

Received: 21.01.2017  
Accepted: 09.10.2017  
Published: 12.12.2017

## Bioluminescencja jako narzędzie w biologii molekularnej\*

### Bioluminescence as a tool in molecular biology

Katarzyna Pajor, Daniel Sypniewski, Ilona Bednarek

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

#### Streszczenie

Bioluminescencja od wielu lat jest przedmiotem badań naukowców; istnieje wiele mechanizmów tego zjawiska. Najbardziej rozpowszechniony występuje u bakterii. Jest uwarunkowany obecnością operonu *lux*, który koduje wszystkie elementy niezbędne do emisji promieniowania świetlnego, nie ma więc potrzeby dostarczenia substratów z zewnątrz. Równie popularny mechanizm bioluminescencji wykazują chrząszcze z gatunku *Photinus pyralis*. Lucyferaza występująca u tych organizmów to FLuc, a substratem jest D-lucyferyna. Bioluminescencja jest też cechą wielu organizmów oceanicznych. Większość z nich opiera zjawisko emisji promieniowania na reakcji utlenienia koelenterazyny do koelenteramidu z udziałem lucyferaz RLuc oraz GLuc. Dzięki różnorodności wymienionych systemów, bioluminescencja została wykorzystana do opracowania niezwykle czułych technik znajdujących zastosowanie w biologii molekularnej i medycynie. Najważniejszą z nich jest obrazowanie bioluminescencyjne (BLI). Jest to metoda tania i nietoksyczna, pozwalająca na obrazowanie zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Wykorzystywana jest m.in. w badaniach interakcji między białkami, w oznaczaniu komórek macierzystych, monitorowaniu zakażeń wirusowych, bakteryjnych, grzybiczych oraz pasożytniczych, a także w analizowaniu procesów nowotworzenia. Umiejętność modyfikowania różnych typów komórek w taki sposób, by wykazywały bioluminescencję, umożliwiła stworzenie biosensorów czułych na określone anality. W ostatnich latach opracowano również nowoczesne techniki molekularne wykorzystujące zjawisko bioluminescencji. Zalicza się do nich testy immunoenzymatyczne, udoskonalone analizy związane z wykrywaniem ATP w układach biologicznych, a także analizę BART (analiza bioluminescencyjna w czasie rzeczywistym), która pozwala na ocenę amplifikacji kwasów nukleinowych.

#### Słowa kluczowe:

bioluminescencja • obrazowanie bioluminescencyjne • lucyferaza • emisja promieniowania • białka reporterowe

#### Summary

Bioluminescence has been studied for many years by scientists. There are numerous mechanisms of that phenomenon; among them bacterial bioluminescence is the most frequently found in nature. This type of bioluminescence is determined by the appearance of *lux* operon, which encodes all elements necessary to produce light emission and it does not require any additional substrates supply. Another commonly found example of bioluminescence mechanism is performed by *Photinus pyralis*. Luciferase of *P. pyralis* named FLuc requires D-luciferin as a substrate. Bioluminescence is also characteristic for many deep-sea organisms. Most of them are based on oxidation reaction of coelenterazine to coelenteramide mediated by RLuc or GLuc luciferases. Due to the variety of bioluminescence mechanisms in nature, it has become possible to apply them in many sensitive methods that can be used in molecular biology and medicine. The most significant application of bioluminescence is BLI (bioluminescence

\*Praca finansowana ze środków Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (KNW-1-043/N/6/B).

imaging). This method is cheap and nontoxic which allows both *in vitro* and *in vivo* imaging. BLI applications include, e.g. protein-protein interactions, stem cells labeling, tracking of viral, bacterial, fungal and parasitical infections, and carcinogenesis analyses. Bioluminescence has also been used in the creation of modified cell systems capable of light emission in response to certain analytes and thus very sensitive biosensors have been generated. Other important areas of bioluminescence application are immunoassays, ATP assays, and BART analysis (bioluminescent assay in Real-Time) – a very sensitive technique which allows scientists to estimate nucleic acids amplification.

**Keywords:** bioluminescence • bioluminescence imaging • luciferase • light emission • reporter proteins

**GICID:** 01.3001.0010.7011  
**DOI:** 10.5604/01.3001.0010.7011  
**Word count:** 8213  
**Tables:** –  
**Figures:** 10  
**References:** 47

**Adres autora:** dr Daniel Sypniewski, Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej SUM, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec; e-mail: dsypniewski@sum.edu.pl

**Wykaz skrótów:** **APDs** – fotodiody lawinowe (avalanche photodiodes); **BART** – analiza bioluminescencyjna w czasie rzeczywistym (bioluminescent assay in real-time); **BBIC** – zintegrowany obwód bioluminescencyjny bioreportera (bioluminescent bioreporter integrated circuit); **BLEIA** – bioluminescencyjny test immunoenzymatyczny (bioluminescent enzyme immunoassay); **BLI** – obrazowanie bioluminescencyjne (bioluminescent imaging); **BRET** – transfer energii rezonansu bioluminescencji (bioluminescence resonance energy transfer); **CCD** – matryca typu CCD (charge coupled device); **CFU** – jednostka tworząca kolonię (colony forming unit); **CMOS** – matryca typu CMOS (complementary metal oxide semiconductor); **CS-BLI** – swoiste komórkowo obrazowanie bioluminescencyjne *in vitro* (cell-specific *in vitro* bioluminescence imaging); **CT** – tomografia komputerowa (computed tomography); **DMBA** – 9,10-dimetylo-1,2-benzantracen; **EF** – czynnik obrzęku (edema factor); **EYFP** – wzmocnione białko żółtej fluorescencji (enhanced yellow fluorescent protein); **Fluc** – lucyferaza świetlika (firefly luciferase); **GFP** – białko zielonej fluorescencji (green fluorescent protein); **GLuc** – lucyferaza *Gaussia princeps*; **HCMV** – ludzki cytomegalowirus (human cytomegalovirus); **HSV-1** – wirus opryszczki pospolitej 1 (herpes simplex virus 1); **LAMP** – amplifikacja izotermiczna metodą odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem pętli (loop-mediated isothermal amplification); **LF** – czynnik śmiertelności (lethal factor); **MDR1** – gen kodujący białko oporności wielolekowej 1 (multidrug resistance gene 1); **NLuc** – lucyferaza NanoLuc; **P-gp** – glikoproteina P; **PAP** – kwaśna fosfataza gruczołu krokowego (prostatic acid phosphatase); **PET** – pozytonowa tomografia emisyjna (positron emission tomography); **PSA** – swoisty antygen sterczowy (prostate specific antigen); **QD** – kropki kwantowe (quantum dots); **RLuc** – lucyferaza *Renilla reniformis*; **SPECT** – tomografia emisyjna pojedynczych fotonów (single-photon emission computed tomography).

## WSTĘP

Zgodnie z definicją bioluminescencją nazywa się zdolność żywych komórek do emisji promieniowania w zakresie światła widzialnego. Jest to skutek reakcji utlenienia lucyferyny będącej substratem, z udziałem enzymu - lucyferazy (fotoproteiny). Aby oddziaływanie to mogło zaistnieć, niezbędna jest obecność tlenu, a w poszczególnych przypadkach także dodatkowych enzymów, które wpływają na zmianę konformacji lucyferyny na bardziej aktywną, a tym samym na zwiększenie jej zdolności do reagowania z tlenem przy współdziałaniu lucyferazy [38]. Długość emitowanego promieniowa-

nia bywa różna i zależy m.in. od budowy enzymu, która prawie dla każdego systemu bioluminescencji jest inna [47]. Istnieje zatem wiele mechanizmów zjawiska bioluminescencji. Wszelkoność tego fenomenu stała się bodźcem do studiów nad jego genezą [19], które doprowadziły do opracowania wielu technik, które opierają się na procesach naturalnie zachodzących w środowisku. Korzystają z nich specjaliści z różnych dziedzin, takie jak np. biotechnologia, medycyna czy ochrona środowiska. Najszersze zastosowanie bioluminescencja znajduje jednak w biologii molekularnej. Szczególnie istotne było opracowanie techniki obrazowania bioluminescencyjnego, które umożliwiło naukowcom prowadzenie badań

*in vivo* na dużą skalę [33]. Dzięki idei użycia lucyferazy jako białka reporterowego możliwe stało się poznanie funkcji, umiejscowienia oraz żywotności komórek w organizmach ssaków. Obecnie obrazowanie z użyciem bioluminescencji jest jedną z najważniejszych metod prowadzenia analiz procesów chorobowych oraz reakcji organizmu na terapię [11,33].

Ostatnie lata zaowocowały opracowaniem nowych technologii z użyciem lucyferazy. Obecnie enzymu tego używa się w testach immunoenzymatycznych, podczas wykrywania interakcji między białkami, w badaniach nad kwasami nukleinowymi, a także w analizach związanych z wykrywaniem ATP oraz innych analitów – pierwiastków, związków aromatycznych i substancji o charakterze toksycznym [33].

## BIOLUMINESCENCJA W NATURZE

### Odkrycie i znaczenie bioluminescencji

Zjawisko bioluminescencji jest znane ludziom od setek lat. Pierwsze doniesienia o jego istnieniu pochodzą jeszcze z relacji z podróży Krzysztofa Kolumba. Wiadomo też, że już w starożytności Arystoteles oraz Pliniusz Starszy zastanawiali się nad źródłem światła, które można było obserwować u niektórych martwych ryb oraz w zwilgotniałym drewnie [5]. Badania nad zjawiskiem luminescencji prowadzili również Robert Boyle – to on dowiódł, że luminescencja badanych przez niego organizmów zależna jest od obecności tlenu, czy Raphael Dubois, który doświadczałnie wyjaśnił działanie systemu emisji światła przez żywe organizmy [5,38]. R. Dubois zajmował się badaniem mieszanin, które sporządził z użyciem ekstraktu z narządu świetlnego chrząszcza z gatunku *Pyrophorus noctilucus*. Jedną z mieszanin była sporządzona w zimnej wodzie, a druga w ciepłej. Pierwsza wykazywała właściwości zawiesziny emitującej światło, które jednak z upływem czasu było coraz słabsze, aż do całkowitego zaniknięcia. Druga natomiast, sporządzona z użyciem ciepłej wody, nie wykazywała bioluminescencji, więc Dubois schłodził ją, a następnie połączył z pierwszą mieszaniną. Spowodowało to ponowne pojawienie się efektu luminescencji. Wynioskowano wtedy, że ekstrakt sporządzony w zimnej wodzie zawiera termolabilny enzym, który nazwano lucyferazą, a ciepła mieszanina zawierała czynnik, który był stabilny w wysokiej temperaturze. Nazwano go lucyferyną i uznano za substrat enzymu, który wykazywał właściwości w roztworze zimnej wody [38].

Poszukując źródeł powstania bioluminescencji wśród zwierząt i mikroorganizmów, naukowcy zauważyli dużą różnorodność gatunków, które odznaczają się tą cechą. Większość z nich to organizmy występujące w oceanach, ponieważ jest to stabilne i przejrzyste środowisko, co sprzyja komunikowaniu się między sobą nawet na duże odległości. Istnieją także zwierzęta lądowe zdolne do bioluminescencji, takie jak: ślimaki, dżdżownice i chrząszcze, w tym najbardziej popularne świetliki. Możliwe, że

