



DERLEME / REVIEW

Biyoluminesans ışık ve bioluminesans görüntüleme tekniklerinin moleküler biyoloji araştırmaları bakımından önemi

Bioluminescence radiation and importance of bioluminescence imaging techniques in molecular biology studies

Erdal Tunç

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, Turkey

Cukurova Medical Journal 2019;44(4):1473-1483.

Abstract

Some unique living organisms produce visible light from chemical energy in a process called bioluminescence. Bioluminescent organisms express luciferase enzymes which catalyze chemical reactions in which luciferases convert their substrates and produce visible light. Different bioluminescent organisms contain different luciferase enzyme/substrate systems. For creating an assay system, genes encoding selected luciferase reporter and any protein, can be fused via cDNA synthesis and then luciferase-fused protein can be traced in living organism or in cell culture, depending on bioluminescence glowing (radiation). Besides, in a predetermined setup, progression phases of experimentally created infections of any bacteria, virus, parasite or fungus species which transfected with luciferase encoding gene can easily be traced via bioluminescence. Any bioluminescence assay system is composed from three elements: transfer of luciferase gene and injection of its substrate material to animal subject, and acquiring/processing light signals by charge coupled device (CCD) camera. In bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system which is particularly used in protein-protein interaction (PPI) studies, closely positioned or interacting labeled-proteins give both bioluminescent and fluorescent signals. In comparison to other protein-assay techniques, bioluminescence imaging is simple, non-invasive, cost-effective and convenient technique which is promising in terms of finding more usage areas in the future. In this paper, besides a review of important studies focused on the subject, general knowledge about basic principles of bioluminescence, various bioluminescence-creating enzyme-substrate systems and bioluminescence imaging (BLI) modalities were provided.

Keywords: Bioluminescence, luciferase, BRET, fused proteins

Öz

Canlı bünyesinde meydana gelen reaksiyonlar sonucunda kimyasal enerjiden görünür ışık üretilmesine ve buna bağlı olarak meydana gelen ışımaya bioluminesans ışık denir. Bioluminesans gösteren organizmaların sentezledikleri lusiferaz enzimler ve kimyasal dönüşümlerini katalizledikleri ilgili substratların oluşturdukları reaksiyonlar neticesinde bioluminesans ışık meydana gelmektedir. Farklı canlı türlerinde çeşitli lusiferaz enzimleri bulunmaktadır. Lusiferaz enzimlerden seçilecek olan birini kodlayan reporter gen, cDNA aracılığıyla herhangi bir proteini kodlayan genle kaynaştırılmak suretiyle, ilgili proteinin lokasyonu veya etkileşimleri in vivo olarak izlenebilmektedir. İlgilenilen virüs, bakteri, parazit ve maya türlerine aktarılan lusiferaz enzim genleri sayesinde, bu türlerin oluşturdukları enfeksiyonların seyir süreçleri izlenebilmektedir. İzleme düzeneği, ilgili denek hayvana lusiferaz geninin aktarılması, hayvana substratın enjekte edilmesi ve CCD kamera (foton-elektron etkileşimli kamera) ile izlemenin yapılması basamaklarından oluşmaktadır. Özellikle protein-protein etkileşim çalışmalarında kullanılan BRET (bioluminesans ışımaya dayalı rezonans enerji transferi) tekniği ile bioluminesans ve floresan ışıklar bir arada izlenebilmektedir. Diğer protein saptama/izleme teknikleri ile kıyaslandığında in vivo bioluminesans görüntüleme denek hayvana girişimde bulunmayı gerektirmeyen, basit, ucuz ve oldukça elverişli bir tekniktir. Bu çalışmada bioluminesans ışımının temel prensipleri, bioluminesans ışık üreten enzim-substrat sistemleri ve bioluminesans ışımaya dayalı çeşitli in vivo izleme düzenekleri hakkında genel bilgiler verilmiş ve bu konularla ilgili önemli çalışmaların sonuçları derlenmiştir.

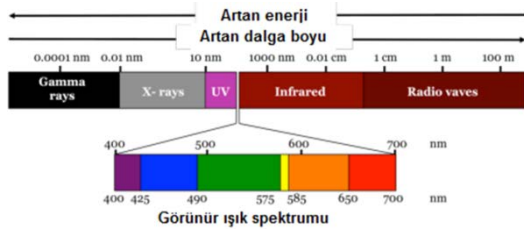
Anahtar kelimeler: Bioluminesans, lusiferaz, BRET, füzyon proteinler

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Erdal Tunç, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, Turkey E-mail: terdal@cu.edu.tr
Geliş tarihi/Received: 05.03.2019 Kabul tarihi/Accepted: 11.04.2019 Çevrimiçi yayın / Published online: 18.09.2019

GİRİŞ

Işık, görme duyusunu uyaran ve eşyaları görünür hale getiren doğal ajan olarak tanımlanmaktadır. Tüm renkleri ihtiva eden beyaz ışık veya görünebilen güneş ışığı bir objenin üzerine düştüğünde; ilgili obje, şekline ve yapısal kompozisyonuna bağlı olarak, belli dalga boyu aralığındaki ışıkları soğurur ve belli dalga boyu aralığındaki ışıkları yansıtır, yansıyan dalga boyundaki ışık söz konusu objenin şeklini ve rengini ortaya çıkarır.

Doğada gözlemlenebilen objelerin fiziksel görüntüleri bu şekilde oluşur. Elektromanyetik spektrumda 380-780 nm dalga boyu aralığındaki ışımalar, görünür ışık spektrumuna karşılık gelmektedir^{1,2,3,4} (Şekil 1).

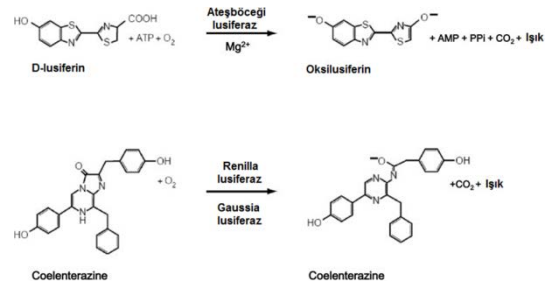


Şekil 1. Elektromanyetik radyasyon spektrumu⁵.

Işık kaynağının parlaklık düzeyine bağlı olarak görünür ışık spektrumu, 310 nm ile 1100 nm dalga boyu aralığına kadar genişletilebilmektedir. Bu spektrum mor ötesi ve yakın kızıl ötesi dalga boyundaki ışımları da ihtiva etmektedir¹. Işığa kimyasal veya fiziksel olarak tepki veren, maruz kaldığı reaksiyonların neticesi olarak ışık yayan veya üzerine düşen ışığı farklı dalga boyunda ve renkte yansıtan proteinlere fotoaktif proteinler denir⁶.

