

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

GABRIELA DE OLIVEIRA

**ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE
E ESPECTROS DE BIOLUMINESCÊNCIA DAS LUCIFERASES DE *Phrixotrix hirtus*
E OUTROS BESOUROS BIOLUMINESCENTES**

São Carlos

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

GABRIELA DE OLIVEIRA

**ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE
E ESPECTROS DE BIOLUMINESCÊNCIA DAS LUCIFERASES DE *Phrixotrix hirtus*
E OUTROS BESOUROS BIOLUMINESCENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientação: Prof. Dr. Vadim R. Viviani

São Carlos

2019

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos n° 2015/05949-4, n° 2010/05426-8, sendo que, as opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP; da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Gabriela de Oliveira, realizada em 22/03/2019:

Prof. Dr. Vadim Viviani
UFSCar

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
UFSCar

Profa. Dra. Karina Martins
UFSCar

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto
UNESP

Profa. Dra. Marcia Regina Brochetto Braga
UNESP

Para minha segunda mãe, Izaura

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares e meu namorado, Dennis, que sempre me apoiaram e foram a base para minhas conquistas. Agradeço por todo o apoio, compreensão e paciência, principalmente ao meu pai Antônio Eduardo, minha mãe Rosângela e meus avós Izaura e Manuel.

Ao meu orientador Prof. Dr. Vadim Viviani pela oportunidade, orientação e confiança permitindo a realização deste trabalho. Obrigada por colaborar em minha formação profissional e pessoal.

A todos os meus amigos, colegas e ex-colegas de laboratório, em especial Monique Romeiro, Antônio Marcelino, Tamara Bastos, Gabriele Verônica, Jaqueline R. Silva, Maria Theresa, Danilo T. Amaral, Mariele Carvalho, Daniel Rangel e Raone Reis pelos ensinamentos, conselhos, conversas e risadas.

Aos docentes e secretárias do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) por todo o conhecimento proporcionado e auxílio.

Aos professores, técnicos e funcionários da UFSCar campus de Sorocaba pela colaboração com as atividades do presente projeto.

À FAPESP pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa de Doutorado Direto (2015-05949-4), sendo que, as opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo financiamento inicial deste projeto e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

RESUMO

Luciferases de vagalumes tem sido extensivamente utilizadas como reagentes bioanalíticos e os seus cDNAs como genes repórteres e biosensores para bioimagem. Luciferases de vagalumes, larvas “trenzinho” e besouros “tec-tec”, possuem características de termoestabilidade, cinética e espectro de bioluminescência diferenciados, podendo oferecer alternativas para aumentar as aplicações destas enzimas. Entretanto, a maioria destas enzimas são instáveis em temperaturas acima de 30°C, e as luciferases de vagalumes apresentam espectros de bioluminescência sensíveis a temperatura. Nesta tese, realizamos um amplo estudo do efeito da temperatura na estabilidade e espectros de bioluminescência de luciferases recombinantes de besouros bioluminescentes brasileiros, e usamos mutagênese sítio-dirigida para aumentar a termoestabilidade da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix hirtus*. As luciferases mais termoestáveis foram as que emitem luz mais deslocada para o azul dentro de cada família: a do elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans* (534 nm), aquela do fengodídeo *Phrixotrix vivianii* (546 nm) e aquela do lampirídeo *Amydetes vivianii* (538 nm), confirmando que luciferases emissoras na região do verde ao azul são mais estáveis. Todas as luciferases pH-sensitivas de vagalumes estudadas aqui, apresentaram sensibilidade do espectro de bioluminescência à temperatura. As luciferases com o espectro de bioluminescência mais deslocado para o azul, também foram menos sensíveis a temperatura, na seguinte ordem: *Amydetes* < *Cratomorphus* < *Photinus* < *Macrolampis*. Também foi possível averiguar a existência de uma relação linear entre temperatura e razão de intensidade de luz nas regiões do verde e vermelho, que permitem quantificar racionometricamente a temperatura usando estas luciferases. Finalmente, a luciferase emissora de luz vermelha de *P. hirtus* mostrou-se refratária à estabilização por mutagênese sítio-dirigida, apenas N351E e R353E apresentaram termoestabilidade ligeiramente maior do que a enzima selvagem, preservando o mesmo espectro de bioluminescência. Os resultados sugerem que esta luciferase emissora de luz vermelha seja muito flexível, requerendo uma engenharia considerável para estabilizá-la.

Palavras-chave: bioluminescência, luciferases pH-sensitivas, luciferases pH-insensitivas, termoestabilidade, curva racionométrica.

