

# Bioluminiscencija morskih organizama

---

Janček, Bruna

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:602717>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Bruna Janček**  
0058222094

**Bioluminiscencija morskih organizama**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biologija 2

**Mentor:** doc. dr. sc. Tomislav Vladušić

**Zagreb, 2024.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Bioluminiscencija morskih organizama**

**Bruna Janček, 0058222094**

**Sažetak:**

Bioluminiscencija je sposobnost organizma da emitira svjetlost oksidacijom luciferina uz pomoć luciferaze i u prisutnosti kisika ili vodikova peroksida. Ovisno o uvjetima u kojima organizmi žive, bioluminiscencija ima različite uloge i pojavljuju se različiti mehanizmi i kemijske građe molekula ključnih za provođenje emisije svjetlosti (luciferini i luciferaze). Bioluminiscencija pronalazi široku primjenu u medicini, biotehnologiji, biokemiji, razvoju lijekova i terapija, genetičkom inženjerstvu i u tehnologiji senzora i rasvjete. Cilj ovog rada je proučiti kemijske reakcije emisije svjetlosti, istražiti kako je bioluminiscencija omogućila preživljavanje određenih organizama u tako ekstremnim i mračnim uvjetima i na koji način su znanstvenici iskoristili ovu pojavu za napredak već postojećih metoda ili razvijanje novih. Morski organizmi emitiraju različite boje od kojih se najčešće, pogotovo na većim dubinama, može uočiti plava i plavo-zelena svjetlost zbog male valne duljina koja dopire najdublje.

**Ključne riječi:** bioluminiscencija, morski organizmi, luciferaze, luciferin

**Rad sadrži:** 30 stranica, 16 slika, 0 tablica, 50 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** doc. dr. sc. Tomislav Vladušić

**Datum obrane:** 16. rujna 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Biology and Genetics of Microorganisms  
Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

**Bioluminescence of marine organisms**

**Bruna Janček, 0058222094**

**Abstract:**

Bioluminescence is the ability of an organism to emit light through the oxidation of luciferin with the help of luciferase and in the presence of oxygen or hydrogen peroxide. Depending on the conditions in which organisms live, bioluminescence serves different roles, and various mechanisms and chemical structures of the molecules crucial for light emission (luciferins and luciferases) exist. Bioluminescence finds wide application in medicine, biotechnology, biochemistry, drug development and therapy, genetic engineering, and sensor and lighting technology. This paper aims to study the chemical reactions involved in light emission, explore how bioluminescence has enabled certain organisms to survive in such extreme and dark conditions, and how scientists have utilized this phenomenon to advance existing methods or develop new ones. Marine organisms emit different colors, most commonly blue and blue-green light, especially at greater depths due to the small wavelength that reaches the deepest.

**Keywords:** biotechnology, marine organisms, luciferases, luciferins

**Thesis contains:** 30 pages, 16 figures, 0 tables, 50 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Assistant Professor Tomislav Vladušić, PhD,

**Thesis defended:** 16. September, 2024

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. POVIJEST ISTRAŽIVANJA BIOLUMINISCENCIJE .....	2
2.2. EMISIJA SVJETLOSTI .....	2
2.3. BIOLUMINISCENTNI SUSTAVI MORSKIH ORGANIZAMA.....	3
2.3.1. BIOLUMINISCENTNI SUSTAV BAKTERIJA .....	4
2.3.2. KOELENTERAZINSKI BIOLUMINISCENTNI SUSTAVI .....	5
2.3.3. BIOLUMINISCENTNI SUSTAV SVJETLEĆIH BIČAŠA.....	6
2.3.4. BIOLUMINISCENTNI SUSTAV KOLUTIĆAVCA .....	7
2.4. ULOGE BIOLUMINISCENCIJE.....	7
2.4.1. PRIMARNA OBRANA .....	7
2.4.2. ALARM PROTIV ULJEZA .....	9
2.4.3. APOSEMATIČKA OBOJENOST .....	9
2.4.4. PRIVLAČENJE PLIJENA .....	9
2.4.5. OSVJETLJENJE PLIJENA I OKOLIŠA .....	10
2.4.6. PROTUOSVJETLJENJE (STAPANJE S OKOLINOM) .....	11
2.4.7. OSIGURAVANJE POVOLJNOG OKOLIŠA .....	12
2.4.8. KOMUNIKACIJA UNUTAR VRSTE .....	12
2.5. PRIMJENA BIOLUMINISCENCIJE .....	13
2.5.1. ISPITIVANJE GENSKE EKSPRESIJE .....	13

2.5.2. ISTRAŽIVANJE PROTEIN-PROTEIN INTERAKCIJA.....	15
2.5.3. BIOLUMINISCENTNO BIOLOŠKO SNIMANJE <i>IN VIVO</i> .....	16
2.6. ZELENI FLUORESCENTNI PROTEIN.....	18
2.6.1. PRIMJENA ZELENOG FLUORESCENTNOG PROTEINA.....	18
2.6.2. FÖRSTEROV PRIJENOS ENERGIJE REZONANCIJOM.....	21
2.6.3. PRIMJENA GFP-A U DIJAGNOSTICI TUMORA.....	23
3.ZAKLJUČCI.....	24
4.POPIS LITERATURE.....	25

## 1. UVOD

Bioluminiscencija je emisija vidljive svjetlosti od strane organizama. Nastaje oksidacijom molekule luciferina ili druge molekule uz prisutstvo kisika ili reaktivnog spoja kisika te katalizatora luciferaze ili fotoproteina, oksidaza koje se aktiviraju u prisutnosti iona kalcija, magnezija, mangana i natrija. Luciferin je organska molekula koja se razlikuje među organizmima. Različite vrste luciferina imaju jedinstvenu strukturu koja omogućuje specifične emisije svjetlosti. Ovisno o svojim potrebama, primjerice za privlačenjem plijena ili partnera, životinje mogu živčanom i hormonskom regulacijom kontrolirati kada će zasvijetliti (Smithsonian, 2018). Bioluminiscencija je poprilično raširena prilagodba na uvjete u morima i oceanima te se pojavljuje kod pripadnika brojnih skupina: bakterija (simbiotske bakterije roda *Vibrio* i *Photobacterium*), dinoflagelata ili svijetlećih bičaća (Dinoflagellata), zrakaša (Radiolaria), rebraša (Ctenophora), mekušaca (Mollusca), žarnjaka (Cnidaria), kolutićavca (Annelida), rakova (Crustacea), bodljikaša (Echinodermata), četinočeljustaša (Chaetognatha), plaštenjaka (Tunicata), svitkoglavaca (Cephalochordata) i riba (skupine Chondrichthyes, Osteichthyes). Svi ti organizmi se mogu svrstati u dvije kategorije, žive li na morskom dnu (bentos) ili u otvorenim vodama (pelagijal). Za pelagijal su tipični planktonski (gibanje im ovisi o strujanju vode zbog ograničene mogućnosti kretanja) i nektonski organizmi (aktivno plivajući organizmi), dok su pripadnici bentosa primjerice odrasli organizmi razreda Hydrozoa, Mollusca, Annelida, Echinodermata (Pandurović, 2017). Organizmi koji bioluminisciraju mogu se pronaći od površine oceana ili mora pa sve do 4000 metara dubine prilikom čega se njihov broj smanjuje s povećanjem dubine. Dokazano je da u tom rasponu dubine 75 % organizama ima sposobnost bioluminisciranja te da se takav odnos svjetlećih i ne svjetlećih organizama ne mijenja s promjenom dubine (Anonymous 1, 2017). Svjetlost je skup elektromagnetskih valova čija valna duljina određuje boju koju oko detektira, kako i koliko daleko svjetlost putuje kroz vodu, a time i koliko dobro organizmi mogu percipirati svjetlosni signal (Haddock i Case, 1999). Različiti bioluminiscentni organizmi imaju različit raspon maksimuma emisije koji može biti poprilično širok, kao kod nekih Hydrozoa (od 443 nm do 680 nm), ili pak uzak kao kod amfipodnih rakova roda *Scina* (od 435 nm do 444 nm, Letendre i sur., 2024). Najčešći uočen raspon maksimuma emisije je između 440 i 505 nm, ali ne postoji široko prihvaćeno objašnjenje zašto se rasponi emitiranih valnih duljina svjetlosti razlikuju među bioluminiscentnim organizmima. Smatra se da je svjetlost obalnih vrsta općenito zelena, dok oceanske vrste uglavnom proizvode plavu svjetlost (Haddock i Case, 1999).

## 2. TEORIJSKI DIO

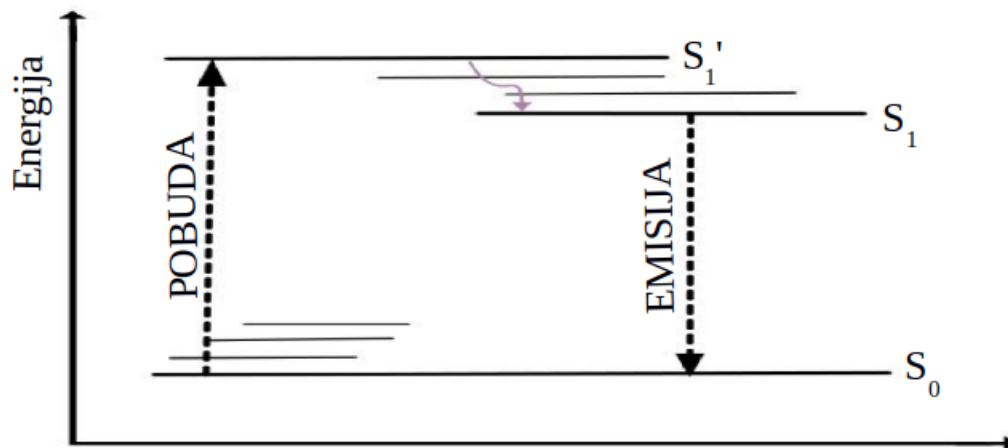
### 2.1. Povijest istraživanja bioluminiscencije

Benjamin Franklin je 1753. godine pretpostavio da neka vrsta "izuzetno malih životinja" u vodi "može ipak davati vidljivu svjetlost." U to vrijeme, prirodoslovci poput Godeheu de Rivillea, opremljeni ranim mikroskopima, potvrdili su Franklinovu pretpostavku: bljeskovi i svjetlost oceana potječu od živih bića, posebno od sitnih "morskih insekata" koje danas nazivamo planktonom (Anonymous 2, 2022). Na početku istraživanja bioluminiscencije vjerovalo se da je fosfor ili njegovi spojevi odgovorni za svjetlost koju emitiraju organizmi. Tek 1821. godine francuski kemičar Macaire uočio je da tvar odgovorna za svjetlost ima svojstva slična albuminu, što je ukazivalo na biološku osnovu svjetlosti. Još bliže istini došao je Raphaël Dubois (1849.-1929.), farmaceut, liječnik i profesor na La Faculté des Sciences u Lyonu koji je predstavio dvije ideje uzroka bioluminiscencije. Prva, koja nije bila testirana, tvrdila je da svjetlost nastaje oksidacijom masti unutar granula svjetlećih stanica. Druga, koja se pokazala točnijom, tvrdila je da procesi poput biofotogeneze (kako se tada nazivala bioluminiscencija) pripadaju živim tkivima i stanicama te da se ne mogu reproducirati izvan živog organizma. Duboisova opažanja da se svjetlost prestaje proizvoditi nakon smrti organizma, kao i dugotrajna luminiscencija mrtvih tijela i sekreta, ukazivala su na to da stanice i tkiva neko vrijeme preživljavaju smrt organizma, što je poduprlo njegovu drugu hipotezu. Dubois je prvi dokazao da je u procesu bioluminiscencije uključen enzim, kojeg je nazvao luciferaza (od latinskog *lucifer*, što znači "svjetlonoša", izvedeno iz *lux* – svjetlost i *ferre* – nositi) (Anctil, 2018). Duboisovo otkriće o ulozi luciferaze bilo je ključno za razumijevanje bioluminiscencije i postavilo temelje za daljnja istraživanja ovog fenomena.

### 2.2. Emisija svjetlosti

Potrebno je zadovoljiti dva uvjeta da dođe do emisije svjetlosti (slika 1) u biokemijskoj reakciji: energija koja se oslobađa u reakciji treba biti veća od konačne kemijske energije elektronski pobuđenog produkta (konačnog ili intermedijarnog); i 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 iz okoliša (Bach Rojceky, 2020).





**Slika 1.** Dijagram Jablonskog, izmjena energije tijekom bioluminiscentne reakcije.  $S_0$  osnovno stanje,  $S_1$  i  $S_1'$  pobuđena stanja.

