



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

TITOLO DELLA TESI

La bioluminescenza delle lucciole:  
dalla chimica delle notti d'estate a possibili applicazioni tecnologiche

Relatore: Prof. Paolo Centomo

Laureanda: Arianna Gentilin

Matricola: 2010385

Anno Accademico 2022/2023



## Sommario

1. INTRODUZIONE.....	1
2. SCOPO DELLA TESI .....	1
3. SINCRONISMO .....	2
4. LUCIFERASI E LUCIFERINA.....	3
4.1 Luciferasi.....	3
4.2 Luciferina .....	3
5. REAZIONE DI LUCIFERASI E LUCIFERINA .....	6
5.1 Reazione Primaria per l'emissione di luce .....	6
5.2 Reazioni Secondarie.....	8
5.3 Ruolo del coenzima A .....	9
6. TRANSIZIONI NELLO SPETTRO LUMINOSO.....	10
6.1 Tautomeria cheto-enolica dell'ossiluciferina .....	10
6.2 Meccanismo del trasferimento di carica intramolecolare intrecciato .....	11
6.3 Polarizzazione del microambiente dell'ossiluciferina .....	11
6.4 Meccanismo della struttura di risonanza.....	12
6.5 Dimensione della cavità proteica della luciferasi .....	12
7. APPLICAZIONI TECNOLOGICHE .....	17
7.1 Quantificazione degli analiti .....	17
7.2 Reporter genico .....	17
7.3 Imaging bioluminescente.....	18
7.3.1 Pro e contro del processo di imaging bioluminescente .....	20
7.4 Tecniche imaging .....	21
7.5 Vibrio fischeri bioluminescence inhibition assay .....	21
8. CONCLUSIONI .....	23
BIBLIOGRAFIA .....	25



## 1. INTRODUZIONE

Le lucciole sono coleotteri appartenenti alla famiglia Lampyriade. Esistono più di 2.000 specie di lampiridi, che popolano la maggior parte delle regioni della terra con climi temperati e tropicali. La loro caratteristica principale è la bioluminescenza, che producono per comunicare e durante il rituale per l'accoppiamento. Per alcune di queste specie, definite "itineranti", i maschi volano da soli alla ricerca della femmina, la quale, invece, rimane appollaiata fra la vegetazione. Il maschio lampeggia ritmicamente e quando anche una femmina lampeggia in risposta, le due lucciole iniziano il corteggiamento che consiste in una serie di lampi alternati necessari per condurre l'uno dall'altra. Esistono, però, molti altri tipi di corteggiamento, come quello delle lucciole presenti in Asia, per cui le lampiridi si radunano in fitti sciami sugli alberi, quasi una per foglia, e qui i maschi lampeggiano nella notte tutti allo stesso ritmo (1).

La bioluminescenza è il risultato di un processo che si verifica in diversi organismi viventi in cui una sostanza eccitata elettronicamente, prodotta durante una reazione chimica, decade al livello di base. La ricerca scientifica ha rivelato il sistema enzima-substrato, costituito rispettivamente da "luciferasi" e "luciferina" (dal latino Lucifero, "Portatore di luce"). Tra tutti gli organismi bioluminescenti le lucciole sono tra le più studiate e ben caratterizzate, specialmente la lucciola nordamericana, *Photinus pyralis* (Ordine Coleoptera, Famiglia Lampyridae) (2).

## 2. SCOPO DELLA TESI

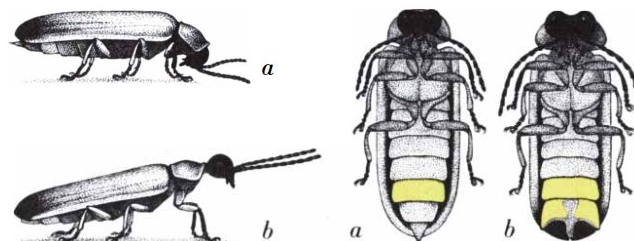
In questa Tesi verrà trattato il fenomeno della sincronia della bioluminescenza che si verifica fra lucciole vicine. Saranno, inoltre, presentate le principali reazioni chimiche catalizzate da *Photinus pyralis* luciferasi, responsabili della bioluminescenza, con particolare attenzione ai componenti principali, luciferasi e luciferina. Dei due composti verrà approfondita la struttura, il funzionamento e le reazioni secondarie a cui possono dar luogo. Verrà analizzato anche il ruolo dei reagenti coinvolti nella reazione, quali ATP-Mg<sup>2+</sup> e O<sub>2</sub>, oltre a quello dei complessi risultanti e dei composti responsabili delle reazioni secondarie, come AMP, PPI-Mg<sup>2+</sup> e CoA.

Saranno, inoltre, presentate le transizioni coinvolte nel processo di bioluminescenza che portano all'emissione di luce di diverso colore. Saranno presentate le diverse ipotesi avanzate

nel corso del tempo, ciascuna delle quali identifica specie diverse come le responsabili dell'emissione di luce. Saranno, infine, descritte alcune applicazioni consolidate e innovative dell'enzima, fra cui l'imaging bioluminescente, il gene *luc* come reporter e test di tossicità basati sulla bioluminescenza.

### 3. SINCRONISMO

La sincronizzazione delle lucciole, osservata principalmente in alcune regioni dell'Asia, è dovuta al loro sistema nervoso e al modo in cui quest'ultimo percepisce il tempo. Più in particolare l'organo luminoso della lucciola è situato vicino al fondo dell'addome e viene attivato da segnali provenienti dal cervello. È stato verificato sperimentalmente che una stimolazione visiva della lucciola causata da una luce circostante innesca la produzione di un lampo nell'organo luminoso della lucciola stessa (Figura 1), con un tempo minimo tra lo stimolo e la risposta (1).



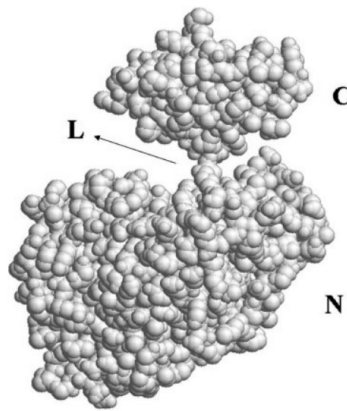
**Figura 1:** Lucciole della specie *Pteroptyx* viste di profilo e dal basso; l'area dei loro organi luminosi è colorata. La femmina (a) è mostrata in posizione di riposo, il maschio (b) è rappresentato in posizione di allerta.

L'intervallo tra uno stimolo e il successivo cambia in base alla specie e va da 560 millisecondi fino a 3 secondi. Si è dimostrato che la sincronizzazione del flash è controllata da una sorta di *pacemaker* che gestisce anche la frequenza del battito cardiaco della lucciola. Per sincronizzarsi con intervalli diversi dal proprio il pacemaker viene resettato e il tempo richiesto per l'arresto e il successivo riavvio spiegano il breve ritardo (pochi millisecondi) tra ogni lampo luminoso (1).

## 4. LUCIFERASI E LUCIFERINA

### 4.1 Luciferasi

La luciferasi è un enzima presente nell'organismo delle lucciole e la sua reazione biochimica con i composti presenti permette la produzione di bioluminescenza. La luciferasi (ossigeno-4-ossidoriduttasi), in particolare, è classificata come *Photinus*-luciferina ed il substrato su cui reagisce chimicamente è la luciferina (LH<sub>2</sub>). Mediante studi cristallografici si è potuto dimostrare come la luciferasi sia costituita da due domini compatti: un dominio più esteso N-terminale, contenente la maggior parte degli amminoacidi fondamentali per l'attività bioluminescente, ed uno più piccolo C-terminale, uniti da uno spaziatore composto da un peptide flessibile (Figura 2) (3).

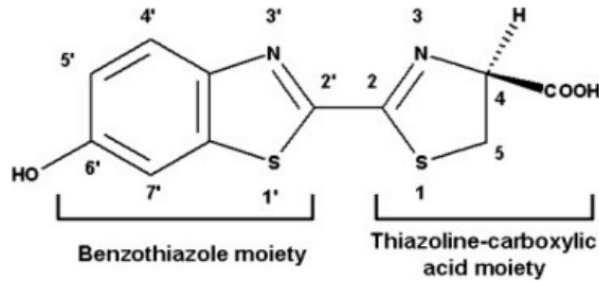


**Figura 2:** Luciferasi *Photinus pyralis*. L'immagine rappresenta il dominio N-terminale più grande e quello C-terminale più piccolo, connessi da uno spaziatore (L).

Durante il corso della reazione questi due domini si uniscono fra loro e con il substrato, comportando un cambiamento nella conformazione. La luciferasi, infatti, adotta una “forma chiusa” quando forma l'intermedio responsabile dell'emissione luminosa e una “forma aperta” quando si complessa con reagenti e prodotti (3).