Fotoaktif proteinler üç grupta ele alınabilirler. Birinci grup fotoaktif proteinler, ışığa maruz kalmaya bağlı olarak bünyesinde buldukları canlının tepki vermesine yol açan foto-reseptörlerdir. Hayvanlarda bulunan ve görme işleminde rol alan rhodopsin, mor fotosentetik bakterilerde bulunan ve negatif fototaksise yol açan foto-aktif sarı protein (photoactive yellow protein, PYP) ve bitkilerde bulunan flavoprotein ışık sensörleri bu gruptadırlar^{7,8}. İkinci grupta floresan proteinler bulunmaktadır. Maruz kaldığı ışığın dalga boyunu ve dolayısıyla rengini değiştirerek yansıtan moleküllere floresan moleküller, bu tip ışımaya da floresan ışımaya denir. Bağlandıkları moleküllere floresan özellik kazandıran çeşitli floresan boyalar ve canlı

bünyesinde doğal floresan özellik gösteren proteinler bulunmaktadır⁹. Floresan proteinlerin prototipi olarak yeşil floresan protein (green fluorescent protein, GFP) 1961 yılında deniz anası türü olan *Aequorea victoria*'da keşfedilmiştir ve 2008 yılında bu proteini kodlayan gen klonlanarak in vivo izleme amacıyla *Escherichia coli*'ye transfer edilmiştir. Daha sonraları GFP benzeri başka fotoaktif floresan proteinler de keşfedilmiştir^{6,10,11}. Üçüncü grup olarak biyoluminesans ışımaya oluşturan enzimlerden söz edilebilir. Canlı bünyesinde meydana gelen biyolojik reaksiyonlar sonucu kimyasal enerjinin görünür ışık formuna dönüştürülmesi ve bu şekilde üretilen görünür ışığın çevreye yayılması olayına biyoluminesans ışımaya denir. Bu enerji çevrimi, lusiferazlar denilen bir grup enzim ve kimyasal dönüşümlerini katalizledikleri substratları tarafından gerçekleştirilir. Lusiferazlar canlı bünyesinde doğal olarak üretilen enzimler olup, katalizledikleri reaksiyon neticesinde substratlarının görünür ışık üretmesini sağlarlar (Şekil 2).



Şekil 2. Ateş böceği (Firefly), deniz menekşesi (Renilla) ve deniz böceği (Gaussia) lusiferazları katalizledikleri biyoluminesans reaksiyonları¹².

Canlıların bünyelerinde meydana gelen doğal ışımalar veya ışıkla uyarmaya bağlı olarak meydana gelen ışımalar, biyolojik izleme açısından çok önemlidirler. İlk olarak 2002 yılında Bhaumik ve ark.'ları enzim-substrat sistemini (RLuc-coelenterazine) kullanmak suretiyle farelerde biyoluminesans izleme düzeneği oluşturmuşlardır¹². Günümüzde, buna benzer enzim-substrat sistemleri kullanılarak çeşitli in vivo izleme düzenekleri oluşturulmakta ve bu şekilde bu teknikten yaygın olarak faydalanılmaktadır^{6,13,14,15}. Benzer şekilde lusiferaz enzim sistemi ile transfekte edilmiş insan, hayvan ve bitki hücre hatlarının kültürlerinde biyoluminesans izleme yapılabilmektedir^{16,17,18}. Bu çalışmada, biyoluminesans ışımaya çeşitleri ve biyoluminesans ışımaya dayalı olarak oluşturulan in vivo izleme düzenekleri (in-vivo assay) hakkında

bilgi verilmesi ve ilgili çalışmaların derlenmesi hedeflenmiştir.

BIYOLÜMINESANS IŞIMA ÇEŞİTLERİ, IŞIMA YAPAN CANLI TÜRLERİ, İLGİLİ ENZİMLER VE SUBSTRATLAR

Bugüne kadar çeşitli türlerde lusiferaz enzimleri keşfedilmiştir. Ateş böceklerinin ürettiği ateş böceği lusiferaz enzimi, oksijen ve ATP varlığında yeşil ışık çıkaran bir reaksiyonu katalizler. Ateş böceği lusiferaz enziminin substratı D-lusiferin bileşiğidir. D-lusiferin bir seri reaksiyon sonucu esas ışmayı yapan oksilusiferin bileşiğine dönüştürülmektedir (Şekil 2). Pek çok lusiferaz formunun yarı ömürleri birkaç saatle sınırlıdır. Bu durum, bu enzimlerin in vivo izleme düzeneklerinde reporter olarak kullanılmasına yol açmaktadır. Özellikle canlıların sirkadiyen ritimlerinin izlenmesinde bu enzimler elverişli birer araç niteliğindedirler^{12,13,19}.

Teknik olarak lusiferaz reporter genleri, sentetik olarak eklendikleri genlerin transkripsiyonel ve translasyonel ifade düzeyleri hakkında doğal ışma yapmak suretiyle bilgi verirler, aynı zamanda ilgili proteinin hücre veya organel içerisindeki yeri hakkında da bilgi verirler²⁰. Farklı ışma yapan lusiferaz genleri farklı proteinleri kodlayan genlere eklemek suretiyle, lusiferazlar ile birleştirilmiş bu proteinlerin etkileşim durumları hakkında bilgi sahibi olunabileceği gibi; eğer söz konusu proteinler herhangi bir sinyal iletim yolağının elemanları iseler, ilgili sinyal iletim yolağının çalışması hakkında da bilgi sahibi olunabilir¹².

Ayrıca lusiferaz reporterler küçük hayvanlar üzerinde oluşturulan in vivo izleme düzeneklerinde ilgilenilen hücrelerin lokasyonları ve dağılımları hakkında da bilgi verirler. Özellikle kök hücre transplantasyonlarında hayvanlara verilen kök hücrelerin uzun süreli takiplerinde biyolüminesans reporter genlerden faydalanılmaktadır. Son zamanlarda lusiferaz enzimini kodlayan genin transferi ile amaca uygun (dokuya özgü veya daha yaygın) ışma yapan transgenik hayvanlar (light-producing transgenic animals, LPTA veya light-producing transgenic, LPT) üretilmeye başlanmıştır ve bu denek hayvanlar kanserlerin, metabolik hastalıkların ve enfeksiyonların araştırılmasında kullanılmaktadırlar. Fare ve zebra balığı bu şekilde transforme edilmiş transgenik hayvanlardır. Özellikle farelerde germline olarak önemli bazı proteinleri kodlayan genlerin promoterleri altına yerleştirilen

biyolüminesans reporter genler, ilgili genlerin kodladığı proteinlerin fonksiyonlarının in vivo olarak izlenmesini kolaylaştırmaktadırlar^{12,13,14,21}.