U reakciji dolazi do pobuđivanja molekule iz osnovnog stanja ( $S_0$ ) pod utjecajem elektromagnetskog polja ili energije egzotermne reakcije. Pobuđena molekula se prevodi nazad u osnovno stanje uz oslobađanje dodatne energije u obliku topline ili svjetlosti. Ako se energija oslobađa u obliku vidljive svjetlosti, riječ je o luminescenciji. Izvori energije pobude mogu biti različiti i ovisno o njima se emisija energije dijeli u tri kategorije; kemilumiscencija (izvor energije pobude je kemijska reakcija), fluorescencija (izvor energije pobude je svjetlost) i biolumiscencija (u kemijskoj reakciji sudjeluje enzim luciferaza ili fotoprotein). U drugom koraku dolazi do prijelaza nekog međuprodukta reakcije ( $S_1'$ ) u elektronski pobuđeno stanje ( $S_1$ ), tj. transformacije kemijske potencijalne energije u energiju pobuđivanja elektrona. Treći korak je emisija svjetlosti iz pobuđenog stanja (Bach Rojcky, 2020).

### 2.3. Bioluminiscentni sustavi morskih organizama

Biolumiscencija je iznimno raznolika i prisutna u velikom broju različitih vrsta organizama, pri čemu se luciferini i luciferaze ili fotoproteini razlikuju u svojoj kemijskoj građi, što rezultira različitim bojama i svojstvima emitirane svjetlosti. Većina bioluminiscentnih organizama u moru emitira plavu svjetlost jer ona ima kraću valnu duljinu (oko 450–495 nm), što joj omogućuje da putuje najdalje kroz vodu. Međutim, postoje iznimke, poput riba iz rodova *Aristostomias*, *Pachystomias* i *Malacosteus*, koje, uz plavu, mogu emitirati i crvenu svjetlost. Crvena svjetlost s valnom duljinom većom od 700 nm, brzo se apsorbira u stupcu vode, zbog čega većina dubokomorskih organizama ne može detektirati taj dio spektra. Upravo zbog toga su ove ribe u prednosti prilikom komunikacije s drugim pripadnicima

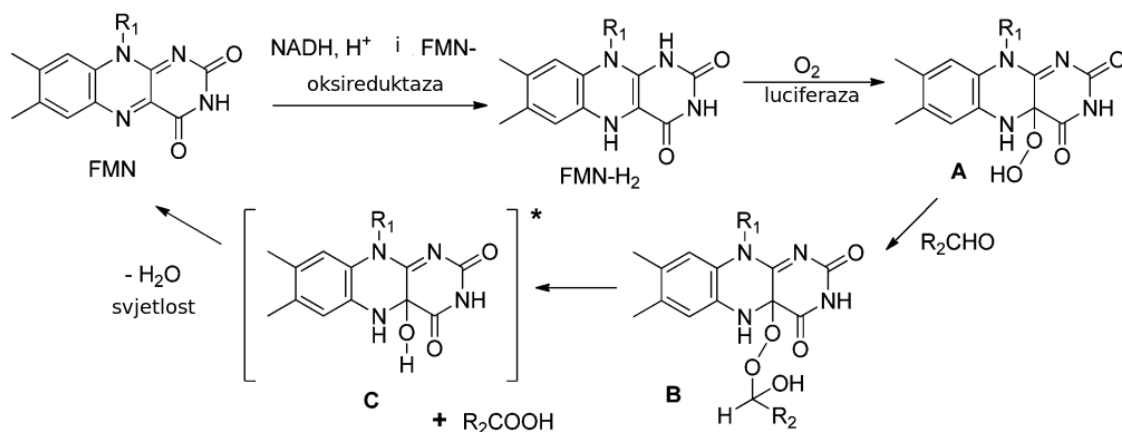
svoje vrste, pronalaženja plijena i izbjegavanja predatora. Ribe roda *Aristostomias* i *Pachystomias* razvile su posebne pigmente koji im omogućuju detekciju crvene svjetlosti, čiji je maksimum apsorpcije upravo u tom dijelu spektra. Ribe iz roda *Malacosteus*, osim pigmentata za detekciju crvene svjetlosti, imaju dodatnu prilagodbu u obliku fotosenzibilizatora deriviranog iz klorofila (Douglas i sur., 2000). Neki organizmi stvaraju vlastitu svjetlost, dok drugi iskorištavaju prisutnost simbiotskih bioluminiscentnih bakterija, poput onih iz rodova *Allivibrio* ili *Photobacterium*, kako bi emitirali svjetlost. To su tek poznatiji primjeri prilagodbi na uporabu bioluminiscencije, uz razvoj posebnih leća, vidnih pigmenta i raznih drugih prilagodba oka kako bi se uspješno detektiralo svjetlost određenih valnih duljina u širokom vidnom polju (Bach Rojecky, 2020). U kontroli bioluminiscencije sudjeluju živčani sustav i hormoni poput, primjerice u morskih pasa, melatonina, adrenokortikotropnog hormona i  $\alpha$ -melanocit stimulirajućeg hormona (Duchatelet i sur., 2020). Smatra se kako je bioluminiscencija nastala kao nusprodukt oksidacijskih reakcija koje su se već događale u stanicama. Luciferini imaju jaka antioksidativna svojstva i mogu pomoći u uklanjanju slobodnih radikala, što je korisno za stanice. U tom ranom evolucijskom kontekstu, bioluminiscencija je mogla imati zaštitnu funkciju prije nego što je razvila svoje složenije uloge u komunikaciji, kamuflaži i lovu (Haddock i sur., 2010).

### 2.3.1. Bioluminiscentni sustav bakterija

Trenutno poznate bioluminiscentne bakterije koje nastanjuju mora, oceane i obalne vode pripadaju rodovima *Vibrio*, *Allivibrio*, *Photobacterium* i *Schewanella*. Sve ove bakterije proizvode enzime luciferaze, koje su heterodimerne flavin monooksigenaze. Luciferaze se sastoje od dvije podjedinice, a aktivni centar nalazi se na  $\alpha$ -podjedinici, gdje se veže reducirana molekula flavin mononukleotida (FMN), koja služi kao kromofor u procesu emisije svjetlosti. Luciferaza katalizira oksidaciju kromofora, no postoje razlike zbog kojih dolazi do emisije svjetla različitih valnih duljina. Neke bakterije emitiraju više valnih duljina, ili svjetlost ne emitira luciferaza već dodatni antenski protein poput fluorescentnih proteina ili lumazin proteina. Svi oni kao kromofor imaju FMN ili slične molekule, poput RBF (engl. *Retinoblastoma Binding Factor*), DMRL (engl. *6,7-dimethyl-8-ribityllumazine*). Kod bakterija roda *Photobacterium* postoje lumazin proteini koji su konačni akceptori energije pobuđenog stanja luciferaze što rezultira pobuđenim stanjem kromofora lumazina i emisije plave svjetlosti. *Allivibrio fischeri* emitira plavu i žutu svjetlost jer uz luciferazu sintetizira žuti fluorescentni protein (engl. *Yellow Fluorescent Protein*, YFP) kao antenski protein.

Tijekom reakcije luciferaza prolazi kroz promjene konformacije, što olakšava pretvorbu kromofora u pobuđeno stanje (Baldwin i sur., 1995). Stvaranje bioluminiscencije u bakterija

započinje redukcijom flavin mononukleotida (FMN) u FMN-H<sub>2</sub> što katalizira specifična flavin reduktaza LuxG (slika 2). U sljedećem koraku flavin monooksigenaza luciferaza u aerobnim uvjetima oksidira FMNH<sub>2</sub> u hidroperoksid (slika 2A). Nakon reakcije hidroperoksida s alifatskim aldehidom nastaje peroksihemiactal (slika 2B). Nastali tetraedarski međuprodukt (Slika 2B) raspada se na karboksilnu kiselinu, emitira se zeleno-plava svjetlost te se obnavlja početni spoj FMN (slika 2C) (Campbell i sur., 2009).



**Slika 2.** Mehanizam bioluminiscencije u bakterijskom sustavu (Bach Rojecky, 2020)

### 2.3.2. Koelenterazinski bioluminiscentni sustavi

Koelenterazin je molekula koja služi kao luciferin, tj. spoj koji emitira svjetlost tijekom biokemijske reakcije u bioluminiscentnim organizmima. Razlikuju se tri glavna koelenterazinska sustava, ovisno o tome kako organizmi koriste koelenterazin u procesu bioluminiscencije, a koji uključuju reakcije katalizirane luciferazama, fotoproteinima ovisnim o kalcijevim ionima ili reaktivnim kisikovim spojevima (ROS). U prvom tipu reakcije oksidaciju koelenterazina (CTZ) provode CTZ-luciferaze interakcijom enzim-supstrat stvarajući koelenteramid, ugljikov dioksid i kontinuiranu emisiju svjetlosti (Campbell i sur., 2009). Drugi tip predstavljaju sustavi fotoproteina koji u svojoj šupljini imaju nekovalentno vezan oksidirani derivat koelenterazina, 2-hidroperoksi koelenterazina te su regulirani kalcijevim ionima. Primjeri takvih fotoproteina su aekvorin (iz meduza roda *Aequorea*, poput *A. victoria* (slika 4)), obelin (iz žarnjaka *Obelia longissima*), klitin (iz žarnjaka *Clytia gregaria*), mitrokomin, tarakikolin, mnemiopsin (iz rebraša *Mnemiopsis leidyi*) i velopin. Vezanjem Ca<sup>2+</sup> na fotoprotein dolazi do oksidacijske dekarboksilacije 2-hidroperoksi koelenterazina i stvaranja koelenteramida. Reakcija se može odvijati i bez kalcijevih iona, ali će biti nekoliko milijuna puta sporija jer oni

djeluju kao alosterički modulatori (Eremeeva i Vysotski, 2018). Varijacija drugog sustava je bioluminiscencijska reakcija koju provodi pr. koralji iz roda *Renilla* jer je koelenterazin vezan u šupljini strukture o  $\text{Ca}^{2+}$  ovisnih koelenterazin vezujućih proteina (engl. *Coelenterazine-Binding Protein*, CBP). Kada se  $\text{Ca}^{2+}$  veže na CBP, *Renilla* luciferaza oksidira koelenterazin i to većom učinkovitošću nego da se koelenterazin nalazi u slobodnom obliku. Takvi sustavi stvaraju kratkotrajne bljeskove. Treći tip sustava se može naći kod nekih glavonožaca (pr. *Watasenia scintillans* ili *Symplectoteuthis oualaniensis*) i školjkaša (*Pholas dactylus*) te je najmanje istražen mehanizam. Fotoproteina kao što su folasin i simplektin sadrže kovalentno vezani dehidrokoelenterazin, za emisiju svjetlosti trebaju kisik jer za pobudu koriste reaktivne kisikove spojeve (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) poput superoksid anion radikala ili hidrosil radikala. Neki autori i takve fotoproteine zovu luciferazama sa stabilno vezanim luciferinima. Kako bi bioluminiscentni organizmi u bilo kojem trenu mogli brzo reagirati emisijom svjetlosti, potrebno je odgovarajuće skladištiti ključne molekule. U prvom tipu sustava luciferaza i koelenterazin se skladište odvojeno u žlijezdama te se izlučuju u vodu gdje se miješaju i svijetle čime ili straše i zbunjuju predatora ili privlače plijen. U drugim sustavima je potrebna stimulacija živčanim sustavom (Krasitskaya i sur., 2020).

### 2.3.3. Bioluminiscentni sustav svjetlećih bičaća

Dinoflagelati imaju guste vezikule scintilone unutar kojih se nalazi luciferin, luciferaza i kod nekih vrsta, luciferin vezujući proteini (engl. *Luciferin Binding Protein*, LBP). Kada se dinoflagelati nađu u mraku, dolazi do pomicanja scintilona prema periferiji stanice. Bioluminiscencija je uzrokovana mehaničkim podražajima (uzburkivanje morske vode) koji aktiviraju receptor vezan za G-protein na membrani koji prenosi signal unutar stanice. Dolazi do povećanja koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  iona u citoplazmi, depolarizacije te nastanka akcijskog potencijala na membrani vakuole. Akcijski se potencijal prenosi na membrane scintilona koji su u dodiru s vakuolom, i tamo otvara protonske kanale. Protoni putuju iz vakuole u scintilone i smanjuju pH s 8 na 6 što mijenja konformaciju luciferaze oslobađajući mjesta za vezanje luciferina, rezultirajući njegovom oksidacijom i emisijom plave svjetlosti valne duljine od 475 nm. One vrste koje sintetiziraju LBP (*Lingulodinium polyedrum*, *Noctiluca scintillans*) vežu luciferin na LBP pri neutralnom ili alkalnom pH što sprječava autooksidaciju. Kada se pH u scintilonu snizi ispod 7, dođe do konformacijske promjene i LPB-a i luciferaze, rezultirajući bioluminiscencijom (Valiadi M i Iglesias-Rodriguez, 2013). Melatonin stimulira pojavu bioluminiscencije (Hardeland i sur., 1999).

