k_B e^{-k_B t})}{k_B - k_A} = 0$$

Rješavanjem jednadžbe za vrijeme  $t = t_M$  u stanju mirovanja, dobije se  $I_0$ :  $t_M = \frac{\ln \frac{k_A}{k_B}}{k_A - k_B}$ .

Istraživanja kinetike BL započela su tek pedesetih godina prošlog stoljeća na bakterijskim luminescentnim sustavima i BL sustavima krijesnica. [8]

#### 4. 1. 1. Kinetika reakcija fotoproteina

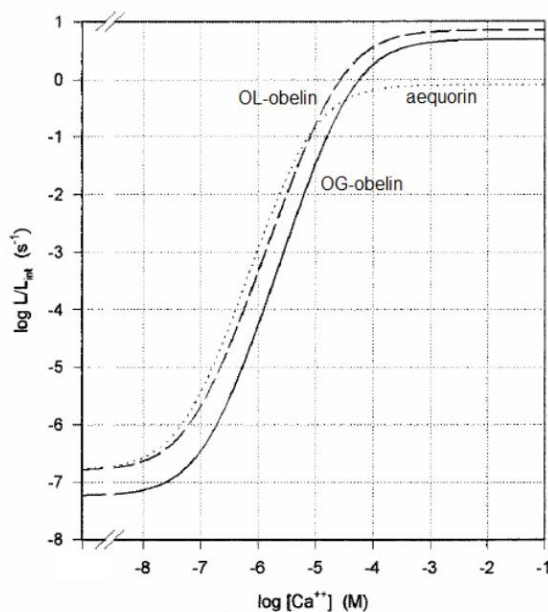
Dobar primjer „ABC” modela su fotoproteini regulirani koncentracijom  $\text{Ca}^{2+}$  te se taj model može nazivati ABC\* model budući da su u njega uključene samo dvije komponente stvaranja BL:  $\text{Ca}^{2+} + \text{fotoprotein} \rightarrow \text{hv}$



Slika 16. A. Grafički prikaz vremenske ovisnosti intenziteta BL fotoproteina obelina. B. Polulogaritamski prikaz vremenske ovisnosti pada intenziteta BL. [13]

Prikazani polulogaritamski dijagram (Slika 16.) je BL reakcija fotoproteina obelina uz niske koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  pri čemu nastaje „bljesak“ emitiranog svjetla. Maksimum svjetlosti se događa za manje od 0,2 s, a raspada se (nestaje) usko eksponencijalno, što je prikazano ravnom linijom na polulogaritamskoj skali. Intenzitet svjetlosti na maksimumu je označen s  $I_0$ . Ovo je standardni postupak za brzu analizu BL miješanjem reakcijskih komponenata, bilježenjem početnog intenziteta svjetlosti  $I_0$  i izjednačavanjem s koncentracijom ograničavajuće komponente. Eksponencijalna stvarna brzina porasta BL obelina primjenom postupka sa zaustavljenim protokom iznosi oko  $400 \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 1,7 \text{ ms}$ ), a za aequorin je nešto sporija,  $115 \text{ s}^{-1}$ . Te se stope razlikuju među vrstama fotoproteina, ali zajednička je neovisnost o koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$  i za stope porasta i smanjenja BL.

BL je izuzetno osjetljiv način za detekciju komponenti reakcija. Nakon otkrića aequorina i da njegovu BL u osnovi pokreće  $\text{Ca}^{2+}$ , smatralo se da bi aequorin mogao biti koristan za mjerenje niskih koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$ , kakve su prisutne u biološkim sustavima. Za ovu primjenu, reakcija aktivacije aequorina ili drugih fotoproteina s  $\text{Ca}^{2+}$  mora biti kalibrirana u ovisnosti  $I_0$  o koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$ . Vrijednost  $B_{\text{max}}$  ili  $I_0$  odražava količinu početne komponente  $A_0$ , odnosno u slučaju BL fotoproteina, dodanu koncentraciju  $\text{Ca}^{2+}$ . Osjetljivost na koncentraciju dodanih  $\text{Ca}^{2+}$  razlikuje se ovisno o fotoproteinu, OL-obelin je najosjetljiviji i ima najveću širinu linearnosti ili dinamičkog raspona (Slika 17.). Nagib je u svakom slučaju približno 2,5, što znači da je za pokretanje reakcije potrebno više od 2 vezana  $\text{Ca}^{2+}$  iona. [8]

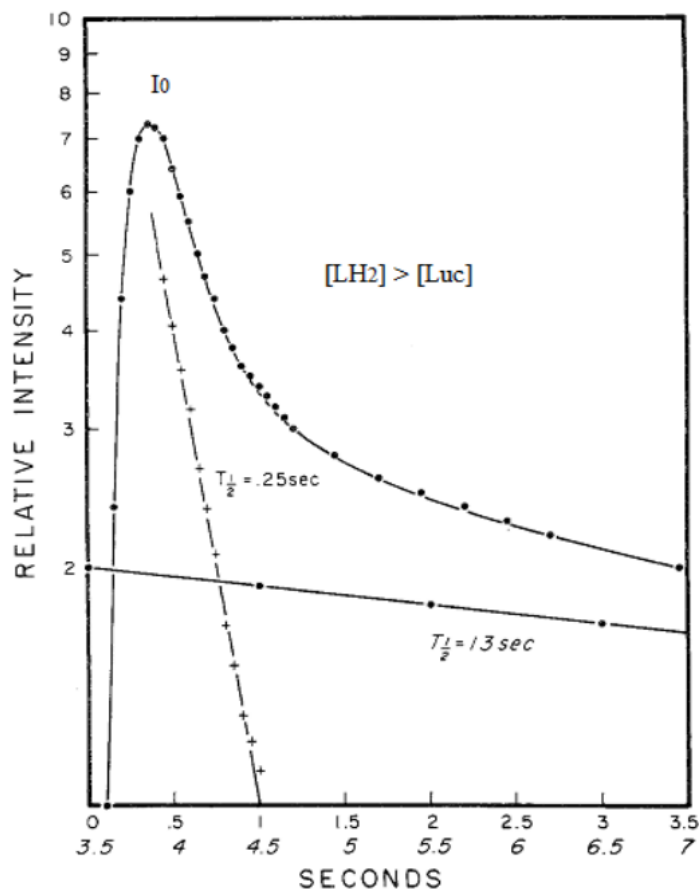


Slika 17. Logaritamski prikaz ovisnosti relativnog intenziteta BL fotoproteina o koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$ . OL – obelin vrste *Obelia longissima*, OG – obelin vrste *Obelia geniculata* [14]