Biyolüminesans ışma yapan prokaryotik tür olarak *Photobabdu luminescens* (*Xenorhabdu luminescens*) bakteri türü önemlidir. Bu bakteri, genomunda, lux adı verilen lusiferaz enzimini kodlayan genleri ve bu enzimin aldehit substratının oluşmasını sağlayan genleri bir operon (lux operon, luxCDABE) halinde taşımaktadır. Bu operonda luxA ve lux B genleri lusiferaz enziminin alt birimlerini kodlarken luxC, luxD ve luxE genleri yağ asidinden lux lusiferazın aldehit substratının oluşmasını sağlayan çoklu enzim kompleksinin elemanlarını kodlamaktadırlar^{6,14,20}. Günümüzde luxCDABE operonu veya diğer biyolüminesans reporter genlerle modifiye edilen pek çok virüs, bakteri, parazit ve maya türleri ile deneysel olarak hayvanlar üzerinde deri, kemik dokusu, sindirim yolu, üriner yol, akciğer, diş, orta kulak enfeksiyonları oluşturulmakta ve bu enfeksiyonların seyir süreçleri ve tedavi protokollerine yanıtları takip edilebilmektedir. Bu çalışmalarla enfeksiyonların gelişim süreçlerinin daha iyi anlaşılması ve bu enfeksiyonlarla mücadelede daha ileri stratejilerin geliştirilmesi hedeflenmektedir. Yine hastalık yapıcı bakteri genlerinin ekspresyon düzeylerinin izlenmesi mümkün olmaktadır^{6,13,14}.

Biyolüminesans görüntüleme tekniği immün sistemin etkinliği ile ilgili çalışmalarda da kullanılmaktadır. Bu bağlamda patojen mikropların yüzey moleküllerine bağlanan TLR (Toll-like receptor) reseptörünün, MyD88 proteininin, tip 1 ve tip 2 interferon reseptörlerinin doğumsal immün sistem açısından önemlerini ortaya koyan çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında biyolüminesans gösteren *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter rodentium* bakteri türlerinin ve herpes simpleks 1 virüsünün farelerde oluşturdukları enfeksiyonlar izlenmiştir.

Çalışmalar neticesinde, gen aktarımı yoluyla oluşturulan biyolüminesans ışmadan faydalanılarak anılan türlerin oluşturdukları enfeksiyonların gelişim seyirleri detaylı olarak incelenmiş ve anılan reseptör ve proteinlerin immün yanıt açısından önemleri bir kez daha ortaya konmuştur¹⁴. Çeşitli canlı türlerinde keşfedilmiş doğal lusiferaz-substrat sistemlerinin (Tablo 1) yanı sıra, ışma kalitesini arttırmak amacıyla mutant lusiferaz enzimleri ve kimyasal olarak modifiye edilmiş substrat maddeleri de geliştirilmiştir.

Tablo 1. Ana lusiferaz enzim çeşitleri, elde edildikleri örnek türler, substratları ve oluşturdukları ışımaların renkleri. Lusiferazların farklı türlerden izole edilebilen bir çok varyantları bulunmaktadır^{12,13,15,22-28}.

Biyoluminesans enzimin adı	Bulunduğu türün adı	Protein büyüklüğü	Substratı	Maksimum emisyon dalga boyu ve rengi	Kaynaklar
Firefly luciferase (FLuc) (Ateşböceği lusiferazı)	Photinus pyralis	62 kDa	D-luciferin	562 nm Sarı-yeşil	2,3
Renilla luciferase (RLuc) (Deniz menekşesi lusiferazı)	Renilla reniformis	36 kDa	Coelenterazine	480-482 nm Mavi-yeşil	2,3
Gaussia luciferase (GLuc) (Deniz böceği lusiferazı)	Gaussia princeps	19.9 kDa	Coelenterazine	480-600 nm Mavi-yeşil	3,15,23
Bacterial luciferase (Lux) (bakteri lusiferazı)	Photobacterium luminescens	37 ve 40 kDa	-	490 nm Mavi-yeşil	3,28
Vargula luciferase (Vluc) (Deniz ateşböceği lusiferazı)	Vargula hilgendorfi	62 kDa	Vargulin	460 nm Mor-mavi	23
Metridia luciferase (Deniz böceği lusiferazı)	Metridia longa	24 kDa	Coelenterazine	480 nm Mavi-yeşil	23
NanoLuc (NL) luciferase (Derin deniz karidesi lusiferazı)	Oplophorus gracilirostris	19 kDa	Furimazine	460 nm Mavi	3,26
Cypridina luciferase (CnL) (Deniz ateşböceği lusiferazı)	Cypridina noctiluca	~61,5 kDa	Cyprinidid luciferin	~460 nm Mavi	3,27

Genetik mühendisliği teknikleri ile oluşturulan mutant lusiferazlar, doğal lusiferazlara göre daha ileri ışımaya özellikleri göstermektedirler. Örneğin son zamanlarda PLG2 olarak adlandırılan mutant bir lusiferaz enzimi *P. pyralis* lusiferaz enziminin N domaini ile *R. italica* lusiferaz enziminin C domaininden oluşturulmuştur. Bu değişikliklere ilave olarak PLG2 enziminin protein dizisini oluşturan aminoasitlerden 5'i yine genetik mühendisliği teknikleri ile değiştirilmiştir. Sonuçta oluşturulmuş olan varyant kendisini oluşturan doğal enzimlerden daha kaliteli ışımaya vermiştir^{13,22}. Son zamanlarda D-luciferin substrat maddesinin ışımaya kalitesini arttıran kimyasal modifikasyonları da keşfedilmiştir. Bu modifiye substratlar arasında aminolusiferin (NH₂LH) ve N-alkylated 6'-aminolusiferin sayılabilir. Buna göre *P. pyralis* lusiferaz enzimini katalizlediği reaksiyonda, N-alkylated 6'-aminolusiferin substratı, aminolusiferin substratından daha iyi ışımaya vermektedir. Yine *P. pyralis* lusiferaz enziminin katalizlediği reaksiyonda, siklik alkilaminolusiferin, D-luciferinden daha iyi ışımaya vermektedir. Buna benzer şekilde amaca uygun olarak substrat bileşiklere uygulanacak bazı

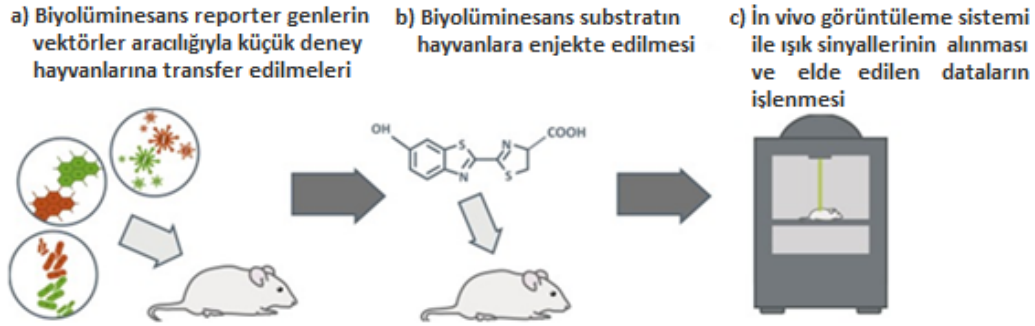
modifikasyonlarla hem ışımaya kalitesinin hem de ışımaya dalga boyunun/renginin değiştirilebileceği gösterilmiştir^{13,21}.