#### 2.3.4. Bioluminiscentni sustav kolutićavca

Kolutićavci mnogočestinaši porodice Polynoidae imaju fotosome, organele koji su dio fotocita epitela ljuskastih elitri na površini tijela i ovisno o vrsti mogu emitirati žutu, zelenu i plavu svjetlost kao odgovor na podražaj. Fotosomi sadrže fotoproteine polinoidine koji djeluju kao peroksidaze a kromofori su najčešće flavini. Uloga različitih polinoidina u mnogočestinaša nije do kraja poznata, kao što nisu poznati niti luciferini ili mehanizam bioluminiscencije. Polinoidini su nađeni i u nebioluminiscentnih vrsta, pa se pretpostavlja da imaju ulogu u zaštiti od oksidacijskog stresa (Moraes i sur., 2021).

### 2.4. Uloge bioluminiscencije

Bioluminiscencija može imati složene ekološke uloge, uključujući indirektni efekt na predatore u ekosustavu. Ovaj fenomen uključuje strategije u kojima bioluminiscentni organizmi ne samo da se brane od svojih izravnih predatora, već i potencijalno privlače pažnju drugih predatora koji lovi njihove napadače.

#### 2.4.1. Primarna obrana

Životinje često koriste snažan bljesak bioluminiscencije kako bi prestrašile, iznenadile ili omele nadolazećeg predatora i omogućile si priliku za bijeg (Smithsonians, 2018). Dubokomorski mnogočestinaši „zeleni bombaši“ (*Swima bombiviridis*) koriste bioluminiscenciju upravo u te svrhe. Ime su dobili po luminescentnim prilagođenim škragama, koje poput "bombi" ispunjenih tekućinom iznenada zasvijetle kada ih životinja odbaci (slika 3). Tekućina intenzivno sjaji nekoliko sekundi prije nego što polako izbledi (Aguilera, 2009). Varijaciju ovog obrambenog ponašanja pokazuje vampirska lignja (*Vampyroteuthis infernalis*) koja izbacuje ljepljivu bioluminiscentnu sluz kako bi zaplašila, zbunila i usporila predatore, omogućujući sebi vrijeme za bijeg (Anonymous 2, 2022). Neki organizmi odstranjuju vlastite svjetleće dijelove tijela koji se nastavljaju kretati i svijetliti kako bi omeli predatora. Dobar primjer je dubokomorska lignja *Octopoteuthis deletron* koja odvaja svoje bioluminiscentne krakove koji se zalijepu za predatora i ometaju ga. Takvo namjerno odstranjivanje dijela tijela pri susretu s predatorom koji onda nastavljaju svijetliti i satima nakon, čak i u probavilu predatora je nepovoljno za predatora jer privlači pažnju u uvjetima u kojima je važno ostati neuočljiv. Ovu pojavu znanstvenici smatraju selektivnim pritiskom koji je doveo do široke rasprostranjenosti crveno ili crno obojenih probavila kod prozirnih životinja čiji pigmenti apsorbiraju plavu svjetlostbioluminiscencije (Pandurović, 2017). Primjer takve prilagodbe može se uočiti kod prozirnog rebraša *Lampocteis*

*cruentiventer* s crvenim probavilom koje prigušuje bioluminiscentno svjetlo probavljenog plijena (slika 4) (Anonymous 3, 2020).



**Slika 3.** Prikaz bioluminiscentnih škrga ("bombi") na mnogočetinašu *Swima bombiviridis* (Moskovitz, 2009)



**Slika 4.** *Lampocteis cruentiventer* (Anonymous 3, 2020).

#### 2.4.2. Alarm protiv uljeza

Glavni predator prati trag emitirane svjetlosti bioluminiscentnog organizma, ali „alarm protiv uljeza“ tog organizma privlači pažnju sekundarnog predatora svog predatora. Ovakav indirektni efekt bioluminiscencije dokazan je eksperimentom u kojem su korišteni dinoflagelati kao plijen, račić *Mysida* kao njihov glavni predator i riba *Porichthys notatus* kao sekundarni predator (Pandurović, 2017). *Pyrocystis noctiluca* je jarko emitirajuće vrsta dinoflagelata koja mijenja intenzitet bioluminiscencije u slučaju pojave primarnog predatora, najčešće račića. Jarki i dugotrajniji bljeskovi svjetlosti vide se dalje i privlače ribe poput *Apogon maculatus* koje se hrane račićima. Takav „alarm protiv uljeza“ koriste jer ne stvaraju toksine (Cusick i Widder, 2014).

#### 2.4.3. Aposematička obojenost

Aposematizam dolazi od grčkih riječi; *apo* - daleko i *sema* – znak, a odnosi se na evolucijsku strategiju u kojoj organizmi koriste signale upozorenja kako bi odvratili predatore. Ti signali mogu biti vizualni, zvučni ili kemijski, a njihova svrha je upozoriti predatore na neprofitabilnost plijena, najčešće zbog njegove toksičnosti, neukusnosti ili sposobnosti obrane. Sastoji se od dva elementa: primarne obrane koju čine osebujne boje, mirisi ili zvukovi i koja djeluje prije nego što predator napadne te sekundarne obrane, bilo da je kemijska, morfološka ili tip ponašanja, koja čini plijen neprofitabilnim za predatore (Rojas i sur., 2015). Neki od organizama koji koriste bioluminiscenciju kao aposematički signal su dinoflagelati roda *Alexandrium*, *Pyrodinium bahamense*, *Lingulodinium polyedra* te nekih vrsta iz rodova *Gonyaulax* i *Protoceratium* koji uz prisutnost luciferaze sintetiziraju i fluorescentni protein poput GFP-a. Smatra se da bioluminiscencijom manjeg intenziteta upozoravaju na svoju otrovnost (Cusick i Widder, 2014). Zmijača *Ophiopsila aranea* koristi bioluminiscenciju kao mehanizam fakultativne aposematičke obojenosti, smanjujući stupanj predacije od strane noćnih predatorskih vrsta rakova poput *Carcinus maenas* i *Pilumnus hirtellus* (Jones i Mallefet, 2010).

#### 2.4.4. Privlačenje plijena

Bioluminiscenciju za privlačenje plijena koriste brojni organizmi. Najpoznatiji primjeri su ribe udičarke (red Lophiiformes) koje koriste bakterije za proizvodnju dugotrajnog sjaja (slika 5). Te su ribe dobile ime po karakterističnom organu esku, koji se nalazi na vrhu pokretne šipčice dorzalne peraje (ilicija) što podsjeća na ribolovni štap, odnosno na manji organizam pa djeluje kao mamac. Eska sadrži bioluminiscentne bakterije kojima udičarke mame plijen u blizinu usta udičarki (Anonymous 4, 2010). Uz esku, ženke iz porodice Ceratiidae imaju još dvije ili tri

modificirane šipčice dorzalne peraje na kojima se nalazi svijetleći organ s bioluminiscentnim bakterijama, karunkula. Bakterije su iz roda *Enterovibrio* (Freed i sur., 2019). Također lignje iz roda *Chiroteuthis* i hobotnice iz roda *Stauroteuthis* koriste svoje svjetleće organe koji se nalaze na krakovima kako bi privukle plijen. Neki organizmi iskorištavaju tuđe sposobnosti bioluminiscencije, „alarm protiv uljeza“, kako bi privukli ili otkrili svoj plijen. U ovoj ulozi sekundarni predator iskorištava emisiju svjetlosti plijena primarnog predatora kako bi uhvatio svoj plijen (Pandurović, 2017).



**Slika 5.** Prikaz ribe udičarke *Cryptopsaras couesii* (Britannica, 2019)

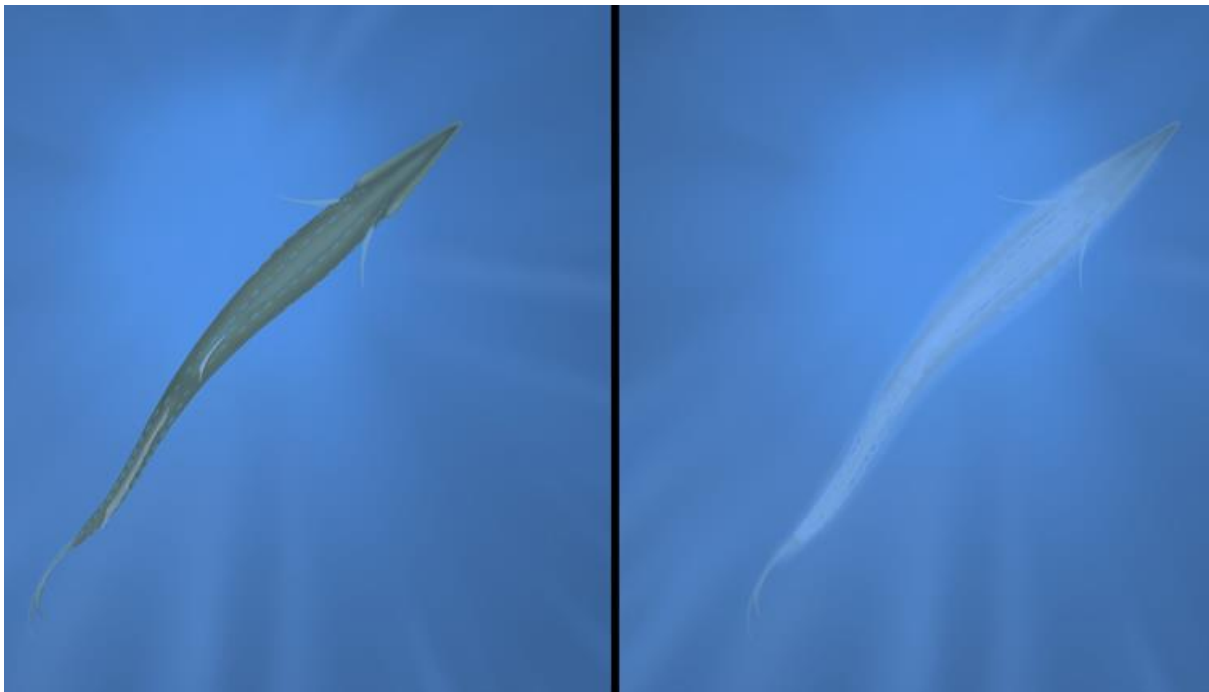
#### 2.4.5. Osvjetljenje plijena i okoliša

Lignja *Taningia danae* je životinja s do sad najvećim zabilježenim organima za proizvodnju žute svjetlosti (fotofore) koji se nalaze na krajevima dvaju krakova. Fotofori su veličine limuna i imaju pigmentiranu membranu s pomoću koje se mogu prekriti i otkriti. Time lignja kontrolira kada će bioluminiscirati pa tako koristi kratke pulseve jake svjetlosti za zbunjivanje i osljepljivanje plijena te dugotrajnu bioluminiscenciju pri kretanju i za procjenu udaljenosti do plijena, ili pak koristi serije kratkotrajnih i dugotrajnijih pulseva za privlačenje partnera (Kubodera i sur., 2007). Riba *Malacosteus niger* (engl. Stoplight Loosejaw) engleski je naziv dobila po jarkocrvenom svjetlu koje koristi za osvjetljavanje plijena iz svojih fotofora koje sadrže posebne stanice, fotocite koje proizvode svjetlo. Njezin je plijen većinom slijep za crvenu svjetlost što joj daje veliku prednost prilikom lova, dok plavu svjetlost koristi za privlačenje plijena (Chambers, 2023; Sargeant, 2024).



#### 2.4.6. Protuosvjetljenje (stapanje s okolinom)

Protuosvjetljenje kamufliira ribe pomoću ventralnih fotofora koji emitiraju svjetlost na način da spriječe pojavu sjene ispod organizma i prilagode izgled organizma prema difuznom svjetlu s površine mora ili oceana (slika 6). Postoji još jedan način kamufliiranja morskih organizama pri kojem je gornji dio tijela tamnije, a donji dio svjetlije obojen zbog čega tijelo postaje skoro nevidljivo. Fotofori, postavljeni s trbušne strane rakova, glavonožaca, riba, omogućuju prolazak organizma iznad predatora bez zapažanja. Takve životinje intenzitet bioluminiscencije živčanim i hormonskim mehanizmima prilagođavaju intenzitetu osvjetljenosti okoline. Riba udičarka *Cryptopsaras couesi* bioluminiscenciju koristi i za lateralnu kamuflažu. Neke su se morske životinje prilagodile tako maskiranom plijenu i razvile oči usmjerene prema gore sa žutim pigmentom koji im omogućuje raspoznati sunčevu svjetlost od bioluminiscencije. Još bolja prilagodba je uočena kod *Macropinna microstoma* (slika 7) čije se velike oči pomiču od naprijed prema gore te su zaštićene prozirnim slojem od pipaka žarnjaka od kojih otimaju hranu ili kod *Dolichopteryx longipes* koja ima dva vidna polja. Jednim okom gleda u stranu, dok je drugo usmjereno prema gore te na taj način može loviti plijen i paziti na svoju okolinu (Pandurović, 2017).