### 4.2 Luciferina

Il nome della luciferina (LH<sub>2</sub>) delle lucciole è [acido (S)-2-(6'-idrossi-2'-benzotiazolil)-2-tiazolin-4-carbossilico] e la sua struttura, determinata mediante diffrazione dei raggi X, è costituita da un benzotiazolo e un'unità di acido tiazolin-carbossilico connessi da un legame in posizione C2-C2' (Figura 3). La struttura responsabile dell'emissione di luce, in particolare, è solamente la D-luciferina (3).



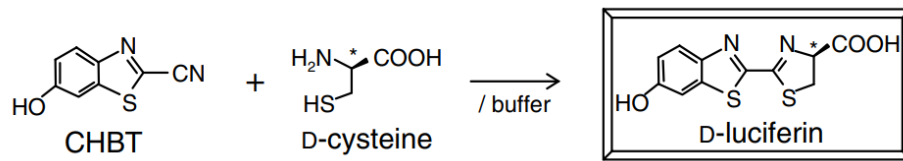
**Figura 3:** Struttura chimica della luciferina presente nelle lucciole *D-LH<sub>2</sub>*; divisa nei due frammenti principali: il benzotiazolo a sinistra e l'acido tiazolin-carbossilico a destra.

Della luciferina, tuttavia, non si conosce ancora il reale meccanismo di sintesi che avviene in natura e non si sa nemmeno se le lucciole possiedono gli enzimi atti alla sua produzione, o se questi vengano introdotti nel loro organismo dall'ambiente esterno. Innanzitutto, in natura, oltre a quella delle lucciole, sono presenti diversi tipi di luciferina, come la luciferina batterica, contenuta in alcuni batteri presenti nei pesci e nei calamari, e la luciferina dinoflagellata, presente in alcune specie di gamberetti. Tuttavia, le strutture di molte altre luciferine appartenenti ad organismi bioluminescenti che vivono nell'oceano, come molluschi e ditteri, rimangono tutt'ora sconosciute. In secondo luogo, esistono due tipi di organismi bioluminescenti: quelli in grado di produrre la propria luciferina *de novo* partendo da metaboliti semplici, e quelli che la acquisiscono da fonti esterne. Nel primo caso l'organismo deve codificare tutti i geni necessari per gli enzimi coinvolti nella biosintesi della luciferina, come avviene per alcuni procarioti; nel secondo caso, invece, l'organismo può acquisire la luciferina mediante altri metodi come, ad esempio, attraverso l'alimentazione, come per l'idromedusa *Aequorea victoria*. È possibile, però, anche un terzo caso, in cui l'organismo bioluminescente sfrutta una combinazione dei due metodi appena citati, ovvero necessita inizialmente dell'acquisizione di un composto fondamentale da un altro organismo, il quale poi viene modificato e convertito nella luciferina effettivamente utilizzata dall'organismo stesso (4).

Si ritiene, tuttavia, che l'origine dell'anello tiazolico della luciferina sia una cisteina, amminoacido coinvolto in un passaggio della reazione di sintesi *in vitro* (4). La cisteina presenta due possibili enantiomeri, L- e D-, che possono generare rispettivamente L-LH<sub>2</sub> e D-LH<sub>2</sub>. In natura, però, solo la forma L- è presente nei peptidi e negli amminoacidi, mentre la

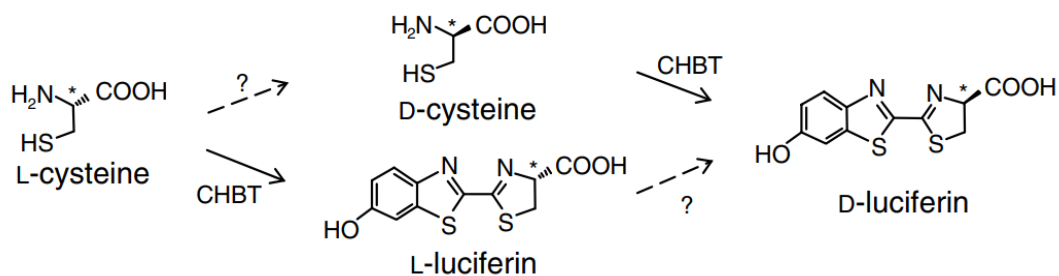


forma D- quindi deve essere prodotta partendo dalla prima. La D-cisteina può reagire con 2-ciano-6-idrossibenzotiazolo (CHBT) per dare la D-LH<sub>2</sub> (Figura 4) (4).



**Figura 4:** Sintesi chimica della D-luciferina, partendo dalla D-cisteina e CHBT.

In alternativa, è possibile anche un processo che avviene in diversi stadi, il primo dei quali è la produzione di L-LH<sub>2</sub> partendo dalla L-cisteina presente in natura, mediante il composto CHBT. La L-LH<sub>2</sub> prodotta viene convertita in L-LH<sub>2</sub>-CoA, a sua volta racemizzato per enolizzazione. Sarà l'idrolisi del solo enantiomero D- prodotto in quest'ultimo passaggio a fornire il substrato bioluminescente osservato nelle lucciole, D-LH<sub>2</sub> (Figura 5) (5).



**Figura 5:** Ipotesica via biosintetica della D-luciferina dalla L-cisteina. Il meccanismo in alto prevede la conversione immediata a D-cisteina e successiva reazione con CHBT. Il meccanismo in basso prevede, invece, la formazione iniziale della L-luciferina.

L'-LH<sub>2</sub> rappresenta quindi un soggetto di difficile interpretazione, in quanto inizialmente si pensava fungesse da inibitore della reazione di bioluminescenza; invece, più recentemente è stato scoperto che la sua conversione in D-LH<sub>2</sub> porta comunque alla produzione del substrato bioluminescente e quindi all'emissione di luce. Tuttavia, la luce prodotta da questo substrato risultante dalla conversione di L-LH<sub>2</sub> è molto diversa da quella proveniente dal D-LH<sub>2</sub> aggiunto direttamente: in particolare, l'intensità risulta più debole (3).

## 5. REAZIONE DI LUCIFERASI E LUCIFERINA

### 5.1 Reazione Primaria per l'emissione di luce

La sintesi chimica che porta alla produzione di bioluminescenza inizia con una reazione del substrato luciferina D-LH<sub>2</sub> con ATP. Si tratta di una reazione di tipo S<sub>N</sub>2 che coinvolge il gruppo fosfato dell'ATP e il gruppo carbossilico dell'anello tiazolinico di D-LH<sub>2</sub>. Nello specifico l'Ossigeno del gruppo carbossilico rappresenta il nucleofilo che attacca il fosforo in posizione α dell'ATP, provocando l'uscita del gruppo, pirofosfato (PPi), e il trasferimento del gruppo adenilato (AMP) sulla luciferina, che la attiva. Si tratta quindi di una reazione di adenilazione, che produce l'anidride mista D-LH<sub>2</sub>-AMP e il complesso ATP-Mg<sup>2+</sup>, necessario a proteggere la carica negativa e a determinare la conformazione dei gruppi fosfato (Figura 6) (3).

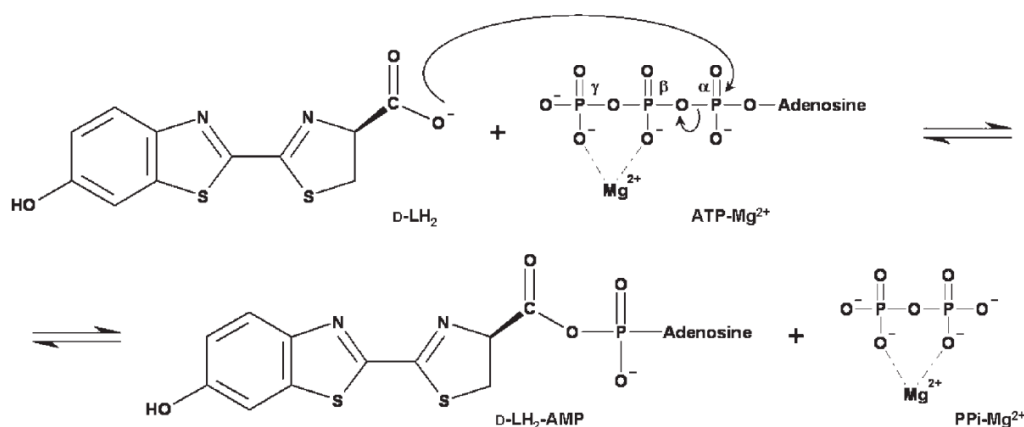
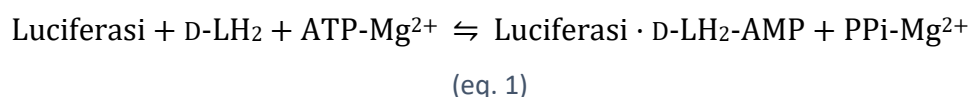
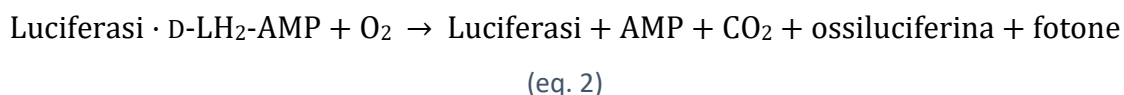
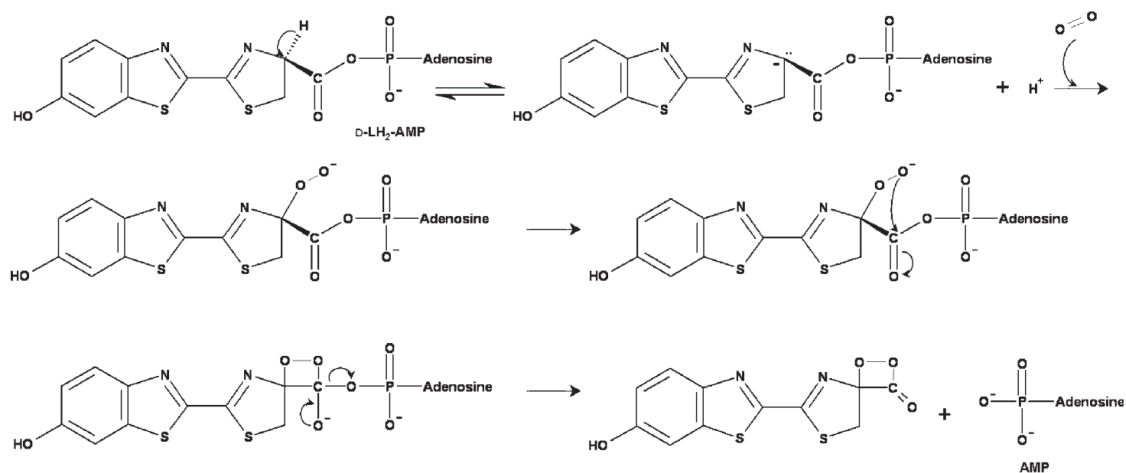