İZLEME DÜZENEGİNİN HAZIRLANMASI VE BİYOLUMİNESANS GÖRÜNTÜLEME (BLI)

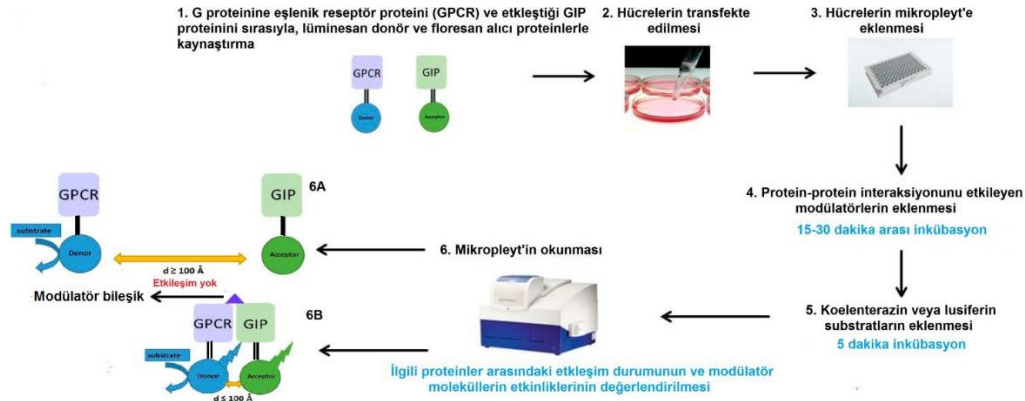
Konvansiyonel görüntüleme

bioluminesans

Biyoluminesans görüntüleme amacıyla oluşturulan izleme düzeneklerinde, birinci aşamada, hedeflenen gen ile birlikte lusiferaz genini ekspresye edecek ekspresyon vektörleri oluşturulur. Vektör olarak, lipozomlar, enfeksiyon yeteneğini kaybetmiş virüsler, adenoviral ekspresyon vektörleri, ekspresyonları sonradan indüklenebilen ve çoğunlukla tedavi amaçlı kullanılan lentiviral vektörler, lipopolamin ve plasmid DNA'dan oluşturulan lamellar veziküller yaygın olarak kullanılmaktadırlar^{16,29}.



Şekil 3. Küçük hayvanlara uygulanan in vivo BLI tekniğinin şematize gösterimi: Şekilde in vivo BLI görüntüleme tekniğinin üç ana aşaması verilmiştir. a) Lusiferaz eksprese eden vektörün hayvana verilmesi b) biyolüminesans substratın hayvana verilmesi c) görüntüleme ile ilgili dataların alınması ve işlenmesi¹³.



Şekil 4. BRET tekniği aşamalarının şematize gösterimi. Bu gösterimde modülatör moleküllerin, GPCR (G proteinine eşlenik reseptör) proteini ile GIP proteinleri (GPCR reseptörün etkileşim yaptığı proteinler) arasındaki etkileşime nasıl tesir ettikleri ile ilgili prosedür gösterilmiştir³⁷.

Bundan sonra ekspresyonu hedeflenen gen ile lusiferaz genini bir gen kaseti şeklinde içeren vektörler, içinde buldukları veziküllerin hücre zarlarıyla lipofilik kaynaşması, elektroporasyon veya viral vektörlerin doğrudan organizmaya verilmesi yöntemleri ile hedef hücre veya dokulara transfer edilirler^{16,30,31}. Vektörler aracılığıyla önce bir grup hücre transkrite edilip, sonra bu transkrite hücreler canlı organizmaya verilebileceği gibi, vektör doğrudan da canlı organizmaya verilebilir. Özellikle viral vektörler doğrudan canlı organizmaya verilebilirler^{32,33}. İkinci aşamada organizmaya ilgili lusiferaz enziminin substrat maddesi enjekte edilir. Son aşamada ise oluşan biyolüminesans ışma, CCD kameralarla izlenerek elde edilen görüntü ve datalar

kaydedilir (Şekil 3). CCD kameralar, yarı iletken silikon maddesinden oluşan bir düzleme fotonların çarpması sonucu elektronların atomik bağlarından kopmaları ve bu kopan elektronların akışından görüntü elde edilmesi prensibine göre çalışan kameralardır. Standart halde biyolüminesans görüntüleme cihazları 400-700 nm dalga boyu arasındaki ışmaları okuyabilmektedirler (Şekil 1), ancak yakın kızılötesi sensör aparatı bulunan CCD kameralar 700-800 nm dalga boyu aralığındaki ışmaları da okuyabilmektedirler. CCD kameraların farklı amaçlara dönük çeşitleri de geliştirilmiştir^{34,35}. Azot soğutmalı CCD kameraları özellikle tek hücre ışmalarının uzun süreli izlenmesinde kullanılmaktadırlar. Daha düşük çözünürlüklü foton

sayan CCD kameralar ise kısa süreli canlı hücre izlemelerinde kullanılmaktadırlar¹⁶. CCD kameralardan daha ileri biyoluminesans görüntüleme tekniği olarak, biyoluminesans tomography (BLT) görüntüleme sistemi geliştirilmiştir. BLT görüntüleme sistemi, ışık geçirmeyen bir kutu içerisinde bir CCD kamera, bir lens ve fare veya in vivo incelemeye konu olan küçük hayvanın üzerine konacağı sahneden oluşmaktadır. Çekim sırasında hayvanın üzerinde bulunduğu sahne bilgisayar komutuyla döndürülmekte ve farklı açı ve düzlemlerden 2 boyutlu görüntüler elde edilmektedir. Elde edilen bu 2 boyutlu görüntüler bir bilgisayara aktarılmakta ve çeşitli algoritmalar yardımıyla 3 boyutlu görüntü oluşturulmaktadır. Daha gelişmiş versiyonlarda eşzamanlı olarak multispektral çoklu görüntüler alınmaktadır. İlave olarak, BLT ile bilgisayarlı tomografinin (CT) bir arada kullanıldığı daha kaliteli ve daha detaylı görüntülerin alındığı sistemler de geliştirilmiştir. Optik PET olarak adlandırılan sistemde tek bir dedektör, biyoluminesans fotonları ve gama ışınlarını birlikte yakalayabilmekte ve bu her iki ışımadan yüksek çözünürlüklü görüntüler elde edebilmektedir^{13,36}.