#### 4. 1. 2. Kinetika bioluminiscencije krijesnica

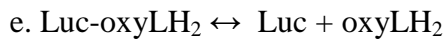
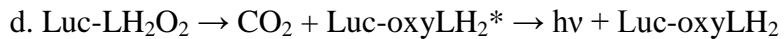
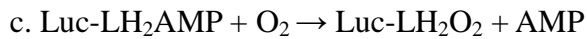
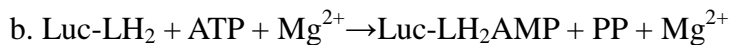
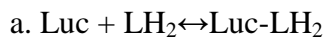
Standardni postupak ispitivanja kinetike reakcija BL krijesnica je brzo dodavanje jedne komponente u višku u puferiranu otopinu luciferaze, unutar luminometra koji bilježi emitiranu svjetlost u ovisnosti o vremenu.

Intenzitet BL dobiven je nakon brzog dodavanja otopine ATP i  $Mg^{2+}$  u otopinu puferiranu na pH 8 koja sadrži luciferin krijesnice ( $LH_2$ ) i luciferazu krijesnice (Luc) pod tlakom zraka. Luminometar bilježi trenutni bljesak svjetlosti, s intenzitetom koji propada sporije od porasta bljeska. Intenzitet BL ima vrlo brz porast i dvije sporije stope propadanja, polulogaritamaska skala pokazuje da su obje stope propadanja eksponencijalne, to jest slijede kinetiku prvog reda (Slika 18.). Visina bljeska  $I_0$  proporcionalna je graničnim koncentracijama Luc-a ili supstrata, i to je temelj za široku primjenu BL krijesnica za ispitivanje ATP-a u biološkim uzorcima. [8]



Slika 18. Grafički prikaz vremenske ovisnosti relativnog intenziteta BL krijesnice. [15]

Utvrđeno je da se BL reakcije krijesnica događaju u nizu koraka od kojih su neki nepovratni:



U prvoj reakciji dolazi do nekovalentnog vezanja  $\text{LH}_2$  na Luc (a.). Inicijalni intenzitet svjetlosti,  $I_0 = 7,2$  jedinice relativnog intenziteta je mjera stalne koncentracije adenilestera vezanog na luciferazu Luc-LH<sub>2</sub>AMP (b.), a time i početne količine aktivne luciferaze prema modelu ABC\*. Da se kinetika BL uklapa u ABC\* model može se pokazati na isti način kao i za fotoproteine, da je prvi korak vezanja luciferin supstrata brz i ne ograničava brzinu reakcije. Kompleks (Luc-LH<sub>2</sub>AMP) nastaje kinetikom bimolekularne reakcije koja pridonosi početnoj brzini porasta intenziteta. Nakon postignutog maksimalnog intenziteta linearno propadanje na logaritamskoj skali s poluživotom  $t_{1/2} = 0,25$  s predstavlja kinetiku pseudo prvog reda, zbog dodavanja molekularnog kisika jer samo koncentracija supstrata ovisi o vremenu (c.). Dodavanje kisika je spor nepovratni korak koji tvori kovalentni kompleks. Otprilike 1s nakon maksimuma gubitak BL slijedi sporiju brzinu prvog reda,  $t_{1/2} = 13$  s, a ovisno o uvjetima eksperimenta, ovo svjetlo niskog intenziteta može dugotrajno biti gotovo konstantno (d.). Produkt Luc-oxylH<sub>2</sub> koji zaostaje nakon emisije svjetlosti polako disocira (e.), sprječavajući brzi oporavak luciferaza u posljednjem koraku.[8]

#### 4. 1. 3. Kinetika bioluminiscencije bakterija

Za bakterijsku luciferazu možemo vezati tri koraka, odnosno intermedijara:

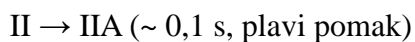
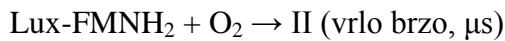


Kinetika reakcija BL bakterija slijedi kinetiku prvog reda, a luciferaza (Lux) ima jedno "mjesto vezanja" za FMNH<sub>2</sub>, pri čemu nastaje Intermedijar I.



Strogo eksponencijalno raspadanje bioluminiscencije slijedi ABC model, a njegova nepovratnost nije u skladu s prethodno navedenom intermedijarnom ravnotežom I, osim ako se ta ravnoteža uspostavlja brže od nepovratnih koraka koji slijede :  $I \rightarrow II \rightarrow III \rightarrow h\nu$

Apsorpcijske spektralne promjene pokazale su prisutnost nekoliko početnih oblika vezanog reduciranog flavina pri reakciji s otopljenim kisikom bez aldehida. Predložen je redosljed i brzine promjena pomoću bakterijske luciferaze iz roda *Vibrio harveyi*:

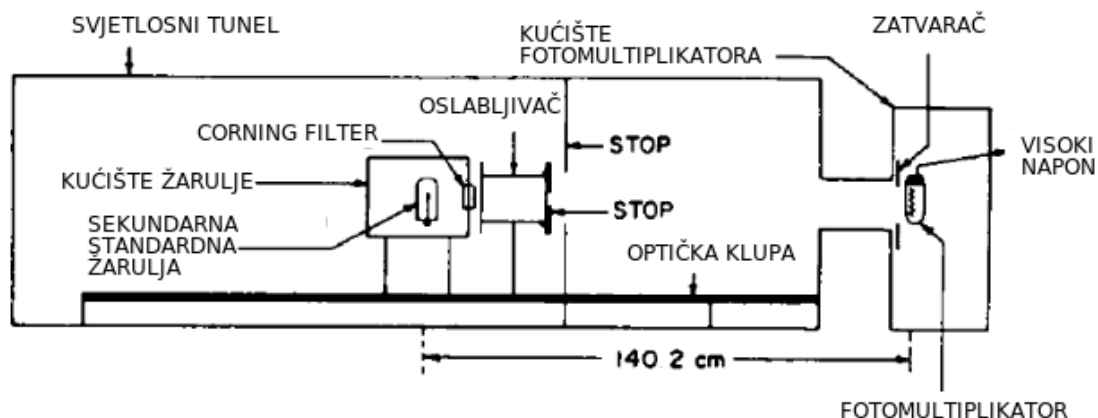


Tri različita oblika vezanih peroksiflavina razlikuju se njihovim apsorpcijskim spektrima i proizlaze iz konformacijskih promjena luciferaze. Prvi oblik II imao je maksimum apsorpcije na 375 nm, koji je prelazio u plavi pomak do 370 nm (oblik IIA), nakon čega je uslijedila povećana apsorbanacija da bi se dobio IIB koji ima isti apsorpcijski maksimum.