Figura 6: reazione di adenilazione di D-LH<sub>2</sub> e ATP-Mg<sup>2+</sup>.

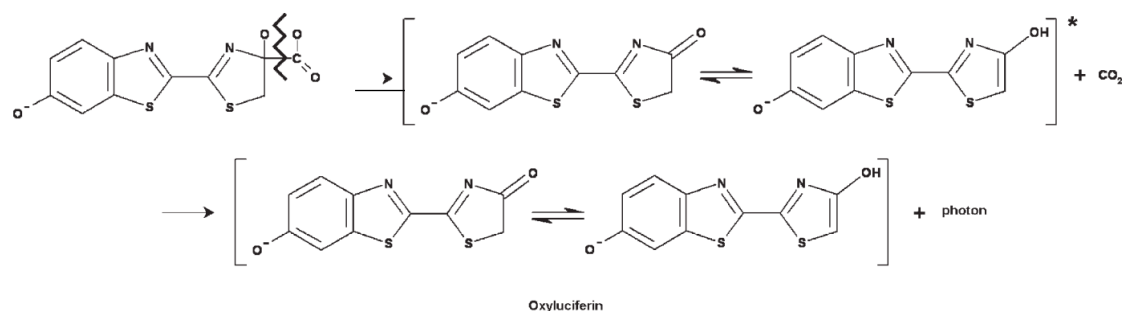
L'intermedio D-LH<sub>2</sub>-AMP in seguito perde un protone formando il carbanione corrispondente, il quale viene attaccato da O<sub>2</sub> molecolare in una reazione di ossidazione (Figura 7).





**Figura 7:** Meccanismo di formazione del diossetanone dall'intermedio D-LH<sub>2</sub>-AMP, con successiva liberazione del gruppo AMP.

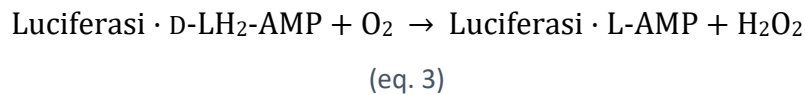
Poiché nella prima fase di adenilazione l'ATP non può donare energia per favorire la reazione, lo spostamento di AMP serve a rendere il C $\alpha$  più acido e ad agevolare quindi la formazione dell'anello a quattro membri, mediante l'attacco da parte del gruppo idroperossidico. In questo modo si ha la formazione del luciferina diossetanone e l'uscita del gruppo AMP. L'instabilità e l'elevata energia del diossetanone ne provocano una rottura immediata e la liberazione di CO<sub>2</sub> come prodotto. La molecola che ne risulta è detta ossiluciferina, presenta tautomeria cheto-enolica e si trova in uno stato eccitato di singoletto. Il suo decadimento allo stato fondamentale provoca la liberazione di un fotone e quindi l'emissione di luce visibile (Figura 8) (3).



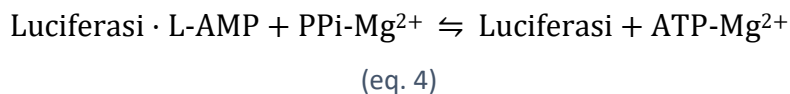
**Figura 8:** Decarbossilazione ossidativa dell'anello del diossetanone per ottenere l'ossiluciferina, l'emettitore di luce, presente nei due tautomeri cheto ed enolico. La rottura spontanea dell'anello diossetanone produce ossiluciferina in uno stato eccitato di singoletto (\*) il cui decadimento al livello fondamentale provoca l'emissione di un fotone.

## 5.2 Reazioni Secondarie

Esistono anche altre reazioni, che coinvolgono gli intermedi che si formano durante il processo, e che non portano tuttavia all'emissione di luce. Una di queste è la reazione della D-LH<sub>2</sub>-AMP con l'ossigeno per formare la deidroluciferil-AMP (L-AMP) (3).



A sua volta la L-AMP può reagire con il prodotto iniziale PPI-Mg<sup>2+</sup>, formando la deidroluciferina (L) e rigenerando l'ATP (eq. 4). Inizialmente si credeva che il prodotto L fosse il responsabile dell'emissione di luce e quindi questo composto veniva indicato erroneamente con il termine luciferina. Si è notato, inoltre, come questa seconda reazione provochi, invece, l'inibizione di parte dell'emissione della luce rilasciata dalla reazione principale. La causa di questo effetto non è il singolo prodotto L, ma la sua adenilazione ad L-AMP (eq. 4, reazione inversa), inibitore molto forte della luciferasi. Si osserva, infatti, che il 20% della quantità di LH<sub>2</sub> consumata è dovuto alla sintesi di L-AMP da D-LH<sub>2</sub>-AMP (eq. 3).

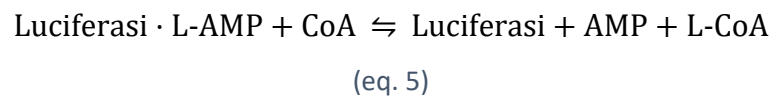


L-L-AMP non è l'unico inibitore di luce nel processo: ad esempio, anche l'ossiluciferina stessa mostra un comportamento simile. Entrambi i prodotti, infatti, sono responsabili del caratteristico modello a luce alternata emessa dalle lucciole. È per questo motivo che la reazione secondaria presentata nell'eq. 4, in cui un forte inibitore, L-AMP, viene sostituito da un inibitore L meno efficace, è in realtà favorevole alla produzione di luce. Il prodotto L, infatti, oltre ad avere caratteristiche di inibitore molto meno efficaci, può essere anche facilmente rimosso dal sito attivo della luciferasi: la perdita di luminescenza risulta perciò più limitata (3).

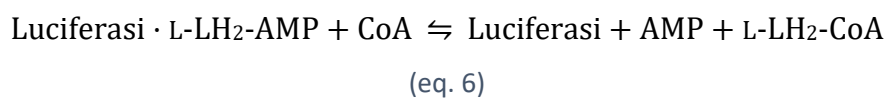
Un ruolo ambiguo e paradossale è anche quello del PPI, per il quale, essendo un prodotto della fase di adenilazione (eq. 1), ci si aspetterebbe un effetto inibitorio. Infatti, tale comportamento viene osservato in condizioni di bassa concentrazione di ATP. Tuttavia, lo stesso PPI può agire anche da attivatore della bioluminescenza mediante la pirofosforolisi dell'L-AMP: il forte inibitore viene in questo modo rimosso per formare i due prodotti L e ATP (eq. 4). In questo secondo caso il ruolo di attivatore viene giustificato da un'elevata concentrazione di ATP (6).

### 5.3 Ruolo del coenzima A

Il ruolo importante del coenzima A nella reazione della luciferasi è stato studiato da *Marques e collaboratori* (3). Il coenzima A (CoA), infatti, non è presente come reagente nella reazione che si verifica in natura, ma, se aggiunto *in vitro* durante il processo, può modificare l'emissione di luminescenza. In primo luogo, se il CoA viene utilizzato come reagente iniziale, si crea un'illuminazione a luce continua e non più il modello a lampeggi alternati. Se, invece, viene aggiunto nel mezzo della reazione, quando già si osserva l'emissione di luce, il CoA promuove un lampo di luce secondario, che si alterna al primo. Nel dettaglio, il CoA è coinvolto in due reazioni, la prima delle quali è catalizzata da luciferasi e coinvolge l'inibitore L-AMP con la formazione di L-CoA, deidroluciferil-CoA, un inibitore meno efficiente (eq. 5). In questo modo la luciferasi può continuare a catalizzare la reazione che produce luce e che risulta meno disturbata da agenti secondari.