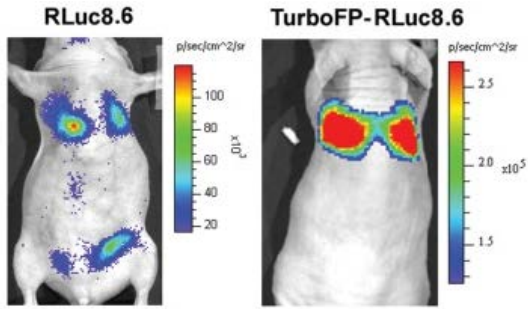
BRET

BRET olarak adlandırılan teknik ile biyoluminesans ve floresan ışımaya bir arada izlenmektedir. Bu yöntem, özellikle sinyal yollarında meydana gelen protein etkileşimlerinin in vivo olarak izlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Buna göre sinyal yolağından bulunan bir protein (donör protein) bir biyoluminesans reporter ile işaretlenirken, kendisinden sonra gelen veya etkileştiği protein (alıcı protein) floresan reporter ile işaretlenmektedir³⁷. Bu düzenekte donör protein, biyoluminesans reporter olarak RLuc, FLuc, GLuc, NLuc lusiferazların doğal ve mutant formlarından biriyle, alıcı protein ise floresan reporter olarak sarı, yeşil, kırmızı floresan proteinler (yellow fluorescence protein, YFP; green fluorescence protein, GFP; red fluorescence protein, RFP) veya bunların versiyonlarından biri ile işaretlenmektedir³⁷⁻³⁹. İşaretleme için ilgili lusiferaz genini, donör protein genine; ilgili floresan protein genini, alıcı protein genine ekleyen sentetik cDNA'lar oluşturulmakta ve bunların in vivo ekspresyonları sağlanmaktadır. İlave olarak, ekprese edilen lusiferaz enzimin substratı (RLuc lusiferaz için coelenterazine ve varyantları, FLuc için d-lusiferin) ilgili hücre grubuna veya denek organizmaya verilmektedir. Bundan sonra in vivo izleme

yapılmaktadır^{37,40}. Düzenek kabaca şu şekilde işlemektedir: Proteinler eğer yeterince yakın konumda iseler (aralarında etkileşim varsa veya aynı sinyal yolağına elemanı iseler), biyoluminesans reporter elektronik relaksasyon enerjisini ışımaya dipol-dipol eşleşmesi ile floresan reporter'a aktarmakta ve onu uyarmaktadır. Bu şekilde uyarılmış olan floresan reporter özgün dalga boyunda photonik enerji üretmektedir/ışımaya yapmaktadır. BRET oluşumunun işareti olarak biyoluminesans reporter'ın emisyonunda azalma, floresan reporter'ın emisyonunda artma meydana gelmekte; bu durum da işaretli proteinlerin yapısal ve fonksiyonel olarak etkileştikleri anlamına gelmektedir. Eğer proteinler arasında etkileşim yoksa floresan ışımaya meydana gelmemektedir. Yine BRET tekniği ile proteinlerin etkileşim durumlarını değiştiren modülatör moleküllerin (PPI modulators) etkinlikleri de izlenebilmektedir (Şekil 4).

Bu güne kadar BRET1, BRET2, BRET3, NanoBRET, Quantum Dot-Based BRET şeklinde başlıca 5 çeşit BRET izleme düzeneği oluşturulmuştur. Bu BRET izleme düzenekleri kapsamında lusiferaz enzimlerin, substrat maddelerin ve floresan reporter proteinlerin farklı kombinasyonları ihtiyaca göre bir araya getirilmiştir^{37,40,41,42}. Bu bağlamda, G proteinine eşlenik reseptör çalışmalarında kullanılan BRET1 ve BRET2 teknikleri model teşkil etmektedirler. G proteinine eşlenik reseptörler (GPCR), iki veya çoklu alt birimlerden oluşmaktadır. Bu reseptörler hücrelerin çoğalma, farklılaşma, göç etme ve yaşamlarını idame ettirme özelliklerini etkileyen yollarda görev almaktadırlar. Reseptör kompleksini oluşturan proteinlerin etkileşimlerinde veya kompleksin başka proteinlerle olan etkileşimlerinde meydana gelecek olan bir düzensizlik ilgili sinyal yollarını etkileyecek ve hücrede ilgili işlevlerin bozulmasına yol açacaktır. Bu yüzden bunun gibi protein-protein etkileşimlerinin çalışılması önemlidir ve BRET yöntemi bu etkileşimlerin in vivo olarak çalışılmasını olanaklı kılmaktadır. GPCR çalışmalarında RLuc lusiferaz enzim geni, donör reseptör geni ile; sarı veya yeşil floresan protein geni (sırasıyla BRET1 ve BRET2), alıcı protein geniyle (G α , G β , G γ proteinlerini kodlayan genlerden biri) cDNA aracılığıyla kaynaştırılır. Oluşan BRET ışımalarına göre proteinlerin etkileşim durumları değerlendirilir. Benzer şekilde rapamisin bileşiğinin varlığında FRB ve FKBP12 proteinlerinin yaptığı etkileşim, protein-protein etkileşimi çalışmalarında model olarak

kullanılmaktadır. Bu bağlamda rapamisin bileşiğine bağlanan FRB ve FKBP12 proteinlerinin fare akciğerinde etkileştikleri BRET tekniği ile gösterilmiştir (Şekil 5). Ayrıca BRET tekniği ile donör ve alıcı proteinlerin konformasyonlarındaki küçük değişiklikler de anlaşılabilir. Çünkü BRET kompleksinin elemanı proteinlerin konformasyonlarında meydana gelen küçük değişiklikler dahi sinyal yoğunluğunu değiştirebilir^{37,41,42}.

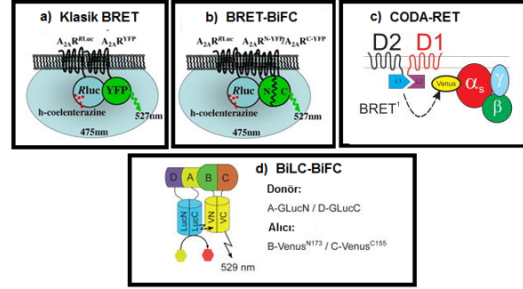


Şekil 5. Bir antibiyotik olan rapamisin bileşiği FRB ve FKBP12 proteinlerine yüksek afinite ile bağlanmaktadır.

Anılan her iki proteine bağlanmasından dolayı rapamisin bileşiğinin varlığında FRB ve FKBP12 proteinlerinin yaptığı etkileşim, protein-protein etkileşimi çalışmalarında model olarak kullanılmaktadır. Rapamisin bileşiği aracılığıyla FRB ve FKBP12 proteinlerinin fare akciğerinde etkileştiklerini gösteren BRET görüntüleri. Bu izleme düzeneğinde FRB proteinini kodlayan gen, mavi-yeşil ışınma yapan RLuc8.6 lusiferaz enzim geni ile; FKBP12 proteinini kodlayan gen, kırmızı ışınma yapan TurboFP protein geni ile kaynaştırılmışlardır. Bu füzyon proteinlerle transfekte edilen memeli HT1080 hücreleri kuyruk veni yoluyla farelere enjekte edildiklerinde, transfekte hücrelerin farelerin akciğerlerinde kümelendikleri izlenmiştir. Yine RLuc8.6 lusiferaz enziminin substratı olarak coelenterazine bileşiği farelere enjekte edilmiştir. Şekildeki farelerin akciğer bölgelerinde, a) sadece donör FRB-RLuc8.6 füzyon proteininin aşırı eksprese olduğu koşullarda RLuc8.6 lusiferaz enziminin katalizasyonuna bağlı mavi-yeşil renkli biyolüminesans ışınmanın baskın olarak meydana geldiği b) her iki füzyon proteinin (donör FRB-RLuc8.6 ve alıcı FKBP12-TurboFP) aşırı eksprese olduğu koşullarda, biyolüminesans ışınmaya dayalı rezonans enerji transferi olayının gerçekleşmesine bağlı olarak, hem mavi-yeşil biyolüminesans ışınmanın ve hem de kırmızı tonlarda floresan ışınmanın meydana gelmiş olduğu gözlenmektedir⁴².