**Slika 6.** Prikaz korištenja protuosvjetljenja prilikom kamufliiranja od predatora. Lijevo: riba bez aktivnih trbušnih fotofora, desno: aktivni fotofori, stapanje sa svjetlom koje dolazi s površine (Smithsonian, 2018).



**Slika 7.** *Macropinna microstoma* (Anonymous 5, 2009).

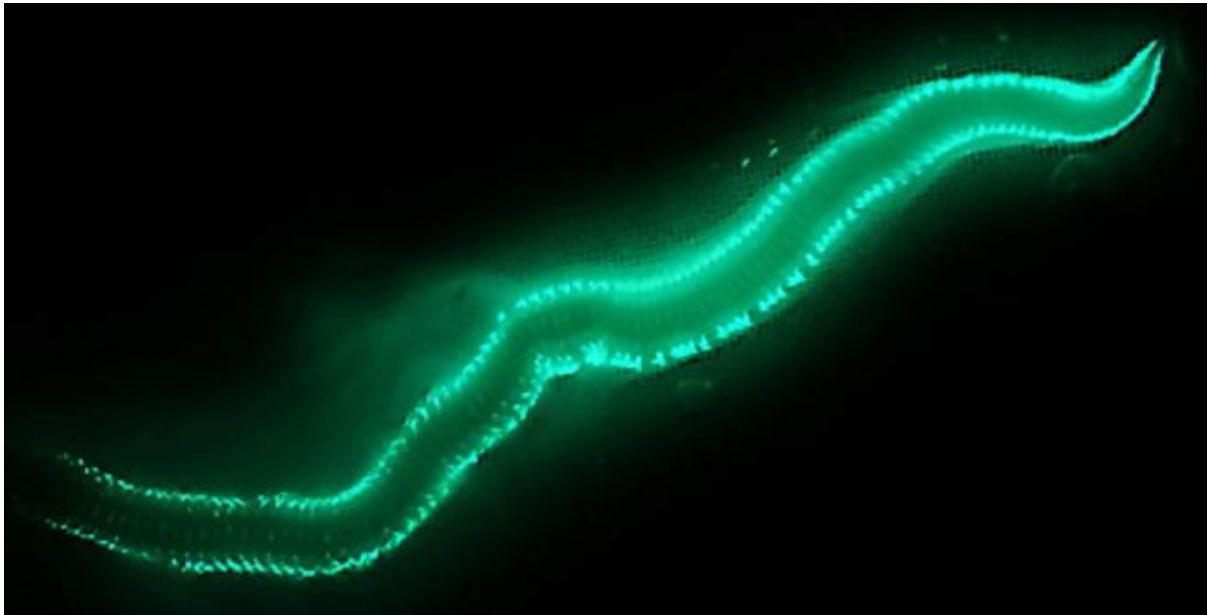
#### 2.4.7. Osiguravanje povoljnog okoliša

Smatra se da bioluminiscencija pomaže bakterijama da privuku veće organizme koje će naseliti, čime dobivaju stabilan okoliš, poput probavnog trakta ili fotofora (svjetlećih organa) morskih životinja. Ova interakcija često ima oblik simbioze, u kojoj obje strane ostvaruju korist. Kod bakterije *Allivibrio fischerii* bioluminiscencija nastaje kao odgovor na gustoću bakterijske populacije (kod nekih drugih bakterija ne) bilo na česticama detritusa u morskoj vodi (Haddock i sur., 2010) ili pri naseljavanju fotofora lignje *Euprymna scolopes*. Simbioza bakterijama tako daje stabilan okoliš, a lignji kamuflažu bioluminiscencijom (Verma i Miyashiro, 2013).

#### 2.4.8. Komunikacija unutar vrste

Bioluminiscencija za reproduktivnu komunikaciju prisutna je primjerice kod mnogočetinaša *Odontosyllis enopla*, hobotnica iz roda *Japetella* te riba iz rodova *Photoblepharon* i *Leiognathus*. Vrste roda *Odontosyllis* bioluminisciraju u svrhu razmnožavanja ovisno o lunarnom ciklusu kada dolazi do međusobne kemijske i vizualne komunikacije. Ženke *O. enopla* (Slika 8) tijekom razmnožavanja plivaju u krugovima i otpuštaju jajašca zajedno s bioluminiscentnim mukusom. Mužjaci se usmjeravaju prema svjetlosti ženki i ispuštaju svoje gamete, pri čemu emitiraju kratke bljeskove svjetlosti. (Brugler i sur., 2018). Riba roda *Leiognathus equulus* nastanjuje mutne obalne vode sa slabom vidljivošću i često love u skupinama s različitim vrstama. Kako bi se omogućilo parenje u leiognatidnih je vrsta došlo do razvoja spolnog dimorfizma svjetlosnog organa (fotofora) kojim mužjaci privlače ženke pomoću vrsno-specifične lateralne luminescentne signalizacije. Fotofori sadrže epitelne stanice koje tvore brojne pojedinačne tubule i bakterije *Photobacterium leiognathi* koje se nalaze unutar lumena svakog tubula. Mogu

kontrolirati, raspršivati i usmjeravati bakterijsku svjetlost korištenjem reflektivnih slojeva i pokrivača za kromatofore svjetlosnog organa kako bi stvarali različite obrasce svjetla specifične za vlastitu vrstu te na taj način održavaju reproduktivnu izolaciju u mutnim vodama (Sparks i sur., 2005).



**Slika 8.** *Odontosyllis enopla* (Brugler i sur., 2018)

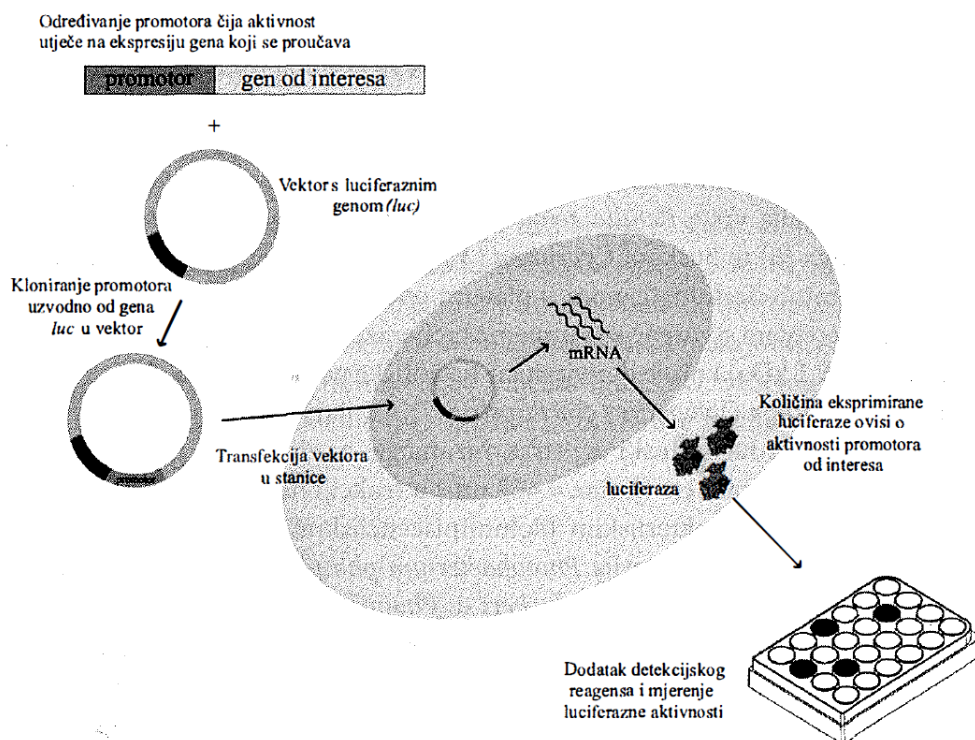
## **2.5. Primjena bioluminiscencije**

Bioluminiscencija se može upotrijebiti u medicini i biotehnologiji za otkrivanje i praćenje bolesti, razvoja terapije, genetsko inženjerstvo i praćenje interakcije molekula s proteinima te za razvoj materijala, tehnologija senzora i rasvjete. Bakterije *Allivibrio fischerii* su tako iskorištene u bioluminiscentnoj rasvjeti grada Rambouilleta u Francuskoj kao mjera uštede električne energije (Yeung, 2022).

### **2.5.1. Ispitivanje genske ekspresije**

Bioluminiscencija se može primijeniti u raznim istraživanjima, molekularnoj biologiji i biokemiji tako da geni čiji produkti sudjeluju u luminiscenciji iskoriste kao reporterski, za praćenje ekspresije gena od interesa. Postupak uključuje kloniranje gena od interesa s promotorom zajedno s reporterskim genom u ekspresijski vektor koji se unosi u stanicu domaćina. Nakon ekspresije gena s rekombinatnog vektora određuje se koncentracija reporterskog proteina ili se mjeri enzimski aktivnost reportera što omogućuje kvantitativnu analizu reportera prisutnog u stanicama. Na tom principu rade luciferazni testovi (slika 9). U medij stanicu koje

ekspimiraju luciferazu dodaje se luciferin, prilikom čega dolazi do emisije svjetlosti koja se detektira luminometrom s fotomultiplikatorom. Testovi s jednim reporterskim genom su najbrži i najjeftiniji za dobivanje podataka o genskoj ekspresiji, ali detaljni i točni rezultati ponekad se teško dobiju zbog složenosti stanica. U slučaju promjene intenziteta bioluminiscentnog signala, varijacije u broju stanica ili smanjenja učinkovitosti transfekcije između uzoraka koriste se dvostruki luciferazni sustavi. Oni podrazumijevaju simultanu ekspresiju i mjerenje kako eksperimentalnog tako i kontrolnog reporterskog enzima koji služi za normalizaciju rezultata eksperimentalnog enzima. Na ekspresiju eksperimentalnog reportera utječu eksperimentalni uvjeti, dok se kontrolnim reporterom reguliraju varijacije u broju stanica ili učinkovitosti transfekcije (Tekić i Maravić Vlahoviček, 2020). U stanicu se unose dva vektora; jedan s kontrolnim genom reporterom koji je pod ekspresijom konstitutivnog promotora i drugi s eksperimentalnim genom reporterom. Kao konstitutivni i eksperimentalni reporter mogu se koristiti geni za različite luciferaze čiji se signali mogu razdvojiti jer koriste različite luciferine, provode različitu kinetiku emisije svjetlosti ili imaju drugačije valne duljine emisijskih maksimuma, zbog čega se svjetlosni signali mogu razdvojiti optičkim filtrima. Primjer dvostrukog luciferaznog testa je korištenje luciferaze krijesnice i NanoLuc<sup>®</sup> luciferaze. NanoLuc<sup>®</sup> luciferaza je monomerni enzim temeljen na luciferazi iz dubokomorskih škampa *Oplophorus gracilirostris* koji je stabilan pri širokom rasponu pH, temperaturi do 55 °C te je idealan za primjenu kod reporterskih virusa i proučavanja fuzije proteina. Te luciferaze koriste različite supstrate koji se dodaju u reakcijsku smjesu. Nakon dodatka prvog supstrata aktivira se reakcija jedne luciferaze te se mjeri intenzitet bioluminiscencije. Dodatkom drugog supstrata prekida se prva reakcija i pokreće aktivnost druge luciferaze čija se količina ponovno mjeri intenzitetom luminiscencije (Anonymous 6, 2014).



**Slika 9.** Prikaz jednostrukog luciferaznog testa s vektorom koji sadrži gen luciferaze krijesnica (*luc*) (Tekić i Maravić Vlahoviček, 2020).