La seconda reazione che coinvolge CoA è quella con L-LH<sub>2</sub>-AMP ed ha come prodotto L-luciferil-coenzima A. Il reagente L-LH<sub>2</sub>-AMP, e prima di esso L-LH<sub>2</sub>, non sono coinvolti nella reazione principale e quindi non portano alla produzione di luce alla fine del processo e agiscono perciò come inibitori di reazione. L'eq. 6, quindi, guidata dal reagente CoA, rimuove tali specie dalla reazione e favorisce l'illuminazione.



Il motivo per cui il CoA reagisce con la luciferasi non è ancora del tutto chiaro, ma una possibile spiegazione è legata alla somiglianza della biochimica tra le reazioni catalizzate dalla luciferasi e da alcune ligasi, come l'acil-CoA. Questo enzima catalizza l'adenilazione degli acidi grassi con un meccanismo molto simile alla fase di adenilazione della reazione bioluminescente della luciferasi. Poiché gli acidi grassi si comportano come inibitori della reazione della luciferasi, la loro conversione in acil-adenilati grassi rappresenta un altro modo per favorire la produzione di luce (3).

## 6. TRANSIZIONI NELLO SPETTRO LUMINOSO

In condizioni di pH leggermente basico (pH 7.5-7.8), la regione dello spettro di emissione di colore giallo-verde, caratteristica della luciferasi, cade nell'intervallo 550-570 nm, con un picco centrato a 562 nm. Poiché la luciferasi è un enzima sensibile a variazioni di pH, la banda di emissione può spostarsi fino a 620 nm in ambiente acido. Sono state proposte diverse ipotesi per spiegare questo fenomeno, la prima delle quali fu avanzata da White e collaboratori (2).

### 6.1 Tautomeria cheto-enolica dell'ossiluciferina

La prima ipotesi per spiegare la dipendenza dello spettro di emissione della luciferasi dal pH è basata sulle diverse conformazioni, chetonica ed enolica, che l'ossiluciferina può assumere. Si osservò il cambiamento del colore della luce in diverse condizioni di pH e fu proposto che lo stato eccitato della forma chetonica dell'anione  $\text{OxyLH}_2$  rilassasse emettendo luce rossa, mentre lo stato eccitato della forma enolica dello stesso composto emettesse luce giallo-verde (Figura 9). La modulazione del colore dipenderebbe quindi dall'equilibrio cheto-enolico dell'ossiluciferina, influenzato a sua volta dalla polarità dell'ambiente in cui si trova il sito attivo (7,8).

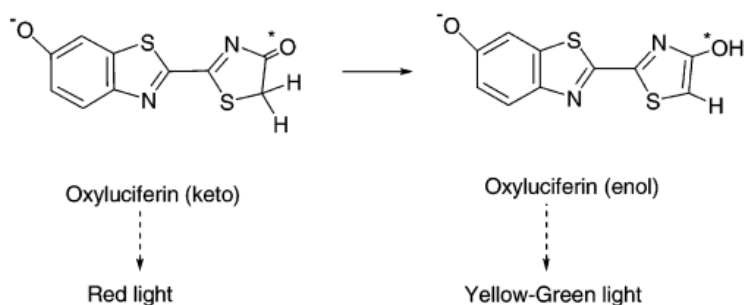


Figura 9: Strutture chimiche dei tautomeri dell'ossiluciferina (9).

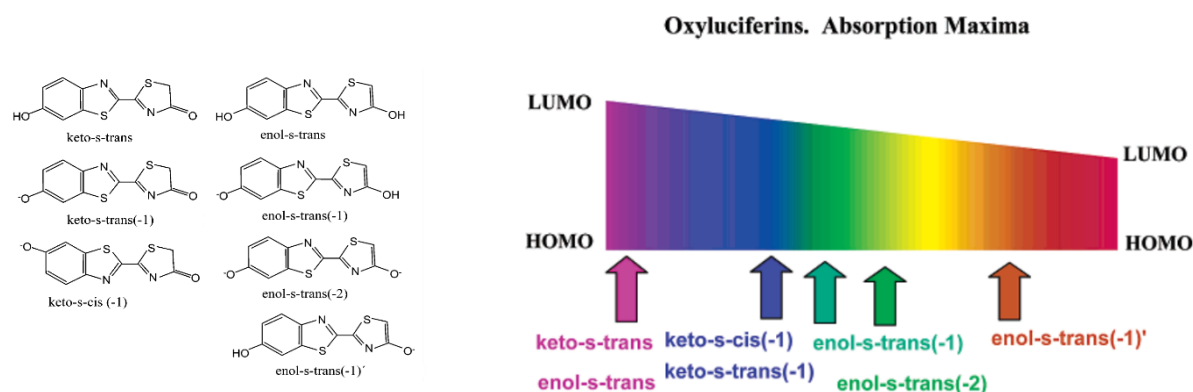
Più recentemente, sulla base di evidenze sperimentali e calcoli teorici, è stato dimostrato come l'unica forma responsabile della luminescenza multicolore sia la forma chetonica  $\text{OxyLH}_2$  dell'anione ossiluciferina fenolato allo stato eccitato di singoletto. A questo riguardo, il ruolo della polarità del sito attivo nel colore della bioluminescenza è stato considerato come uno dei fattori ambientali più influenti nella stabilizzazione della carica negativa sullo ione fenolato di ossiluciferina (2).

## 6.2 Meccanismo del trasferimento di carica intramolecolare intrecciato

Un altro meccanismo per spiegare la dipendenza dello spettro di emissione della luciferasi dal pH, riportato da *McCrapra e collaboratori* (10), prevede che il tautomero chetonico sia l'unico responsabile dell'emissione di luce, sia rossa che verde. Sulla base di questa ipotesi, la variazione di colore è associata alla rotazione attorno al legame C2-C2' (Figura 3) della porzione  $-N=C-C=N-$  del composto: la conformazione ad energia minima con rotazione di  $\phi=90^\circ$  emette luce rossa, quella con  $\phi<90^\circ$  corrisponde, invece, alla conformazione ad alta energia ed emette luce verde. Tuttavia, questo modello è stato confutato quando è stato dimostrato che il legame C2-C2' possiede un parziale carattere di doppio legame: di conseguenza, affinché possa avvenire la rotazione, è necessario superare una barriera di energia alquanto elevata. Di fatto, le evidenze più recenti suggeriscono che la diversa emissione di fluorescenza dell'ossiluciferina in funzione del pH sia dovuta ad un'unica forma chetonica, priva di rotazioni di legame (2).

## 6.3 Polarizzazione del microambiente dell'ossiluciferina

L'ipotesi proposta da *Hirano e collaboratori* (11) per spiegare la variazione di colore della bioluminescenza in funzione del pH è basata sull'interazione dell'ossiluciferina con l'ambiente. In particolare, il modello proposto considera la correlazione tra la colorazione e la polarizzazione dell'OxyLH<sub>2</sub>, associando la luce rossa ad una maggiore polarizzabilità. Sono state identificate le diverse forme di enolato dell'ossiluciferina (enol-s-trans<sup>(-1)</sup>, enol-s-trans<sup>(-2)</sup> ed enol-s-trans<sup>(-1)'</sup>), considerate responsabili dell'emissione di luce dal verde al rosso, mentre alle strutture cheto-s-trans, cheto-s-cis<sup>(-1)</sup> e cheto-s-trans<sup>(-1)</sup> è associato l'intervallo dal viola al blu (Figura 10).



**Figura 10:** Massimi di assorbimento previsti per le forme neutre ed anioniche delle strutture chetoniche ed enoliche di OxyLH<sub>2</sub> (12).

Questa ipotesi si contrappone perciò al modello che prevede che la forma chetonica sia l'unica conformazione ad emettere luce: quest'ultimo modello viene perciò considerato plausibile, ma non necessario per spiegare l'origine della bioluminescenza multicolore (11).

#### 6.4 Meccanismo della struttura di risonanza

Secondo l'ipotesi riportata da *Branchini e collaboratori* (9) la modulazione del colore di bioluminescenza è dovuta alla delocalizzazione della carica negativa in due posizioni diverse della conformazione cheto-anionica dell'ossiluciferina allo stato eccitato. È presente, infatti, un ibrido di risonanza dello stato eccitato ad energia inferiore rispetto al primo, responsabile dell'emissione rossa (Figura 11). Esiste perciò uno stato eccitato che contiene il gruppo  $-N=C-C=N-$  (I) che rilassa emettendo luce verde, ed uno caratterizzato dalla porzione  $-N-C=C-N-$  (II), che rilassa emettendo luce rossa (9).