Kinetika reakcija BL može se pojednostaviti eliminiranjem početnih koraka, prvo izolacijom luciferaze-flavin hidroperoksida II, a zatim slijedeći kinetiku BL i apsorpcije dodavanjem dekanala. Dekanal se koristi jer je njegova kinetika reakcije spora što osigurava vrijeme oko 55 s potrebno za skeniranje apsorpcijskih spektara. [8]

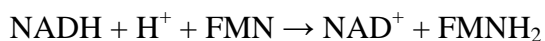
## 4. 2. Mjerenje kvantnih prinosa

Prvo mjerenje kvantnog prinosa BL bilo je 1957. godine za bakterijsku BL. Fotomultiplikator (Slika 19.) je kalibriran za apsolutni odziv spektralne ovojnice s maksimumom na 490 nm i raspodjelom na istom području kao i bakterijska BL. Uređaj je koristio filtere u boji radi ograničavanja spektralnog područja i termopile za mjerenje ukupne svjetlosti iz standardne žarulje, koju je tada zamijenio izvor bakterijske luciferaze. Termopil je zatim zamijenjen fotomultiplikatorom. Za daljnje smanjenje intenziteta žarulje korišteno je dodatno filtriranje svjetla i pomicanje fotomultiplikatora na veću udaljenost.[8]



Slika 19. Uređaj za mjerenje kvantnog prinosa bakterijske luciferaze koji su koristili Cormier i Totter (1957.). [16]

Reakcija je provedena u sferičnom spremniku i korištena je reakcija bakterijske luciferaze na sljedeći način:



Upotrebljeni aldehid bio je dodekanal koji je potrošen tijekom reakcije, premda vjerojatni produkt laurinska kiselina tada nije identificiran. Opaženo je da se za svaki einstein BL izgubi 30 molova dodekanala, tj. kvantni prinos za dodekanal bio je  $0,03 \pm 0,01$ . Kvantitativni rezultat bio je  $\Phi_B(\text{FMN}) > 3$ , što znači da se FMN ne koristi u svjetlosnom putu, već se pretvara u reakciji da bi se ponovno koristio drugim korakom redukcije NADH, prema gore povezanoj reakcijskoj shemi. Kvantni prinos je izračunat integriranjem intenziteta BL u eksponencijalno propadanje BL, ali samo u ranoj fazi reakcije gdje je ona bila prividno prvog reda.

Godine 1959. određen je kvantni prinos primjenom pročišćenog luciferina krijesnice, a iznosio je 0,88. Zbog ograničene dostupnosti čistog prirodnog luciferina bilo je potrebno osigurati maksimalnu detekciju pa se nije koristio točkasti izvor svjetlosti. Reakcija je izvedena u staklenoj bočici postavljenoj izravno na prednju stranu fotomultiplikatora i spojenoj s uljem, tako da se izbjegne potreba za korekcijom indeksa loma.

Kvantni prinos BL krijesnica je ponovno utvrđen optički čistim D-luciferinom, koristeći istu luciferazu iz *P. pyralis*, i s dva različito konstruirana seta, jedan s pomno kalibriranom optičkom geometrijom i drugi s integrirajućom sferom za prikupljanje svjetla, koji u potpunosti uklanja učinak loma svjetlosti. Kalibriranom geometrijom dobiveno je  $\Phi_B(\text{luciferin}) = 0,41$  i  $0,48$ , obje s nesigurnošću  $\pm 0,07$ , a kod integrirajuće sfere  $\Phi_B(\text{luciferin}) = 0,48$ .

Treća vrsta BL koja se sustavno proučavala apsolutnom radiometrijom bila je ona iz morskih organizama.. Vargulin iz morskih rakova vrste *Cypridina (Vargula)* reagira s molekularnim kisikom na luciferazu *Cypridina*, stvarajući plavu emisiju s maksimumom na 462 nm i određenim  $\Phi_B(\text{vargulin}) = 0,30$ , i  $\Phi_B(\text{O}_2) = 0,30$ , oba s nesigurnošću  $\pm 0,04$ . Istim pristupom izmjerena je BL pročišćenog fotoproteina aequorina u prisutnosti  $\text{Ca}^{2+}$ . Dodatkom  $\text{Ca}^{2+}$ , aequorin emitira plavu BL s maksimumom na oko 465 nm i određenom  $\Phi_B(\text{aequorin}) = 0,16$ . Postupak umjeravanja fotomultiplikatora ponovno je bio vezan na standardnu žarulju koja daje apsolutni spektralni odziv, a korištena je sferna reakcijska posuda koja se nalazila na nekoj udaljenosti između točke i izvora. U kasnijim eksperimentima podešavanje fotometra je kalibrirano naspram luminola i daje  $\Phi_B(\text{vargulin})=0,30$ . [8]

## 5. RASPRAVA

### 5. 1. Razvoj i primjena luciferaza

Luciferaza obuhvaća klasu enzima koji kataliziraju reakciju u kojoj supstrat općenito poznat kao luciferin reagira s kisikom kako bi emitirao svjetlost. Visoka kvantna učinkovitost katalizatora BL reakcija pridonosi niskim granicama detekcije konačnog produkta. S obzirom da luciferaza emitira svjetlost tijekom biokemijske reakcije, nema potrebe za izvorom pobude, što instrumentaciju za mjerenje BL čini jednostavnom i isplativom. Luciferaze su izolirane iz nekoliko organizama (Tablica 1), uključujući krijesnice, bakterije, crve, gljivice itd., kao što je opisano u prethodnim poglavljima.