### 2.5.2. Istraživanje protein-protein interakcija

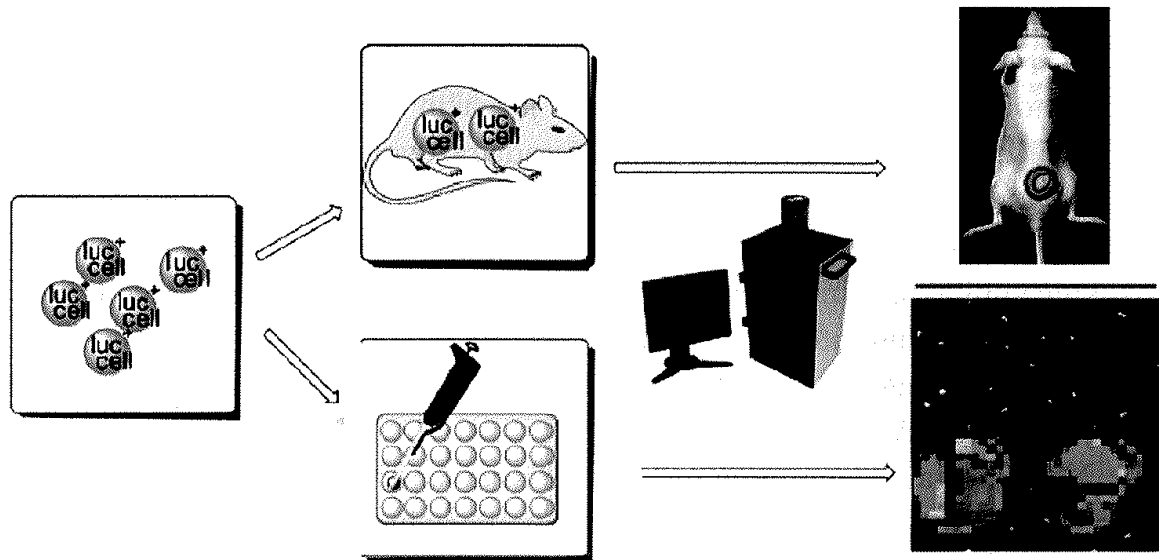
Kako bi se proučile protein-protein interakcije potrebno je spojiti reporterske gene odgovorne za bioluminiscenciju s genima koji kodiraju proteine čija se interakcija želi istražiti. Postoje dva načina kako se to može provesti. Prvi način je da se gen od jednog proteina od interesa koji se naziva »mamac« spoji s genom koji kodira za luciferazu, a drugi protein od interesa koji se naziva »plijen« spoji se s fluorescentnim ligandom (ili obrnuto) u odvojenim medijima. Ako dođe do interakcije fuzioniranog proteina »mamca« i »plijena«, luciferaza i fluorescentni protein naći će se u neposrednoj blizini i doći će do prijenosa energije proizvedene luciferaznom reakcijom na fluorescentni protein koji onda emitira svjetlost određene valne duljine, budući da su takvi fluorescentni proteini molekule koje mogu emitirati svjetlost tek pod utjecajem vanjske pobude. Provedena interakcija proteina bit će uočljiva promjenom boje emitirane svjetlosti te se takav fenomen naziva bioluminiscencijski prijenos energije rezonancijom (engl. *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*, BRET). Drugi način podrazumijeva korištenje luciferaze koja je rastavljena na dva dijela i zbog toga biološki

inaktivna. Svaki dio spaja se s jednim proteinom od interesa te ako dođe do interakcije proteina, fragmenti će se povezati i luciferaza će biti ponovno aktivna što se očituje kao bioluminiscentni signal. Riječ je o metodi razdvojene luciferaze ili komplementacije proteinskih fragmenata (Tekić i Maravić Vlahoviček, 2020).

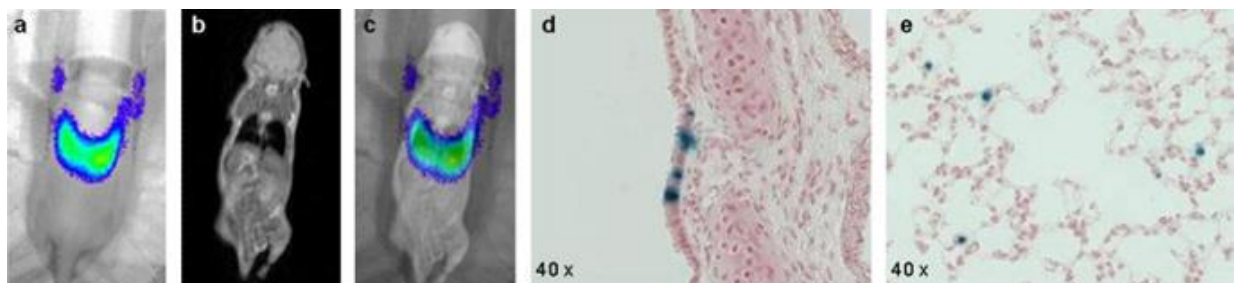
### 2.5.3. Bioluminiscentno biološko snimanje *in vivo*

Bioluminiscentno biološko snimanje (engl. *Bioluminescence Imaging*, BLI) koristi se u pretkliničkoj fazi razvoja lijeka za proučavanje patoloških mehanizama bolesti i odgovara organizma na tretman lijekovima. Vršiti se injektiranjem bioluminiscentnih tumorskih, imunskih, matičnih ili drugih tipova stanica u životinje te se prati broj i prostorna raspodjela tih stanica u životinjskim modelima (slika 10). Prednosti su neinvazivnost i izbjegavanje korištenja radioizotopa inače prisutnih u konvencionalnim metodama, jednostavnost, jeftinija oprema i nisu potrebni posebno obučeni stručnjaci. Omogućuje višestruko snimanje jedne životinje u stvarnom vremenu kako bi se pratila progresija ili regresija bolesti, što smanjuje broj životinja koje se koriste u istraživanjima. Prikupljaju se podaci veće statističke značajnosti te se smanjuje patnja i broj životinja žrtvovanih za provedbu istraživanja. Problem može biti uvođenje nekralježnjačkog gena u stanice sisavaca, poput ljudskih, zbog čega se ne primjenjuje u kliničkoj fazi ispitivanja, niska prostorna rezolucija snimanja i slabljenje signala koji ovisi o valnoj duljini emisije svjetlosti, dubini stanice koja sadrži bioluminiscentne reportere i okolnom tkivu. Dolazi do slabog prodora svjetlosti kroz kožu i tkiva jer se većina svjetlosti s valnim duljinama manjim od 600 nm apsorbira zbog prisutnosti hemoglobina u vaskulariziranom tkivu. Napretkom genetičkog inženjerstva, molekularne biologije i sintetske kemije širi se primjena bioluminiscentnih reportera i smanjuju se nedostaci metode. Problem smanjenja intenziteta signala prilikom snimanja dubljih tkiva može se riješiti korištenjem luciferaza koje emitiraju crvenu ili infracrvenu svjetlost koja se manje apsorbira u tkivima ili sintezom novih supstrata luciferaza koji polučuju veći intenzitet svjetlosti (Tekić i Maravić Vlahoviček, 2020). Jedan od primjera primjene biološkog snimanja pomoću neinvazivne bioluminiscencije uz potvrdu snimanjem magnetskom rezonancijom (engl. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI) je detekcija transfera gena u tkivo pluća miševa. Carlon i suradnici razvili su novi model genske terapije za pluća korištenjem vektora dobivenih iz adeno-asociranih virusa (AAV) te su uspješnost transdukcije pratili kombiniranjem BLI za vizualizaciju bioluminiscentnog signala i magnetske rezonancije za dodatni prikaz anatomskih struktura (Carlon i sur., 2009). AAV-i imaju malu jednolančanu DNA koju okružuje proteinski omotač te ne sadrže lipidni dvosloj, što ih čini izazito virulentnim. Za gensku terapiju upotrebljavaju se rekombinirani AAV bez gena za virulenciju i s unesenim genom od interesa te reporterskim genom za luciferazu. Luciferin se unosi intraperitonealno ili intratorakalno (Naso i sur., 2017). Cai i sur., 2012 intravenozno su u fetuse miševa unijeli AAV koji sadrži

reporterske gene za luciferazu za BLI, te za  $\beta$ -galaktozidazu za imunohistokemijsku potvrdu uspješne infekcije s AAV-om.  $\beta$ -galaktozidaza cijepa supstrat X-gal čime nastaje produkt koji spontano dimerizira i oksidira, dajući plavo obojenje. Mladunci su rođeni carskim rezom, odgajani i praćeni pomoću BLI-a jednom tjedno do dobi od 1 mjeseca (slika 11) (Carlson i sur., 2009). Ohlendorf i suradnici izravno su detektirali bioluminiscenciju uz pomoć MRI. Stanice krvnih žila životinjskog modela ekspimirale su bPAC a okolno tkivo luciferazu (Ohlendorf i sur., 2024). Kad se osvijetli, bPAC stvara cAMP koji uzrokuje širenje žile i veći protok krvi vidljiv uz pomoć MRI.



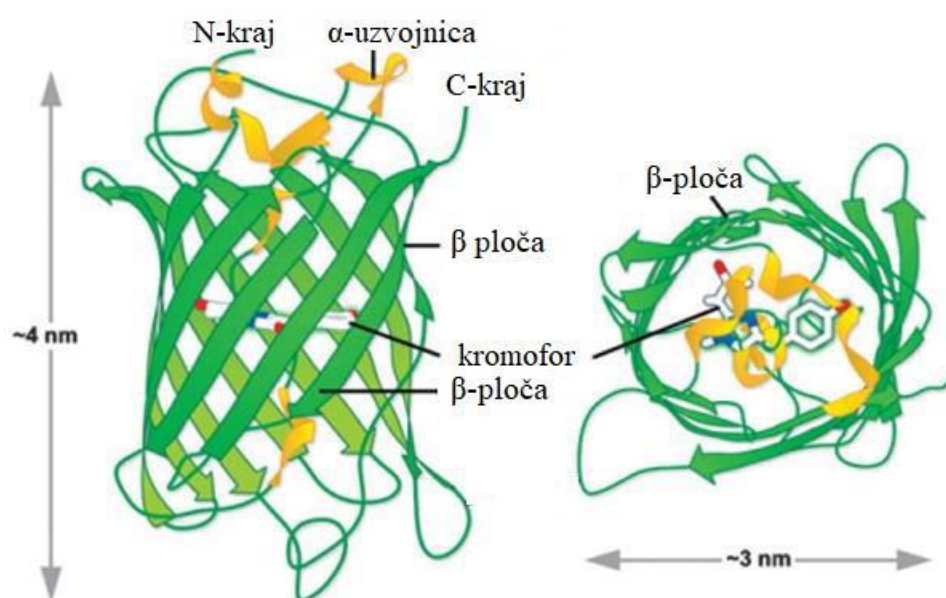
**Slika 10.** Gore: *in vitro* dolje: *in vivo* bioluminiscentno snimanje. Unošenjem gena za luciferazu stanice postaju bioluminiscentne i mogu se injektirati u animalne modele ili koristiti za ispitivanje na mikrotitarskim pločicama. Nakon izlaganja stanica luciferinu detektira se inducirani bioluminiscentni signal te se rezultati prikazuju kao slike u skali pseudoboja. Također, mogu se spojiti sa MRI snimkama životinja za točniju lokaciju signala (Tekić i Maravić Vlahoviček, 2020).



**Slika 11.** Kolokacija ekspresije gena uz pomoć BLI i MRI. a: bioluminiscentni signal dobiven uz pomoć BLI lociran u plućima miševa b: MRI prikaz istog miša. c: potvrda ekspresije gena s AAV vektora u plućima preklapanjem BLI i MRI. d, e: potvrda ekspresija gena s AAV vektora nakon X-gal bojenja za vizualizaciju LacZ pozitivnih stanica (Carlson i sur., 2009).

## 2.6. Zeleni fluorescentni protein

Zeleni fluorescentni protein (engl. *Green Fluorescent Protein*, GFP) pripada skupini fluorescentnih proteina odgovornih za bioluminiscenciju brojnih morskih organizama, najčešće žarnjaka. Sastoji se od 11  $\beta$ -ploča i jedne  $\alpha$ -uzvojnice na kojoj se nalazi kromofor kao dio strukture samog proteina. Kromofor je odgovoran za boju svjetlosti i nalazi se u centru molekule (slika 12). Struktura GFP-a formira cilindar tvoreći  $\beta$ -bačvu (engl.  *$\beta$ -barrel*). Prvotno je izoliran iz meduze *Aequorea victoria* koja ga stvara u fotoorganu zajedno s fotoproteinom aekvorinom. Luminiscencija nastaje kada aekvorin oksidira koelenterazin uz prisutnost  $\text{Ca}^{2+}$  iona dajući plavo svjetlo. GFP apsorbira plavo svjetlo i prevodi ga u zeleno. Početkom 1990-tih gen za GFP eksprimiran je u bakteriji *Escherichia coli* i osjetnim neuronima oblića *Caenorhabditis elegans*. Izlaganjem stanica UV ili plavoj svjetlosti dolazi do emisije zelene svjetlosti. Utvrđeno je da nije štetan za stanice. Spajanjem gena za GFP s genom za drugi protein dobije se fuzionirani protein kojem se mogu pratiti ekspresija i lokalizacija (Kerum, 2018). Mutagenезom i izolacijom iz drugih organizama su dobiveni proteini koji fluoresciraju na drugim valnim duljinama, stabilnije, dugotrajnije i s drukčijom ovisnošću o  $\text{Ca}^{2+}$  poput CFP (engl. *Cyan-*), BFP (engl. *Blue-*), YFP (engl. *Yellow-*), RFP (engl. *Red-*), VFP (engl. *Violet Fluorescent Protein*) i njihovih inačica.