ABSTRACT

Firefly luciferases have been extensively used as bioanalytical reagents and their cDNAs as reporter genes and bioimaging biosensors. Luciferases of fireflies, “rail-road” worm and “tec-tec” beetles, have different characteristics of thermostability, kinetics and spectrum of bioluminescence, being able to offer alternatives to increase the applications of these enzymes. However, most of these enzymes are unstable at temperatures above 30 ° C, and firefly luciferases exhibit bioluminescence spectra sensitive to temperature. In this thesis, we conducted an extensive study of the effect of temperature on the stability and bioluminescence spectra of recombinant luciferases from Brazilian bioluminescent beetles, and we used site-directed mutagenesis to increase the thermostability of red-light-emitting luciferase from *Phrixotrix hirtus*. The most thermostable luciferases were the ones that emitted the most shifted light to the blue within each family: that of the Elateridae *Pyrearinus termitilluminans* (534 nm), that of the Phengodidae *Phrixotrix vivianii* (546 nm) and that of the Lampyridae *Amydetes vivianii* (538 nm), confirming that emitting luciferases in the region from green to blue are more stable. All the pH-sensitive luciferases of fireflies studied here presented sensitivity of the bioluminescence spectrum to temperature. The luciferases with the most displaced bioluminescence spectrum for blue were also less temperature sensitive in the following order: *Amydetes* < *Cratomorphus* < *Photinus* < *Macrolampis*. It was also possible to verify the existence of a linear relationship between temperature and light intensity ratio in the green and red regions, which allow quantifying ratiometrically the temperature using these luciferases. Finally, *P. hirtus* red light-emitting luciferase was resistant to stabilization by site-directed mutagenesis, only N351E and R353E showed slightly higher thermostability than the wild-type enzyme, preserving the same bioluminescence spectrum. The results suggest that this red light-emitting luciferase is very flexible, requiring considerable engineering to stabilize it.

Key-words: bioluminescence, pH-sensitive luciferases, pH-insensitive luciferases, thermostability, ratiometric curve.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Bioluminescência	16
1.2. Luciferases de Coleópteros.....	17
1.3. Aplicações Bioanalíticas das Luciferases de Besouros	21
1.3.1. Termoestabilidade de luciferases de besouros.....	22
1.4. Luciferases de besouros brasileiros	24
1.4.1. A luciferase emissora de luz vermelha de <i>Phrixotrix hirtus</i>	24
1.4.2. Luciferases pH-sensitivas	25
1.5. Uso de luciferases de vagalumes pH-sensitivas como indicador intracelular de pH e metais.....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. COMPARAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DAS LUCIFERASES RECOMBINANTES DE BESOUROS	30
4.1.2. cDNAs das luciferases.....	31
4.1.3. Transformação	31
4.1.4. <i>Screening</i> da termoestabilidade <i>in vivo</i>	32
4.1.5. Indução da expressão heteróloga de proteína	33
4.1.6. Extração e Purificação de proteína por cromatografia de afinidade.....	33
4.1.7. Eletroforese em gel de SDS (SDS – PAGE)	34
4.1.8. Medidas de atividade da luciferase <i>in vitro</i>	34
4.1.9. Quantificação de proteínas totais.....	35
4.1.10. Atividade específica	35
4.1.11. Análise da termoestabilidade <i>in vitro</i> de luciferases recombinantes selvagens ..	35
4.1.12. Espectros de bioluminescência.....	36
4.2. EFEITO DA TEMPERATURA NO ESPECTRO DE LUCIFERASES pH-SENSITIVAS	36

4.2.1. Efeito da temperatura nos espectros de bioluminescência de luciferases pH-sensitivas.....	36
4.2.2. Análise raciométrica do efeito da temperatura na razão de intensidade de luz vermelha e verde.....	37
4.2.3. Efeito da temperatura na fluorescência do triptofano na luciferase pH- sensitiva de <i>Macrolampis sp2</i>	37
4.3. OBTENÇÃO DE MUTANTES TERMOESTÁVEIS DA LUCIFERASE EMISSORA DE LUZ VERMELHA DE <i>Phrixotrix hirtus</i>	37
4.3.1 Mutagênese Sítio-Dirigida.....	38
4.3.2. Eletroforese em gel de agarose	41
4.3.3. Mini-prep de DNA plasmidial.....	41
4.3.4. Sequenciamento de DNA	41
4.3.5. Determinação dos valores de K_M para a D-luciferina e ATP	42
4.3.6. Análise da termoestabilidade <i>in vitro</i> dos mutantes da luciferase de <i>P. hirtus</i>	42
4.4. ANÁLISES COM FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA	42
5. RESULTADOS	44
5.1. COMPARAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE DAS LUCIFERASES RECOMBINANTES DE COLEÓPTEROS BIOLUMINESCENTES.....	44
5.1.1. Termoestabilidade <i>in vivo</i>	44
5.1.2. Comparação da termoestabilidade das luciferases em extratos brutos.....	45
5.1.3. Comparação da termoestabilidade de luciferases purificadas <i>in vitro</i>	52
5.1.4. Análise da estrutura primária das luciferases selvagens.....	55
5.2. EFEITO DA TEMPERATURA NOS ESPECTROS DE BIOLUMINESCÊNCIA DE LUCIFERASES pH – SENSITIVAS	59
5.2.1. Efeito da temperatura nos espectros de bioluminescência	60
5.2.2. Análise raciométrica do efeito da temperatura	62
5.2.2. Efeito da temperatura na fluorescência do triptofano como indicador de mudança conformacional	63
5.3. SELEÇÃO DE MUTANTES TERMOESTÁVEIS DA LUCIFERASE EMISSORA DE LUZ VERMELHA DE <i>Phrixotrix hirtus</i>	64
5.3.1. Embasamento e estratégias das mutagêneses	64
5.3.2. Efeito das mutações na termoestabilidade	70
5.3.3. Efeito das mutações nos espectros de bioluminescência.....	72
5.3.4. Efeito das mutações nos K_M para luciferina e ATP	72