Çok alt birimli protein kompleksleri ile ilgili çalışmalarda, kompleksi oluşturan protein birimlerin arasındaki etkileşimlerin eşzamanlı gösterimi için multiplex BRET düzenekleri geliştirilmiştir. Bu multiplex düzeneklerden SRET (sequential rezonans energy transfer, sequential RET) tekniği, üç protein birim arasındaki etkileşim çalışmalarında kullanılmaktadır. Proteinlerden biri RLuc lusiferaz enzimi ile, diğer ikisi ise floresan proteinlerle

kaynaştırılmaktadır. Bu şekildeki izleme düzeneğinde, biyolüminesans protein BRET ile birinci floresan proteini uyarmakta, ilk floresan protein ise floresan rezonans enerji transferi (FRET) ile ikinci floresan proteini uyarmaktadır⁴².



Şekil 6. Klasik a) BRET, b) BRET-BiFC, c) CODA-RET, d) BiLC-BiFC teknikleri ile elde edilen görüntülerin temsili gösterimleri

a) Adenosin reseptörü A2A homomerleri, RLuc lusiferaz ve YFP floresan proteini ile kaynaştırılmışlardır; bu iki homomerin, homodimer oluşturmak üzere 10 nm'den daha kısa mesafede etkileşmeleri BRET ışınlarına yol açmıştır b) Adenosin reseptörü A2A homomerleri, RLuc lusiferaz, N-YFP (N terminal fragment) ve C-YFP (C terminal fragment) floresan proteinleri ile kaynaştırılmışlardır; bu üç homomerin, homotrimer oluşturmak üzere etkileşmeleri BRET-BiFC ışınlarına yol açmıştır⁴³. c) D2 ve D1 dopamin reseptörleri, RLuc8 lusiferaz enziminin sırasıyla N terminal (L1) ve C terminal (L2) fragmentleri ile; G protein kompleksinin G α s alt birimi ise Venus floresan proteini ile kaynaştırılmışlardır. Gösterimdeki BRET ışınma, D2 ve D1 reseptörlerin heteromerik olarak etkileştikleri ve RLuc lusiferaz enzim parçalarının bir araya gelmesiyle oluşan biyolüminesansın enerji transferi yoluyla Venus floresan proteini uyardığına işaret etmektedir⁴⁴. d) D ve A proteinleri Gluc lusiferaz enziminin sırasıyla, N terminal ve C terminal fragmentleri ile kaynaştırılmışlardır; B ve C proteinleri, floresan proteinin (Venus) sırasıyla N terminal ve C terminal ile fragmentleri kaynaştırılmışlardır. Dört protein birimin bir araya geldiklerinin işareti olarak BRET ışınları gerçekleşmiştir⁴⁷.

Neticede üç protein birimin yapmış olduğu ışınlar izlenebilmektedir. BRET-BiFC (biomolecular-fluorescence complementation) yönteminde, RLuc enzimi bir proteinle, floresan proteinin N terminal parçası bir proteinle, C terminal parçası başka bir proteinle cDNA aracılığıyla kaynaştırılmaktadır. RLuc enziminin oluşturduğu biyolüminesans enerji, floresan protein parçalarını barındıran proteinlerin bir araya gelmesi durumunda floresan ışınmayı uyarmaktadır ve bu şekilde ilgili üç proteinin etkileşim durumları izlenebilmektedir^{42,43}.

CODA-RET (complemented donor acceptor resonance energy transfer) tekniği özellikle heterodimerik reseptörlerin etkileşim çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu teknikte heterodimer reseptör

kompleksini oluşturan ünitelerin her biri biyoluminesans Rluc enziminin N ve C terminal fragmentleri ile cDNA aracılığıyla kaynaştırılır. Reseptör kompleksinin etkileştiği protein ise uygun floresan protein ile kaynaştırılır. Reseptör heterodimerizasyonu meydana geldiğinde, lusiferaz enziminin parçaları bir araya gelmiş olur ve biyoluminesans ışımaya gerçekleşir, oluşan enerji transferi ile de floresan proteini uyarılır ve floresan ışımaya meydana gelir. Sonuçta etiketli üç proteinin, hücresel işleyişin bir parçası olarak, uygun şekilde etkileşmiş oldukları bu özel BRET tekniği ile gösterilmiş olur^{44,45}.

BiLC-BiFC (Biomolecular luminescence complementation-biomolecular fluorescence complementation) tekniği ile dört alt birimli protein komplekslerinde, birimler arası etkileşim izlenebilmektedir. Böyle bir kompleksi oluşturan protein birimlerden ikisi, biyoluminesans Gluc lusiferaz enziminin N ve C terminal fragmentleri ile, kalan iki protein birim ise Venus floresan proteininin N ve C terminal parçaları ile cDNA aracılığıyla kaynaştırılır. Dört birimli kompleksi oluşturan proteinler bir araya geldiklerinde; Gluc enziminin ve Venus floresan proteininin parçaları bir araya gelmiş olurlar ve BRET izleme düzenneği oluşur. Böyle bir düzenekte BRET ışımalarının oluşması, dört protein biriminin bir kompleks dahilinde etkileştikleri anlamına gelir^{42,46,47}(Şekil 6).

BIYOLÜMINESANS GÖRÜNTÜLEMENİN CANLI İZLEME BAKIMINDAN ÖNEMİ, AVANTAJLARI VE DEZAVANTAJLARI

Halihazırda deneysel olarak oluşturulan kanserlerin ve enfeksiyonların seyir süreçlerinin takibinde, deney hayvanlarına verilen kök hücrelerin izlenmesinde, proteinlerin ekspresyon düzeylerinin/lokasyonlarının belirlenmesinde ve protein etkileşim çalışmalarında yaygın olarak kullanılan in vivo biyoluminesans görüntüleme basit, ucuz ve oldukça elverişli bir yöntemdir^{6,48,49,50,51,52,53}. Bu yöntemde kendiliğinden ışımaya yapan protein veya molekül izlendiği için, ilgili protein veya molekül hassas bir şekilde tespit edilebilmekte ve ölçümlenebilmektedir. Üzerinde çalışılan denek hayvana herhangi bir girişimde bulunulmadan in vivo izleme yapılabilmektedir. Biyoluminesans görüntüleme gözlemlenen molekül kendiliğinden ışımaya yaptığı için, ışık mikroskopları için geçerli olan büyütme oranının

çözünürlük gücü ile sınırlı olma kuralı ortadan kalkmaktadır. Bundan dolayı ışık mikroskopuyla gözlemlenemeyen, 200 nm'den çok daha küçük boyutlardaki proteinler veya moleküller biyoluminesans görüntüleme tekniği ile görünür hale gelmektedirler^{6,48,54,55,56}.