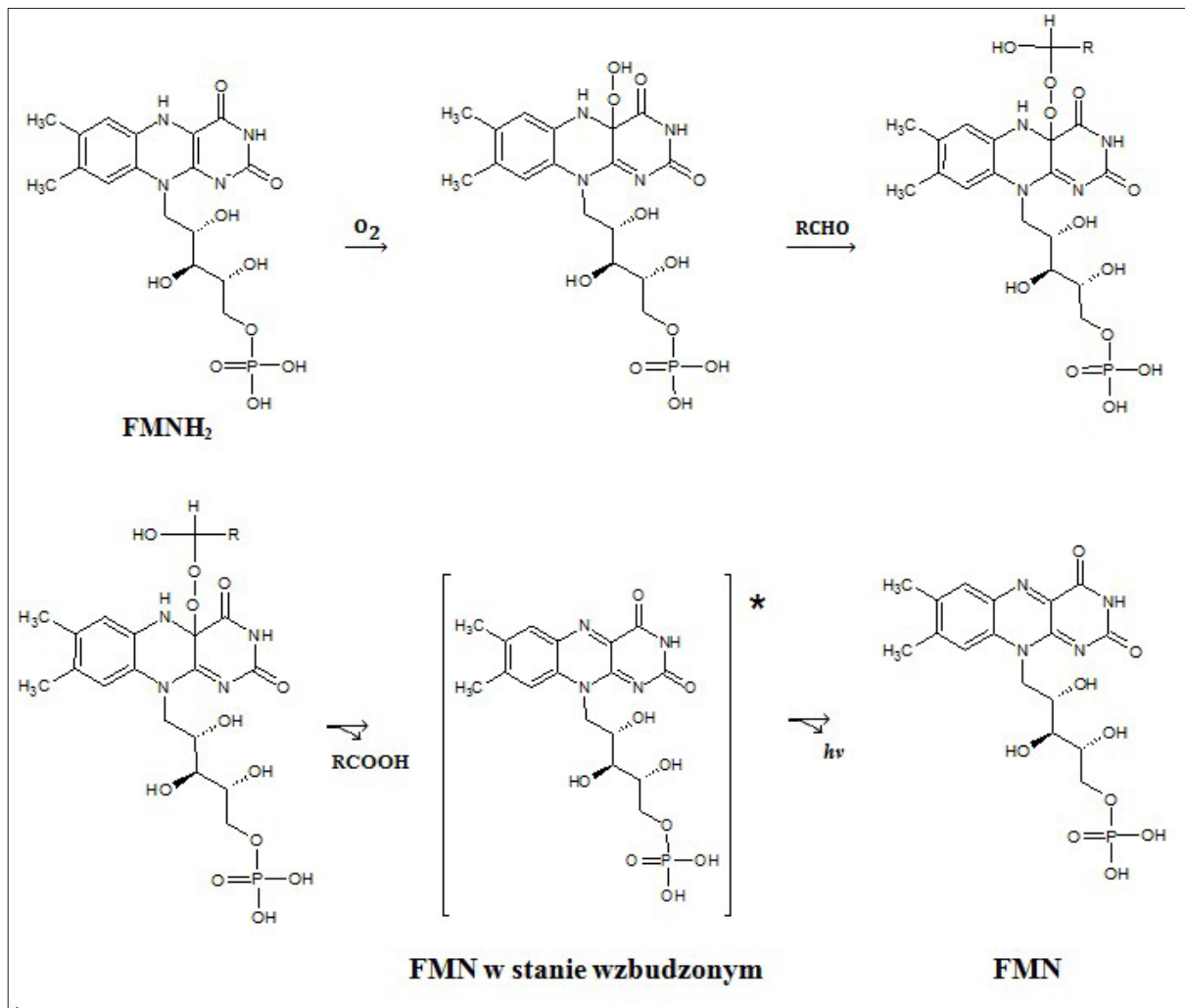
występują także gatunki słodkowodne zdolne do emisji promieniowania, np. w głębinach jeziora Bajkał. Trudno jednak wyróżnić cechę łączącą wszystkie te zwierzęta, dlatego uważa się, że bioluminescencja ewoluowała w przyrodzie wielokrotnie i niezależnie u różnych organizmów, wykluczając bakterie, u których podejrzewa się istnienie jednego mechanizmu ewolucji tego zjawiska. Można przez to rozumieć, że jest to proces stosunkowo łatwy, a jednocześnie niezwykle istotny ze względu na to, jak często się pojawia w środowisku. Bioluminescencja jest więc zjawiskiem powszechnym, ale nie do końca jeszcze poznany. Jest to spowodowane brakiem możliwości zbadania wielu organizmów ze względu na środowisko życia – techniki, które służą do badania wód oceanicznych nie pozwalają jeszcze na dostanie się na głębokość, na której podejrzewa się istnienie innych organizmów wykazujących bioluminescencję [19].

Dlaczego więc bioluminescencja odgrywa tak istotną rolę wśród tej bardzo zróżnicowanej grupy organizmów? Niektóre bakterie wykorzystują to narzędzie by przedłużyć cykl życiowy – zasiedlają organizm ryby, a następnie emitują światło, przyciągając uwagę większych drapieżników; umożliwia im to dłuższe przeżycie. Żabnicokształtne wykorzystują bioluminescencję by przyciągnąć zdobycz, a brudnice do błyskawicznego ostrzegania przed nadciągającym drapieżnikiem. Wśród gatunków, które występują na lądzie nie sposób nie przywołać świetlików, które dzięki bioluminescencji komunikują się między sobą w celu zwabienia osobnika płci przeciwnej bądź zasygnalizowania informacji o obecności pokarmu [5].

### Bioluminescencja bakterii

System bioluminescencji u bakterii wyróżnia się występowaniem operonu *lux*, którego ekspresja umożliwia powstanie wszystkich produktów niezbędnych do emisji promieniowania świetlnego, bez potrzeby pobierania substratów z zewnątrz [33]. Operon jest zbudowany z genów *luxA* i *luxB*, których produktem jest lucyferaza, a także genów *luxC*, *luxD* i *luxE*, które kodują enzymy niezbędne do syntezy długołańcuchowego nasyconego aldehydu, np. dekanalu, dodekanalu lub aldehydu mirystynowego [4,33]. Ostatni z genów należący do operonu *lux* to *luxG*, który koduje enzym uczestniczący w tworzeniu zredukowanego mononukleotydu flawinowego (FMNH<sub>2</sub>). Geny operonu *lux* u większości bakterii są ułożone w kolejności *CDABEG*. Niektóre z bakterii mają także dodatkowy gen *luxF*, znajdujący się między genami *luxB* i *luxE*, będący prawdopodobnie zduplikowaną wersją genu *luxB*. Jego obecność stwierdzono u niektórych gatunków z rodzaju *Photobacterium* [4].

Bakteryjna lucyferaza jest heterodimerem powstałym z połączenia produktów ekspresji genów *luxA* oraz *luxB* i do swojej aktywności, oprócz wcześniej wymienionych FMNH<sub>2</sub> i odpowiedniego aldehydu, wymaga tlenu. Reakcja lucyferazy powoduje powstanie produktu ubocznego w postaci promieniowania świetlnego o długości fali 490 nanometrów (ryc. 1) [6].



Ryc. 1. Mechanizm bioluminescencji występujący u bakterii

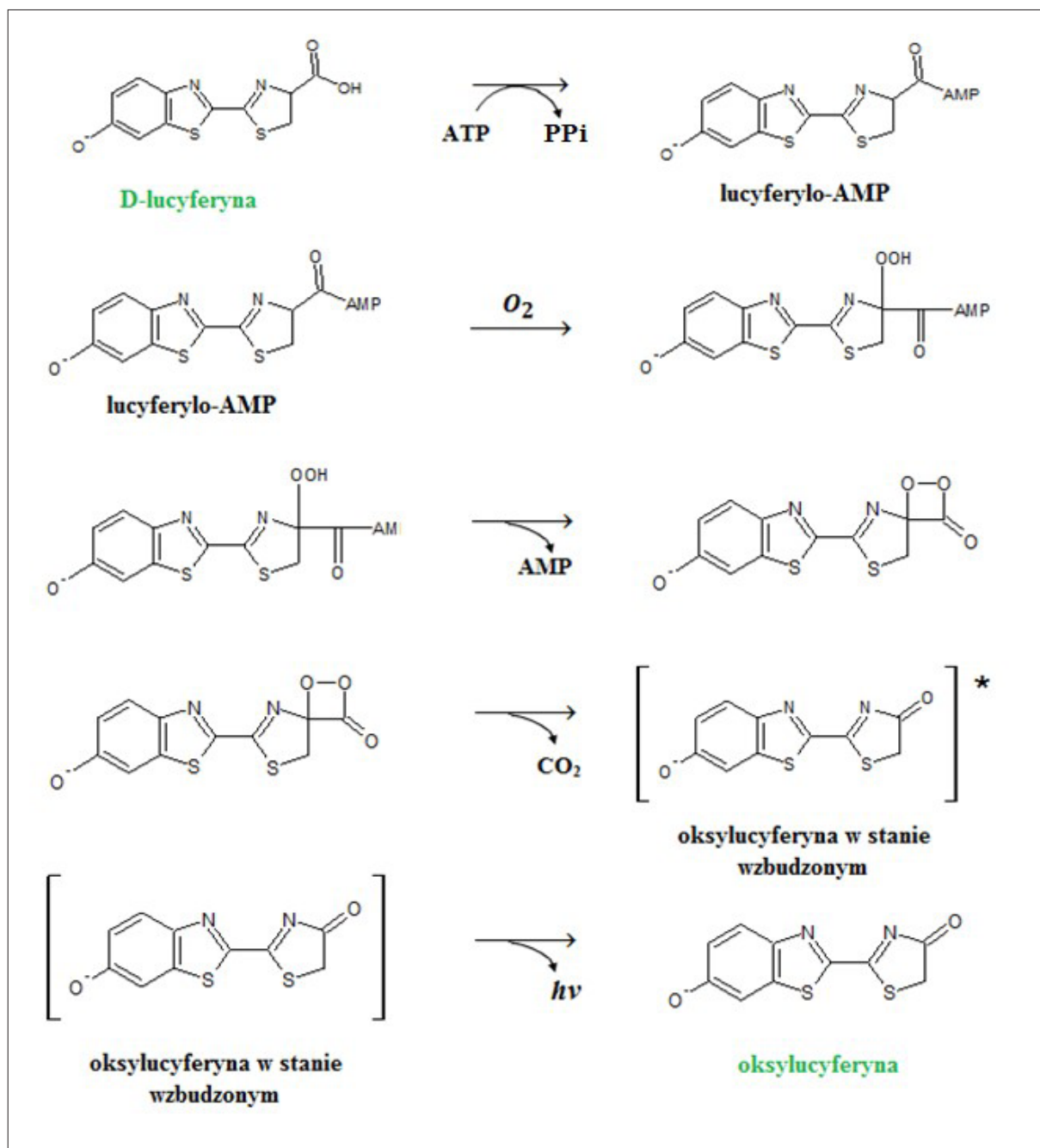
### Bioluminescencja owadów

Najbardziej znaną lucyferazą, występującą u owadów zdolnych do bioluminescencji, jest firefly luciferase (FLuc) (w języku polskim określana jako lucyferaza świetlika) występująca u chrząszcza z gatunku *Photinus pyralispyralis* [26]. Jej obecność wykazano także u niektórych gatunków z rodzin *Lampyridae*, *Elateridae* czy *Phengodidae* [38]. FLuc, w przeciwieństwie do lucyferazy bakteryjnej, jest monomerym [14]. Oddziałuje z D-lucyferyną, wytwarzaną przez fotocyty – wyspecjalizowane komórki znajdujące się w odwłoku owada [5]. Aby reakcja między D-lucyferyną i lucyferazą zaszła, niezbędna jest obecność ATP, tlenu oraz jonów magnezu [8]. Na początku, poprzez reakcję z ATP, cząsteczka D-lucyferyny zostaje aktywowana. Produktem przejściowym tego etapu jest kompleks lucyferazy i lucyferyno-AMP, który następnie reaguje z cząsteczką tlenu [14]. Powstaje oksylucyferyna – produkt niestabilny i znajdujący się w stanie wzbudzonym [5]. Podczas powrotu oksylucyferyny do stanu podstawowego, zostaje wydzielona energia w postaci promieniowania o długości fali 560 nm i żółtozielonej barwie (ryc. 2) [14].

### Bioluminescencja organizmów oceanicznych

Spośród wszystkich środowisk oceany są źródłem największej liczby organizmów zdolnych do bioluminescencji. Występuje w nich bardzo duża bioróżnorodność, zarówno zwierząt, jak i systemów wykorzystywanych do emisji promieniowania. Najlepiej opisanymi organizmami żyjącymi w oceanach i wykazującymi zdolność do bioluminescencji są parzydełkowce, widłonogi, bruzdnice i małżoraczkę [19].

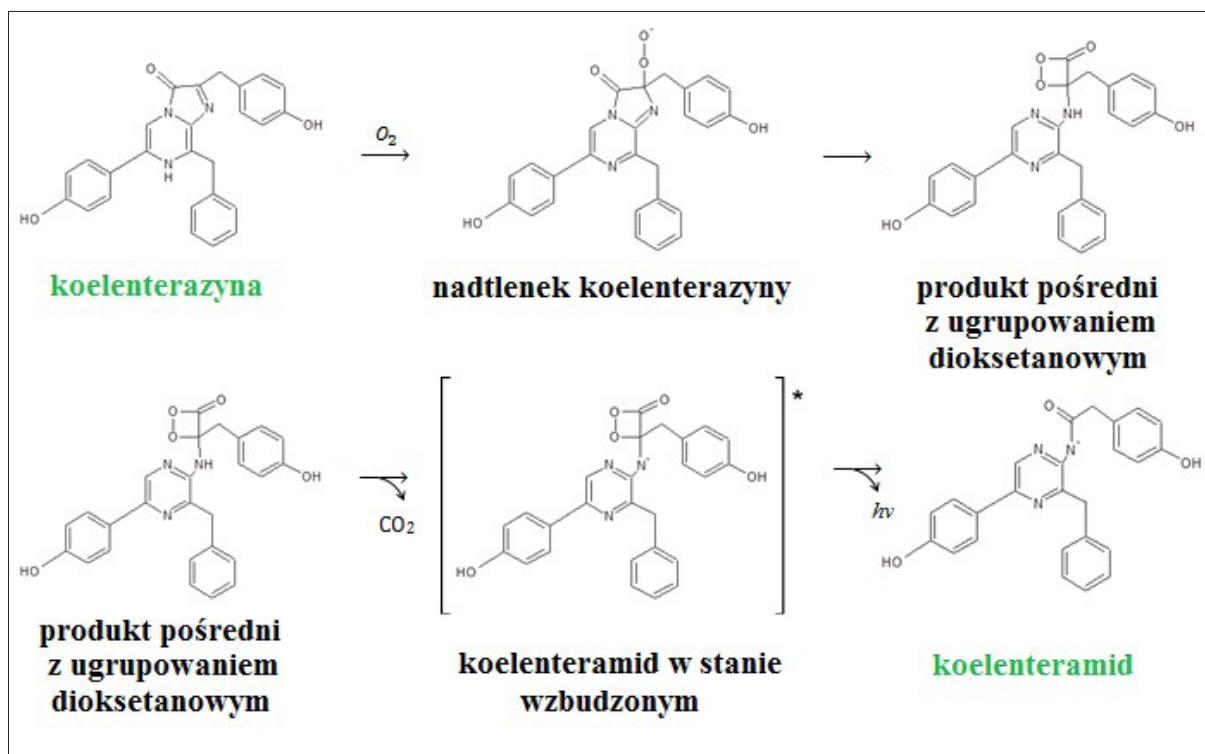
Najbardziej rozpowszechniony system bioluminescencji w środowisku oceanicznym opiera się na lucyferazie wykorzystującej koelenterazynę. Jest to związek monomeryczny, będący pochodną imidazopyrazynonu, a korzystające z niej lucyferazy mają masę o wiele mniejszą od lucyferazy świetlika z gatunku *Photinus pyralis* [1,26,33]. System, by prawidłowo funkcjonować, potrzebuje jedynie tlenu i w przeciwieństwie do lucyferazy świetlika, nie wymaga udziału ATP [30]. Koelenterazyna może występować w postaci związanej z fotoproteinami, co obserwuje się u stulbiopławów, żebroplawów i promienic. Pierwszą z odkrytych fotoprotein była