6. DISCUSSÃO.....	74
6.1. COMPARAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE DAS LUCIFERASES DE COLEÓPTEROS BIOLUMINESCENTES	74
6.1.1. Relação entre a termoestabilidade e o espectro de bioluminescência	74
6.1.2. Relação entre a termoestabilidade e características cinéticas.....	75
6.1.3. Relações entre termoestabilidade e estrutura.....	76
6.2. EFEITO DA TEMPERATURA NOS ESPECTROS DE LUCIFERASES PH-SENSITIVAS	77
6.3. EFEITO DE MUTAÇÕES NA TERMOESTABILIDADE DA LUCIFERASE DE <i>P. hirtus</i>	78
7. CONCLUSÕES	80
8. PERSPECTIVAS	82
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
10. ARTIGOS PUBLICADOS.....	95
11. ARTIGOS EM FASE DE PUBLICAÇÃO	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Dispositivo de carga acoplada (<i>Charge-Coupled Device</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	1,4-Dithio-D-threitol
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosídeo
LB	Luria Bertani (meio de cultura bacteriano)
Rpm	Rotações por minuto
SOB	<i>Super Optimal Broth</i> – meio de cultura bacteriano “super ideal”

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Vagalumes das três principais famílias de coleópteros bioluminescentes: (A) *Macrolampis* sp, um vagalume da família Lampyridae; (B) *Pyrophorus punctatissimus* vagalume “tec-tec” da família Elateridae; (C) larva trenzinho *Phrixotrix hirtus* da família Phengodidae. Fonte: VIVIANI (2008) adaptada.....p. 17
- Figura 2.** Luciferina de coleópteros.....p. 18
- Figura 3.** Reação de bioluminescência catalisada pelas luciferases de besouros através da ativação ATP-dependente e oxidação da molécula de luciferina. Fonte: HASTINGS (1991) (adaptado).....p. 18
- Figura 4.** (A) Estrutura tridimensional da luciferase de *Photinus pyralis* representando o domínio N-terminal em azul, violeta e verde; e o domínio C-terminal em amarelo, que se aproximam possivelmente para envolver os substratos durante a catálise. Fonte: CONTI *et al.* 1996 (adaptada). (B) Estrutura da luciferase de *Luciola cruciata* complexada com o análogo DLSA, demonstrando o domínio N-terminal em cinza e o domínio C-terminal azul. Fonte: NAKATSU *et al.* 2006 (adaptada).....p. 20
- Figura 5.** (A) Estrutura tridimensional da luciferase do fengodígeo *Phrixotrix hirtus*, visão frontal da conformação em octâmero. (B) Visão lateral do octâmero da luciferase de *Phrixotrix hirtus*, demonstrando o N-terminal (rosa) e o C-terminal (vermelho). (C) Visão lateral do luciferase de *Amydetes vivianii*, demonstrando o N-terminal (verde água) e o C-terminal (azul). Fonte: CARRASCO-LÓPEZ *et al.*, 2018 (adaptada).....p. 21
- Figura 6.** Delineamento da metodologia utilizada na primeira etapa do projeto.....p. 31
- Figura 7.** Curva Padrão de concentração de soroalbumina bovina (BSA).....p. 35
- Figura 8.** Delineamento da metodologia utilizada.....p. 39
- Figura 9.** Termoestabilidade *in vivo* de bactérias expressando as luciferases recombinantes selvagens: (A e A1) *A. vivianii*, (B e B1) *Macrolampis* sp2, (C e C1) *C. distinctus*, (D e D1) *P. termiutilluminans*, (E e E1) *F. bruchi*, (F e F1) *P. angustus*, (G e G1) *P. hirtus*, (H e H1) *P. vivianii*. *o número “1” representa incubação após 50°C..p. 45
- Figura 10.** Termoestabilidade das luciferases de vagalumes lampirídeos em extratos brutos: (linha preta) *Macrolampis* sp2, (tracejado) *Amydetes vivianii* e (pontilhado) *Cratomorphus distinctus* após incubação durante 1-48 horas a (A) 4°C; (B) 22°C e (C) 37°C.....p. 47
- Figura 11.** Termoestabilidade das luciferases de elaterídeos em extratos brutos: (linha preta) *Fulgeochlizus bruchi*, (tracejado) *Pyrophorus angustus* e (pontilhado) *Pyrearinus*

termitilluminans luciferase após incubação durante 1-48 horas a (A) 4°C; (B) 22°C e (C) 37°C.....p. 49

Figura 12. Termoestabilidade das luciferases de fengodideos em extrato bruto: (linha preta) *Phrixotrix hirtus* e (tracejado) *Phrixotrix vivianii* após incubação durante 1-48 horas a (A) 4°C; (B) 22°C e (C) 37°C.....p. 51

Figura 13. Termoestabilidade das luciferases purificadas: da família Lampyridae *Macrolampis* sp2 (linha cinza) e comercial de *P. pyralis* (linha cinza claro); da família Elateridae *Pyrearinus termitilluminans* (linha preta); e da família Phengodidae *Phrixothrix hirtus* (tracejado) e *Phrixothrix vivianii* (pontilhado) após incubação durante 1-48 horas a (A) 4°C; (B) 22°C e (C) 37°C.....p. 54