Tablica 1. Prikaz izoliranih parova luciferaza-luciferin, veličine luciferaza i valne duljine maksimuma emitirane svjetlosti. [17]

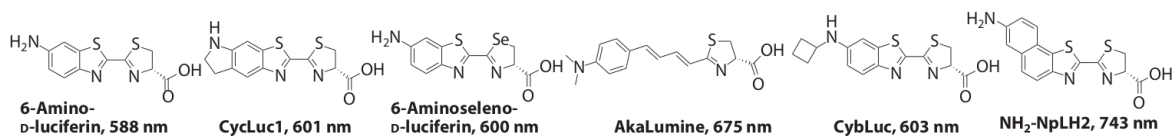
PORIJEKLO	LUCIFERAZA	LUCIFERIN	VELIČINA (kDa)	$\lambda_{MAX}$ (nm)
<i>Photinus pyralis</i>	FLuc	D-Luciferin	61	560
<i>Photinus pyralis</i>	Akaluc	AkaLumin	61	650
<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i>	CBR	D-Luciferin	61	615
<i>Pyrearinus termitilluminans</i>	ELuc	D-Luciferin	61	538
<i>Renilla reniformis</i>	RLuc8	CTZ	36	480
<i>Renilla reniformis</i>	Rluc8.6	CTZ	36	535
<i>Gaussia princeps</i>	GLuc	CTZ	20	473
<i>Oplophorus gracilirostris</i>	NanoLuc	Furimazin	19	460
<i>Oplophorus gracilirostris</i>	teLuc	DTZ	19	502
<i>Photorhabdus luminescens</i>	iLux	FMNH <sub>2</sub> i masni aldehyd	>200	490

Legenda: CBR, crvena luciferaza klišnjaka (engl. click beetle red luciferase); CTZ, koelenterazin; DTZ, difenilterazin; FLuc, luciferaza krijesnice (engl. firefly luciferase); FMNH<sub>2</sub>, reducirani flavin mononukleotid; GLuc, *Gaussia* luciferaza; RLuc, *Renilla* luciferaza.

### 5. 1. 1. Razvoj i primjena luciferaza D-luciferina

FLuc je najraširenija luciferaza za biološku i biotehnološku primjenu jer katalizira reakciju supstrata D-luciferina i adenozin-5-trifosfata (ATP). Kako bi se dodatno poboljšala toplinska i pH stabilnost FLuc-a, razvijena je himerna luciferaza spajanjem N-terminalne domene FLuc i C-terminalne domene *Luciola italica* luciferaze, što rezultira enzimom koji pokazuje trostruko veću aktivnost nego izvorni FLuc. Za *in vivo* oslikavanja primjenom bioluminiscencije (engl. bioluminescent imaging, BLI), idealni luciferin trebao bi emitirati fotone blizu infracrvenog zračenja kako bi maksimizirao prodiranje u tkivo uz minimalno raspršenje. [19]

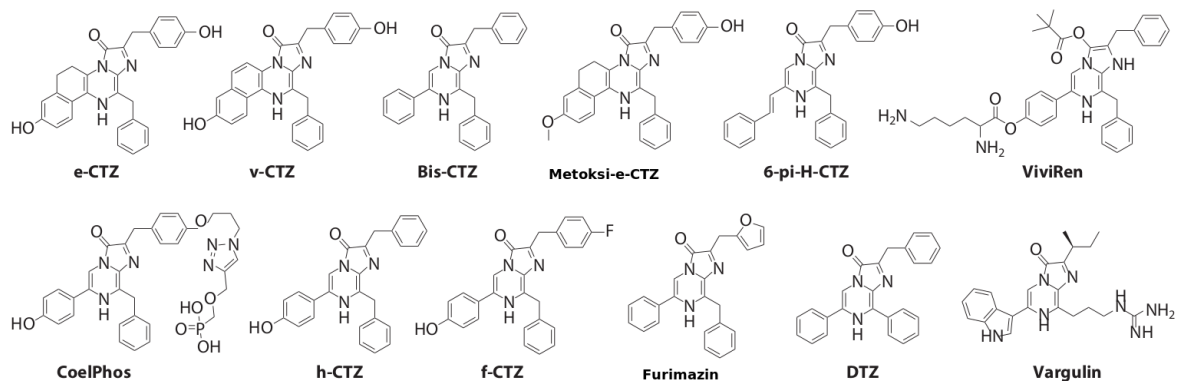
Kod analoga D-luciferina sa zamijenjenim atomom sumpora u 6-amino-D-luciferinu s atomom selena došlo je do pomaka zračenja u crveno područje na 600 nm i više *in vivo* svjetline 6-aminoselena-D-luciferina. Nekoliko drugih analoga D-luciferina, poput CycLuc1, AkaLumine i CybLuc, poboljšali su *in vivo* svojstva Fluc-a (Slika 20.). [19]



Slika 20. Analozi D-luciferina i valne duljine apsorbancije. [17]

### 5. 1. 2. Razvoj i primjena luciferaza koelenterazina

Za razliku od FLuc, većina luciferaza koje stupaju u reakcije s CTZ ne zahtijevaju dodatne kofaktore, kao što je ATP. S obzirom da je kemijska struktura CTZ-a identificirana, a CTZ potvrđen kao zajednički supstrat raznih luciferaza porijeklom iz vodenih organizama, sintetizirani su mnogi CTZ analozi (Slika 21.). Neki sintetički CTZ analozi mogu dovesti do jedinstvene reakcije, veće svjetline, crveno-pomaknute emisije ili boljih *in vivo* karakteristika. [18]



Slika 21. Analizi koelenterazina. [17]