Ryc. 2. Mechanizm bioluminescencji występujący u świetlika *Photinus pyralis*

ekworyna wyizolowana z meduzy z gatunku *Aequorea victoria* [19]. Wraz z koelenterazyną i tlenem tworzy stabilny kompleks wrażliwy na obecność jonów wapnia – w chwili kontaktu kompleksu z jonami  $\text{Ca}^{2+}$  następuje zmiana konformacji i emisja promieniowania światła niebieskiego. Ta właściwość pozwoliła na wykorzystanie ekworyny m.in. w testach mających na celu pomiar wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia [34]. Bardzo podobne właściwości i zastosowanie do ekworyny wykazuje obelina (obelin) – fotoproteina pozyskiwana z parzydełkowca z gatunku *Obelia longissima* [33]. Do opisywanej grupy związków należy także symplek-

tyna, występująca u kałamarnicy należącej do rodzaju *Symplectoteuthis*. Najbardziej popularne lucyferazy wykorzystujące koelenterazynę pozyskiwane są natomiast z parzydełkowców z gatunku *Renilla reniformis*, a także z widłonogów *Gaussia princeps* [19]. Lucyferazy te oznacza się kolejno jako RLuc oraz GLuc. Podobnie jak lucyferaza świetlika są enzymami bardzo chętnie wykorzystywanymi w biologii molekularnej, często łączone ze sobą [46]. Obecność lucyferaz wykorzystujących jako substrat koelenterazynę wykazano także u innych organizmów oceanicznych. Należą do nich np. kałamarnice z rodzaju *Watasenia*, gdzie koelenterazyna występuje



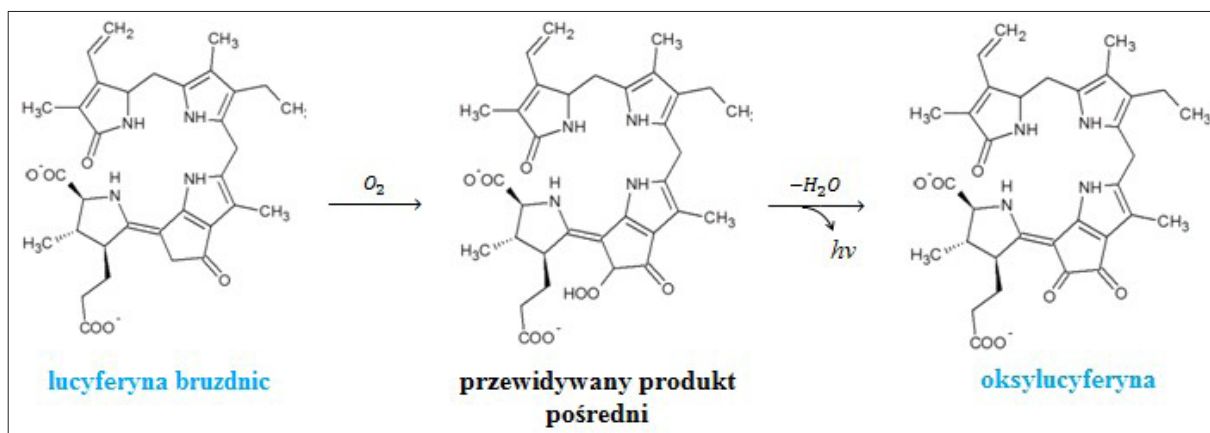
Ryc. 3. Mechanizm bioluminescencji wykorzystujący koelenterazynę

w postaci disiarczenu, czy krewetki z rodzaju *Oplophorus* [19]. To właśnie z gatunku *Oplophorus gracilirostris* wyizolowano lucyferazę, która po odpowiednich modyfikacjach z użyciem technik inżynierii genetycznej, nazwano NanoLuc (NLuc). Jako substrat wykorzystuje związek będący analogiem koelenterazyny. Sygnał powstający w wyniku jego połączenia się z NLuc jest ponad 150 razy intensywniejszy niż ten, którego emisję obserwuje się w wyniku reakcji z udziałem FLuc [25]. Innymi organizmami używającymi koelenterazyny do bioluminescencji są ogonice, szczecioszczękie, a nawet niektóre ryby [19]. Utlenienie koelenterazyny powoduje powstanie koelenteramidu, a emitowane przy tym promieniowanie ma barwę zielononiebieską i długość fali zbliżoną do 480 nm (ryc. 3) [22,27,33].

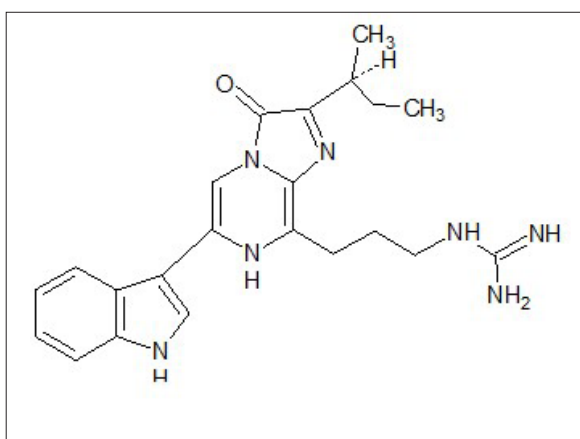
Wśród organizmów oceanicznych zdolnych do bioluminescencji należy wyróżnić także bruzdnice. Ich bioluminescencja jest procesem złożonym z kilku etapów i ściśle zależnym od wartości pH [40]. Duże znaczenie odgrywają w niej małe pęcherzyki nazywane scyntylonami (scintillons). W każdym z nich znajdują się: lucyferaza, lucyferyna oraz białka wiążące lucyferazę (tylko u niektórych gatunków) [20]. Bruzdnice emitują promieniowanie w odpowiedzi na ruch wody, wywołany np. bliską obecnością drapieżnika. Mechanizm transdukcji tego sygnału rozpoczyna się od aktywacji receptorów białka wiążącego GTP, znajdujących się w błonie komórkowej. Następnie dochodzi do zmiany sygnału mechanicznego na elektryczny przez zwiększenie stężenia jonów wapnia w komórce. Następstwem jest depolaryzacja błony wakuoli oraz jej połączenie z otaczającymi ją scynty-

lonami. Zmienia się potencjał czynnościowy błon tych pęcherzyków i dochodzi do otworzenia bramkowanych napięciem jonowych kanałów wodorowych. Napływ protonów z wakuoli do środka scyntylonu powoduje spadek pH i wyzwolenie reakcji chemicznej, prowadzącej do emisji kwantu promieniowania świetlnego [40]. Lucyferaza bruzdnic jest heterocyklicznym związkiem aromatycznym o budowie zbliżonej do chlorofilu [19]. Niektóre gatunki zawierają białka, które mają wiązać lucyferazę, by nie uległa autooksydacji w pH powyżej 7,0. Gdy wnętrze scyntylonów ulega zakwaszeniu, białka te uwalniają lucyferazę, która przechodzi w postać aktywną, a następnie utlenia lucyferynę do oksylucyferyny. Reakcja zachodzi z uwolnieniem kwantu promieniowania o długości fali równej 475 nm i niebieskiej barwie (ryc. 4) [40]. Poza bruzdnicami, tego typu lucyferaza występuje także u szczętek, inaczej nazywanych krylem [19].

Jeden z najbardziej oryginalnych mechanizmów bioluminescencji obserwuje się u małżoraczków. Charakterystyczna lucyferyna *Cypridina* (ryc. 5), syntetyzowana z tryptofanu, izoleucyny i argininy, występuje głównie u *Cypridina* i *Vargula* z rzędu *Myodocopida*. Nie wszystkie małżoraczkowate używają lucyferyny *Cypridina* w bioluminescencji - rząd *Halocyprida* korzysta z koelenterazyny. Wykazano jednak, że lucyferyny *Cypridina* używają także niektóre gatunki ryb z rodziny zmiataczowatych (rodzaje *Pempheris* i *Parapriacanthus*) oraz *Porichthys notatus* z rodziny batrachowatych. Ryby te mają wyspecjalizowane struktury pełniące funkcję organów świetlnych, będące przedłużeniem ich przewodu pokarmowego [19].



Ryc. 4. Mechanizm bioluminescencji występujący u bruźnic

Ryc. 5. Struktura lucyferyny *Cypridina*

## OBRAZOWANIE BIOLUMINESCENCYJNE

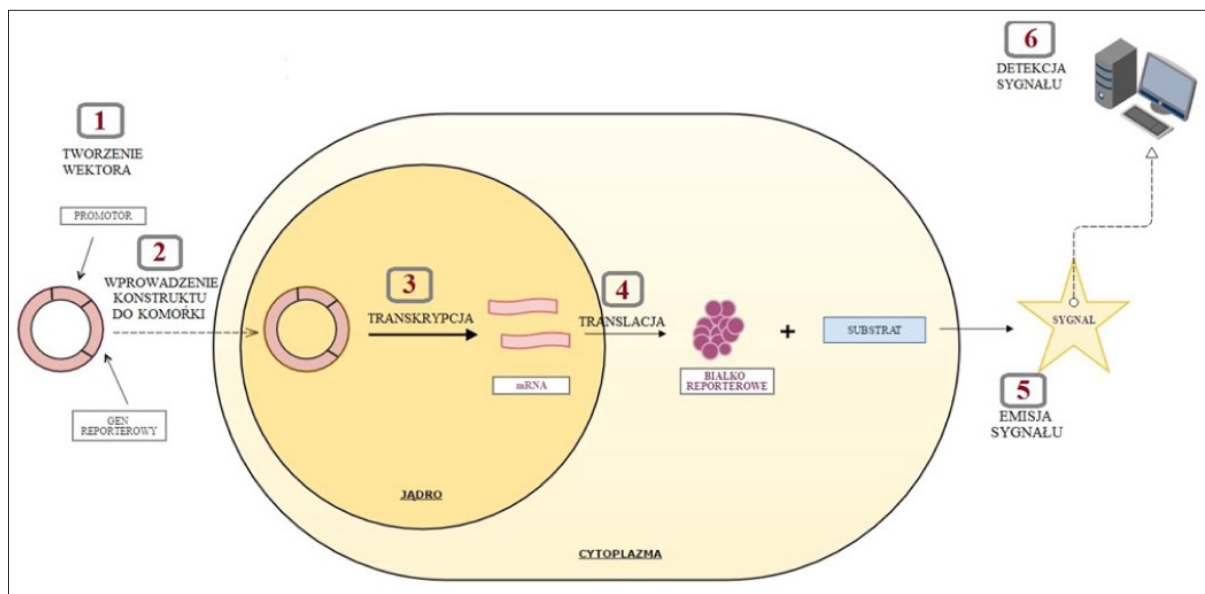
### Charakterystyka metody

Obrazowanie bioluminescencyjne (BLI - bioluminescence imaging) jest jedną z najbardziej czułych technik pozwalających na przeprowadzanie badań *in vivo* na poziomie molekularnym [32]. Do poddawanego obrazowaniu organizmu wprowadza się konstrukty zawierające geny niezbędne do zajścia procesu bioluminescencji. Dzięki temu możliwe jest wykorzystanie zjawiska w badaniu organizmów, które nie mają naturalnej umiejętności emisji promieniowania świetlnego. Interakcja między lucyferazą i lucyferyną – powstająca w wyniku ekspresji genów konstruktów bądź podawaną z zewnątrz – przyczynia się do powstania sygnału, który jest wykrywany i analizowany przez odpowiednią aparaturę [2,30] (ryc. 6). Technika jest tania i nieskomplikowana, nie wymaga więc zaangażowania wysoko wykwalifikowanej kadry pracowniczej. Jest również nietoksyczna i umożliwia szybkie zaobserwowanie skutków badania [42]. Cechuje się wysokim stosunkiem tzw. sygnału użytecznego do szumu (tła), co pozwala na detekcję nawet bardzo słabych sygnałów swoistych [22]. W obrazowaniu bioluminescencyjnym używa się kamer z matrycą CCD

(charge coupled device), które są bardzo czułe i umożliwiają nie tylko określenie liczby powstających fotonów, ale także dokładne umiejscowienie zjawiska w badanej próbce lub organizmie [35]. Większa wydajność pracy takiej kamery może być osiągnięta, gdy przed przystąpieniem do obrazowania podda się ją schłodzeniu, najczęściej do temperatury oscylującej około minus 80°C. Ma to na celu redukcję występowania szumów o charakterze termicznym [8]. Technika BLI odznacza się jednak także pewnymi ograniczeniami. Problemem okazało się rozpraszanie i absorpcja sygnału przez tkanki zwierzęcia poddanego BLI. Barwnikami, które charakteryzują się zdolnością pochłaniania światła są np. melanina czy hemoglobina. Rozpraszanie generuje natomiast problemy związane z detekcją promieniowania świetlnego pochodzącego z głęboko położonych tkanek [26]. Dlatego też niemożliwe jest, jak dotąd, zastosowanie techniki BLI w obrazowaniu dużych organizmów, w tym człowieka. Inną trudnością jest rozdzielenie fotonów pochodzących z tkanek bezpośrednio z sobą sąsiadujących. Jest to spowodowane głównie tym, że BLI jest techniką dwuwymiarową, o małej rozdzielczości przestrzennej [22]. Nowoczesne rozwiązania techniczne umożliwiają jednak wyeliminowanie tej niedogodności. Mimo gorszej rozdzielczości otrzymywanych zdjęć, obrazowanie bioluminescencyjne w przeciwieństwie do technik pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) czy tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów (SPECT), umożliwia przeprowadzenie badań wielu organizmów, w krótkim czasie i przy małym nakładzie finansowym. Tym samym technika BLI stała się jedną z najczęściej stosowanych technik obrazowania i wciąż trwają prace nad jej udoskonalaniem [26].