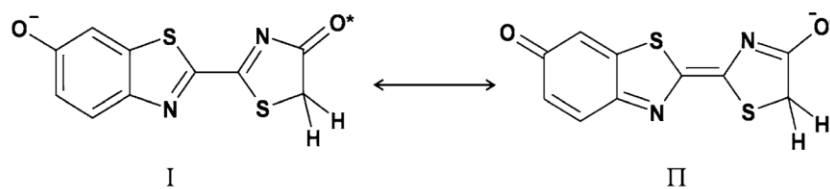
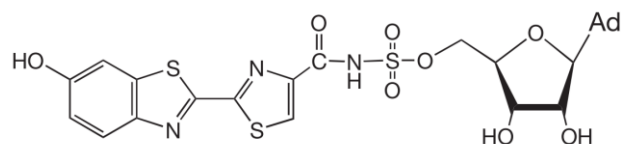


Figura 11: Delocalizzazione di carica nell'anione ossiluciferina

#### 6.5 Dimensione della cavità proteica della luciferasi

*Nakatsu e collaboratori* (13) propongono che lo spostamento verso il rosso dello spettro di emissione della luciferasi in ambiente acido sia dovuto a cambiamenti conformazionali dell'enzima e in particolare alla sostituzione di un singolo amminoacido all'interno della struttura della luciferasi. Sono state analizzate due diverse strutture di luciferasi appartenenti alla specie *Luciola Cruciata*: il *wild-type* e il *red mutant* (S286N), complessati con un intermedio ad alta energia, 5'-O-[N-(deidroluciferil)-sulfamoil] adenosina (DLSA), analogo al complesso Luciferil-AMP (Figura 12). Il red mutant (S286N) possiede una catena di Asparagina in posizione 286, a differenza del wild-type, che nella stessa posizione presenta una catena che contiene Serina. Confrontando le strutture ottenute con DLSA con quelle delle luciferasi complessate con AMP e ossiluciferina, i reali prodotti di reazione, si osservano dei cambiamenti conformazionali solamente per l'enzima wild-type e non per il red mutant (13).





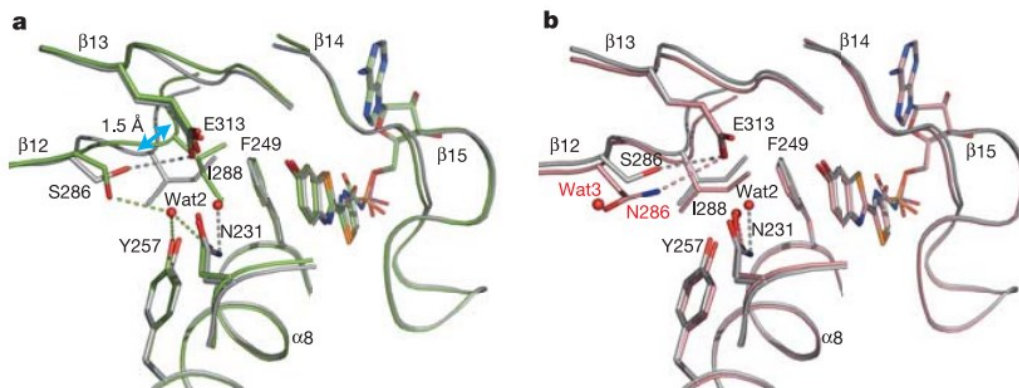
**5'-O-[N-(dehydroluciferyl)-sulfamoyl]adenosine (DLSA)**

*Figura 12: Struttura del DLSA, intermedio analogo del complesso Luciferil-AMP.*

La struttura cristallina della luciferasi wild-type complessata con DLSA presenta la caratteristica divisione nei due domini N-terminale e C-terminale. Le conformazioni delle frazioni deidroluciferina e sulfamoyladienosina nel complesso con DLSA sono molto simili rispettivamente a quelle dell'ossiluciferina e dell'AMP nel complesso AMP/ossiluciferina: questa evidenza suggerisce che l'analogo intermedio con DLSA mima in modo piuttosto efficiente ossiluciferina e AMP. Considerando quindi le strutture della luciferasi wild-type nei complessi con Mg-ATP (reagente), DLSA (intermedio ad alta energia) e AMP/ossiluciferina (prodotti), si nota come le strutture della luciferasi legate ai reagenti e ai prodotti siano simili, mentre si osservano differenze significative nella struttura del complesso con DLSA. I complessi con reagenti e prodotti possiedono un sito attivo in forma aperta, poiché il substrato è meno impacchettato rispetto al complesso con DLSA. Inoltre, il filamento  $\beta$ 12 del complesso con DLSA è molto più vicino al sito di legame della luciferina rispetto alle altre due strutture e, più in particolare, il  $C\alpha$  dell'Isoleucina Ile 288 si trova più vicino al DLSA e la catena laterale dell'Ile 288 è ruotata di  $131^\circ$  (Figura 13a). Questo movimento coinvolge la catena laterale della Serina, Ser 286, che normalmente è legata alla catena dell'Acido glutammico, Glu 313, nei complessi di luciferasi-AMP/ossiluciferina, mentre nel complesso con DLSA forma nuovi legami a idrogeno con la Tirosina, Tyr 257, e l'Asparagina, Asn 231, attraverso una molecola d'acqua (Wat 2). Questo cambiamento conformazionale è accompagnato anche da una leggera rotazione della catena laterale della Fenilalanina, Phe 249, verso DLSA. Questi spostamenti si traducono in una "forma chiusa" del sito attivo, ovvero una struttura in cui l'anello benzotiazolico di DLSA è strettamente inserito in una tasca idrofobica (13).

Pertanto, l'enzima wild-type può cambiare la sua conformazione durante il processo catalitico creando un microambiente estremamente idrofobo (forma chiusa) per lo stato eccitato di ossiluciferina, dato dal movimento transitorio delle catene laterali dell'Ile 288. La "forma

aperta” del sito attivo rappresenta la struttura della luciferasi quando questa si trova nello stato fondamentale, sia prima che dopo la reazione, mentre la “forma chiusa” corrisponde alla forma attiva dell’enzima durante il corso della reazione. Con il procedere della reazione si sviluppa l’intermedio luciferil-AMP che lega l’ossiluciferina allo stato eccitato; la disposizione chiusa della catena laterale fa avvenire la reazione in condizioni non polari e in un ambiente rigido, favorendo una perdita minima di energia prima dell’emissione di luce giallo-verde (13).

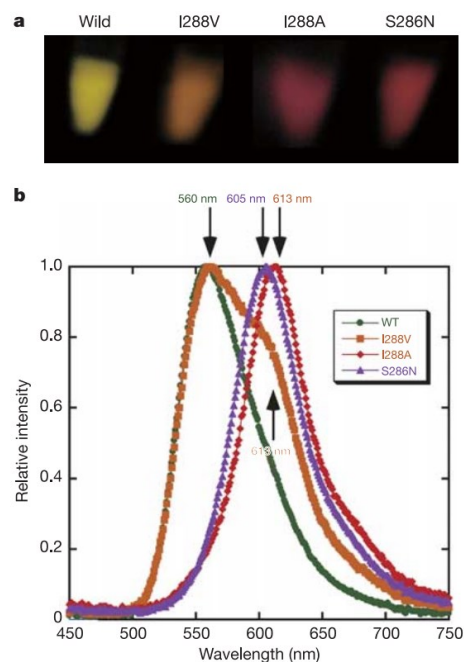


**Figura 13:** a) Sovrapposizione delle strutture dei complessi *Luciferasi(WT)*-DLSA (verde) e *Luciferasi(WT)*-AMP/ossiluciferina (bianco). b) Sovrapposizione delle strutture dei complessi *Luciferasi(S286N)*-DLSA (rosa) e *Luciferasi(WT)*-AMP/ossiluciferina (bianco). Le interazioni polari sono mostrate come linee tratteggiate.

Il motivo per cui, al contrario, il complesso *Luciferina(S286N)*-DLSA non adotta la “forma chiusa” del sito attivo sembra essere dovuto al fatto che la catena di Asn 286 si lega mediante legami a idrogeno a Glu 313 e ad una molecola d’acqua (Wat 3), bloccando la catena di Ile 286 e costringendo l’enzima a mantenere la “forma aperta” (Figura 13b). Il sito attivo, quindi, rimane nella forma aperta durante tutta la reazione e l’ambiente, meno rigido, porta alla perdita significativa di una parte dell’energia dello stato eccitato. Si osserva di conseguenza un rilassamento termico che in questo secondo caso comporta l’emissione di luce rossa a bassa energia. Questa ipotesi collega quindi la modulazione del colore alla dimensione della tasca proteica della luciferasi ed alla quantità di energia che questa può rilasciare durante il rilassamento dello stato eccitato: una forma non rilassata emette luce giallo-verde, mentre in seguito al rilassamento strutturale emette luce rossa (13).