Figura 14. Plotes de hidrofobicidade de acordo como Kyte & Doolittle baseados nas estruturas primárias das luciferases, com destaques para os picos mais hidrofóbicos do lampirídeo *Amydetes vivianii* (vermelho), do elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans* (azul) e fengodídeo *Phrixotrix vivianii* (verde).....p. 56

Figura 15. Imagens mostrando porções hidrofílicas (azul) e hidrofóbicas (vermelho) nas luciferases de: (A) do lampirídeo *Amydetes vivianii*, (B) do elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans* e (C) fengodídeo *Phrixotrix vivianii*.....p. 56

Figura 16. Estrutura da luciferase do vagalume *Luciola cruciata* mostrando os resíduos K208 e Q211 que correspondem aos resíduos K206 e D209 na luciferase de *A. vivianii*.....p. 57

Figura 17. Estrutura da luciferase do vagalume *Luciola cruciata* mostrando os resíduos K124, K132, K133 e T140 que correspondem aos resíduos K121, R129, K130 e E137 da luciferase pH-insensitível de *P. termitilluminans*.....p. 58

Figura 18. Efeito da temperatura nos espectros de bioluminescência das luciferases: (A) *Macrolampis* sp2, (B) *P. pyralis*, (C) *C. distinctus* e (D) *A. vivianii*; 5°C (preto), 15°C (cinza escuro), 25°C (cinza claro), 35°C (pontilhado).....p. 61

Figura 19. Curva Raciométrica do efeito da temperatura nas intensidade de bioluminescência verde e vermelha nas luciferases pH-sensíveis, *Macrolampis* sp2 (vermelho), *P. pyralis* (preto), *C. distinctus* (verde) e *A. vivianii* (azul).....p. 63

Figura 20. Estrutura dos mutantes duplos da luciferase de *P. hirtus* e suas interações: (A) N351C (laranja)/ T307C (branco); (B) K323C (laranja)/ A293C (branco); (C) E268C (branco)/ L297C (laranja).....p. 67

- Figura 21.** Estrutura dos mutantes da luciferase de *P. hirtus* e suas possíveis interações: (A) N351E (branco); (B) A229R (branco).....p. 67
- Figura 22.** Estrutura dos mutantes da luciferase de *P. hirtus*: (A) R353E (verde) e os resíduos para a possível interação de ponte salina K356 (branco) e K357 (amarelo); (B) S314T.....p. 68
- Figura 23.** Estrutura dos mutantes da luciferase de *P. hirtus* e suas possíveis interações: (A) G312A (branco); (B) G358P (branco).....p. 69
- Figura 24.** Estrutura do mutante da luciferase de *P. hirtus* E341A (branco) e suas possíveis interações.....p. 70
- Figura 25.** Gel de SDS 10 % com extratos brutos de células *E.coli* BL21 expressando o duplo mutante N351C/T307C da luciferase de *P. hirtus* extraídos de 3 formas diferentes: (M) marcador de peso molecular; (1) *pellet* (produzido após a extração e ressuspenso em água); (2) extrato bruto extraído com a concentração final de 8 mM de DTT; (3) extrato bruto extraído com a concentração final de 1 mM de luciferina; (4) extrato bruto extraído com concentrações final de 8 mM de DTT mais 1 mM de luciferina.....p. 71
- Figura 26.** Termoestabilidade da luciferase recombinante selvagem de *P. hirtus* e seus mutantes após incubação a 37°C durante 1-120 minutos.....p. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo de todos os mutantes sítio dirigidos obtidos e suas interações.....p.	39
Tabela 2. Sequência dos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para mutagênese sítio-dirigida na luciferase de <i>Phrixotrix hirtus</i>p.	40
Tabela 3. Oito regiões mais hidrofóbicas das luciferases mais termoestáveis.....p.	55
Tabela 4: Pontes dissulfeto preditas pelos <i>softwares</i> DiANNA e <i>Dipro</i> , e pontos isoelétricos das luciferases recombinantes selvagens.....p.	59
Tabela 5. Espectro de bioluminescência, inclinação da reta e a diferentes meia-bandas entre 5-35°C, das luciferases pH- sensitivas.....p.	62
Tabela 6. Sumário do efeito das mutações na termoestabilidade, propriedades cinéticas e espectros de bioluminescência na luciferase selvagem de <i>P. hirtus</i>p.	73
Tabela 7. Propriedades cinéticas, termoestabilidade e espectro de bioluminescência das luciferases de besouros.....p.	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bioluminescência

Bioluminescência é a emissão de luz fria e visível por organismos vivos. É uma forma de quimioluminescência catalisada por enzimas conhecidas como luciferases, que catalisam oxidações altamente exergônicas de um substrato – a luciferina – liberando energia na forma de luz visível com alta eficiência. Durante a oxidação das luciferinas, são formados intermediários peroxídicos altamente instáveis e ricos em energia, cuja clivagem térmica gera produtos carbonílicos, um dos quais no estado eletronicamente excitado singlete que se desativa emitindo luz (WILSON, 1995).