Işık fotonlarının önemli kısmının dokudan geçerken kaybolması, biyoluminesans görüntüleme yönteminin dezavantajı olarak değerlendirilmektedir. Bu durum, CCD kameranın tespit ettiği ışımaya miktarı ile canlı dokuda araştırılan reporter proteinin yaydığı gerçek ışımaya miktarı arasında fark oluşmasına yol açmaktadır. Ayrıca biyoluminesans ışımının oluşması için ortamda (izlenen doku veya organda) yeterli kadar O₂ ve lusiferazın çeşidine göre gerekli kofaktörlerin olması gerekmektedir. Bu koşulların oluşmadığı şartlarda istenen kalitede biyoluminesans ışımaya elde edilemeyebilir. Özellikle izlenecek protein derin dokudaysa, 600 nm ve üstü dalga boyundaki kırmızı ve yakın kızıl ötesi ışınlarla çalışmak daha isabetli olmaktadır. Çünkü 600 nm ve üstü dalga boyundaki kırmızı ve yakın kızıl ötesi ışınlar canlı dokulardan daha az kayıpla geçebilmektedirler^{6,50,51}.

Özellikle biyoluminesans görüntülemenin, floresan görüntüleme (FI), bilgisayarlı tomografi (CT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve pozitron emisyon tomografi (PET) görüntüleme teknikleri ile bir araya getirildiği multi-modal düzenekler daha çok kanser araştırmalarında kullanılmaktadırlar. Bu multi-modal düzenekler ileride enfeksiyon hastalıklarının seyirlerinin takip edilmesi bakımından da çok faydalı olacaklardır. Özellikle enfeksiyon ajanı patojenin ve ona yanıt oluşturan konak organizmanın immün hücrelerinin farklı ışınlar yaptığı izleme düzeneklerinin hazırlanması, enfeksiyonların gelişim seyirleri ve enfeksiyonlarla mücadele bakımından çok yararlı bilgiler verecektir⁶.

SONUÇ

Biyoluminesans görüntüleme, in vivo çalışmalarda üzerinde çalışılan hayvana girişimde bulunmayı gerektirmeyen, uzun süreli takibi olanaklı kılan, ışık mikroskopları için sınırlayıcı olan çözünürlük gücüne bağlı olmayan ve bu yönleriyle gelecek vaat eden bir tekniktir. Bu özelliklerinden dolayı, gelecekte özellikle proteinlerin, hücrelerin ve enfeksiyon ajanlarının in vivo takibi çalışmalarında daha yaygın olarak kullanılacağı öngörülmektedir. İlave olarak daha kaliteli ışımaya veren enzim-substrat sistemlerinin de geliştirilebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Yazar Katkıları: Çalışma konsepti/Tasarımı: ET; Veri toplama: -; Veri analizi ve yorumlama: ET; Yazı taslağı: ET; İçeriğin eleştirilip incelenmesi: ET; Son onay ve sorumluluk: ET; Teknik ve malzeme desteği: -; Süpervizyon: ET; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Author Contributions: Concept/Design : ET; Data acquisition: -; Data analysis and interpretation: ET; Drafting manuscript: ET; Critical revision of manuscript: ET; Final approval and accountability: ET; Technical or material support: -; Supervision: ET; Securing funding (if available): n/a.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support

KAYNAKLAR

- Sliney DH. What is light? The visible spectrum and beyond. *Eye*. 2016;30:222–29.
- Claridge E, Cotton S, Hall P, Moncrieff M. From colour to tissue histology: Physics-based interpretation of images of pigmented skin lesions. *Med Image Anal*. 2003;7:489–502
- <https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/solar-energy/> 25-01-2019.
- <https://www.scientificamerican.com/article/why-is-the-sky-blue/> 25-01-2019.
- Pietrzykowska M. The roles of Lhcb1 and Lhcb2 in regulation of photosynthetic light harvesting (PhD thesis). Umea/Sweden, Umea University. 2015.
- Avci P, Karimi M, Sadasivam M, Antunes-Melo WC, Carrasco E, Hamblin MR. In-vivo monitoring of infectious diseases in living animals using bioluminescence imaging. *Virulence*. 2018;9:28-63.
- Liu L, Cui G, Fang WH. Excited states and photochemistry of chromophores in the photoactive proteins explored by the combined quantum mechanical and molecular mechanical calculations. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2015;100:255-84.
- Christie JM, Blackwood L, Petersen J, Sullivan S. Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant Cell Physiol*. 2015;56:401-13.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (editors). *Molecular biology of the cell*. In visualizing cells. 5th ed., New York: Garland Science, Taylor & Francis Group. 2008;586-7.
- Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc*. 2005;217:1-15.
- Stepanenko OV, Verkhusha VV, Kuznetsova IM, Uversky VN, Turoverov KK. Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Curr Protein Pept Sci*. 2008;9:338-69.
- Kim JE, Kalimuthu S, Ahn BC. In vivo cell tracking with bioluminescence imaging. *Nucl Med Mol Imaging*. 2015;49:3–10.
- Mezzanotte L, van't Root M, Karatas H, Goun EA, Löwik CWGM. In vivo molecular bioluminescence imaging: new tools and applications. *Trends Biotechnol*. 2017;35:640-52.
- Suff N, Waddington SN. The power of bioluminescence imaging in understanding host-pathogen interactions. *Methods*. 2017;127:69–78.
- Tannous BA, Kim DE, Fernandez JL, Weissleder R, Breakefield XO. Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol Ther*. 2005;11:435-43.
- Greer LF 3rd, Szalay AA. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence*. 2002;17:43-74.
- Kennedy HJ, Rafiq I, Pouli AE, Rutter GA. Glucose enhances insulin promoter activity in MIN6 beta-cells independently of changes in intracellular Ca²⁺ concentration and insulin secretion. *Biochem J*. 1999;342:275-80.
- Xu T, Ripp S, Sayler GS, Close DM. Expression of a humanized viral 2A-mediated lux operon efficiently generates autonomous bioluminescence in human cells. *PLoS One*. 2014;9(5):e96347.
- Welsh DK, Kay SA. Luciferase. In *Methods in Enzymology*. 2005. <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/luciferase>, 28-01-2019.
- Eun HM. Luciferase. In *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*. 1996. <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/luciferase>, 28-01-2019.
- Naumov P, Ozawa Y, Ohkubo K, Fukuzumi S. Structure and spectroscopy of oxyluciferin, the light emitter of the firefly bioluminescence. *J Am Chem Soc*. 2009;131:11590–605.
- Branchini BR, Southworth TL, Fontaine DM, Kohrt D, Talukder M, Micheli E et al. An enhanced chimeric firefly luciferase-inspired enzyme for ATP detection and bioluminescence reporter and imaging applications. *Anal Biochem*. 2015;484:148–53.
- Badr CE. Bioluminescence imaging: basics and practical limitations. *Methods Mol Biol*. 2014;1098:1-18.
- Lee J, Müller F, Visser AJWG. The sensitized bioluminescence mechanism of bacterial luciferase. *Photochem Photobiol*. 2018;doi: 10.1111/php.13063(Epub ahead of print).
- Bessho-Uehara M, Oba Y. Identification and characterization of the Luc2-type luciferase in the Japanese firefly, *Luciola parvula*, involved in a dim luminescence in immobile stages. *Luminescence*. 2017;32:924-31.
- Stacer AC, Nyati S, Moudgil P, Iyengar R, Luker KE, Rehemtulla A et al. NanoLuc reporter for dual luciferase imaging in living animals. *Mol Imaging*. 2013;12:1-13.
- Nakajima Y, Kobayashi K, Yamagishi K, Enomoto T, Ohmiya Y. cDNA cloning and characterization of a secreted luciferase from the luminous Japanese ostracod, *Cypridina noctiluca*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004;68:565-70.