**Slika 12.** Prikaz strukture zelenog fluorescentnog proteina (Kerum, 2018)

### 2.6.1. Primjena zelenog fluorescentnog proteina

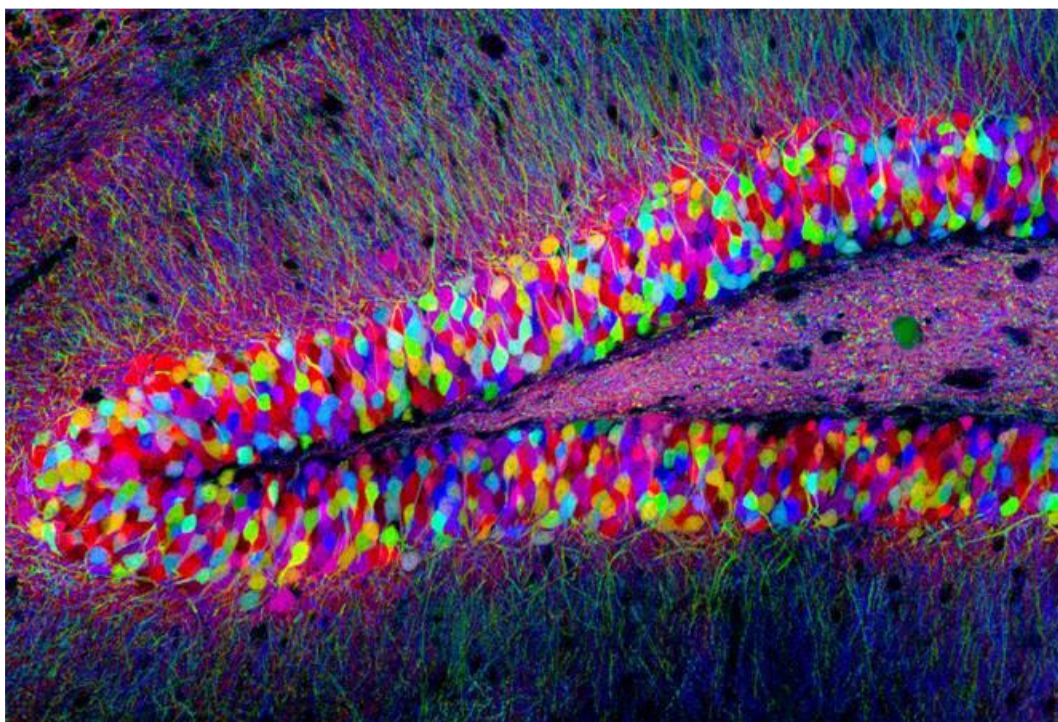
Fluorescentni proteini su manje štetni od nekih kemijskih biljega, pr. fluorescein izotiocijanata (FITC), što je potaknulo razvoj različitih modifikacija i visoko automatiziranih sistema kojima



se promatraju stanice tijekom ekspresije produkta obilježenih fluorescentnim proteinima, ili stanice imunohistokemijski obojene protitijelima označenima s fluorescentnim proteinom. Fluorescentni proteini se tako koriste kao reporteri regulacije aktivacije i transkripcije gena, biosenzori, fuzijski proteini za praćenje pokretljivosti proteina/stanica tijekom razvoja, molekularni biljezi za praćenje rasta stanica (npr. patogenih bakterija ili stanica tumora) te biljezi za lokalizaciju proteina u stanicama. Prednost GFP-a je u tome što je kromofor dio strukture proteina pa nisu potrebni dodatni faktori i supstrati. Spajanjem gena od interesa s genom za GFP nastaje fuzionirani protein koji se eksprimira i svijetli u živoj stanici te je moguće odrediti kako i gdje dolazi do izražaja tog gena. Proteini se također mogu označiti fluorescentnim markerima koji daju uvid u promjene proteina pri različitim uvjetima (Kerum, 2018).

Jedna od primjena fluorescentnih proteina je tzv. brainbow tehnika u neuroznanosti. Temelji se na kombinaciji tri ili više fluorescentnih proteina različitih boja; pr. crvene, zelene i plave koji u različitim kombinacijama mogu dati sve boje spektra. Geni za fluorescentne proteine (FP) različitih boja stave se jedan za drugim u transgenski konstrukt te se između njih postave parovi LoxP mjesta. LoxP mjesta su palindromske sekvence koje prepoznaje Cre rekombinaza koja ovisno o orijentaciji LoxP parova može ili izrezati DNA između para (ista orijentacija) ili napraviti inverziju sekvence (suprotna orijentacija). Kada Cre nije prisutna doći će do ekspresije samo prvog FP u nizu, dok u njenoj prisutnosti može doći do ekspresije drugih proteina, ovisno o broju LoxP parova i njihovoj orijentaciji. Na taj način se mogu označiti pojedinačni neuroni transgeničnih miševa i proučavati međudnosi neurona (slika 13) (Weissman i Pan, 2015).

1970-tih godina pojavila se tehnika fotoizbljeđivanja (engl. *photobleaching*) koja se koristi za vizualizaciju i kvantifikaciju dinamičkih procesa u stanici. Fotoizbljeđivanje je fotokemijska promjena molekule fluorescentnog kromofora (fluorofora; i poslijedično boje) primjenom lasera tako da trajno izgubi sposobnost fluoresciranja. Dolazi do cijepanja kovalentnih veza ili nespecifičnih reakcija fluorofora i okolnih molekula. Oporavak fluorescencije mjeri se kao funkcija vremena, a stopa unosa neizbljeđenih fluorescentnih proteina se povezuje s njihovom pokretljivošću. Ako je prisutna jedna ili više populacija nepokretnih proteina koji su stabilno vezani unutar fotoizbljeđenog područja neće doći do potpunog povratka fluorescencije, dok je u slučaju visoko mobilnih proteina nemoguće potpuno fotoizbljeđiti ciljano područje (Kerum, 2018).



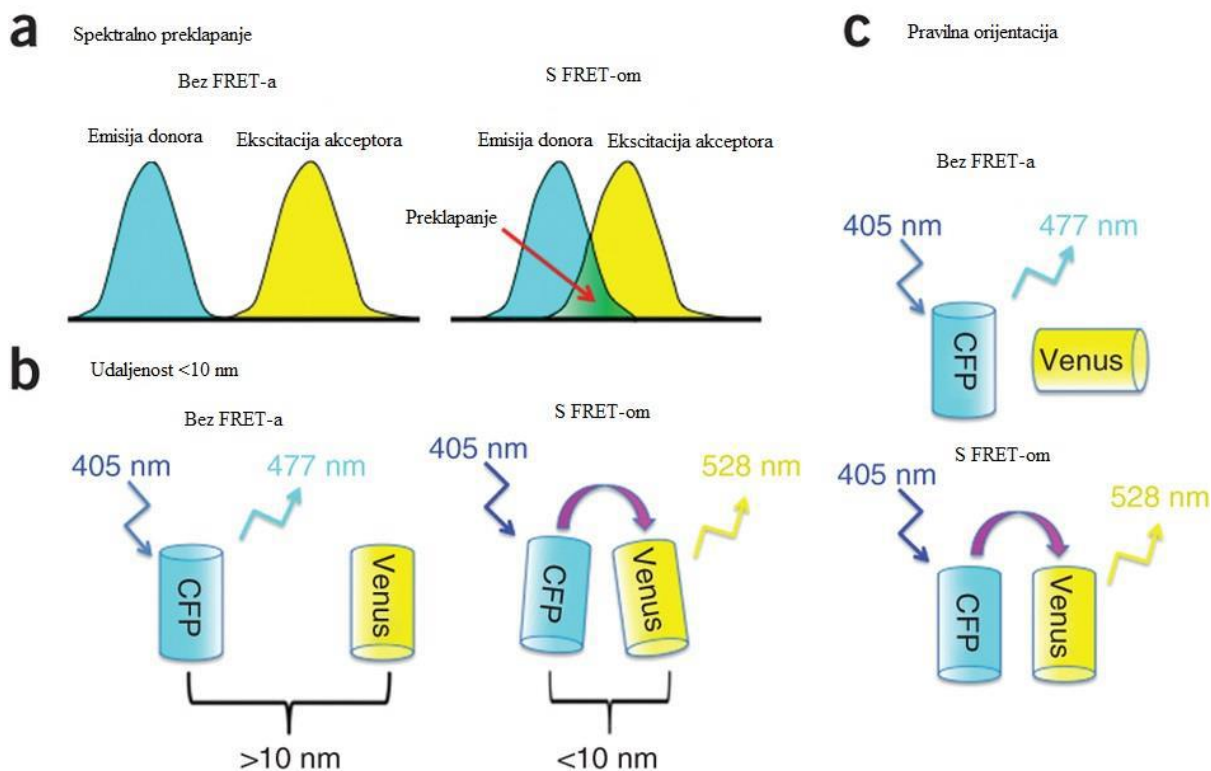
**Slika 13.** Prikaz neurona hipokampusa transgeničnih miševa označenih brainbow tehnikom uz pomoć cre-lox rekombinacijskog sustava (Kerum, 2018).

Prva uspješna transformacija zelenim fluorescentnim proteinom izvršena je u oblika *Caenorhabditis elegans* nakon čega su fluorescentni proteini postali jedan od osnovnih alata u proizvodnji i analizi transgeničnih organizama. Modificirani organizmi fluoresciraju kako bi se pratila ekspresija i prijenos određenog gena, razvoj tkiva i organa, aktivacija promotora i regulacija genske aktivnosti, uspješnost mutageneze, nuklearne transplantacije, RNA interferencije i homologne mitotske rekombinacije. Neki modelni organizmi koji se transformiraju s GFP-om i sličnim proteinima su ribe zebrića *Danio rerio* i medaka *Oryzias latipes*, vinska mušica *Drosophila melanogaster*, miš *Mus musculus* i žaba pandžašica *Xenopus laevis*. Posebno zanimljivi organizmi su ribe *Oryzias latipes* i *Danio rerio* zbog prozirnih embrija koji u kombinaciji s promotorima osjetljivim na teške metale i hormone mogu služiti kao indikatori onečišćenja okoliša. Transgenične ribe se još mogu koristiti i kao ornamentni organizmi pod nazivom „GlowFish“ (Kerum, 2018). Južnokorejski tim sa Nacionalnog sveučilišta u Seoulu kojeg je vodio Byeong-Chun Lee je 2009. godine uspješno uzgajao prvog genski modificiranog psa, transgeničnog bigla s RFP-om pod nazivom Ruppy (od engl. *Ruby puppy*). Inficirali su fibroblaste s virusnim vektorom kako bi ekspimirali crveni fluorescentni protein izoliran iz žarnjaka *Discosoma striata*. Modificirane jezgre fibroblasta prenijeli su u oocite iz kojih je uklonjena jezgra te ih uzgajali u Petrijevim zdjelicama nekoliko sati. U zadnjem koraku znanstvenici su implantirali klonirane embrije u surogat majke i od 344

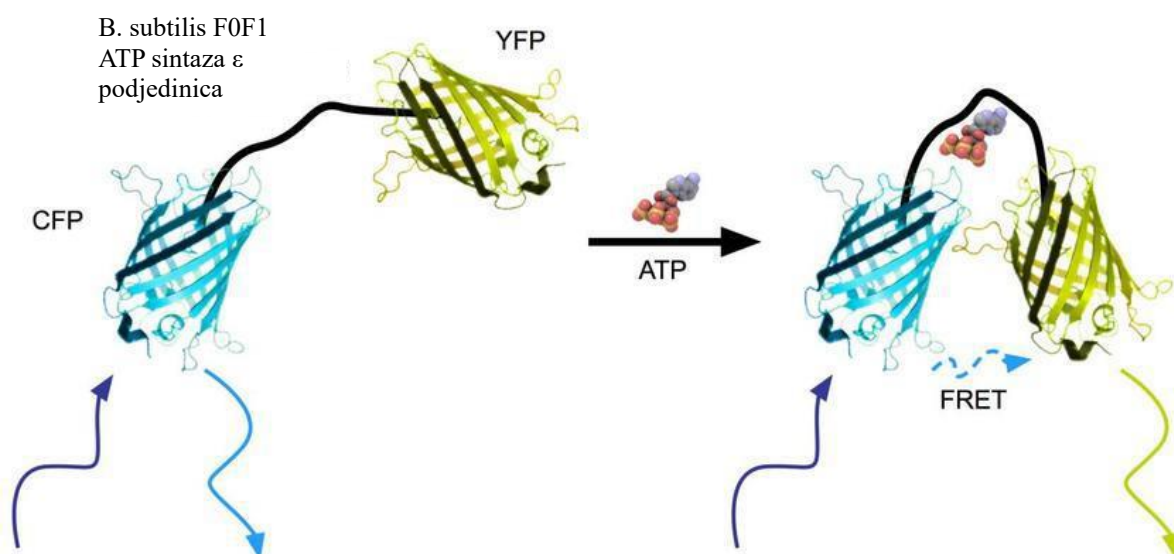
embrija dobili 5 zdravih transgeničnih psića. Jedan problem prilikom kloniranja transgeničnih pasa je ciljati gdje će se gen od interesa uklopiti u genom kako ne bi došlo do stvaranja pasa s mutacijama ili delecijama. Znanstvenici su doskočili tom problemu razvijanjem metode ciljanog genskog modificiranja (engl. *gene targeting*) i za to dobili Nobelovu nagradu 2007. godine (Callaway, 2009). Stvoreni su i fluorescirajući mačići s antivirusnim restrikcijским proteinom TRIMCyp i GFP kao reporterom (Wongsrikeao i sur., 2011).