### Lucyferazy stosowane w BLI

Pierwsza opisana próba wykorzystania BLI była w 1995 r., przeprowadzona przez C.H. Contaga i wsp., opierała się na wprowadzeniu do genomu bakterii *Salmonella Typhimurium* operonu *lux*, pochodzącego z bakterii *Photobacterium luminescens* [22]. Badania przeprowadzono w celu otrzymania bakterii zdolnych do autoluminescencji, a następnie zainfekowano nimi myszy, by móc ocenić ich reakcję na antybiotykoterapię [30]. Opisana



Ryc. 6. Schemat techniki BLI z użyciem genu reporterowego

metoda jest jednym ze sposobów przeprowadzania BLI z użyciem komórek bakteryjnych, natomiast nie znalazła zastosowania w znakowaniu komórek ssaków [22,26]. Istnieje jednak wiele lucyferaz, nie pochodzących z bakterii, które można wykorzystać w obrazowaniu organizmów wyższych. Wieloletnie badania ich właściwości (tabela 1) pozwoliły na wyselekcjonowanie takich, które mają najszerszy zakres zastosowań (ryc. 7) [8,26,30].

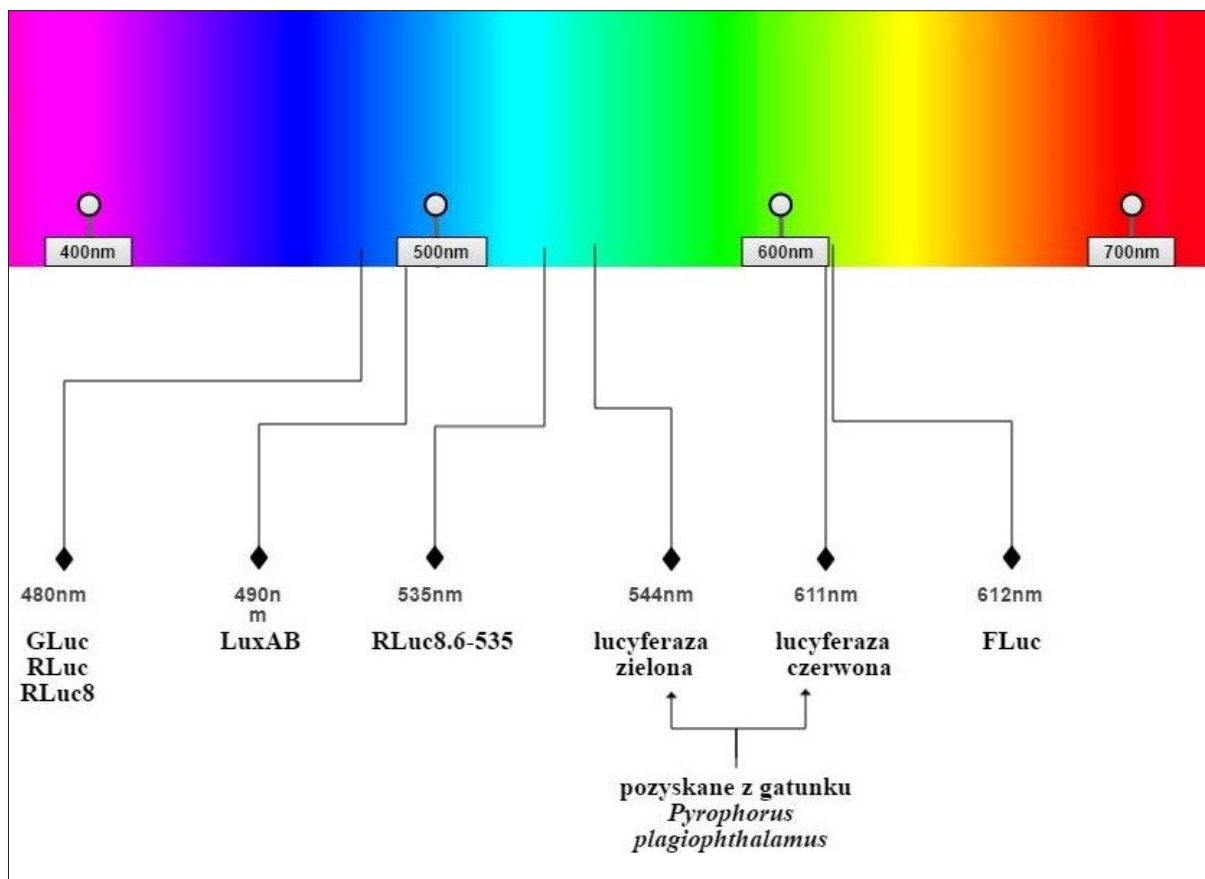
Wśród lucyferaz używanych w technice BLI najbardziej są pożądane te, które w reakcji z lucyferyną emitują promieniowanie w zakresie barwy czerwonej ( $\lambda > 600$  nm). To właśnie fale o tej długości najłatwiej przenikają przez tkanki i w przeciwieństwie do krótszych fal, nie są tak łatwo absorbowane przez naturalnie występujące w organizmie pigmenty. Emisję w tym zakresie stwierdza się w reakcjach, w których udział biorą lucyferazy pozyskiwane z gatunków *Photinus pyralis* oraz *Pyrophorus plagiophthalmus* [30]. Do reakcji bioluminescencji niezbędna jest m.in D-lucyferyna, którą podaje się dootrzewnowo. Charakteryzuje się dużą biodostępnością i z łatwością przenika barierę krew-mózg oraz krew-łożysko. Maksymalny efekt bioluminescencji można zauważyć po 10 min od zaaplikowania D-lucyferyny i utrzymuje się nawet do 30 min. Wynika z tego, że D-lucyferyna jest substratem względnie stabilnym w warunkach *in vivo*. Opisany rodzaj BLI jest wykorzystywany w badaniach wymagających technik o dużej czułości [22]. Lucyferazami o właściwościach zupełnie odmiennych od lucyferazy FLuc są GLuc oraz RLuc, które jako substrat wykorzystują koelenterazynę, a długości fali emitowane w katalizowanych przez nie reakcjach najczęściej osiągają wartości rzędu 480 nm, co odpowiada barwie niebieskiej widma optycznego. Zoptymalizowana wersja enzymu RLuc - RLuc8.6-535 - w reakcji z koelenterazyną przyczynia się do emisji promieniowania o długości fali 535 nm, co jednak wciąż nie

pozwala osiągnąć próg zakresu światła czerwonego. Zwiększa to rozproszenie promieniowania w tkankach organizmu poddawanego działaniu techniki BLI. Koelenterazyna jest podawana w postaci iniekcji do żyły ogonowej bądź dosercowo, a gdy znajdzie się w osoczu ulega autooksydacji. Utleniona postać substratu przyczynia się do wzrostu szumów w czasie detekcji, powodując, że czułość techniki jest niższa niż BLI z użyciem lucyferazy FLuc i D-lucyferyny. Koelenterazyna słabiej niż D-lucyferyna przenika przez bariery krew-tkanki. Jej biodostępność jest ograniczona ze względu na obecność w błonach komórkowych ssaków glikoproteiny P (P-gp), kodowanej przez gen *MDR1* (multidrug resistance gene 1), która przyczynia się do usuwania substratu z komórek organizmu zwierzęcia poddawanego obrazowaniu bioluminescencyjnemu [26]. Inną cechą odróżniającą koelenterazynę od D-lucyferyny jest to, że już po zaledwie jednej minucie od podania, osiągany jest maksymalny efekt bioluminescencji, a jego zanik obserwuje się po 10 min [20].

### Systemy obrazowania bioluminescencyjnego

W dobrym zrozumieniu różnic między poszczególnymi systemami BLI istotne jest opisanie lucyferazy w charakterze genu reporterowego. Gen taki, by odpowiednio spełniał swoją funkcję, nie powinien naturalnie występować w materiale genetycznym komórki, zatem zostaje do niej wprowadzony z użyciem odpowiedniego wektora. Jego ekspresja prowadzi do powstania białka lub jego fragmentu, które po interakcji ze swoistym substratem pozwala na zwizualizowanie wybranych procesów komórkowych [39]. Obrazowanie bioluminescencyjne jest zatem możliwe jedynie wtedy, gdy w badanym organizmie lub hodowli *in vitro* znajdują się komórki zawierające w materiale genetycznym aktywny gen lucyferazy. By tak się stało należy przeprowadzić proces wyizolowania genu





Ryc. 7. Lucyferazy najczęściej używane w BLI

kodującego ten enzym z organizmu dawcy, wklonowaniu go do odpowiedniego wektora molekularnego wraz ze swoistym promotorem oraz badaną sekwencją, a następnie na transfekcji tak skonstruowanym wektorem wybranych komórek organizmu biorcy [1]. Po podaniu substratu swoistego dla lucyferazy można ocenić wydajność procesu. Polega to na pomiarze sygnału świetlnego emitowanego przez poddane manipulacjom komórki i porównaniu z kontrolą, której nie poddano transformacji [14]. Z genów reporterowych korzysta się głównie przy ocenie wydajności transkrypcji, lecz zakres jej zastosowań jest znacznie szerszy. Są to badania nad mechanizmami regulacji ekspresji genów, ocena interakcji występujących między białkami oraz analiza ich aktywności w poszczególnych procesach komórkowych. Geny reporterowe dostarczają także informacji o szlakach sygnałowych komórek oraz o procesach, które w nich zachodzą podczas infekcji lub kancerogenezy. Należy jednak pamiętać, że niezwykle ważny jest odpowiedni dobór lucyferazy oraz wektora (w tym także odpowiedni dobór promotora) [1]. W zależności od wykonywanej analizy, może się także okazać, że niezbędne będzie wykorzystanie więcej niż jednego białka reporterowego lub połączenie BLI z inną techniką [1,8,35].

W technice BLI można wykorzystywać jeden lub kilka genów reporterowych, przy czym nie wszystkie z nich muszą być genami kodującymi lucyferazę. Najczęściej

jednak są stosowane wektory z pojedynczym genem lucyferazy, wykazującym ekspresję konstytutywną. Dzięki temu pomiary bioluminescencji mogą być prowadzone w trybie ciągłym, a więc znajdują zastosowanie w obrazowaniu żywych organizmów - nie ma konieczności uśmiercania zwierzęcia biorącego udział w badaniu. Przyczynia się to do redukcji liczby zwierząt laboratoryjnych zaangażowanych w doświadczenie, co ma znaczący wymiar etyczny. W przypadku BLI wykorzystującego jeden gen reporterowy ważna jest obserwacja zmian natężenia emitowanego światła w stosunku do stanu pierwotnego. Na tej podstawie można określać takie parametry, jak np. skuteczność podawanego leku w stosunku do komórek nowotworowych. [8]. Badania z wykorzystaniem BLI w stanie stacjonarnym prowadził McMillin i wsp. [28]. Dotyczyły m.in. wpływu obecności komórek zrębu w mikrośrodowisku guza na przeżywalność komórek nowotworowych w czasie podawania określonych leków. Badania wykazały, że takie leki jak imatinib, nilotinib, deksametazon i doksorubicyna wykazują mniejszą aktywność przeciwnowotworową w obecności komórek zrębu, natomiast związek o nazwie reversine działa przeciwnie. Wnioski wyciągnięto na podstawie emitowanego przez transfekowane komórki nowotworowe promieniowania - gdy pomiar wskazywał na ograniczenie zjawiska bioluminescencji w porównaniu do obserwacji prowadzonej przed rozpo-

częciem terapii, świadczyło to o skutecznym działaniu leku. Badania z użyciem BLI pozwalają zatem także na porównywanie aktywności różnych preparatów terapeutycznych, a pośrednio również na śledzenie mechanizmów wpływających na powstawanie lekooporności [28]. Innym przykładem wykorzystania tego rodzaju BLI są badania przeprowadzone przez J. Kima i wsp. [25]. Stworzyli wektor lentiwirusowy zawierający zmodyfikowany gen *luc2* wraz z promotorem ludzkiej ubikwityny i wprowadzili do komórek linii 4T1 mysiego raka sutka. Zabieg pozwolił na późniejszą obserwację rozwoju guza i monitorowanie procesu przerzutowania u myszy, które uległy transfekcji wektorem [25].