### 5. 1. 2. 1. *Renilla* luciferaza i derivati

*Renilla* luciferaza (RLuc) klonirana je iz *R. reniformis* te emitira svjetlost na 480 nm u prisustvu CTZ-a. RLuc8 sadrži osam supstitucija aminokiselina iz RLuc i pokazuje četverostruko povećanje intenziteta emitirane svjetlosti. Kako bi se emisija RLuc promijenila, njegovo je aktivno mjesto modificirano, što je dovelo do niza novih varijanti s emisijom BL u rasponu od 475 nm do 547 nm u prisutnosti CTZ-a. Razvijeno je nekoliko varijanti s crvenim pomakom, poput RLuc7-521 i RLuc8.6-535, koji imaju maksimume emisije pri 521 nm i 535 nm, čime je poboljšana *in vitro* i *in vivo* svjetlina u odnosu na RLuc. Brojni analozi CTZ-a koji nose različite supstituente na položajima C-2, C-5, C-6 ili C-8 sintetizirani su uglavnom radi poboljšanja svjetline BL i stvaranja fotona koji emitiraju crveni pomak. Konkretno, par RLuc i e-CTZ (s etilnom skupinom na položaju C-5) prikazuje maksimume emisije na 418 nm i 475 nm i sedam je puta svjetliji od para RLuc i CTZ. Također, par RLuc8.6 i v-CTZ (s benzenskom jezgrom vezanom na položaje C-5 i C-6) daje crveno pomaknutu emisiju koja doseže maksimum od 588 nm. S druge strane, bis-CTZ mogao bi plavim pomakom pomaknuti BL RLuc8 na ~405 nm. Može se zaključiti da je sada dostupno nekoliko RLuc deriviranih parova luciferaze-luciferina s emisijama od ~400 nm do ~590 nm.[17]

### **5. 1. 2. 2. *Gaussia luciferaza i derivati***

GLuc, koji je prirodna luciferaza porijeklom iz veslonožaca roda *Gaussia princeps*, emitira svjetlost na ~473 nm u prisutnosti CTZ-a. GLuc8990 je desetostruko svjetliji od GLuc-a i ima maksimum emisije na 503 nm. Zanimljivo je da su svijetle varijante GLuc korištene za aktiviranje o svjetlu-ovisnih ionskih kanala (engl. channelrhodopsin) i protonskih pumpi na membranama živčanih stanica s njihovom posljedičnom inhibicijom ili aktivacijom.

Za razliku od RLuc, GLuc slabije ulazi u reakcije s najčešćim sintetičkim CTZ analogima. Proširenjem mogućih supstrata GLuc pomoću proteinskog inženjeringa može se proširiti spektar boja BL, a time i njihov mogućnost primjene. [17]

### **5. 1. 2. 3. *Oplophorus luciferaza i derivati***

Podjedinica od 19 kDa *Oplophorus* luciferaze (OLuc) pretvorena je u NanoLuc™ dodatkom furinog supstituenta na drugi položaj u imidazopirazinonskom prstenu. NanoLuc™ ima 16 mutacija, a u prisustvu sintetičkog CTZ analoga, furimazina, *in vitro* ima ~100 puta veću svjetlinu od FLuc-D- luciferin sustava. Tri poznata CTZ analoga, uključujući h-CTZ, f-CTZ i bis-CTZ, kada su upareni s NanoLuc™, mogu generirati dvostruko ili trostruko jaču bioluminiscenciju od furimazina.

Zbog male veličine, velike svjetline, visoke stabilnosti i uspješne komercijalizacije, NanoLuc™ je vrlo popularan u velikom broju biomedicinskih istraživanja, nadmašivši RLuc i FLuc u mnogim aspektima. Glavni nedostatak NanoLuc™-a je njegov maksimum emisije plave svjetlosti na ~460 nm, što rezultira ograničenom apsorpcijom u tkivo zbog raspršivanja plavih fotona po biološkom uzorku. Luciferaze koje se dobivaju iz OLuc, kao što su NanoLuc™ i teLuc, jasno pokazuju povoljnija svojstva u odnosu na RLuc i druge luciferaze. Luciferaze dobivene iz OLuc mogu se modificirati inženjeringom i luciferaza i luciferina, što dovodi do fleksibilnosti za dodatno podešavanje emisije boje. [17]

### **5. 1. 3. Razvoj i primjena bakterijskih luciferaza**

BL iz bakterija posredovana je heterodimernim luciferazama (luxA i luxB) koje su kodirane *luxCDABE* operonom, a uz tri biosintetska enzima (luxC, lucD i luxE) odgovorne su za proizvodnju dugolančanog aldehidnog supstrata, luciferina. Ovaj BL sustav ograničen je slabom svjetlinom, plave emisije (490 nm) i ovisnošću o prisustvu reduciranog riboflavin fosfata (FMNH<sub>2</sub>) i dugolančanih aldehida.

Budući da je dostupnost FMNH<sub>2</sub> ograničena u stanicama, koekspresijom reduktaze flavin mononukleotida (FMN) i uvođenjem dodatnih mutacija preko *luxCDABE* operona, dobiven je iLux. Takav modificirani BL sustav je šest do osam puta svjetliji od FLuc u pojedinačnim bakterijskim stanicama. [19]

## 5. 2. CANARY

CANARY biosenzor test (engl. cellular analysis and notification of antigen risks and yields) jedan je od najnovijih, najosjetljivijih i najbržih načina detekcije patogena u različitim medijima. Koristi B-limfocite kao senzore koji emitiraju svjetlost nakon interakcije s antigenima bakterija ili drugih patogena (gen *aequorina* je ugrađen metodama genetičkog inženjeringa u genom B-limfocita te oni ekspimiraju fotoprotein i mogu u određenim uvjetima emitirati svjetlost). Vežanje specifičnih antigena bakterija ili patogena za protutijela (imunoglobuline) na membranama B-limfocita aktivira specifične unutarstanične signalne putove povezane s povećanjem koncentracije Ca<sup>2+</sup> u citosolu. To je neophodan korak za aktivaciju *aequorina* B-limfocitima i emisiju svjetlosti. Reakcija se odvija na analitičkom mikročipu na kojem se očitava svjetlosni signal. Ova je metoda vrlo korisna za brzu detekciju patogena kako u medicini (važno za brzo postavljanje dijagnoze i određivanje terapije), tako i u prehrambenoj industriji, ekologiji (detekcija zagađivača okoliša ) i sl.