Ulteriori studi per confermare questa ipotesi sono stati eseguiti preparando due mutanti I288V e I288A, costituiti da sostituenti amminoacidici rispettivamente da Valina (Val) e Alanina (Ala) in posizione 288, e analizzando le differenze nei loro spettri di emissione. I288V e I288A

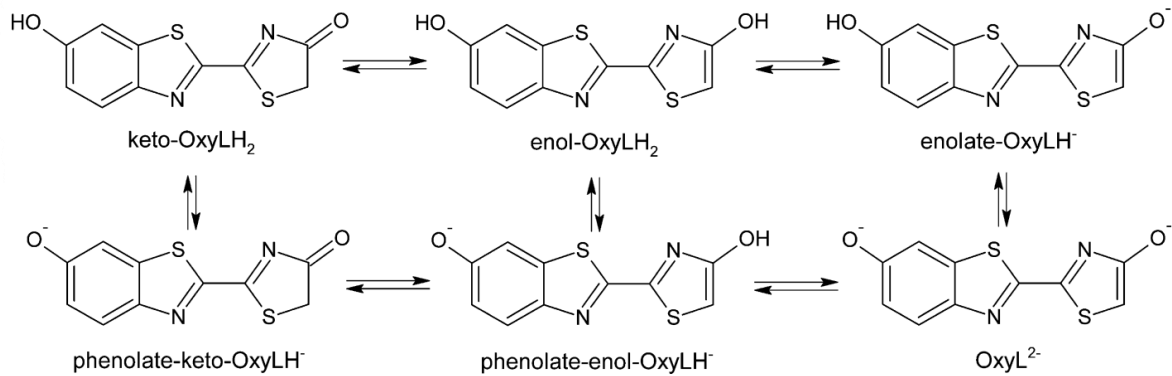
emettono luce rispettivamente nella banda arancione e rossa (Figura 14a), con leggeri spostamenti dovuti alle diverse dimensioni e idrofobicità della catena laterale, riconfermando il ruolo fondamentale di quest'ultima nella colorazione della luce osservata. È stato inoltre osservato come, a differenza degli altri, il mutante I288V presenti due picchi di emissione, anziché uno, a 560 nm e a 613 nm (Figura 14b). Questo dimostra l'esistenza di due stati eccitati a diversa energia, uno ad energia più elevata che emette luce giallo-verde, a 560 nm, e uno ad energia inferiore che emette luce rossa, a 613 nm. Questo indica che gli stati eccitati rilassano da un livello di energia superiore ad uno con energia inferiore quando il residuo amminoacidico nella posizione 288 passa da Ile a Val ad Ala. Questa evidenza indica quindi che la colorazione varia dal giallo-verde al rosso in base alla progressiva diminuzione delle dimensioni e dell'idrofobicità della catena laterale (13).



**Figura 14:** Colore della bioluminescenza del wild-type e delle tre forme mutanti (I288V, I288A e S286N) di luciferasi. a) Fotografie di bioluminescenza mediante una reazione catalizzata da luciferasi. b) Spettri di emissione dei quattro tipi di luciferasi appartenenti a *Luciola Cruciata*.

In conclusione, quindi non esiste un unico modello per spiegare l'origine della modulazione del colore nella bioluminescenza delle lucciole, ma sono state avanzate sei diverse ipotesi contrastanti circa la struttura della molecola responsabile dell'emissione, la più quotata delle quali vede coinvolto l'anione fenolato nella forma chetonica (Figura 15). Il motivo per cui si considera l'anione è dovuto al fatto che la forma neutra dell'ossiluciferina è un emettitore blu

in tutte le condizioni, sia allo stato eccitato che in quello fondamentale. Tuttavia, non essendo osservata l'emissione blu nel sistema biologico reale, l'emettitore nello stato eccitato non può trovarsi nella forma neutra, ma in quella ionizzata.



**Figura 15:** Possibili strutture chimiche di legame dell'ossiluciferina OxyLH<sub>2</sub>. La struttura identificata come l'emettitore di luce è l'anione fenolato nella forma chetonica, in basso a sinistra (14).

Molti fattori, fra cui pH, polarità del microambiente, presenza di specie ioniche nella cavità, ecc., possono influire, anche collettivamente, sulla struttura che assumerà il composto durante l'emissione. Purtroppo, gli studi riportati fino ad oggi trascurano i contributi sterici ed elettrostatici della proteina e il trasferimento di carica, che devono essere approfonditi per descrivere più accuratamente il fenomeno. Sono due i principali risultati ottenuti dagli studi pubblicati finora: in primo luogo, il fenomeno multicolore della bioluminescenza è correlato principalmente alla polarizzazione, derivante da diversi legami H, dell'ambiente circostante la Oxy-LH<sub>2</sub>; in secondo luogo, la dimensione della cavità della luciferasi non influisce abbastanza sul substrato dell'ossiluciferina per poter essere la causa della modulazione di colore (2).

## 7. APPLICAZIONI TECNOLOGICHE

I saggi basati sulla bioluminescenza, nell'ultimo decennio, sono stati sfruttati come strumenti atti al monitoraggio dell'espressione genica, alla localizzazione di proteine e le loro interazioni, al rilevamento di infezioni, al monitoraggio della morte cellulare e dell'apoptosi, della crescita tumorale e delle metastasi, per sviluppare saggi genici reporter e svolgere screening farmacologici. I principali vantaggi delle tecniche basate sulla bioluminescenza sono legati a rumore di fondo molto basso nei sistemi biologici, versatilità, non invasività, riproducibilità, alta velocità, alta sensibilità, facilità di esecuzione del saggio e costi limitati (2).

Le aree di interesse principali sono la quantificazione di alcuni analiti della reazione luminosa, come l'ATP, e l'utilizzo del gene *luc* come reporter genico in studi di biologia molecolare e biomanaging (3).

### 7.1 Quantificazione degli analiti

Il primo risultato utile dal punto di vista tecnologico è stato l'isolamento e la purificazione delle luciferasi appartenenti a diverse specie, delle quali attualmente sono infatti disponibili kit commerciali. Il principale analita che viene quantificato dalla luciferasi è l'ATP, essendo l'intensità luminosa prodotta dalla reazione principale proporzionale alla concentrazione di quest'ultimo. La quantificazione di ATP è inoltre una procedura essenziale nell'industria alimentare, come indicatore di contaminazione batterica. Viene infatti utilizzato per la determinazione della carica microbica sulle superfici a contatto con gli alimenti. Sebbene questa tecnologia non possa ancora sostituire le tecniche tradizionali, si è rivelata utile per il monitoraggio in tempo reale della pulizia di tali superfici mediante la decarbossilazione ossidativa della luciferina in presenza dell'ATP. La quantità di luce emessa viene misurata da un luminometro ed è dipendente dalla contaminazione superficiale (15).

### 7.2 Reporter genico

Il progresso recente della biologia molecolare ha permesso il clonaggio e il sequenziamento dei geni delle luciferasi, che possono essere quindi utilizzati con successo come strumenti analitici. È stata quindi sviluppata questa nuova applicazione per le luciferasi come reporter genici, ovvero geni che producono un segnale misurabile in base a determinate condizioni e riportano il modello dell'espressione genica o l'attività dei recettori cellulari. Il gene *luc*

dev'essere introdotto all'interno dell'organismo desiderato per mezzo di un vettore di espressione, come un plasmide. All'interno della cellula poi il gene *luc* viene tradotto in proteina luciferasi funzionale. In seguito, l'aggiunta di D-LH<sub>2</sub> e ATP-Mg<sup>2+</sup> porta ad un'emissione luminosa che viene registrata mediante il luminometro. Questa tecnica viene utilizzata per identificare le sequenze regolatorie o le regioni promotrici nel genoma e nello screening di farmaci (3).

### 7.3 Imaging bioluminescente

L'imaging bioluminescente (BLI) è una tecnica basata sull'utilizzo della luciferasi come reporter genico. Questa tecnica sfrutta il meccanismo bioluminescente per l'analisi in tempo reale dello sviluppo di una malattia a livello molecolare, il monitoraggio e la progressione dell'infezione negli organismi viventi. Particolare importanza ha, nell'ambito della biologia *in vivo*, come applicazione in laboratorio su animali di piccola taglia. La mancanza di bioluminescenza intrinseca nei tessuti dei mammiferi rende l'imaging uno strumento molto sensibile, non invasivo e conveniente dal punto di vista economico. La sensibilità di rilevamento delle sorgenti luminose interne dipende da diversi fattori: il livello di espressione della luciferasi, la profondità delle cellule marcate, per la distanza che devono percorrere i fotoni attraverso i tessuti, e la sensibilità del sistema stesso di rilevamento (16). Il BLI acquisisce come emissione luminosa una lunghezza d'onda di circa 560 nm o superiore, che penetra attraverso diversi centimetri di tessuto. Pertanto, è possibile rilevare la luce emessa dagli organi interni di piccoli animali che esprimono la luciferasi come reporter. Lo strumento utilizzato per questa tecnica è un dispositivo ad accoppiamento di carica (CCD, Charge Coupled Device) che riesce a catturare la luce emessa dalla luciferina in modo non invasivo, convertendo i fotoni in elettroni. La CCD crea un'immagine a colori, in base all'intensità della luce, che viene sovrapposta ad una fotografia di riferimento dell'animale che si vuole analizzare, rendendo chiara e riconoscibile la posizione e la massa delle cellule marcate con la luciferasi (Figura 16) (16).