A bioluminescência teria surgido de forma independente em 30 ou 40 ocasiões no decorrer do processo evolutivo (HASTINGS, 1983; HADDOCK, 2006), sendo que somente no grupo dos insetos essa capacidade teria aparecido ao menos três vezes (VIVIANI, 2001). A bioluminescência pode ser usada para diferentes funções comunicativas, dependendo do organismo, como atração sexual, defesa, camuflagem e atração de presas (HADDOCK *et al*, 2010).

A bioluminescência é predominante nos mares, ocorrendo em aproximadamente 90% dos organismos marinhos das profundezas, de bactérias a peixes, nas mais variadas regiões, dos polos aos trópicos e emitem luz em um amplo espectro, do azul ao vermelho (HADDOCK *et al*, 2010).

A reação bioluminescente também é bastante diversificada, podendo ser do tipo luciferina-luciferase ou utilizando fotoproteínas, em que a luciferina é associada firmemente a proteína formando um complexo estável. Alguns organismos marinhos emitem luz verde devido a presença de uma proteína fluorescente verde (GFP) que funciona como acceptor fluorescente primário de energia. Nestes organismos a energia de excitação de uma fotoproteína ou de um sistema luciferina-luciferase é transferida por ressonância a molécula de GFP resultando na emissão de luz verde (SHIMOMURA, 2006).

Embora menos abundante entre os organismos terrestres, a bioluminescência é encontrada em bactérias, fungos, anelídeos, moluscos, quilópodes e insetos. A classe dos insetos é a mais rica e mais diversificada com espécies bioluminescentes encontradas em

Collembola, Diptera e principalmente em Coleoptera (LLOYD, 1983). Em coleópteros, espécies bioluminescentes ocorrem principalmente na superfamília Elateroidea que inclui as principais famílias de vagalumes (**Fig. 1**): Lampyridae, conhecidos como vagalumes que na fase adulta emitem lampejos na faixa do verde-amarelo (LALL *et al.*, 1980) por meio de lanternas ventrais com a função de atração sexual (LLOYD, 1983); Elateridae, conhecidos como besouros “tec-tec”, que na fase adulta emitem luminescência contínua na região do verde através de duas lanternas protorácicas quando perturbados, além de luz contínua na faixa do verde ao laranja através de órgãos abdominais enquanto o inseto voa; e Phengodidae, conhecidos como larvas trenzinhos, onde as fêmeas e as larvas possuem lanternas puntiformes laterais ao longo do corpo e emitem luz na faixa do verde ao laranja, além de lanternas na cabeça que emitem luz na faixa do verde ao amarelo ou vermelho, dependendo da espécie, como *Phrixotrix* (VIVIANI & BECHARA, 1993, 1997), os únicos organismos terrestres conhecidos a emitirem luz vermelha.

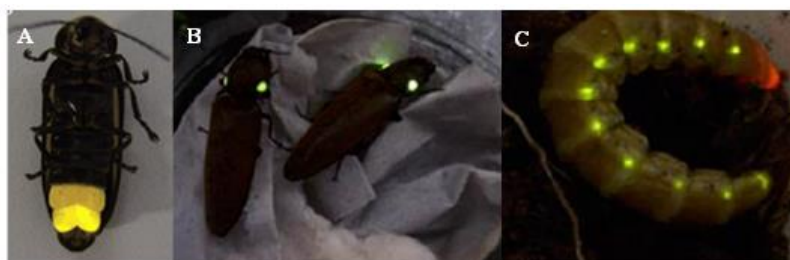


Figura 1. Vagalumes das três principais famílias de coleópteros bioluminescentes: (A) *Macrolampis* sp, um vagalume da família Lampyridae; (B) *Pyrophorus punctatissimus* vagalume “tec-tec” da família Elateridae; (C) larva trenzinho *Phrixotrix hirtus* da família Phengodidae. Fonte: VIVIANI (2008) adaptada.

1.2. Luciferasas de Coleópteros

O mecanismo de bioluminescência terrestre mais bem compreendido é o dos vagalumes. As diferentes famílias compartilham a mesma reação bioluminescente, com substratos (luciferina e ATP) idênticos e luciferasas homólogas (WOOD *et al.*, 1989; VIVIANI, 2002). A luciferina consiste de um composto heterocíclico carboxílico com uma porção benzotiazólica e uma porção carboxílica tiazólica (**Fig. 2**).

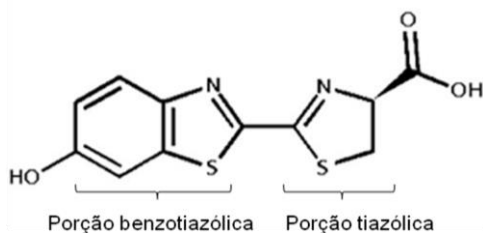


Figura 2. Luciferina de coleópteros.

As luciferases de besouros catalisam a oxidação da luciferina na presença de ATP, Mg^{+2} e O_2 , produzindo luz em uma reação de duas etapas (McELROY & DeLUCA, 1978). Primeiramente ocorre a ativação da luciferina por ATP, produzindo adenilato de luciferina com a liberação de pirofosfato. Na segunda etapa, o adenilato de luciferina é oxidado por oxigênio molecular, produzindo uma dioxetanona que rapidamente se cliva gerando CO_2 e oxiluciferina em um estado eletronicamente excitado singlete que decai emitindo um fóton de luz na faixa verde-vermelho do espectro com uma eficiência quântica de 15-60% dependendo da luciferase (ANDO *et al.*, 2008; NIWA *et al.*, 2010) (Fig. 3).