Specifični bioreporter dobiveni genetičkim inženjeringom koji koriste BL bakterija za emisiju svjetla kao odgovor na specifične induktore iz okoliša također su inovativan način primjene reakcija BL u različitim vrstama istraživanja. Emitirani svjetlosni signal izmjeri se pomoću mikroluminometra povezanog s integriranim krugom (BBIC, engl. bioluminescent bioreporter integrated circuits) na osnovu čega se utvrđuje koncentracije induktora BL reakcije (određenog zagađivača). [12]



### 5. 3. Bioluminiscentno oslikavanje

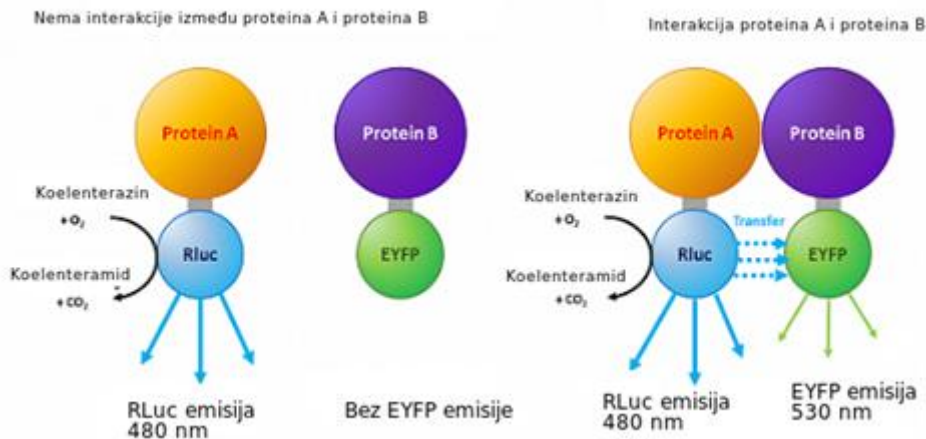
Bioluminiscentno oslikavanje (engl. bioluminescent imaging, BLI) je novija neinvazivna metoda praćenja bioloških procesa razvijena posljednjih desetak godina. Geni koji kodiraju različite luciferaze ugrađeni su u genom stanica, a korisni su za praćenje bioloških funkcija, jer njihovi proteinski produkti kataliziraju emisiju svjetlosti bez potrebe za egzogenim osvjetljenjem (BL). Luciferaze su osjetljivije od često korištenih fluorescentnih reportera, zahvaljujući izuzetno niskim razinama BL koje je lakše detektirati. Druga velika prednost luminescentnih reportera je da nema potrebe za egzogenim osvjetljenjem, koje pri fluorescentnim metodama mogu poremetiti fiziologiju u tkivima osjetljivim na svjetlost i uzrokovati fototoksično oštećenje stanica.

Zbog izrazite osjetljivosti i potpune netoksičnosti, BLI je idealna metoda za mnoge vrste dugoročnih istraživanja na živim stanicama, tkivima, ali i cijelim organizmima, primjerice eksperimentalnim životinjama. Tradicionalna primjena bioluminescentnog snimanja je za mjerenje razine ATP-a u stanicama, jer reakcija luciferaze krijesnice ovisi o prisutnosti kisika i ATP-a. Aktivnost luciferaze danas se koristi i za otkrivanje proteinskih interakcija, za praćenje rasta i diferencijacije tumorskih stanica *in vitro* i *in vivo* te za praćenje transkripcijske i posttranskripcijske regulacije funkcionalno važnih gena. [20]

#### 5. 3. 1. Otkrivanje interakcija protein-protein

Osmišljeno je nekoliko pametnih adaptacija luminiscencije kako bi se istraživale interakcije između proteinskih molekula. Za istraživanje takvih interakcija moguće je spojiti bioluminiscencijske reporterske gene s genima koji kodiraju proteine čija se interakcija želi istražiti. Bioluminiscencijski rezonantni prijenos energije (engl. bioluminescence resonance energy transfer, BRET), analog fluorescentnom rezonantnom prijenosu energije (FRET) koji koristi egzogenu svjetlost, je prvi put primijećen kao prirodni fenomen u meduza vrste *Aequorea*.

U ovom organizmu plavi fotoni koje emitira donor - luminescentni protein aequorin osjetljiv na  $Ca^{2+}$  se prihvaćaju na akceptor - zeleni fluorescentni protein (GFP) i ponovo emitiraju (na većoj valnoj duljini) kao plavo svjetlo nakon fuzije GFP-a s aequorinom. BRET se temelji na interakciji proteina donora (luciferaze) i akceptora (fluorescentni protein) pri čemu, kad se nađu u neposrednoj blizini, dolazi do prijenosa energije proizvedene luciferaznom reakcijom na fluorescentni protein koji onda emitira svjetlost na drugačijoj valnoj duljini (Slika 22.). Ova promjena u boji emitirane svjetlosti ukazuje upravo na interakcije između proteina. [20]



Slika 22. Shematski prikaz BRET-a. [20]