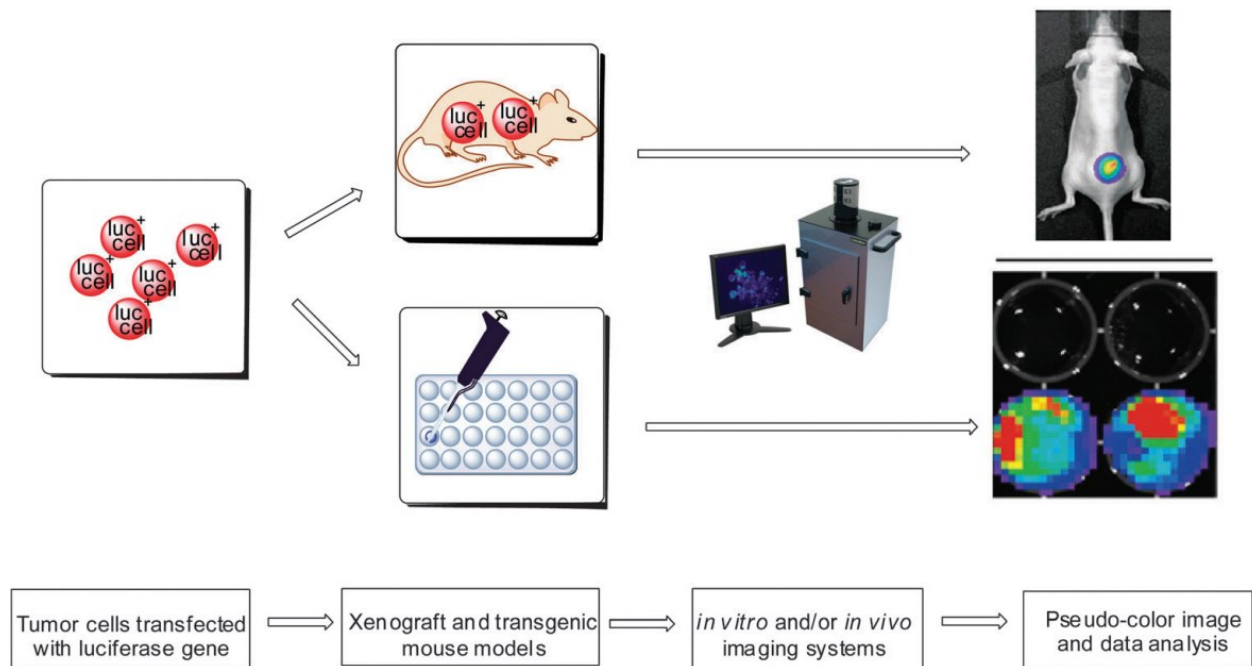


Figura 16: Schema dell'imaging bioluminescente.

I fotoni prodotti nella reazione tra luciferina, ATP e  $Mg^{2+}$  vengono sia dispersi che assorbiti durante l'attraversamento dei tessuti e, in particolare, la luce con lunghezza d'onda più corta viene in gran parte assorbita (luce blu-verde), mentre luce con lunghezza d'onda più lunga (luce rossa) attraversa i tessuti. L'emoglobina, infatti, è il principale responsabile dell'assorbimento di luce nel corpo e assorbe principalmente nella regione blu-verde dello spettro, respingendo invece la regione del rosso. Pertanto, la luce rossa può essere trasmessa in profondità attraverso diversi centimetri di tessuto ed essere comunque rilevata più facilmente, rispetto alla luce blu-verde. È, inoltre, importante considerare le condizioni ambientali durante la selezione, le quali portano ad un'elevata variabilità nella risposta. Questo rappresenta un problema nei test che utilizzano la luciferasi come reporter, ma può essere superato sfruttando sistemi *dual-reporter*, ovvero sistemi in cui, oltre al reporter principale, viene utilizzato anche un secondo reporter di controllo, con emissione di colore diverso, per migliorare la qualità del segnale e distinguere il segnale principale dalle interferenze. Nel caso dei sistemi *dual-reporter* è più utile la luciferasi che emette nella regione di luce rossa, sia per l'applicazione in biosensori che per la riduzione al minimo dell'assorbimento di luce (2,3). Risulta oltretutto significativa la scelta delle luciferasi più appropriate all'uso nell'imaging a bioluminescenza. Le luciferine utilizzate, fra cui D-luciferina

e aminoluciferina, possono produrre luminescenza quando reagiscono con opportune molecole seguendo una procedura in due stadi: inizialmente, i substrati vengono scissi da specifici enzimi o molecole bioattive; in seguito, la luciferina viene ossidata dalla luciferasi per emettere luce, secondo la reazione principale. L'intensità della luce emessa è correlata alla quantità di luciferina disponibile e quindi all'attività degli enzimi nella prima fase del processo. Allo scopo di monitorare l'andamento di tale attività enzimatica sono state progettate sonde opportune, che rilasciano luciferina in presenza di enzimi specifici, emettendo luce. (17).

### 7.3.1 Pro e contro del processo di imaging bioluminescente

Il BLI non richiede una sorgente luminosa di eccitazione, anzi viene eseguito in condizioni di oscurità assoluta, garantendo l'assenza di rumore di fondo, dovuta alla mancanza di espressione della luciferasi da parte dei modelli cellulari e animali analizzati. Si tratta di una tecnica semplice da eseguire e consente il monitoraggio durante tutto il decorso della malattia, senza causare danni agli animali da laboratorio. È possibile, quindi, svolgere più misure nello stesso animale riducendo al minimo gli effetti della variazione biologica. Tuttavia, anche il BLI presenta diversi svantaggi, fra cui l'assenza di substrati luciferasi alternativi alla luciferina e l'aminoluciferina e il tempo di dimezzamento relativamente breve di tali substrati, inadatto quindi ad approcci che richiedono lunghi tempi di integrazione. Inoltre, poiché la reazione tra luciferina e luciferasi richiede molti cofattori, come ATP e  $Mg^{2+}$ , questo metodo si limita ancora all'analisi di cellule ingegnerizzate o di piccoli animali, mentre il possibile impiego negli esseri umani rimane ancora una prospettiva a lungo termine (17). Un altro svantaggio è la possibile attenuazione della luce visibile prodotta dalla luciferasi in seguito ad assorbimento o diffusione della luce da parte dei tessuti dei mammiferi: come regola generale, per ogni centimetro di profondità del tessuto si verifica una perdita di intensità fotonica pari a circa dieci volte. Pertanto, nonostante il BLI rappresenti una tecnica potente e unica, le analisi con questa tecnica sono ancora in via di sviluppo e devono quindi essere affrontate con cautela (16).

Il BLI è stato utilizzato su piccoli animali anche nella ricerca sul cancro, per tracciare le metastasi e misurare il carico tumorale utilizzando delle cellule tumorali specifiche che esprimono la luciferasi. Questo tipo di analisi, che presenta una sensibilità piuttosto elevata,



si è rivelato utile per comprendere la patogenesi delle metastasi *in vivo*. La bioluminescenza misurata è, infatti, proporzionale al numero di metastasi avvenute (16).

#### 7.4 Tecniche imaging

Oltre al BLI, altri metodi non invasivi di imaging sono la risonanza magnetica (MRI), la tomografia a emissione di positroni (PET), la tomografia computerizzata a emissione di fotone singolo (SPECT) e l'imaging a fluorescenza (FLI) (17). La risonanza magnetica (MRI) è una tecnica che sfrutta l'imaging bioluminescente per mappare la struttura interna del corpo e identificare lesioni interne difficilmente determinabili con altri metodi. Viene spesso utilizzata per la valutazione di malattie epatiche. I vantaggi della risonanza magnetica si basano sulla produzione di immagini ad alta qualità, sulla velocità, sull'accuratezza diagnostica e sullo sviluppo di nuovi agenti di contrasto specifici (18). La tomografia ad emissione di positroni (PET) è una tecnica diagnostica di medicina che produce delle stime quantitative della concentrazione farmacologica in punti specifici all'interno del corpo mediante immagini (19). La tomografia computerizzata a emissione di fotone singolo (SPECT) viene utilizzata per applicazioni diagnostiche non invasive. I principali vantaggi della SPECT sono rappresentati da una migliore correzione dell'attenuazione, da una maggiore specificità e da una rappresentazione accurata della localizzazione della malattia e del possibile coinvolgimento dei tessuti adiacenti (20). L'imaging a fluorescenza (FLI) è una tecnica utile per rilevare i processi biologici che avvengono in esseri viventi grazie al suo basso costo e all'alta velocità. Utilizza una sorgente luminosa di eccitazione e non può essere utilizzato nei tessuti più profondi perché rischia di causare danni cellulari (17).