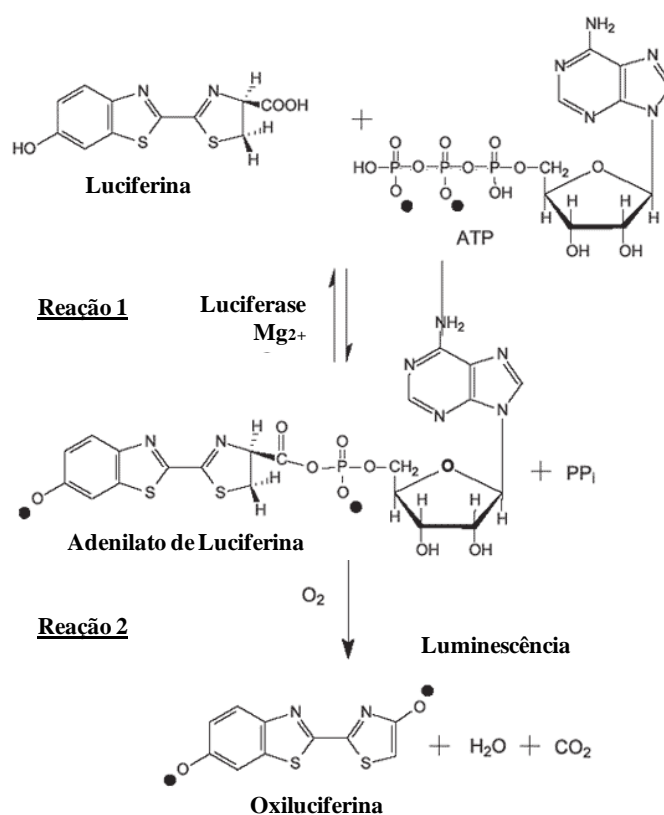


Figura 3. Reação de bioluminescência catalisada pelas luciferases de besouros através da ativação ATP-dependente e oxidação da molécula de luciferina. Fonte: HASTINGS (1991) (adaptado).

Os genes que codificam uma variedade de luciferases, na maioria da família Lampyridae (TATSUMI *et al.*, 1989; KAJIYAMA & NAKANO, 1991; DEVINE *et al.*, 1993; SALA-NEWBY *et al.*, 1996; OHMIYA *et al.*, 1995; VIVIANI *et al.*, 2005; VIVIANI *et al.*, 2011), foram clonados e sequenciados. Codificam polipeptídeos de 543-550 resíduos, que apresentam propriedades semelhantes, preservando entre si de 67% a 99% de identidade em nível de estrutura primária (WOOD, 1995; VIVIANI 2002). Já as luciferases de elaterídeos e fengodídeos (WOOD *et al.*, 1989, VIVIANI *et al.*, 1999 a,b, AMARAL *et al.*, 2012, 2016) apresentam entre 45% e 50% de identidade com as luciferases de lampirídeos.

A estrutura tridimensional da luciferase do vagalume norte-americano *Photinus pyralis*, resolvida por cristalografia de raios X na ausência de substratos (CONTI *et al.*, 1996), mostra que ela é formada por dois domínios distintos: o C-terminal e o N-terminal com 3 subdomínios (subdomínios A e B com duas folhas β flanqueadas por α hélices, e um subdomínio C com um barril β antiparalelo). As duas superfícies N e C-terminal formam um sulco, o sítio ativo, onde são encontrados vários resíduos conservados (**Fig. 4A**). Posteriormente, Nakatsu *et al.* (2006) determinaram a estrutura tridimensional da luciferase do vagalume japonês *Luciola cruciata* complexada com o análogo de adenilato de luciferina, DLSA (5'-O-[N-(dehidroluciferil)-sulfamoil] adenosina) que mostrou uma conformação fechada, ou com os produtos AMP e oxiluciferina que mostrou uma conformação aberta, revelando alguns resíduos do sítio ativo importantes para a ligação com o substrato (**Fig. 4B**). Nesta estrutura, o DLSA fica localizado em uma região hidrofóbica composta pelos resíduos da α -hélice 8 (248-260), fitas β 12 (286-289), β 13 (313-316), β 14 (339-342), β 15 (351-353) e um *loop* (345-350), enquanto a entrada da região é bloqueada pela porção adenosina do DLSA.