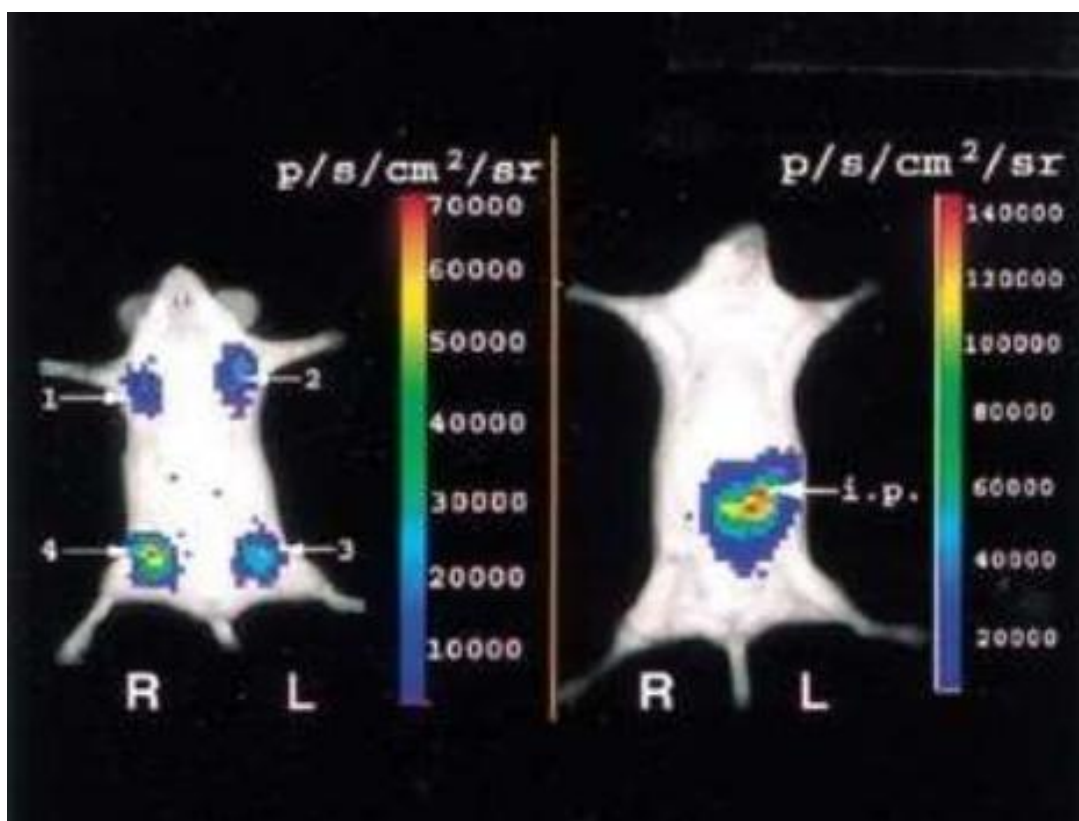
Mogućnost koekspresije fuzijskih kompleksa (donora i akceptora) u živim stanicama omogućuje kvantitativno proučavanje njihove interakcije u stvarnom vremenu. BRET je koristan za proučavanje interakcija protein-protein u biljkama i sisavcima, te za istraživanja u molekularnoj biologiji, poput istraživanja oligomerizacije različitih receptora povezanih s G-proteinom. [21]

Metoda razdvojene luciferaze (eng. luciferase complementation imaging, LCI) ili metoda komplementacije proteinskih fragmenata drugi je način istraživanja protein-protein interakcija primjenom BL. U ovoj se metodi dva ispitivana proteina označavaju komplementarnim, ali inaktivnim fragmentima luciferaze. U slučaju interakcije dva proteina od interesa, komplementarni fragmenti luciferaze se spajaju, obnavlja se njena funkcija te dolazi do emisije svjetla, odnosno do BL signala. U LCI luminiscencija daje kvantitativnu procjenu stupnja interakcije proteina u širokom dinamičkom rasponu. [22]

### 5. 3. 2. *In vivo* bioluminiscentno oslikavanje

*In vivo* bioluminescentno oslikavanje cijelog tijela nudi osjetljivu, kvantitativnu, neinvazivnu metodu praćenja infektivnih stanja i rasta tumora u živih životinja u stvarnom vremenu. Napredovanje bolesti ili djelotvornost lijekova može se procijeniti ubrizgavanjem bioluminiscentnog markera u životinju s posljedicom da tumorske stanice ili stanice patogena emitiraju svjetlost. Ova je metoda vrlo korisna u pretkliničkom razvoju lijekova.

Nakon injekcije luciferina u tijelo životinje koja u određenim tkivima eksprimira gen za luciferazu moguće je detektirati bioluminiscentnu svjetlost koja prolazi kroz slojeve životinjskog tkiva pomoću visoko fotoosjetljivih kamera (engl. charge-coupled devices, CCD). CCD kamere pretvaraju fotone u elektronske naboje i tako pružaju slike visoke kvalitete. Najčešće se slike detektiranog bioluminiscentnog signala prikazuju uz skalu pseudo-boja od kojih svaka predstavlja određeni intenzitet bioluminiscentne svjetlosti izražen u fotonima po sekundi po kvadratnom centimetru po steradianu ( $\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$ ) te se stapaju s fotografijama za preciznu lokalizaciju BL signala u životinjskom tijelu (Slika 23.). Većina sustava za snimanje daje dvodimenzionalnu (2D) informaciju o mjestu i intenzitetu svjetlosti, ali razvijena je i metoda trodimenzionalnog (3D) BLI. [23]



Slika 23. Primjer slika dobivenih bioluminiscentnim oslikavanjem miša *in vivo*. [23]

## 6. ZAKLJUČAK

Dvije glavne vrste kemijskih reakcija koje dovode do bioluminiscencije (BL) uključuju enzime luciferaze, koji kataliziraju oksidaciju supstrata (luciferina) uz određene kofaktore poput ATP-a i metalnih iona, ili fotoproteine koji sami prolaze kroz transformaciju i emitiraju svjetlost tijekom bioluminiscentne reakcije s luciferinom.

Zbog visokih kvantnih prinosa BL reakcija i relativne netoksičnosti supstrata, razvijen je veliki broj in vitro i in vivo analitičkih tehnika kojima se mjeri koncentracija ATP-a ili  $\text{Ca}^{2+}$  u različitim uzorcima. Primjena BL pokazala se vrlo učinkovitom metodom za predočavanje, praćenje i istraživanje bioloških procesa, a u medicini se koristi u dijagnostici tumora i praćenju učinkovitosti terapije.

Poznavanje temeljne kinetike BL reakcija, fizikalno-kemijskih karakteristika različitih luciferaza i supstrata, temelj su za razvoj sintetičkih enzima (proteinski inženjering) i supstrata s boljim karakteristikama, većim kvantnim prinosima, kvalitetnijom emisijom svjetlosti željene svjetline i spektra kako bi granica detekcije bila niža. S obzirom da se svjetlost emitira tijekom biokemijske reakcije, nema potrebe za izvorom pobude, što instrumentaciju potrebnu za mjerenje BL čini jednostavnom i isplativom.

Metodama genetičkog inženjeringa moguće je genom luciferaze ugraditi u genom stanica kako bi se u određenim uvjetima mjerio signal (emitirana svjetlost) u stanicama. CANARY biosenzor test jedan je od najosjetljivijih i najbržih načina detekcije patogena u različitim medijima. Koristi B-limfocite koji eksprimiraju fotoprotein aequorin kao senzore koji emitiraju svjetlost nakon interakcije s antigenima bakterija ili drugih patogena.

Daljnja istraživanja te razvoj novih kompleksa luciferaza-supstrat potrebna su kako bi se princip bioluminiscencije kao prirodnog fenomena iskoristio u još većoj mjeri u različitim vrstama biotehnoških, analitičkih, biomedicinskih istraživanja.