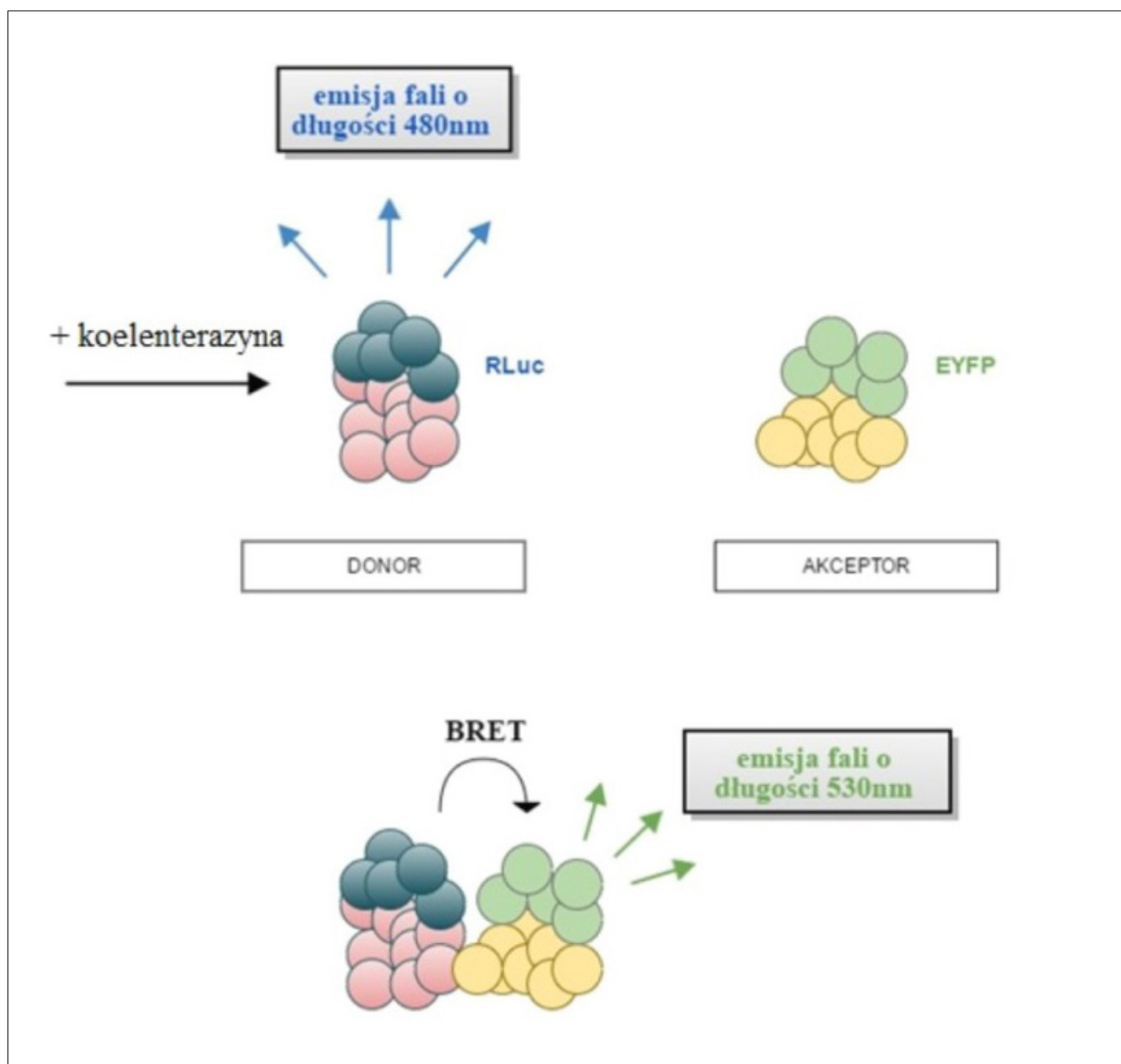
Wykorzystanie w technice obrazowania bioluminescencyjnego kilku genów reporterowych charakteryzuje się większą dokładnością i wiarygodnością otrzymanych wyników niż to z wykorzystaniem pojedynczego reportera [1]. Geny można dobierać dowolnie, choć produkty ich ekspresji muszą się różnić na tyle, by możliwa była odrębna detekcja powstającego sygnału [8]. Cechą różnicującą jest najczęściej długość emitowanej fali promieniowania świetlnego. W badaniach wykorzystujących jeden gen reporterowy często pojawiają się problemy związane z różną wydajnością transfekcji komórek wektorem zawierającym gen. Stwarza to trudności w wyznaczeniu czasu rozpoczęcia emisji. Należy również pamiętać o czynnikach, takich jak błąd pipetowania, zróżnicowanie komórek pod względem metabolizmu lub mechanizmów obronnych, czy zróżnicowana żywotność komórek w poszczególnych próbach poddawanych analizie. Wszystkie te cechy powodują powstawanie zafałszowanych wyników, czego można uniknąć wprowadzając do badań drugi gen reporterowy [1]. Popularnym i często wykorzystywanym przykładem jest użycie genu lucyferazy świetlika *Photinus pyralis* z genem lucyferazy widłonoga *Renilla reniformis*. Produkty ekspresji tych genów różnią się zarówno substratami reakcji, jak i długością emitowanej fali [22]. Ważne jest, by oba geny były pod kontrolą wspólnego promotora [1]. BLI z wykorzystaniem kilku reporterów stosuje się podczas badań, w których pomiarom poddaje się więcej niż jeden rodzaj komórek oraz w czasie analizy genów, które ulegają zmiennej ekspresji, np. zależnie od rytmu dobowego [8].

Istotnym rodzajem obrazowania bioluminescencyjnego jest tzw. BLI wieloskładnikowe, w którym oprócz lucyferazy, używa się także składników, które nie wykazują zdolności do bioluminescencji [8]. Najczęściej są to białka fluorescencyjne, ze względu na ich dużą podatność na modyfikacje genetyczne, co pozwala na tworzenie białek fuzyjnych z ich udziałem. Inne komponenty, których używa się w tym typie obrazowania, to małe barwniki organiczne lub nanocząsteczki, z których najbardziej są popularne kropki kwantowe (QD – quantum dots) [47]. Zjawiskiem, które pozwala zrozumieć procesy zachodzące w BLI z wykorzystaniem lucyferazy i wymienionych cząsteczek, jest BRET (bioluminescence resonance energy transfer) (ryc. 8). Dany proces można rozumieć

jako wymianę energii między donorem, który emituje promieniowanie, a akceptorem, który to promieniowanie absorbuje [30]. Interakcja jest możliwa jedynie wtedy, gdy obie cząsteczki znajdują się blisko siebie w przestrzeni. Istotne jest także, że emitowana w wyniku BRET fala promieniowania, jest dłuższa od wcześniej zaabsorbowanej [32]. Wskutek tego sygnał odbierany w czasie detekcji jest wyraźniejszy, umożliwiając wykorzystanie BRET w badaniu głęboko położonych tkanek [13]. Donorem w tym procesie jest lucyferaza, natomiast rolę akceptora pełni białko fluorescencyjne, wymienione wcześniej QD lub małe cząsteczki barwników organicznych [47]. Zjawisko BRET po raz pierwszy opisano jako zachodzące naturalnie w organizmie meduzy *Aequorea victoria* [42]. Ekworyny często używa się jako cząsteczki pełniącej rolę donora. Innym popularnym enzymem w technice BRET jest RLuc z widłonoga *Renilla reniformis* [13]. Jako cząsteczek akceptorowych często używano natomiast białka GFP (green fluorescent protein) pozyskanego, tak jak w przypadku ekworyny, z gatunku *Aequorea victoria*, ze względu na to, że było najlepiej poznane. Z czasem jednak techniki inżynierii genetycznej pozwoliły na przeprowadzanie dowolnych modyfikacji, zarówno cząsteczek donorowych, jak i akceptorowych [47]. Obecnie wszystkie z tych cząsteczek modyfikuje się zależnie od potrzeb, jakie stawia dana analiza przeprowadzana z użyciem BRET. Przy stosowaniu tej techniki należy wziąć pod uwagę takie właściwości jak szeroki zakres emisji czy duża wydajność kwantowa donora. Gdy analizy dotyczą badań *in vivo*, wymagane jest także, by akceptor emitował promieniowanie w zakresie barwy czerwonej widma [13]. Coraz częściej są jednak stosowane technologie bazujące na wykorzystaniu kropek kwantowych. Są to nanokrystaliczne półprzewodniki, a ich popularność wzrasta dzięki niestandardowym właściwościom fizycznym [47]. Duże nadzieje wiąże się z ich zastosowaniem w obrazowaniu całych organizmów *in vivo*, chociaż jeszcze są problemy związane ze stabilnością tych molekuł w tkankach. W celu ograniczenia przeszkody stworzono modele specjalnych nanokapsulek, które składają się ze zmodyfikowanego białka fluorescencyjnego otoczonego cienką powłoką poliakrylamidową, kowalencyjnie połączonego z cząsteczkami QD [32]. W obrazowaniu bioluminescencyjnym wieloskładnikowym poza BRET można też wyróżnić drugą metodę, w której składnikami są dwie domeny lucyferazy: tzw. C-końcowa oraz N-końcowa. W chwili gdy ulegają rozdziałowi, np. za pomocą odcinka łącznikowego, nie dochodzi do emisji promieniowania [8]. Badania wykazały jednak, że emisja zachodzi, gdy każdą z domen przyłączy się do białek, które wchodzą ze sobą w interakcje [2]. Ten sposób jest mniej skomplikowany niż BRET i nie wymaga przeprowadzania tak wielu modyfikacji [8]. Obie metody są wykorzystywane w badaniu zależności między białkami, zarówno w badaniach *in vivo*, jak i w hodowlach komórkowych [2].

### Znakowanie komórek macierzystych

Komórki macierzyste są zdolne do samoodnowy i różnicowania w inne typy komórek. Ze względu na tę właściwość przewiduje się ich potencjalne wykorzystanie



Ryc. 8. Zjawisko BRET na przykładzie interakcji RLuc z EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) – mutantem białka GFP

w medycynie regeneracyjnej. Od odkrycia ich możliwości intensywnie prowadzono badania weryfikujące losy komórek macierzystych *in vivo*. Komórki te po wprowadzeniu do organizmu migrują do różnych organów, więc niemal niemożliwe było ich zlokalizowanie klasycznymi metodami biologicznymi. Techniki obrazowania umożliwiły naukowcom ocenę ich umiejscowienia oraz zdolności do różnicowania i przetrwania w organizmie. Możliwe stało się zatem dokładniejsze prowadzenie badań nad rolą komórek macierzystych w terapii i diagnostyce wielu schorzeń. Twierdzi się, że mogą być zastosowane m.in. w chorobach serca. Wielokrotnie przypuszczano jakoby wykorzystanie komórek sercowych otrzymanych z embrionalnych komórek macierzystych mogło się przyczynić do odzyskania przez serce prawidłowych funkcji po przebytym wcześniej zawale. Badania z użyciem techniki BLI wykazały jednak, że większość tych komórek umiera w przeciągu bardzo krótkiego czasu od wprowadzenia

do organizmu. Obrazowanie bioluminescencyjne umożliwiło więc określenie problemu dotyczącego braku skuteczności planowanej terapii po zawale serca i otworzyło drogę do prowadzenia badań nad większą przeżywalnością komórek macierzystych w organizmie człowieka [11]. Badania związane z sercowymi komórkami macierzystymi prowadzili także Funakoshi i wsp. [17]. Celem ich analiz była optymalizacja indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych mogących różnicować w kierunku kardiomiocytów oraz ich wszczepiania do serca dawcy. Badacze wyznaczyli komórki, które były zdolne do proliferacji przez 3 miesiące od chwili ich wszczepienia, a następnie przestawały się dzielić i wykazywały cechy charakterystyczne dojrzałych kardiomiocytów wpływając na poprawę funkcji serca. Technika BLI miała podstawowe znaczenie dla tego badania przez umożliwienie obserwowania liczby komórek, które zostały prawidłowo wszczepione i zachowały swoje funkcje [17]. Kardiologia nie jest

jednak jedyną dziedziną nauki, w której bada się wpływ komórek macierzystych na regenerację tkanek. Poważnie nadzieje wiąże się chociażby z ich udziałem w terapii chorób neurodegeneracyjnych. Neuronalne komórki macierzyste stały się więc przedmiotem licznych badań, które mają doprowadzić do zrozumienia genetyki oraz opracowania skutecznej terapii tych schorzeń. Badania wykorzystujące technikę BLI w celu lepszego poznania neuronalnych komórek macierzystych były przeprowadzone przez Hwanga i wsp. [23]. W tym celu komórki wyznakowano bioluminescencyjnie i umieszczono w dwóch odmiennych typach hydrożelu, które są uważane za potencjalne nośniki umożliwiające skuteczne wprowadzenie neuronalnych komórek macierzystych do mózgu objętego procesem neurodegeneracyjnym. BLI znalazło tu zastosowanie w analizie sygnału pochodzącego z komórek, która umożliwiła ocenę ich przeżywalności i zdolności proliferacyjnych po zamknięciu w żelu i wszczępieniu do organizmu myszy [23]. Obrazowanie bioluminescencyjne zastosowano również w monitorowaniu przeżywalności komórek macierzystych wykorzystywanych w terapii schorzeń układu naczyniowego, takich jak choroba tętnic obwodowych, czy też w lokalizowaniu mezenchymalnych komórek macierzystych różnicujących w osteoblasty po ich przeszczepie wykonanym u myszy ze złamaniem kości udowej [21]. Jak dowodzą powyższe przykłady, obrazowanie bioluminescencyjne *in vivo* jest jedną z podstawowych metod wykorzystywanych obecnie w badaniach nad komórkami macierzystymi i jest dobrym narzędziem w śledzeniu ich losów po wprowadzeniu do organizmu zwierzęcia [11].