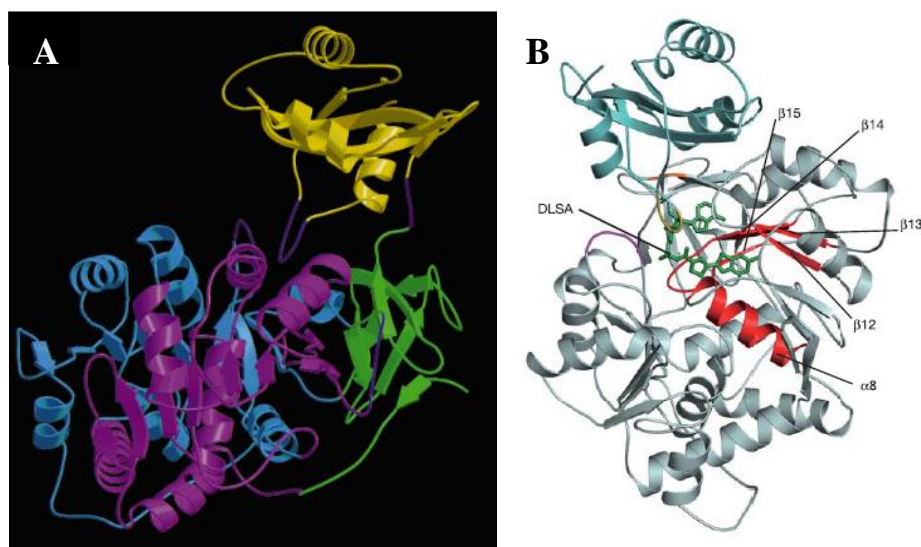


Figura 4. (A) Estrutura tridimensional da luciferase de *Photinus pyralis* representando o domínio N-terminal em azul, violeta e verde; e o domínio C-terminal em amarelo, que se aproximam possivelmente para envolver os substratos durante a catálise. Fonte: CONTI *et al.* 1996 (adaptada). (B) Estrutura da luciferase de *Luciola cruciata* complexada com o análogo DLSA, demonstrando o domínio N-terminal em cinza e o domínio C-terminal azul. Fonte: NAKATSU *et al.* 2006 (adaptada).

Recentemente foram resolvidas também as estruturas tridimensionais das luciferases do fengodígeo emissor de luz vermelha, *Phrixotrix hirtus* (623 nm), o qual possui uma estrutura quaternária octamérica (**Fig. 5A-B**). No entanto, os autores fizeram mutações que já haviam sido publicadas por nosso e outros grupos muito antes; os autores também resolveram a estrutura tridimensional do lampirídeo emissor de luz mais deslocado para o azul, *Amydetes vivianii* (538 nm) (**Fig. 5C**) (CARRASCO-LÓPEZ *et al.*, 2018).

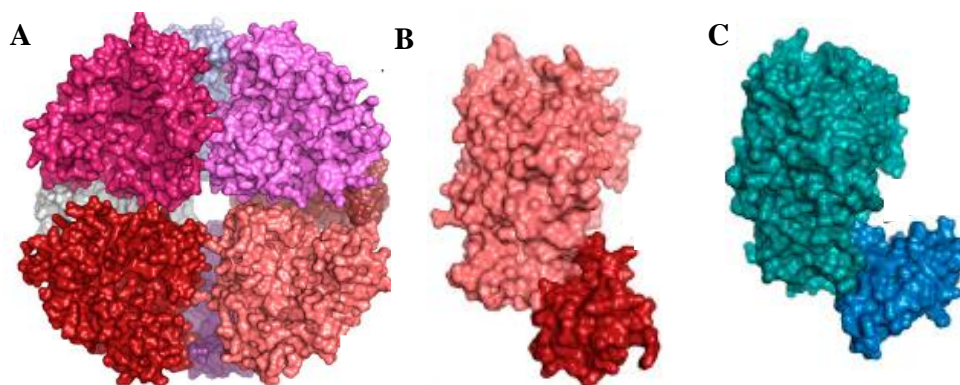


Figura 5. (A) Estrutura tridimensional da luciferase do fengodígeo *Phrixotrix hirtus*, visão frontal da conformação em octâmero. (B) Visão lateral do octâmero da luciferase de *Phrixotrix hirtus*, demonstrando o N-terminal (rosa) e o C-terminal (vermelho). (C) Visão lateral do luciferase de *Amydetes vivianii*, demonstrando o N-terminal (verde água) e o C-terminal (azul). Fonte: CARRASCO-LÓPEZ *et al.*, 2018 (adaptada).

As luciferases de besouros são divididas funcionalmente em dois grupos de acordo com a sensibilidade ao pH: as pH-sensitivas, que incluem as luciferases de Lampyridae, com o espectro que se desloca para o vermelho em pH baixos, altas temperaturas e na presença de cátions divalentes de metais pesados, como o Zn^{2+} (SELIGER & McELROY, 1964; VIVIANI & BECHARA, 1995); e as pH-insensitivas, que incluem as luciferases de Elateridae e Phengodidae em que seus espectros não são afetados por estes fatores (VIVIANI & BECHARA, 1995; VIVIANI *et al.*, 1999).