#### 2.6.2. Försterov prijenos energije rezonancijom

Försterov prijenos energije rezonancijom (engl. *Förster Resonance Energy Transfer*, FRET) je metoda koja se zasniva na interakciji dviju fotoosjetljivih molekula fluorofora od kojih je jedna donor energije, a druga akceptor. Donor fluorofor koji se nalazi u pobuđenom stanju predaje energiju akceptoru fluoroforu preko dipol-dipol veze prilikom čega dolazi do fluorescencije. Bitno je zadovoljiti tri uvjeta kako bi došlo do fluorescencije; mora se preklapati spektar emisije jednog i ekscitacije drugog fluorofora, udaljenost između donora i akceptora fluorofora mora biti manja od 10 nm i trebaju biti u optimalnoj orijentaciji (slika 14) (Kerum, 2018). Senzori temeljeni na FRET-u imaju široku primjenu u biokemiji, staničnoj biologiji i razvoju lijekova. Neki od primjera primjene su senzori za ione (mjerenje tvrdoće vode i pH), tkivni senzori i imunosenzori (Verma i sur., 2023). FRET senzori se koriste pri proučavanju proteinskih interakcija tako da se na jedan protein od interesa veže fluorofor donor, a na drugi akceptor. Ako dođe do povezivanja proteina fluorofori će se naći dovoljno blizu i emitirat će se svjetlost. Prvi takav senzor sastojao se od fluorescentnih proteina EBFP (engl. *Enhanced Blue Fluorescent Protein*) i EGFP (engl. *Enhanced Green Fluorescent Protein*), ali je bio nepraktičan zbog niske svjetline i fotostabilnosti. Senzori se konstruiraju i na način da su fluorescentni proteini (FP) vezani na različite dijelove proteina biosenzora te su međusobno povezani linkerom koji nakon vezanja s ligandom ili uslijed drugih biokemijskih modifikacija mijenja konformaciju, približava fluorofore što uzrokuje prijenos energije i promjenu FRET signala. Primjer takvog senzora je Ateam, senzor ATP-a (slika 15) koji se sastoji od dva fluorescentna proteina povezana preko epsilon podjedinice ATP sintaze koja reagira na povišenu koncentraciju slobodnog ATP-a u stanici. Nedostatci FRET senzora su moguća pojava nespecifične fluorescencije, oligomerizacija probi ili standarda prilikom čega signal nije isključivo odraz interakcije proteina i treba ga dodatno analizirati (Kerum, 2018).



**Slika 14.** Prikaz uvjeta koje FP-FRET par mora zadovoljiti da bi došlo do fluorescencije: preklapanje spektra emisije donora i ekscitacije akceptora (a), udaljenost manja od 10 nm (b) i odgovarajuća orijentacija proteina (c). FRET par se sastoji od CFP (engl. *Cyan Fluorescent Protein*) i Venus YFP (engl. *Yellow Fluorescent Protein*) (Kerum, 2018).



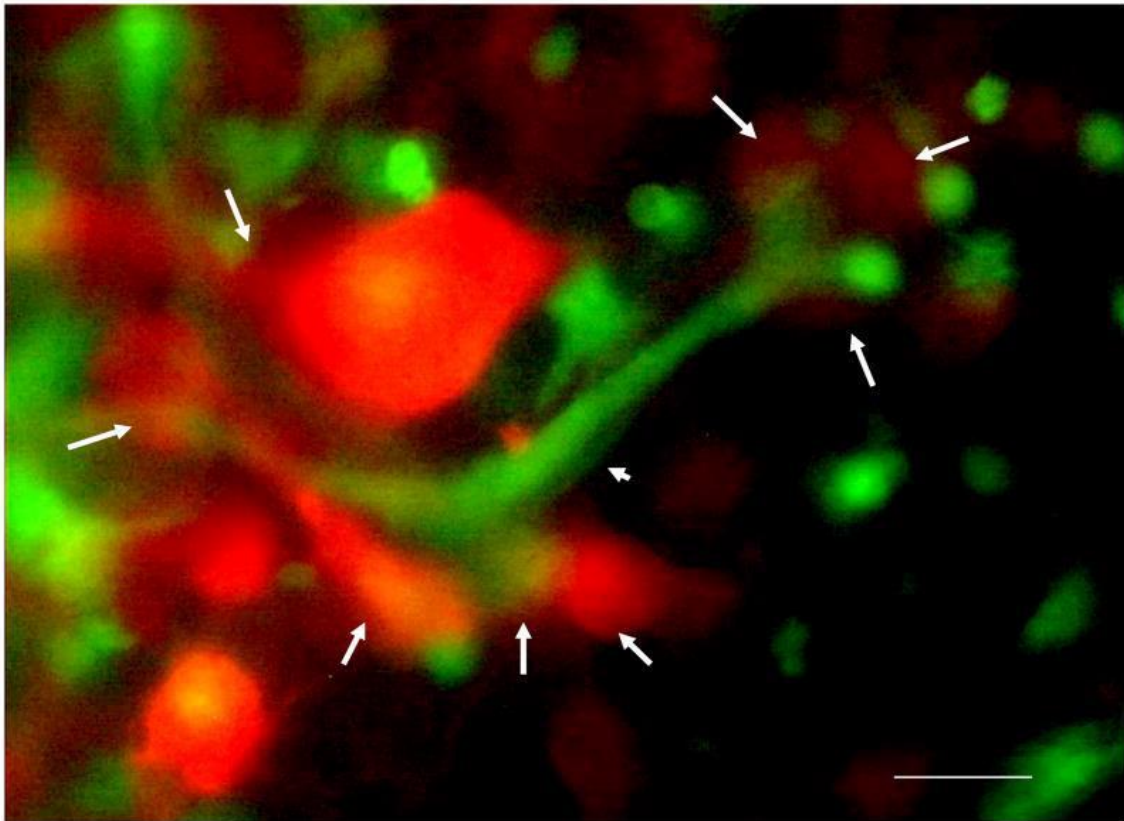
**Slika 15.** ATeam biosenzor s CFP i YFP fluorescentnim proteinima koji se približe u prisutnosti ATP-a zbog promjene konformacije linkera epsilon podjedinice F0F1 ATP sintaze bakterije *Bacillus subtilis* (Kerum, 2018).

### 2.6.3. Primjena GFP-a u dijagnostici tumora

Fluorescentni proteini se mogu koristiti za neinvazivno praćenje dinamike metastaziranja tumora i određivanja učinkovitosti antitumorskih lijekova. Postupak uključuje implantaciju tumorskih stanica označenih fluorescentnim proteinima u živi modelni organizam i praćenje njihovog kretanja, metastaziranja i interakcije sa zdravim stanicama metodama mikroskopije. Za lakše praćenje i analiziranje koriste se proteini koji fluoresciraju u različitim bojama kako bi se označile zdrave i tumorske stanice (slika 16). Razvijena je i metoda kojom se mogu označiti tumorske stanice u živom organizmu što se primjenjuje za dijagnostiku tumora koji se nalaze duboko u ljudskim organima. Za transformaciju tumorskih stanica koriste se specifični virusi (adenovirusi, herpes virusi) koji su modificirani na način da proizvode fluorescentne proteine. Takva metoda se zbog stabilne fluorescencije primjenjuje u kirurgiji i za praćenje zaostalih tumorskih stanica (Kerum, 2018).

Nakon označavanja slijedi detekcija osvijetljenih tumorskih tkiva pomoću posebnih sustava za snimanje fluorescencije koji se sastoje od izvora svjetlosti različitih valnih duljina, filtera, detektora i zaslona za prikaz fluorescencije. Uloga filtera je eliminacija okolnog svjetla koje nije nastalo fluorescencijom i pobuđujućeg svjetla izvora. Prilikom izbora detektora potrebno je paziti na odgovarajuću osjetljivost i spektralni raspon (Woo i sur., 2021).

Fluorescentni proteini mogu se primijeniti i u praćenju faza staničnog ciklusa pomoću FUCCI (engl. *Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator*) metode. Faze staničnog ciklusa mogu se razlikovati promjenom koncentracije faktora licenciranja Cdt1 i njegovog inhibitora geminina. Količina Cdt1 najviša je tokom G1 faze te se smanjuje do S faze, dok geminina ima najviše u S i G2 fazi, a najmanje u M i G1 fazi. Na degrone (dijelove odgovorne za razgradnju) ovih proteina vežu se parovi fluorescentnih proteina (FUCCI probe) koji bivaju destabilizirani E3 ubikvitinskim ligazama APC/C i SCFSkp2 odgovornim za promjene u količini Cdt1 i geminina, zbog čega se jasno razlikuje kada je stanica u G1 fazi a kada u S/G2/M fazi. APC/C je aktivna tokom M i G1 faze jer ligira geminin i SCFSkp2, dok je SCFSkp2 aktivna u S i G2 fazi čime degradira Cdt1. Najčešće se koriste dvije probe zelene i crvene boje kako bi se lakše i pouzdanije pratila izmjena faza staničnog ciklusa. FUCCI senzori mogu se primijeniti u određivanju trajanja određenih faza staničnog ciklusa, povezivanju staničnih procesa (npr. razgradnje proteina) s različitim fazama staničnog ciklusa i za vizualno razlikovanje proliferirajućih stanica i onih u mirovanju (Zielke i Edgar 2015).



**Slika 16.** Zeleno: fibroblasti glodavca označeni zelenim fluorescentni proteinom, crveno: stanice raka prostate glodavca označene crvenim fluorescentnim proteinom (Kerum, 2018).

### 3. ZAKLJUČCI

1. Bioluminiscencija je široko prisutna u morima i oceanima, najčešće kao prilagodba na smanjenu količinu sunčeve svjetlosti ali kod pojedinih organizma može imati i višestruke uloge.
2. S povećanjem dubine smanjuje se broj bioluminiscentnih organizama, ali postotak u odnosu na sve organizme (bioluminiscentne i nebioluminiscentne) ostaje konstantan na vrijednosti od 75% pa se može zaključiti da se općenito smanjuje broj živih organizama na većim dubinama zbog ekstremnijih životnih uvjeta.
3. Postoje razlike u kemijskoj građi luciferina i luciferaza kod različitih organizama, isto tako različite vrste mogu proizvoditi iste luciferine. Jedan od primjera je koelenterazin kojeg sintetiziraju pripadnici devet različitih koljena.
4. Jedan od izazova prilikom određivanja uloga bioluminiscencije jest reproducibilnost prirodnih uvjeta u laboratorijskom okruženju. Tipovi svjetlosne emisije koji se vide tokom

laboratorijskih stimulacija možda nisu istovjetni onima u prirodnom okolišu pa čak i ako je životinja u dobrom stanju i ako je u razvojnoj fazi za koju je bioluminiscencija ključna.

5. Bioluminiscencija pronalazi veliku primjenu u područjima biokemije i biotehnologije zbog moguće neinvazivne upotrebe, jednostavnih i ekonomičnih metoda te visoke osjetljivosti. Daljnjim proučavanjem fluorescentnih proteina doći će do razvoja novih metoda i usavršavanja postojećih za postizanje veće točnosti dobivenih rezultata, primjerice u unovih lijekova za do sada neizlječive bolesti.