### Monitorowanie zakażeń wirusowych

Technika obrazowania bioluminescencyjnego pozwala badaczom na analizowanie przebiegu zakażeń wirusowych oraz odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Badania przeprowadzane w tym kierunku obejmują m.in. obserwację aktywności genów odpowiedzialnych za odporność na zakażenie wirusem, śledzenie komórek układu immunologicznego, analizę procesu replikacji patogenu, czy odpowiedź organizmu na uszkodzenie określonych struktur w wyniku zakażenia. Wszystkie mają na celu lepsze poznanie wpływu badanych wirusów na organizm zwierzęcia oraz sprawdzenie skuteczności działania leków w zwalczaniu chorób pojawiających się wskutek zakażenia [27]. Niestety występują również pewne ograniczenia stosowania techniki BLI w tym przypadku, takie jak niewielki genom RNA-wirusów, do którego trudno jest wprowadzić stosunkowo duży gen reporterowy – może to doprowadzić do atenuacji, jak dzieje się w przypadku wirusa grypy typu A. Konstrukcji wektorów wirusowych z wklonowanym genem lucyferazy jeszcze dokładniej nie opisano. Wiadomo natomiast, że najczęściej wykorzystywanym tu promotorem genów reporterowych jest promotor ludzkiego wirusa cytomegalii (HCMV - human cytomegalovirus) ze względu na utrzymywanie wysokiego poziomu ekspresji. Wykazano także, że wirus opryszczki HSV-1 (herpes simplex virus 1) jest podatny na znakowanie lucyferazą i możliwe jest

nie tylko jakościowe, ale także ilościowe monitorowanie przebiegu zakażenia [9]. Coleman i McGregor [9] opisali kilka z najważniejszych osiągnięć w badaniu zakażeń wirusowych za pomocą BLI. Są wśród nich badania wykonane na myszach, które poddano metodzie knock-out względem genów receptorów oraz genów odpowiedzi interferonu typu I i II, a następnie transfekcji rekombinowanym wirusem HSV-1 znakowanym lucyferazą świetlika. Miały na celu zbadanie roli, którą odgrywają interferony w zakażeniu tym wirusem. Opisano także użycie BLI w badaniu latencji oraz reaktywacji herpeswirusów, a także w analizie roli makrofagów podczas zakażenia wirusem krowianki. Wzięto pod uwagę także obrazowanie progresji zakażenia wirusowego w przypadku wirusa dengi oraz grypy typu A i wspomniano o zmianach w detekcji sygnału po traktowaniu zakażonych myszy przeciwciałami monoklonalnymi [9].

### Znakowanie komórek bakteryjnych

W zakażeniach bakteryjnych, wiele interakcji między gospodarzem a patogenem wciąż nie jest dobrze poznanych. Obrazowanie bioluminescencyjne umożliwia jednak szybkie i proste oznaczanie lokalizacji bakterii w zakażonym organizmie oraz szybkości rozprzestrzeniania się zakażenia. Wiles i wsp. [43,44] prowadzili badania na bakterii z rodzaju *Citrobacter* transformowanych plazmidem zawierającym operon *luxCDABE* i odkryli, że podczas kolonizacji zajmują najpierw część jelita ślepego, a dopiero po pewnym czasie rozprzestrzeniają się w okrężnicy. Zauważyli także, że po ich wyizolowaniu z organizmu myszy, do wywołania ponownego zakażenia potrzebna jest znacznie mniejsza liczba bakterii. Nie wykryto ich w jelicie ślepy, co świadczy o tym, że od razu były zdolne do kolonizacji okrężnicy. Ponieważ informacja o umiejscowieniu i przebiegu zakażenia jest podstawą do opracowania odpowiedniej terapii, próbowano podobne modyfikacje przeprowadzać także na bakterii Gram-dodatnich. Niestety operon *luxCDABE* nie ulega ekspresji u bakterii przynależących do tej grupy, w związku z czym zaczęły się pojawiać nowe pomysły na rozwiązanie tego problemu. Najskuteczniejszym była idea wprowadzona przez Francisca i wsp. [15], którzy skonstruowali swoiste miejsce wiązania rybosomu i umiejscawiali je przed każdym genem operonu. Nową konstrukcję nazwano *luxABCDE* i z powodzeniem jest stosowana w technice BLI do obrazowania bakterii Gram-dodatnich [22]. W ostatnim czasie powstało także wiele publikacji o monitorowaniu za pomocą techniki BLI procesów biotransformacji substancji związanych z zakażeniami bakteryjnymi, np. enterotoksyny wytwarzanej przez *Staphylococcus aureus* czy czynników EF (edema factor) oraz LF (lethal factor), które są składowymi toksynami bakterii z gatunku *Bacillus anthracis* [31,36].

### Monitorowanie zakażeń grzybiczych i pasożytniczych

Do innych czynników chorobotwórczych, które można monitorować technikami obrazowania bioluminescencyjnego

cyjnego zalicza się również pasożyty oraz grzyby. Saeji i wsp. [37] badali zmiany w szybkości replikacji oraz zdolność do reaktywacji w przewlekłym zakażeniu spowodowanym przez pierwotniaka z gatunku *Toxoplasma gondii*. Franke-Fayard i wsp. [16] prowadzili natomiast badania nad *Plasmodium berghei* - skonstruowali trzy różne modele tego pasożyta, wykazujące ekspresję genu lucyferazy. Dwa z tych modeli zawierały gen reporterowy pod kontrolą dwóch swoistych promotorów, wykazujących aktywność na różnych etapach rozwoju, a ostatni wykazywał ekspresję na stałym poziomie. Dzięki ich obrazowaniu odkryto, że podczas zakażenia występuje zjawisko sekwestracji w naczyniach kapilarnych tkanki płuc i tłuszczowej, a także sprecyzowano genę powikłań zachodzących w przebiegu malarii mózgowej. Tym samym dowiedziono, że monitorowanie przebiegu zakażenia na różnych etapach rozwoju pasożyta może dostarczyć więcej istotnych informacji niż ten sam zabieg wykorzystujący gen reporterowy ze stałą ekspresją we wszystkich fazach życia. BLI jest także narzędziem odgrywającym ważną rolę w monitorowaniu infekcji grzybiczych [22]. Donat i wsp. [12] skonstruowali bioluminescencyjny model grzyba pleśniowego z gatunku *Aspergillus fumigatus*, który umożliwił monitorowanie przebiegu skórnej aspergiliozy u myszy z osłabionym układem odpornościowym. Użyto do tego celu genu reporterowego lucyferazy z gatunku *Gaussia princeps* [12]. Każde z opisanych badań służyło lepszemu poznaniu patogenezы określonych chorób oraz skonstruowaniu modelu, na którym będzie można testować leki przeciwko wymienionym pasożytom i grzybom [22].

### Znakowanie komórek nowotworowych

Onkologia jest kolejną dziedziną nauki korzystającą z możliwości obrazowania bioluminescencyjnego. Rokowania w chorobach nowotworowych często zależą od procesów wpływających na rozrost guza oraz zdolności do przerzutowania. Należą do nich m.in.: angiogeneza, zjawisko lokalnej hipoksji, zdolności proliferacyjne komórek oraz wszystkie zmiany na poziomie molekularnym w obrębie szlaków komórkowych, nadekspresji lub hamowania ekspresji określonych genów i wiele innych. Śledzenie komórek nowotworowych jest bogatym źródłem informacji na temat ich losów w organizmie. Najczęstszą praktyką stosowaną w obrazowaniu wymienionych procesów jest modyfikacja *ex vivo* komórek rakowych, które charakteryzują się stałą ekspresją lucyferazy pod kontrolą swoistych promotorów, aktywnych w czasie nowotworzenia. Komórki te mogą być potem wprowadzone do organizmu modelu zwierzęcego stworzonego dla danego typu nowotworu i tam poddane obserwacji [2]. Badania według tego schematu przeprowadził zespół da Ros i wsp. [10] podczas analizowania wpływu terapii skojarzonej doksorubicyny z morfiną na rozrost glejaka mózgu. Naukowcy wykorzystali doniesienia naukowe o zdolności morfiny do zmiany przepuszczalności bariery krew-mózg i wprowadzili ją do chemoterapii. BLI posłużyło im do porównania wartości sygnału emitowanego przez komórki glejaka linii

U87MG ze stabilną ekspresją lucyferazy (tzw. U87MG-luc) między dwiema grupami myszy. Pierwsza z grup była poddana terapii skojarzonej doksorubicyna + morfina, a drugą eksponowano tylko na działanie doksorubicyny. Wyniki wskazały na pięciokrotnie niższą siłę sygnału u myszy poddanych leczeniu z morfiną. Oznacza to, że obrazowanie bioluminescencyjne także i w tym przypadku może służyć analizowaniu nowych terapii i sprawdzaniu skuteczności leków na różnych modelach badawczych [10]. Vantaggiato i wsp. [41] na potrzeby badań stworzyli z użyciem genu lucyferazy świetlika transgeniczną mysz - ERE-Luc. Jest to model zwierzęcy, służący do analizy udziału receptorów estrogenowych w procesie rozwoju nowotworów piersi. BLI znalazło w nim zastosowanie jako metoda pomiaru sygnału wytwarzanego przez estrogenowe elementy odpowiedzi po indukowanej związkami DMBA (9,10-dimethyl 1,2-benzanthracene) kancerogenezie [41]. Innowacyjny pomysł wykorzystania techniki obrazowania bioluminescencyjnego przedstawił natomiast McMillin i wsp. [28] tworząc nową jego odmianę - wybiórczo obrazującą komórki guza w hodowli *in vitro* (CS-BLI - cell-specific *in vitro* bioluminescence imaging). Umożliwiło im to porównanie działania leków przeciwnowotworowych w obecności lub bez innych typów komórek, takich jak np. komórki zrębu [28]. BLI odegrało także istotną rolę w obrazowaniu procesu apoptozy, którego monitorowanie jest niezwykle istotnym badaniem w trakcie oceny skuteczności terapii przeciwnowotworowej. Niers i wsp. [29] stworzyli białko fuzyjne składające się z GFP oraz lucyferazy *Gaussia princeps*, oddzielone peptydem DEVD, rozpoznawanym przez kaspazy-3 i -7. Aktywność tych kaspaz świadczy o indukcji apoptozy, zatem sygnał emitowany w wyniku przecięcia peptydu DEVD i uwolnienia białek reporterowych jest wyznacznikiem rozpoczęcia tego procesu w komórce. Podobny mechanizm działania dotyczy kompleksu, na który składa się lucyferyna oraz pochodna kwasu borowego wrażliwa na działanie nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ). Ten model jest wykorzystywany podczas ustalania poziomu stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych ze stabilną ekspresją lucyferazy. Jeśli komórki zawierające opisany kompleks zostaną poddane ekspozycji na działanie  $H_2O_2$ , dochodzi do uwolnienia lucyferyny, a następnie do jej reakcji z lucyferazą i emisji sygnału. Siła sygnału jest więc wprost proporcjonalna do ilości  $H_2O_2$  znajdującej się w komórce, a tym samym do wzrostu poziomu stresu oksydacyjnego [2].