28. Gupta RK, Patterson SS, Ripp S, Simpson ML, Saylor GS. Expression of the *Photobacterium luminescens* lux genes (luxA, B, C, D, and E) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2003;4:305-13.
29. Yang G, Kramer MG, Fernandez-Ruiz V, Kawa MP, Huang X, Liu Z et al. Development of endothelial-specific single inducible lentiviral vectors for genetic engineering of endothelial progenitor cells. *Sci Rep.* 2015;5:17166.
30. Sugihara K, Park HM, Muramatsu T. In vivo gene electroporation confers strong transient expression of foreign genes in the chicken testis. *Poult Sci.* 2000;79:1116-9.
31. March KL, Woody M, Mehdi K, Zipes DP, Brantly M, Trapnell BC. Efficient in vivo catheter-based pericardial gene transfer mediated by adenoviral vectors. *Clin Cardiol.* 1999;22:123-9.
32. Lipshutz GS, Gruber CA, Cao Y, Hardy J, Contag CH, Gaensler KM. In utero delivery of adeno-associated viral vectors: intraperitoneal gene transfer produces long-term expression. *Mol Ther.* 2001;3:284-92.
33. Lau CP, Wong KC, Huang L, Li G, Tsui SK, Kumta SM. A mouse model of luciferase-transfected stromal cells of giant cell tumor of bone. *Connect Tissue Res.* 2015;56:493-503.
34. Milocco A, Conroy S, Popovichev S, Sergienko G, Huber A. Neutron radiation damage in ccd cameras at joint european torus (jet). *Radiat Prot Dosimetry.* 2018;180:109-114.
35. http://www.specinst.com/What_Is_A_CCD.html. 30-01-209.
36. Feng J, Qin C, Jia K, Zhu S, Yang X, Tian J. Bioluminescence Tomography Imaging In Vivo: Recent Advances. *IEEE journal of selected topics in quantum electronics.* 2012;18(4).
37. El Khamlichi C, Reverchon-Assadi F, Hervouet-Coste N, Blot L, Reiter E, Morisset-Lopez S. Bioluminescence resonance energy transfer as a method to study protein-protein interactions: Application to G protein coupled receptor biology. *Molecules.* 2019;24(3):pii:E537.
38. Schuster M, Kilaru S, Guo M, Sommerauer M, Lin C, Steinberg G. Red fluorescent proteins for imaging *Zymoseptoria tritici* during invasion of wheat. *Fungal Genet Biol.* 2015;79:132-40.
39. Ihara K, Nishimura T, Fukuda T, Ookura T, Nishimori K. Generation of Venus reporter knock-in mice revealed MAGI-2 expression patterns in adult mice. *Gene Expr Patterns.* 2012;12:95-101.
40. De A, Ray P, Loening AM, Gambhir SS. BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals. *FASEB J.* 2009;23:2702-09.
41. Goyet E, Bouquier N, Ollendorff V, Perroy J. Fast and high resolution single-cell BRET imaging. *Sci Rep.* 2016;6:28231.
42. De A, Jasani A, Arora R, Gambhir SS. Evolution of BRET biosensors from live cell to tissue-scale in vivo imaging. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:131.
43. Gandia J, Galino J, Amaral OB, Soriano A, Lluís C, Franco R et al. Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique. *FEBS Lett.* 2008;582:2979-84.
44. Urizar E, Yano H, Kolster R, Galés C, Lambert N, Javitch JA. CODA-RET reveals functional selectivity as a result of GPCR heteromerization. *Nat Chem Biol.* 2011;7:624-30.
45. Niswender CM, Jones CK, Lin X, Bubser M, Thompson Gray A, Blobaum AL et al. Development and antiparkinsonian activity of VU0418506, a selective positive allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor 4 homomers without activity at mGlu2/4 heteromers. *ACS Chem Neurosci.* 2016;7:1201-11.
46. Rebois RV, Robitaille M, Pétrin D, Zylbergold P, Trieu P, Hébert TE. Combining protein complementation assays with resonance energy transfer to detect multipartner protein complexes in living cells. *Methods.* 2008;45:214-18.
47. Waadt R, Schlücking K, Schroeder JI, Kudla J. Protein fragment bimolecular fluorescence complementation analyses for the in vivo study of protein-protein interactions and cellular protein complex localizations. *Methods Mol Biol.* 2014;1062:629-58.
48. Kang JH, Chung JK. Molecular-genetic imaging based on reporter gene expression. *J Nucl Med.* 2008;49:164S-79S.
49. Wang H, Cao F, De A, Cao Y, Contag C, Gambhir SS et al. Trafficking mesenchymal stem cell engraftment and differentiation in tumor-bearing mice by bioluminescence imaging. *Stem Cells.* 2009;27:1548-58.
50. Zinn KR, Chaudhuri TR, Szafran AA, O'Quinn D, Weaver C, Dugger K et al. Noninvasive bioluminescence imaging in small animals. *ILAR J.* 2008;49:103-15.
51. Hong H, Yang Y, Zhang Y, Cai W. Non-invasive cell tracking in cancer and cancer therapy. *Curr Top Med Chem.* 2010;10:1237-48.
52. Jones L, Richmond J, Evans K, Carol H, Jing D, Kurmasheva RT et al. Bioluminescence Imaging Enhances Analysis of Drug Responses in a Patient-Derived Xenograft Model of Pediatric ALL. *Clin Cancer Res.* 2017;23:3744-55.
53. Sharifian S, Homaei A, Hemmati R, B Luwor R, Khajeh K. The emerging use of bioluminescence in medical research. *Biomed Pharmacother.* 2018;101:74-86.

54. Banaszynski LA, Liu CW, Wandless TJ. Characterization of the FKBP.rapamycin.FRB ternary complex. *J Am Chem Soc.* 2005;127:4715-21.
55. Dragulescu-Andrasi A, Chan CT, De A, Massoud TF, Gambhir SS. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein-protein interactions within deep tissues of living subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:12060-5.
56. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (editors). *Molecular biology of the cell. In visualizing cells.* 5th ed., New York: Garland Science, Taylor & Francis Group. 2008;582-3.