#### 4. POPIS LITERATURE

Aguilera M (2009) Scientists Discover Bioluminescent 'Green Bombers' from the Deep Sea Scripps Institution of Oceanography - scripps.ucsd.edu.

<https://scripps.ucsd.edu/news/scientists-discover-bioluminescent-green-bombers-deep-sea>

Pristupljeno 8. kolovoza 2024.

Anctil M (2018) Raphaël Dubois and the Chemistry of Living Light, Luminous Creatures: The History and Science of Light Production in Living Organisms, Chicago: McGill-Queen's University Press, London, str. 163-180. doi: 10.1515/9780773554092-010.

Anonymous 1 (2017) New study shows that three quarters of deep-sea animals make their own light. MBARI - Monterey Bay Aquarium Research Institute,

<https://www.mbari.org/news/new-study-shows-that-three-quarters-of-deep-sea-animals-make-their-own-light/>. Pristupljeno 27. kolovoza 2024.

Anonymous 2 (2022) Bioluminescence. National Geographic Society,

<https://education.nationalgeographic.org/resource/bioluminescence/>.

Pristupljeno 29. lipnja 2024.

Anonymous 3 (2020) Bloody-belly comb jelly. MBARI - Monterey Bay Aquarium Research

Institut, <https://www.montereybayaquarium.org/animals/animals-a-to-z/bloodybelly-comb-jelly>. Pristupljeno 29. kolovoza 2024.

Anonymous 4 (2010) Anglerfish. National Geographic Animals, [https://www.nationalgeo-](https://www.nationalgeographic.com/animals/fish/facts/anglerfish)

[graphic.com/animals/fish/facts/anglerfish](https://www.nationalgeographic.com/animals/fish/facts/anglerfish). Pristupljeno 29. lipnja 2024.

Anonymous 5 (2009) Researchers solve mystery of deep-sea fish with tubular eyes and transparent head. MBARI - Monterey Bay Aquarium Research Institute, <https://www.mbari.org/news/researchers-solve-mystery-of-deep-sea-fish-with-tubular-eyes-and-transparent-head/>.

Pristupljeno 18. lipnja 2024.

Anonymous 6 (2014). Bioluminescent Reporters | Reporter Gene Applications | An Introduction to Reporter Genes. <https://worldwide.promega.com/resources/guides/cell-biology/bioluminescent-reporters/#reporter-gene-applications-2a2ee08b-5f1b-47dd-a8f7-bc7c6d8bd8fb>.

Pristupljeno 29. kolovoza 2024.

Bach Rojecky, H. (2020) Kemijske i fizikalne osnove bioluminiscencije (završni rad), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Baldwin T. O, Christopher J. A, Raushel F. M, Sinclair J.F, Ziegler M.M, Fisher A.J, Rayment I (1995). Structure of bacterial luciferase. *Current Opinion in Structural Biology*, [online] **5**, 6, 798–809. doi:[https://doi.org/10.1016/0959-440X\(95\)80014-X](https://doi.org/10.1016/0959-440X(95)80014-X).

Britannica (2019) Anglerfish | fish. *Encyclopædia Britannica*, <https://www.britannica.com/animal/anglerfish>. Pristupljeno 29. lipnja 2024.

Brugler MR, Aguado MT, Tessler M, Siddall ME (2018) The transcriptome of the Bermuda fireworm *Odontosyllis enopla* (Annelida: Syllidae): A unique luciferase gene family and putative epitoky-related genes. *PLoS One*, **13**, 8, e0200944. doi: 10.1371/journal.pone.0200944.

Cai X, Li L, Krumholz A, Guo Z, Erpelding TN, Zhang C, Zhang Y, Xia Y, Wang LV (2012) Multi-Scale Molecular Photoacoustic Tomography of Gene Expression. *PLoS One*, **7**, 8, e43999. doi: 10.1371/journal.pone.0043999

Callaway E (2009) Fluorescent puppy is world's first transgenic dog. *New Scientist*. <https://www.newscientist.com/article/dn17003-fluorescent-puppy-is-worlds-first-transgenic-dog/>. Pristupljeno 8. kolovoza 2024.

Campbell Z.T, Weichsel A, Montfort W.R, Baldwin T.O (2009) Crystal Structure of the Bacterial Luciferase/Flavin Complex Provides Insight into the Function of the  $\beta$  Subunit. *Biochemistry*, **48**, 26, 6085–6094. doi:<https://doi.org/10.1021/bi900003t>.



Chambers H (2023). Understanding the Stoplight Loosejaw: A Guide to This Rare Deep-Sea Fish. Wild Explained. <https://wildexplained.com/animal-encyclopedia/understanding-the-stoplight-loosejaw-a-guide-to-this-rare-deep-sea-fish/>. Pristupljeno 1. kolovoza 2024.

Carlson M, Toelen J, Himmelreich U, Debyser Z, Deprest J (2009) 721: Combined non-invasive bioluminescence and magnetic resonance imaging improves detection after pulmonary gene transfer in a fetal mouse model. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **201**, 6, 261. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2009.10.738>.

Cusick K.D. i Widder E.A. (2014) Intensity differences in bioluminescent dinoflagellates impact foraging efficiency in a nocturnal predator. *Bulletin of Marine Science*, **90**, 3, 797–811. doi: 10.5343/bms.2013.1059.

Douglas R, Mullineaux C, Partridge J (2000) Long-wave sensitivity in deep-sea stomiid dragonfish with far-red bioluminescence: Evidence for a dietary origin of the chlorophyll-derived retinal photosensitizer of *Malacosteus niger*. *Philosophical Transactions B*, **72**, 1269-1271. doi: 10.1098/rstb.2000.0681.

Duchatelet L, Delroisse J, Mallefet J (2020) Bioluminescence in lanternsharks: Insight from hormone receptor localization. *General and Comparative Endocrinology*, **294**, 113488. doi: 10.1016/j.ygcen.2020.113488.

Dunstan S L, Sala-Newby G.B, Fajardo A B, Taylor K M, Campbel A K (2000) Cloning and expression of the bioluminescent photoprotein pholasin from the bivalve mollusc *Pholas dactylus*. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 9403–9409. doi:10.1074/jbc.275.13.9403

Eremeeva E.V. i Vysotski E.S. (2018) Exploring Bioluminescence Function of the Ca<sup>2+</sup>-regulated Photoproteins with Site-directed Mutagenesis. *Photochemistry and Photobiology*, **95**, 1, 8–23. doi: 10.1111/php.12945.

Freed LL, Easson C, Baker LJ, Fenolio D, Sutton TT, Khan Y, Blackwelder P, Hendry TA, Lopez JV (2019) Characterization of the microbiome and bioluminescent symbionts across life stages of Ceratioid Anglerfishes of the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiology Ecology*, **95**, 10. doi: 10.1093/femsec/fiz146.

Haddock S, Case J (1999) Bioluminescence spectra of shallow and deep-sea gelatinous zooplankton: ctenophores, medusae and siphonophores. *Marine Biology* **133**, 571–582. doi: 10.1007/s002270050497.

Haddock S, Moline M, Case J (2010) Bioluminescence in the Sea. *Annual Review of Marine Science* **2**, 443-493. doi: 10.1146/annurev-marine-120308-081028

Hardeland R, Burkhardt S, Antolín I, Fuhrberg B, Coto-Montes A (1999) Melatonin and 5-methoxytryptamine in the bioluminescent dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. Restoration of the circadian glow peak after suppression of indoleamine biosynthesis or oxidative stress. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **460**, 387-90.

Jones A. i Mallefet J. (2010) Aposematic use of bioluminescence in *Ophiopsila aranea* (Ophiuroidea, Echinodermata). *Luminiscence*, **25**, 2, 155-156.

Kerum, A. (2018) Zeleni fluorescentni protein (završni rad), Sveučilišni odjel za studije mora, Sveučilište u Splitu, Split

Krasitskaya VV, Bashmakova EE, Frank LA (2020) Coelenterazine-Dependent Luciferases as a Powerful Analytical Tool for Research and Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 20, 7465. doi: 10.3390/ijms21207465.

Kubodera, T., Koyama, Y. and Mori, K. (2007). Observations of wild hunting behaviour and bioluminescence of a large deep-sea, eight-armed squid, *Taningia danae*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **274**, 1613, 1029–1034. doi: 10.1098/rspb.2006.0236.

Letendre F, Twardowski M, Blackburn A, Poulin C, Latz I. M (2024) A review of mechanically stimulated bioluminescence of marine plankton and its applications. *Frontiers in Marine Biology*, **10** .doi: 10.3389/fmars.2023.1299602

Moraes G.V, Hannon M.C, Soares D.M.M, Stevani C.V, Schulze A, Oliveira A.G. (2021) Bioluminescence in Polynoid Scale Worms (Annelida: Polynoidae). *Frontiers in Marine Science*, **8**. doi: 10.3389/fmars.2021.643197.

Moskovitz C (2009) *New worm species found: the 'green bomber'* – NBC news

<https://www.nbcnews.com/id/wbna32495109>.

Pristupljeno 1. kolovoza 2024.

Naso M F, Tomkowicz B, Perry W L III, Strohl W R (2017) Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs*, **31**, 4, 317-334. doi: 10.1007/s40259-017-0234-5

Newton Harvey E (2005) A history of luminescence from the earliest times until 1900, American Philosophical Society, Philadelphia.

Ohlendorf R, Li N, Phi VanVD, Schwalm M, Ke Y, Dawson M, Jiang Y, Das S, Stallings B, Zheng WT, Jasanoff A (2024) Imaging bioluminescence by detecting localized haemodynamic contrast from photosensitized vasculature. *Nature Biomedical Engineering* **8**, 775-786. doi: 10.1038/s41551-024-01210-w

Pandurović, T. (2017) Bioluminiscencija dubokomorskih organizama (završni rad), Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, Osijek

Rojas B, Valkonen J, Nokelainen O (2015) Aposematism. *Current Biology*, **25**, 9, 350–351. doi: 10.1016/j.cub.2015.02.015.

Sargeant J. (2024). *Interesting animals that use bioluminescence in the deep Ocean*. - *Ocean Generation*. [online] Ocean Generation. <https://oceangeneration.org/bioluminescence-in-the-deep-ocean/> Pristupljeno 29. kolovoza 2024.

Sparks J S, Dunlap P V, Smith W L (2005) Evolution and diversification of a sexually dimorphic luminescent system in ponyfishes (Teleostei: Leiognathidae), including diagnoses for two new genera. *Cladistics* **21**, 4, 305–327. doi: 10.1111/j.1096-0031.2005.00067.x.

Tekić T, Maravić Vlahoviček G (2020) Primjena bioluminiscencije u istraživanju i razvoju lijekova. *Farmaceutski glasnik*, **76**, 3, 185–196.

<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:863195>

Smithsonian (2018) Bioluminescence. Smithsonian Ocean, <https://ocean.si.edu/ocean-life/fish/bioluminescence> Pristupljeno 29. lipnja 2024.

Valiadi M, Iglesias-Rodriguez D. (2013) Understanding Bioluminescence in Dinoflagellates- How Far Have We Come? *Microorganisms*, **1**, 1, 3-25. doi: 3390/microorganisms1010003.

Verma SC, Tim Miyashiro T (2013) Quorum Sensing in the Squid-*Vibrio* Symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 8, 16386–16401.

Verma A, Noumani A, Yadav A, Solanki P (2023) FRET Based Biosensor: Principle Applications Recent Advances and Challenges. *Diagnostics*, **13**, 8 doi: 10.3390/diagnostics13081375

Weissman T.A. i Pan Y.A. (2015) Brainbow: New Resources and Emerging Biological Applications for Multicolor Genetic Labeling and Analysis. *Genetics*, **199**, 2, 293–306. doi: 10.1534/genetics.114.172510.

Woo Y, Chaurasiya S, O’Leary M, Han E, Fong Y (2021) Fluorescent imaging for cancer therapy and cancer gene therapy. *Molecular Therapy - Oncolytics*, **23**, 231 – 238. doi: 10.1016/j.omto.2021.06.007

Wongsrikeao P, Saenz D, Rinkoski T, Otoi T, Poeschlacorresponding E (2011) Antiviral restriction factor transgenesis in the domestic cat. *Nature Methods*, **8**, 853–859. doi: 10.1038/nmeth.1703

Yeung P, BBC (2022) The French town where the lighting is alive <https://www.bbc.com/future/article/20220407-the-living-lights-that-could-reduce-energy-use> Pristupljeno 29. lipnja 2024.

Zielke N. i Edgar B.A. (2015) FUCCI sensors: powerful new tools for analysis of cell proliferation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, **4**, 5, 469–487. doi: 10.1002/wdev.189.

## Izjava o izvornosti

Ja Bruna Janček izjavlujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

  
Vlastoručni potpis