### NOWOCZESNE ROZWIĄZANIA WYKORZYSTUJĄCE ZJAWISKO BIOLUMINESCENCJI

#### Biosensory typu whole-cell

Biosensorymi są struktury składające się z elementu biologicznego, zdolnego do generowania sygnału w odpowiedzi na określony analit oraz detektora, który ten sygnał rejestruje. Częścią biologiczną biosensora mogą być m.in. enzymy, kwasy nukleinowe, przeciwciała, a nawet całe komórki. Uzyskiwany sygnał jest analizo-

wany zależnie od jego charakteru - może to być detekcja fotonów, ale także monitorowanie zmian temperatury bądź przetwarzanie sygnału elektrochemicznego [7]. Najczęściej używanymi komórkami, które tworzą element biologiczny biosensorów są modyfikowane genetycznie komórki drożdży, bakterii oraz komórki ssaków. Zawierają gen reporterowy połączony ze swoją sekwencją regulatorową reagującą na określony analit lub sprecyzowaną grupę analitów. W chwili gdy pojawia się element rozpoznawany przez biosensor, sekwencja regulatorowa ulega aktywacji i dochodzi do ekspresji genu reporterowego. Opracowanie mechanizmu działania biosensorów typu whole-cell pierwotnie znalazło zastosowanie w badaniu toksyczności próbek wody, a wykorzystywano do tego komórki bakterii z gatunków *Vibrio fischeri* oraz *Vibrio harveyi* naturalnie wykazujących bioluminescencję. Z czasem jednak bioczuJNIKÓW tego typu zaczęto używać również do badania innych rodzajów próbek, np. pod kątem obecności metali ciężkich, substancji genotoksycznych, określonych związków aromatycznych, antybiotyków i wielu innych [33]. Biosensory whole-cell są więc pożądanym narzędziem analitycznym w badaniu stanu środowiska, a ze względu na ogólnodostępność i niskie, w porównaniu do innych metod, koszty produkcji, znalazły zastosowanie także w badaniach farmakologicznych i klinicznych [7]. Jednym z warunków prawidłowego funkcjonowania biosensorów komórkowych jest stały kontakt komórek z przetwornikiem. Najczęściej uzyskuje się go immobilizując komórki metodą kapsułkowania na powierzchni urządzenia odbierającego sygnał. Do tego celu korzysta się z polimerów i żeli, a przykładami są alginiany, poliakryloamid czy agarozę. W celu stworzenia skutecznego mechanizmu zdolnego do pomiarów z użyciem biosensorów whole-cell wykorzystano kable światłowodowe. Na jednym końcu kabla znajdują się unieruchomione, żywe komórki, a na drugim fotopowielacz. Mimo problemów związanych z miniaturyzacją takiego systemu przeprowadzono prace nad przenośnym narzędziem, które umożliwiłoby prowadzenie analiz w terenie. W tym celu powstał biosensor BBIC (bioluminescent bioreporter integrated circuit), na który składa się mikroluminometr CMOS (complementary metal oxide semiconductor) zdolny do pomiarów promieniowania świetlnego oraz nadajnik do zdalnej transmisji danych. Obecnie najbardziej skutecznym narzędziem służącym do zliczania fotonów są fotodiody lawinowe (APDs - avalanche photodiodes). Użyte jako element detekcji w biosensorych gwarantują bardzo wysoką czułość [7]. Elementem biologicznym biosensorów, który działa opierając się na bioluminescencji, najczęściej są komórki bakterii, drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz komórki nowotworowe myszy i człowieka. Genami reporterowymi, które najczęściej występują w tych komórkach są gen lucyferazy świetlika oraz operon kodujący lucyferazę bakteryjną. *Escherichia coli* wykazująca ekspresję FLuc znajduje zastosowanie w wykrywaniu takich analitów, jak rtęć i jej związki oraz cynk. Jeśli zawiera geny kodujące lucyferazę bakteryjną, może służyć do analizowania próbek pod kątem obecności alkanów lub tetracyklin. *Pseudo-*

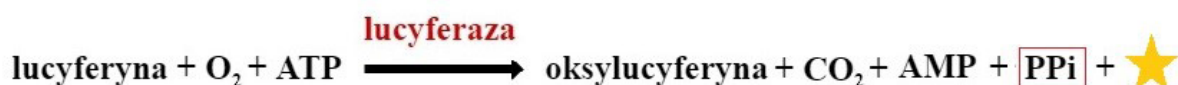
*monas putida* jest składową biosensorów wykrywających związki aromatyczne (np. fenol). Komórki drożdży są natomiast wykorzystywane w biosensorych estrogenów i związków o podobnej budowie. Komórki raka wątroby, zarówno człowieka jak i myszy, są z kolei stosowane w bioczuJNIKÓW związków aromatycznych zawierających w strukturze fluorowce [35].

### Oznaczanie stężenia jonów $Ca^{2+}$ w układach biologicznych

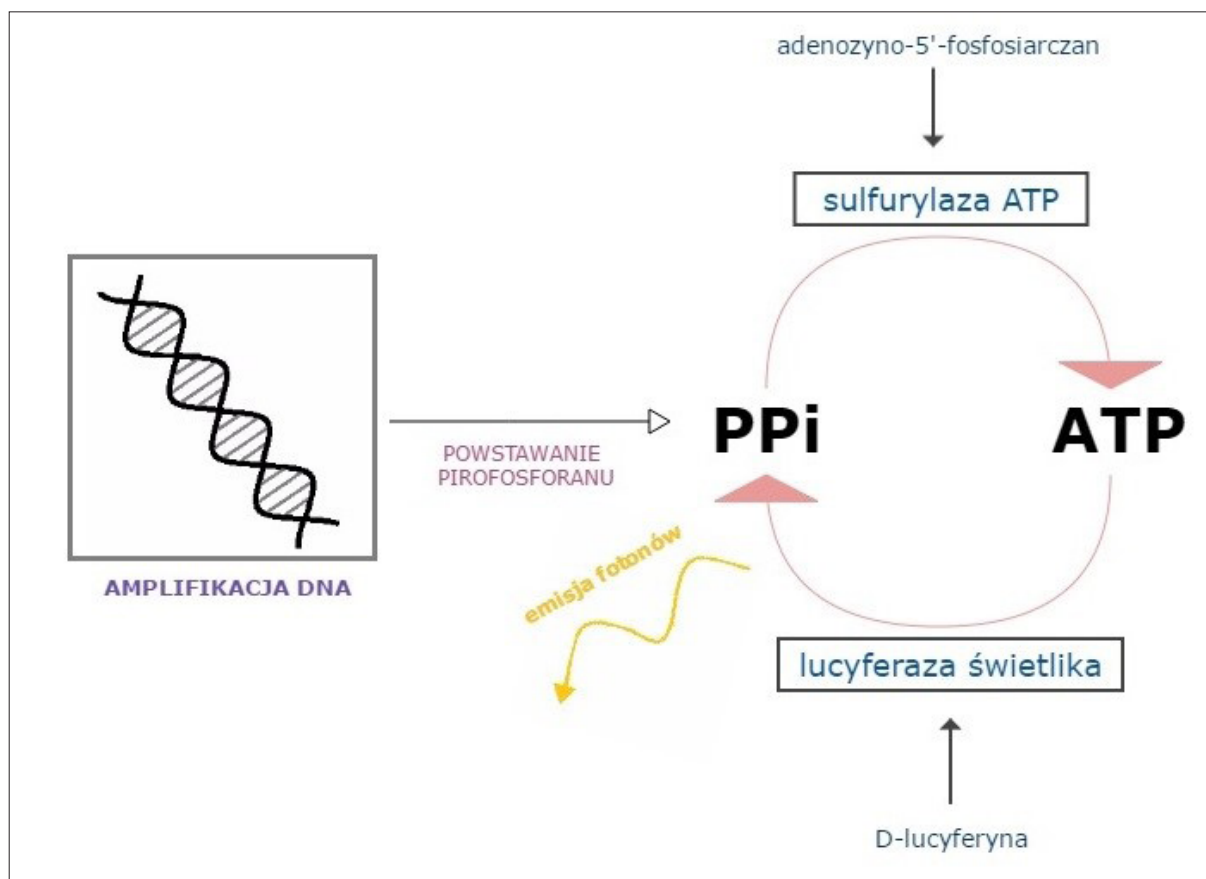
Ekworyna pozyskiwana ze stulbiopława *Aequorea victoria* jest najczęściej stosowanym białkiem służącym do analizy stężenia jonów wapnia w kompartmentach komórkowych, takich jak retikulum endoplazmatyczne czy macierz mitochondrialna [33]. Jest to fotoproteina, która po związaniu z jonami  $Ca^{2+}$  emituje promieniowanie w zakresie światła niebieskiego. Niestety, obrazowanie *in vivo* z jej udziałem w komórkach zwierzęcych charakteryzuje się bardzo niską wydajnością [3]. Rozwiązaniem tego problemu okazało się stworzenie białka fuzyjnego, składającego się z tej fotoproteiny oraz białka zielonej fluorescencji [33]. Użycie techniki BRET umożliwiło wydłużenie fali emitowanego promieniowania i znacząco wpłynęło na wydajność obrazowania. Badania przeprowadzone przez Bakayana i wsp. [3] umożliwiły skonstruowanie nowej odmiany ekworyny nazwanej *Redquorin*, która emituje promieniowanie o długości fali ponad 575 nm. Badania przeprowadzone na komórkach linii HEK-293, po połączeniu z odpowiednim analogiem koelenterazyny, dowiodły jej użyteczności w analizie wahań stężenia jonów wapnia. Ponadto, dokonano także analizy pomiaru stężenia  $Ca^{2+}$  w próbce krwi, która charakteryzuje się tendencją do absorpcji emitowanych fotonów i niezwykle trudno jest przeprowadzić jej obrazowanie. W tym przypadku otrzymano jednak zadowalające wyniki, co daje nadzieję na opracowanie w przyszłości metod umożliwiających skuteczne obrazowanie tej tkanki [3].

### Analizy związane z oznaczaniem ATP

ATP jest wyznacznikiem aktywności metabolicznej komórki, to jedno z najważniejszych źródeł energii i bierze udział w wielu ważnych procesach. Chociaż użycie lucyferazy świetlika do wykrywania cząsteczek ATP jest jednym z najstarszych zastosowań bioluminescencji jako narzędzia w biologii molekularnej, właściwości tej wykorzystuje się w wielu innowacyjnych badaniach. Najczęściej testy bioluminescencyjne do wykrywania ATP znajdują zastosowanie w ocenie czystości powierzchni, ale także w przemyśle spożywczym do określenia przydatności do spożycia [33]. Pomiar ATP opiera się głównie na podstawowej reakcji lucyferazy, angażującej tę wysokoenergetyczną cząsteczkę (ryc. 9). Przykład zastosowania takiego testu przedstawiono w publikacji Kajigaya i wsp. [24], którzy prowadzili badania nad czystością klamek w jednym ze szpitali uniwersyteckich w Japonii. Miały na celu potwierdzenie tezy, iż wiele patogenów przenoszonych jest przez pracowników służby zdrowia,



Ryc. 9. Udział ATP w reakcji utlenienia lucyferyny do oksylycuferyny



Ryc. 10. Schemat techniki BART

którzy mają ciągły kontakt z takimi mikroorganizmami jak oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus*, czy odporne na wankomycynę bakterie z rodzaju *Enterococcus*. Analiza była prowadzona z użyciem bioluminescencyjnego testu wykrywającego ATP, którego stężenie podczas pomiaru wzrasta adekwatnie do liczby drobnoustrojów znajdujących się na badanej powierzchni. Opublikowane wyniki miały wpłynąć na częstsze i dokładniejsze przeprowadzanie procesów dezynfekcji w pomieszczeniach szpitalnych oraz uczulić personel szpitala na większą dbałość o higienę rąk w czasie pracy [24].

Inną czułą metodą służącą do wykrywania ATP jest połączenie reakcji zachodzącej z udziałem lucyferazy świetlika, z reakcją amplifikacji ATP. Wykorzystanie adenozyno-5'-fosfosiarczanu oraz pirofosforanu (PPi) znacząco zwiększyło wydajność analizy. Dzięki niej, możliwe stało się wykrywanie ATP na poziomie, który wykazuje pojedynczą jednostką tworzącą kolonie bakteryjne (CFU - colony forming unit). Z czasem zaczęto wykorzysty-

wać tę metodę w technikach jakościowego i ilościowego oznaczania kwasów nukleinowych. W tym celu opracowano analizę BART (bioluminescent assay in real-time), która stała się alternatywą popularnej metody PCR [33]. BART opiera się na zjawisku powstawania nieorganicznego pirofosforanu podczas amplifikacji kwasu nukleinowego (ryc. 10). PPi ulega reakcji z udziałem enzymu sulfurylasy ATP, w wyniku której powstaje ATP. Następnie ta wysokoenergetyczna cząsteczka uczestniczy w reakcji termostabilnej lucyferazy świetlika, podczas której uzyskuje się emisję fotonów, a ATP ponownie ulega konwersji do pirofosforanu. Ilość emitowanego promieniowania jest wprost proporcjonalna do ilości powstałego PPi, a więc także do stężenia syntezowanego kwasu nukleinowego. BART jest techniką, która nie wymaga zaawansowanych technologicznie detektorów promieniowania świetlnego, a także przyczynia się do łatwego wyznaczenia próbek ujemnych w procesie amplifikacji. Ponadto pozwala na monitorowanie reakcji w czasie rzeczywistym, jest tania i w połączeniu

z innymi technikami, np. LAMP (loop-mediated isothermal amplification), stanowi doskonałe narzędzie do prowadzenia badań nad kwasami nukleinowymi [18].