#### 7.5 *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay

Il saggio di inibizione *Vibrio Fischeri* Bioluminescence Inhibition Assay (VFBI) è un tipo di test per la valutazione della tossicità utilizzato per diverse classi di inquinanti. Il principio alla base di tale test è la correlazione tra la tossicità della sostanza analizzata e i cambiamenti nella cinetica di una reazione bioluminescente, con conseguente diminuzione della luce emessa. *Vibrio fischeri* è un batterio presente in ambienti marini che emette luminescenza per mimetizzarsi o attirare prede. Possiede due substrati per la reazione luminescente: una luciferina e un'aldeide a catena lunga. La luciferina viene ridotta attraverso l'azione enzimatica della luciferasi e reagisce poi con l'ossigeno per produrre una sostanza intermedia, che a sua

volta ossida l'aldeide nell'acido corrispondente. Dal processo si forma anche un complesso comprendente la luciferasi che decompone lentamente emettendo luce blu-verde. Se nell'ambiente di reazione sono presenti anche sostanze tossiche, allora l'intensità della luminescenza prodotta diminuisce in proporzione al livello di tossicità. Si tratta di un metodo circa 1-3 volte più sensibile dei test tradizionali per la valutazione tossicologica sugli animali. Il test VFBI può essere utilizzato per testare la tossicità di antibiotici e agenti antibatterici, di inquinanti atmosferici, di fungicidi, erbicidi, insetticidi e pesticidi, di acque reflue, scarichi industriali e molte altre sostanze. Presenta, inoltre, vantaggi che lo rendono un metodo di screening molto più efficiente rispetto ad altri, fra cui il basso costo e la velocità di analisi, la facilità nell'applicazione, l'affidabilità e la riproducibilità. Si distingue, tuttavia, anche una serie di limitazioni legate a VFBI, come la minore efficienza nell'analisi di alcune sostanze chimiche, tra cui gli antibiotici: i test della durata di 30 minuti risultano inefficienti, ma al contempo l'esposizione a lungo termine (circa 5 ore) comporta una notevole tossicità nei confronti dell'organismo. Sebbene VFBI sia sensibile rispetto ai test biologici tradizionali, presenta a volte degli aspetti negativi: in alcuni casi, infatti, il test non è sufficientemente sensibile per rilevare la sostanza nociva, anche se questa è presente nella massima concentrazione consentita. Si tratta di una tecnica tutt'ora oggetto di studio, che necessita di miglioramenti in termini di versatilità per raggiungere livelli adeguati di automazione e campionatura (21).

## 8. CONCLUSIONI

Sebbene il meccanismo della bioluminescenza delle lucciole sia stato descritto in letteratura in modo dettagliato negli ultimi decenni, alcuni aspetti rimangono ancora poco chiari, a causa della complessità notevole del processo. Tuttavia, è chiaro che il meccanismo bioluminescente si basa sui due principali componenti del processo, luciferasi e luciferina, rispettivamente l'enzima presente nell'organismo delle lucciole e il substrato su cui avviene la reazione. Affinché si verifichi il fenomeno dell'emissione bioluminescente, sono necessari anche altri composti, fra cui ATP, PPI e  $Mg^{2+}$ , i quali si combinano con la luciferasi in una sequenza di passaggi successivi. Non di minore importanza sono le reazioni secondarie che coinvolgono il coenzima A nel meccanismo, le quali determinano l'intensità dell'emissione di luce.

L'origine chimica della bioluminescenza multicolore, nonostante i numerosi studi sperimentali basati sulla produzione e sull'applicazione delle luciferasi delle lucciole, non è ancora stata compresa chiaramente. Ogni ipotesi, infatti, rappresenta attualmente una semplificazione eccessiva del fenomeno reale ed ogni piccola modifica della struttura dell'enzima comporta variazioni troppo grandi delle proprietà del composto e dell'ambiente circostante. L'unica ipotesi largamente condivisa, supportata anche attraverso il confronto tra la fluorescenza dell'emettitore e la bioluminescenza della luciferasi, resta quella che la specie responsabile dell'emissione di luce sia lo ione fenolato. Per quanto riguarda la forma chetonica o enolica, si credeva inizialmente, sulla base di risultati sperimentali raccolti in diversi solventi, a diversi pH e di studi teorici, che la forma enolica fenolato-enolo-OxyLH<sub>2</sub>, fosse responsabile del colore dell'emissione di fluorescenza. Più di recente, invece, studi sperimentali permettono di concludere che l'emettitore sia lo stato eccitato di singoletto della forma chetonica dell'anione fenolato. Lo studio della *Luciola Cruciata* ha fornito numerose informazioni circa la natura del sito di legame dell'emettitore e ha permesso di concludere che la variazione di colore sia dovuta in parte all'apertura/chiusura della tasca attorno all'emettitore stesso, regolata dall'Ile 228. Inoltre, devono essere considerati nel meccanismo anche i possibili legami a idrogeno con le molecole d'acqua circostanti, che possono ridistribuire la carica nell'emettitore ossiluciferina durante la transizione da stato eccitato a stato fondamentale. Studi recenti permettono di concludere quindi che la luce viene emessa dalla forma chetonica dell'anione fenolato e che il colore dipende dalla polarità dell'area circostante, condizionata esclusivamente dall'orientazione delle molecole d'acqua (2).

Infine, le tecniche di imaging molecolare rappresentano un progresso potenzialmente rivoluzionario nello studio delle relazioni strutturali e funzionali in biologia. In particolare, il BLI, che permette di tracciare le cellule che emettono luce in piccoli animali da laboratorio, ha gettato le basi per lo sviluppo di una vasta gamma di applicazioni in ambito biomedico (16).

## BIBLIOGRAFIA

1. BUCK, John; BUCK, Elisabeth. Synchronous fireflies. *Scientific American*, 1976, 234.5: 74-85.
2. HOSSEINKHANI, Saman. Molecular enigma of multicolor bioluminescence of firefly luciferase. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68: 1167-1182.
3. MARQUES, Simone M.; ESTEVES DA SILVA, Joaquim CG. Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB life*, 2009, 61.1: 6-17.
4. DAY, John C.; TISI, Laurence C.; BAILEY, Mark J. Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin. *Luminescence: The journal of biological and chemical luminescence*, 2004, 19.1: 8-20.
5. NIWA, Kazuki; NAKAMURA, Mitsuhiro; OHMIYA, Yoshihiro. Stereoisomeric bio-inversion key to biosynthesis of firefly D-luciferin. *FEBS letters*, 2006, 580.22: 5283-5287.
6. FONTES, Rui, et al. Pyrophosphate and tripolyphosphate affect firefly luciferase luminescence because they act as substrates and not as allosteric effectors. *The FEBS journal*, 2008, 275.7: 1500-1509.
7. DELUCA, Marlene. Hydrophobic nature of the active site of firefly luciferase. *Biochemistry*, 1969, 8.1: 160-166.
8. WHITE, Emil H., et al. The chemi- and bioluminescence of firefly luciferin: an efficient chemical production of electronically excited states. *Bioorganic Chemistry*, 1971, 1.1-2: 92-122.
9. BRANCHINI, Bruce R., et al. An alternative mechanism of bioluminescence color determination in firefly luciferase. *Biochemistry*, 2004, 43.23: 7255-7262.
10. MCCAPRA, F., et al. Bioluminescence and chemiluminescence: Fundamentals and applied aspects. by AK Campbell, LJ Kricka and PE Stanley, John Wiley and Sons, 1994, 387.
11. HIRANO, Takashi, et al. Spectroscopic studies of the light-color modulation mechanism of firefly (beetle) bioluminescence. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131.6: 2385-2396.

12. ORLOVA, Galina; GODDARD, John D.; BROVKO, Liubov Yu. Theoretical study of the amazing firefly bioluminescence: the formation and structures of the light emitters. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125.23: 6962-6971.
13. NAKATSU, Toru, et al. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature*, 2006, 440.7082: 372-376.
14. VIEIRA, João; DA SILVA, Luís Pinto; DA SILVA, Joaquim CG Esteves. Advances in the knowledge of light emission by firefly luciferin and oxyluciferin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2012, 117: 33-39.
15. OSIMANI, Andrea, et al. Bioluminescence ATP monitoring for the routine assessment of food contact surface cleanliness in a university canteen. *International journal of environmental research and public health*, 2014, 11.10: 10824-10837.
16. SADIKOT, Ruxana T.; BLACKWELL, Timothy S. Bioluminescence imaging. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2005, 2.6: 537-540.
17. LI, Jing, et al. Cage the firefly luciferin! –a strategy for developing bioluminescent probes. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42.2: 662-676.
18. KATTI, Girish; ARA, Syeda Arshiya; SHIREEN, Ayesha. Magnetic resonance imaging (MRI)–A review. *International journal of dental clinics*, 2011, 3.1: 65-70.
19. OLLINGER, John M.; FESSLER, Jeffrey A. Positron-emission tomography. *IEEE signal processing magazine*, 1997, 14.1: 43-55.
20. MARIANI, Giuliano, et al. A review on the clinical uses of SPECT/CT. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 2010, 37: 1959-1985.
21. ABBAS, Mazhar, et al. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: a review. *Science of the Total Environment*, 2018, 626: 1295-1309.