## 7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

$k_f$ ,  $k_r$ ,  $k_p$  – konstante brzina

[ES] – koncentracija Michaelis-Menten kompleksa

[E] – koncentracija enzima

[S] – koncentracija supstrata

V – brzina reakcije

$V_{\max}$  – maksimalna brzina reakcije

$K_m$  – Michaelis-Menten konstanta

$\Phi_P$  – fotokemijski kvantni prinos

$\Phi_C$  – kvantni prinos CL reakcije

$\Phi_B$  – kvantni prinos BL reakcije

$\Phi_Y$  – kemijski prinos

$\Phi_E$  – prinos pobude

$\Phi_F$  – prinos fluorescencije

[A], [B] i [C] – koncentracije u ABC modelu

$[A_0]$  – početna koncentracija

$k_A$ ,  $k_B$  – konstante brzina u ABC modelu

t – vrijeme

$t_M$  – vrijeme mirovanja

AMP – adenzin monofosfat

ATP – adenzin trifosfat

BL – bioluminiscencija

BLI – bioluminiscentno oslikavanje

BRET – bioluminiscencijski rezonantni prijenos energije

CBR – crvena luciferaza klišnjaka

CCD – fotoosjetljiva kamera

CIEEL – postupno kemijski pomaknuta luminiscencija za izmjenu elektrona

CL – kemiluminiscencija

CT – prijenos naboja

CTIL – usklađena luminiscencija izazvana CT-om

CTZ – koelenterazin

DTZ – difenilterazin

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

EGTA – egtazična kiselina

ET – prijenos elektrona

FMN – flavin mononukleotid

FMNH<sub>2</sub> – reducirani flavin mononukleotid

FRET – fluorescencijski rezonantni prijenos energije

GFP – zeleno fluorescentni protein

LBP – luciferin vezujući protein

LCI – metoda razdvojene luciferaze

## 8. LITERATURA

1. Shimomura, O., *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Singapore, 2006.
2. Newton Harvey, E., *A history of luminescence from the earliest times until 1900*, Dover Publications, 2005
3. Shimomura, O., *The Photoproteins. Photoproteins in Bioanalysis* (eds S. Daunert and S.K. Deo), John Wiley and Sons, 2006.
4. Brovko, L., *Bioluminescence for food and environmental microbiological safety*, SPIE Press, 2007.
5. Garcia-Campana, A. M., *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, CRC Press, 2001.
6. Navizet, I., Liu, Y.- J., Ferré, N., Roca- Sanjuán, D., Lindh, R., *The Chemistry of Bioluminescence: An Analysis of Chemical Functionalities. ChemPhysChem*, 2011, 12, 3064-3076.
7. Isobe, H., Takano, Y., Okumura, M., Kuramitsu, S., Yamaguchi, K., *J Am Chem Soc* 2005, 127, 8667.
8. Lee J., *Bioluminescence the Nature of Light*, University of Georgia, 2017.
9. Kaskova Z. M., Tsarkova A. S., Yampolsky I. V., *1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine, Chem Soc Rev*, 2011, 45, 6048
10. Oba, Y., Yoshida, N., Kanie, S., Ojika, M., Inouye, S., *Biosynthesis of Firefly Luciferin in Adult Lantern: Decarboxylation of L-Cysteine is a Key Step for Benzothiazole Ring Formation in Firefly Luciferin Synthesis. PLoS ONE* 2013, 8(12): e84023
11. Li, F., Yu, J., Zhang, Z., Cui, Z., Wang, D., Wei, H., Zhang, X. E., *Buffer enhanced bioluminescence resonance energy transfer sensor based on Gaussia luciferase for in vitro detection of protease. Anal Chim Acta*, 2012, 724, 104-110.
12. Roda, A., *Chemiluminescence and Bioluminescence; Past, Present and Future*, Royal Society of Chemistry, 2011., str. 163, 444, 469-470, 473-475

13. Morin, J.G., and Hastings, J.W. (1971) Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. *J Cell Physiol* 1971, 77, 305-311.
14. Markova, S.V., Vysotski, E.S., Blinks, J.R., Burakova, L.P., B-C. Wang, and Lee, J. (2002) Obelin from the Bioluminescent Marine Hydroid *Obelia geniculata*: Cloning, Expression, and Comparison of Some Properties with Those of Other Ca<sup>2+</sup>-Regulated Photoproteins. *Biochemistry* 2002, 41, 2227-2236.
15. McElroy, W.D., Seliger, H.H. *Light and Life* (WD McElroy and B Glass, eds.). Johns Hopkins Press, Baltimore, 1961, str. 219
16. Cormier, M.J., and Totter, J.R. Quantum efficiency determinations on components of the bacterial luminescence system. *Biochem Biophys Acta* 1957, 5, 229-237.
17. Yeh, H. W., Hui-Wang, A., Development and Applications of Bioluminescent and Chemiluminescent Reporters and Biosensors, *Anal Rev Anal Chem* 2019, 12, 129-150
18. Jiang, T., Du, L., Li, M., Lighting up bioluminescence with coelenterazine: strategies and applications. *Photochem Photobiol Sci* 2016, 15, 466–80
19. Close, D. M., Patterson, S. S., Ripp, S., Baek, S. J., Sanseverino, J., Sayler, G. S., (2010.) Autonomous bioluminescent expression of the bacterial luciferase gene cassette (*lux*) in a mammalian cell line. *PLOS ONE* 2010, 5:e12441
20. Welsh, D. K., Kay, S. A., Bioluminescence imaging in living organisms. *Curr Opin Biotechnol.* 2005, 16(1), 73-78.
21. Xu, Y., Kanauchi, A., von Arnim, A. G., Piston, D. W., Johnson, C. H., Bioluminescence resonance energy transfer: monitoring protein-protein interactions in living cells. *Methods Enzymol* 2003, 360, 289-301.
22. Luker, K. E., Piwnica-Worms, D., Optimizing luciferase protein fragment complementation for bioluminescent imaging of protein-protein interactions in live cells and animals. *Methods Enzymol* 2004, 385, 349-360.
23. Massoud, T. F., Gambhir, S. S., Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev*, 2003, 17(5), 545-80.