### Testy immunologiczne wykorzystujące zjawisko bioluminescencji

Zjawisko bioluminescencji jest często wykorzystywane w testach wykrywających określone anality; jednym z nich jest test immunoenzymatyczny BLEIA (bioluminescent enzyme immunoassay). Częsteczkami docelowymi, które są oznaczane tą metodą mogą być białka, takie jak PAP (prostatic acid phosphatase) czy angiotensyna II, ale także bakterie, wirusy oraz niewielkie cząsteczki, np. kortyzol i digoksyna. Rolę cząsteczki znakującej może pełnić lucyferaza świetlika, choć używa się jej rzadko, ze względu na częste występowanie zjawiska utraty aktywności po połączeniu z przeciwciałem. Alternatywą jest biotynylowana lucyferaza *Cypridina*, która jest użyteczna w testach wykrywających interferon  $\alpha$ . Do innych cząsteczek mogących zastąpić lucyferazę świetlika zalicza się ekworynę i obelinę oraz ich postaci mutagenizowane. Podobnie jak w testach immunoenzymatycznych ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), istnieje także multipleksowa odmiana BLEIA. Wykorzystuje ona przeciwciała znakowane ekworyną oraz lucyferazę świetlika w połączeniu ze streptawidyną. Ten typ testu wykorzystano do wykrywania swoistego antygenu sterczowego (PSA - prostate specific antigen) oraz białka PAP. Inne

zastosowanie znalazł test wykorzystujący dwie różne postaci obeliny, z których jedna wykazywała zieloną, a druga fioletową luminescencję. Służył do wykrywania hormonów folikulotropowego oraz luteinizującego [33].

### PODSUMOWANIE

Bioluminescencja jest zjawiskiem rozpowszechnionym w naturze na dużą skalę. Znajduje zastosowanie w różnorodnych procesach życiowych organizmów, a w nauce w licznych badaniach z zakresu biologii molekularnej i medycyny. Najlepiej opisaną techniką wykorzystującą zjawisko bioluminescencji jest obrazowanie bioluminescencyjne. BLI jest metodą taną, szybką i nietoksyczną, dlatego jest dobrą alternatywą dla innych rodzajów obrazowania, takich jak SPECT, TK czy MR. Wykorzystanie lucyferazy jako genu reporterowego jest bardzo często stosowane, dlatego też systemy detekcji i testy oparte na jej właściwościach są ciągle udoskonalane pod względem czułości i łatwości w użyciu. Mimo to, wiele zagadnień naukowych – takich jak brak możliwości wykorzystania BLI u ludzi – wciąż pozostaje nieopracowanych. Studia nad bioluminescencją będą więc zapewne kontynuowane, by najbliższe lata mogły zaowocować uzyskaniem nowych technik umożliwiających jeszcze lepsze wykorzystanie tego zjawiska w przyszłych badaniach.

### PIŚMIENICTWO

- [1] Allard S.T.: Systemy genów reporterowych opartych na zjawisku bioluminescencji. *Postępy Biochem.*, 2008; 54: 350-353
- [2] Badr C.E., Tannous B.A.: Bioluminescence imaging: progress and applications. *Trends Biotechnol.*, 2011; 29: 624-633
- [3] Bakayan A., Domingo B., Miyawaki A., Llopis J.: Imaging  $Ca^{2+}$  activity in mammalian cells and zebrafish with a novel-red emitting aequorin variant. *Pflügers Arch.*, 2015; 467: 2031-2042
- [4] Bergner T., Tabib C.R., Winkler A., Stipsits S., Kayer H., Lee J., Malt-house J.P., Mayhew S., Müller F., Gruber K., Macheroux P.: Structural and biochemical properties of LuxF from *Photobacterium leiognathi*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015; 1854: 1466-1475
- [5] Biron K.: Fireflies, dead fish and a glowing bunny: a primer on bioluminescence. *BioTeach J.*, 2003; 1: 19-26
- [6] Close D.M., Patterson S.S., Ripp S., Baek S.J., Sanseverino J., Sayler G.S.: Autonomous bioluminescent expression of the bacterial luciferase gene cassette (*lux*) in a mammalian cell line. *PLoS One*, 2010; 5: e12441
- [7] Close D.M., Ripp S., Sayler G.S.: Reporter proteins in whole-cell optical bioreporter detection systems, biosensor integrations, and biosensing applications. *Sensors*, 2009; 9: 9147-9174
- [8] Close D.M., Xu T., Sayler G.S., Ripp S.: *In vivo* bioluminescent imaging (BLI): noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals. *Sensors*, 2011; 11: 180-206
- [9] Coleman S.M., McGregor A.: A bright future for bioluminescent imaging in viral research. *Future Virol.*, 2015; 10: 169-183
- [10] da Ros M., Iorio A.L., Consolante D., Cardile F., Muratori M., Fan-tappiè O., Lucchesi M., Guidi M., Pisano C., Sardi I.: Morphine modulates doxorubicin uptake and improves efficacy of chemotherapy in an intracranial xenograft model of human glioblastoma. *Am. J. Cancer Res.*, 2016; 6: 639-648
- [11] de Almeida P.E., van Rappard J.R., Wu J.C.: *In vivo* bioluminescence for tracking cell fate and function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2011; 301: 663-671
- [12] Donat S., Hasenberg M., Schäfer T., Ohlsen K., Gunzer M., Einsele H., Löffler J., Beilhack A., Krappmann S.: Surface display of *Gaussia princeps* luciferase allows sensitive fungal pathogen detection during cutaneous aspergillosis. *Virulence*, 2012; 3: 51-61
- [13] Dragulescu-Andrasi A., Chan C.T., De A., Massoud T.F., Gambhir S.S.: Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein-protein interactions within deep tissues of living subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 12060-12065
- [14] Fan F., Wood K.V.: Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev. Technol.*, 2007; 5: 127-136
- [15] Francis K.P., Joh D., Bellinger-Kawahara C., Hawkinson M.J., Purchio T.F., Contag P.R.: Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in living mice using a novel *luxABCDE* construct. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 3594-3600
- [16] Franke-Fayard B., Janse C.J., Cunha-Rodrigues M., Ramesar J., Büscher P., Que I., Löwik C., Voshol P.J., den Boer M.A., van Duinen S.G., Febbraio M., Mota M.M., Waters A.P.: Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 11468-11473



- [17] Funakoshi S., Miki K., Takaki T., Okubo C., Hatani T., Chonabayashi K., Nishikawa M., Takei I., Oishi A., Narita M., Hoshijima M., Kimura T., Yamanaka S., Yoshida Y.: Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 19111
- [18] Gandelman O.A., Church V.L., Moore C.A., Kiddle G., Carne C.A., Parmar S., Jalal H., Tisi L.C., Murray J.A.: Novel bioluminescent quantitative detection of nucleic acid amplification in real-time. *PLoS One*, 2010; 5: e14155
- [19] Haddock S.H., Moline M.A., Case J.F.: Bioluminescence in the sea. *Ann. Rev. Mar. Sci.*, 2010; 2: 443-493
- [20] Hastings J.W.: Circadian rhythms in *Dinoflagellates*: what is the purpose of synthesis and destruction of proteins? *Microorganisms*, 2013; 1: 26-32
- [21] Huang N.F., Okogbaa J., Babakhanyan A., Cooke J.P.: Bioluminescence imaging of stem cell-based therapeutics for vascular regeneration. *Theranostics*, 2012; 2: 346-354
- [22] Hutchens M., Luker G.D.: Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. *Cell. Microbiol.*, 2007; 9: 2315-2322
- [23] Hwang D.W., Park K.M., Shim H.K., Jin Y., Oh H.J., Oh S.W., Lee S., Youn H., Joung Y.K., Lee H.J., Kim S.U., Park K.D., Lee D.S.: *In vivo* bioluminescence imaging for viable human neural stem cells incorporated within *in situ* gelatin hydrogels. *EJNMMI Res.*, 2014; 4: 61
- [24] Kajigaya N., Hirose Y., Koike S., Fujita T., Yokota N., Hata S., Ikenaga M., Kobayashi N., Takahashi T.: Assessment of contamination using an ATP bioluminescence assay on doorknobs in a university-affiliated hospital in Japan. *BMC Res Notes.*, 2015; 8: 352
- [25] Kim J.B., Urban K., Cochran E., Lee S., Ang A., Rice B., Bata A., Campbell K., Coffee R., Gorodinsky A., Lu Z., Zhou H., Kishimoto T.K., Lassota P.: Non-invasive detection of a small number of bioluminescent cancer cells *in vivo*. *PLoS One*, 2010; 5: e9364
- [26] Luker K.E., Luker G.D.: Applications of bioluminescence imaging to antiviral research and therapy: multiple luciferase enzymes and quantitation. *Antiviral Res.*, 2008; 78: 179-187
- [27] Luker K.E., Luker G.D.: Bioluminescence imaging of reporter mice for studies of infection and inflammation. *Antiviral Res.*, 2010; 86: 93-100
- [28] McMillin D.W., Delmore J., Weisberg E., Negri J.M., Geer D.C., Klippel S., Mitsiades N., Schlossman R.L., Munshi N.C., Kung A.L., Griffin J.D., Richardson P.G., Anderson K.C., Mitsiades C.S.: Tumor cell-specific bioluminescence platform to identify stroma-induced changes to anticancer drug activity. *Nat. Med.*, 2010; 16: 483-489
- [29] Niers J.M., Kerami M., Pike L., Lewandrowski G., Tannous B.A.: Multimodal *in vivo* imaging and blood monitoring of intrinsic and extrinsic apoptosis. *Mol. Ther.*, 2011; 19: 1090-1096
- [30] Prescher J.A., Contag C.H.: Guided by the light: visualizing biomolecular processes in living animals with bioluminescence. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2010; 14: 80-89
- [31] Rasooly R., Do P., Hernlem B.: Sensitive, rapid, quantitative and *in vitro* method for the detection of biologically active *staphylococcal* enterotoxin type E. *Toxins*, 2016; 8: E150
- [32] Roda A., Guardigli M.: Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012; 402: 69-76
- [33] Roda A., Guardigli M., Michelini E., Mirasoli M.: Bioluminescence in analytical chemistry and *in vivo* imaging. *Trends Analyt. Chem.*, 2009; 28: 307-322
- [34] Roda A., Mirasoli M., Michelini E., Di Fusco M., Zangheri M., Cevenini L., Roda B., Simoni P.: Progress in chemical luminescence-based biosensors: a critical review. *Biosens. Bioelectron.*, 2016; 76: 164-179
- [35] Roda A., Pasini P., Mirasoli M., Michelini E., Guardigli M.: Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends Biotechnol.*, 2004; 22: 295-303
- [36] Rougeaux C., Becher F., Ezan E., Tournier J.N., Goossens P.L.: *In vivo* dynamics of active edema and lethal factors during anthrax. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 23346
- [37] Saeij J.P., Boyle J.P., Grigg M.E., Arrizabalaga G., Boothroyd J.C.: Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. *Infect. Immun.*, 2005; 73: 695-702
- [38] Stevani C.V., Oliveira A.G., Mendes L.F., Ventura F.F., Waldenmaier H.E., Carvalho R.P., Pereira T.A.: Current status of research on fungal bioluminescence: biochemistry and prospects for ecotoxicological application. *Photochem. Photobiol.*, 2013; 89: 1318-1326
- [39] Turner P.C., McLennan A.G., Bates A.D., White M.R.: Organizacja klonowanych genów. W: *Biologia Molekularna. Krótkie wykłady*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007, 200-203
- [40] Valiadi M., Iglesias-Rodriguez D.: Understanding bioluminescence in *Dinoflagellates* – how far have we come? *Microorganisms*, 2013; 1: 3-25
- [41] Vantaggiato C., Dell’Omo G., Ramachandran B., Manni I., Radaelli E., Scanziani E., Piaggio G., Maggi A., Ciana P.: Bioluminescence imaging of estrogen receptor activity during breast cancer progression. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2016; 6: 32-41
- [42] Welsh D.K., Kay S.A.: Bioluminescence imaging in living organisms. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2005; 16: 73-78
- [43] Wiles S., Clare S., Harker J., Huett A., Young D., Dougan G., Frankel G.: Organ specificity, colonization and clearance dynamics *in vivo* following oral challenges with the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Cell. Microbiol.*, 2004; 6: 963-972
- [44] Wiles S., Dougan G., Frankel G.: Emergence of a ‘hyperinfectious’ bacterial state after passage of *Citrobacter rodentium* through the host gastrointestinal tract. *Cell. Microbiol.*, 2005; 7: 1163-1172
- [45] Wong J.M., Pérez-Moreno J.L., Chan T.Y., Frank T.M., Bracken-Grissom H.D.: Phylogenetic and transcriptomic analyses reveal the evolution of bioluminescence and light detection in marine deep-sea shrimps of the family *Oplophoridae* (Crustacea: Decapoda). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2015; 83: 278-292
- [46] Wu N., Rathnayaka T., Kuroda Y.: Bacterial expression and re-engineering of *Gaussia princeps* luciferase and its use as a reporter protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015; 1854: 1392-1399
- [47] Xia Z., Rao J.: Biosensing and imaging based on bioluminescence resonance energy transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2009; 20: 37-44

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.