1.3. Aplicações Bioanalíticas das Luciferases de Besouros

As luciferases de vagalumes têm sido amplamente aplicadas para finalidades bioanalíticas. Uma vez que ATP está presente nas células de todos os organismos vivos, as luciferases de vagalumes são utilizadas em análise de contaminação microbiológica de fluidos biológicos, avaliação da viabilidade celular, testes enzimáticos envolvendo a geração ou degradação de ATP (CAMPBELL, 1988). Após a clonagem do cDNA de luciferases de vagalumes, os genes das luciferases se tornaram os mais sensíveis genes repórteres para acompanhar expressão gênica em células vivas e tecidos. Estas aplicações incluem a análise de atividade transcripcional de promotores em diferentes linhagens celulares, bioimagem de células animais e plantas durante o desenvolvimento embrionário e estudo do ritmo circadiano (NAYLOR, 1999, NAKAJIMA *et al.* 2010, PENDERGAST *et al.* 2010, KWON *et al.* 2010, RODA & GUARDIGLI, 2012, DORZAZ

et al., 2017). Na área biomédica aplicações incluem o uso dos genes da luciferase para estudo de progressão e regressão viral e de bactérias (KOVACS, 1991, ANDREU *et al* 2010), avaliação não invasiva de proliferação e regressão tumoral em modelos animais (BAGGET *et al.*, 2004; HORTS *et al* 2011) e análise de condrogênese e desenvolvimento de terapia gênica para regeneração de cartilagens (JE *et al.*, 2017).

O número de aplicações foi ampliado com o uso das luciferases em sistemas repórter múltiplos que utilizam simultaneamente várias luciferases emissoras de diferentes cores de luz para análise simultânea de múltiplos eventos celulares (NAKAJIMA *et al*, 2005; VIVIANI & OHMIYA, 2006).

A maioria dos genes de luciferases de coleópteros aplicada em biotecnologia codificam luciferases que emitem luz na região verde-amarelada do espectro, limitando consideravelmente suas aplicações, uma vez que muitos tecidos biológicos são consideravelmente opacos nesta região. Neste contexto, a luciferase de *Phrixotrix hirtus*, a única clonada que naturalmente emite luz vermelha (VIVIANI *et al*, 1999), tem sido usada em tecidos de mamíferos e outros tecidos ricos em pigmentos como hemoglobina que absorvem comprimento de ondas mais curtos (NAKAJIMA *et al*, 2010). Entretanto, esta luciferase em geral apresenta baixa termoestabilidade na forma selvagem, não sendo estável para utilização em ensaios em temperaturas elevadas, ou para expressão em células de mamíferos. Por isto, algumas luciferases atualmente empregadas para finalidades comerciais passaram por processos de otimização por engenharia de proteínas como mutagênese sítio-dirigida, mutagênese randômica, quimerização e evolução *in vitro* (KAJIYAMA & NAKANO, 1993; VIVIANI & OHMIYA, 2000; VIVIANI *et al.*, 2004; KOKSHAROV & UGAROVA, 2011). Algumas destas variantes têm estabilidade a 60°C (HALL *et al.*, 1998).

1.3.1. Termoestabilidade de luciferases de besouros

Ao longo dos anos os estudos com luciferases mutantes termoestáveis foram desenvolvidos em sua maioria com vagalumes da família Lampyridae.

Os primeiros mutantes termoestáveis foram obtidos a partir da luciferase do vagalume japonês *Luciola cruciata*, por meio de mutagênese randômica com a substituição T217I; posteriormente, a substituição do resíduo T217 por leucina, valina, cisteína, fenilalanina e metionina mostrou a existência de uma relação entre a termoestabilidade e a hidrofobicidade (KAJIYAMA & NAKANO, 1993). Outros

mutantes termoestáveis foram obtidos como os mutantes E356R/V368A da luciferase de *Hotaria parvula* (KITAYAMA *et al.*, 2003).

A partir disto, foram desenvolvidos diversos trabalhos com a luciferase do vagalume *Photinus pyralis*, como o mutante emissor de luz vermelha Ppy-RE (S284T) e o mutante emissor de luz verde Ppy-GR (V241I/ G246A/ F250S) (BRANCHINI *et al.*, 2007) mais termoestáveis. Os autores se basearam no estudo de Tisi *et al.* (2002) e introduziram as mesmas mutações em diferentes segmentos da luciferase - T214A, A215L, I232A, F295L e E354K – resultando em um aumento na termoestabilidade a 37° C. Também com a luciferase de *Photinus pyralis*, Karimzadeh, Moradi & Hosseinkhani (2012) produziram o mutante A296C-A326C que resultou em um aumento da termoestabilidade através da formação de uma ponte dissulfeto estabilizadora. Resultados semelhantes foram observados nos estudos com hidrolases, com a luciferase de *Renilla*, a enzima Diisopropil-fluorofosfatase (DFPase) e a azoredutase de *Halomanas elongata* (FARNOOSH *et al.*, 2016; KAHRANI *et al.*, 2017; MOHAMMADI *et al.*, 2018; NAKHAEI *et al.*, 2018).

Assim como verificado em um estudo de Amini-Bayat *et al.* (2012), Yu *et al.* (2015) se basearam na relação entre flexibilidade e estabilidade, e introduziram resíduos de Pro nas regiões mais flexíveis da luciferase de *Photinus pyralis*. O mutante H489P reteve cerca de 20% de sua atividade enzimática após exposição a alta temperatura, demonstrando que proteínas que possuem maior termoestabilidade são mais rígidas. Tal resultado também foi verificado nos estudos com a luciferase de *P. pyralis* de Karimzadeh, Moradi & Hosseinkhani (2012) e Jarchi *et al.* (2018).

A partir da luciferase de *Lampyrus turkestanicus*, Mortaszavi & Hosseinkhani (2011) produziram os mutantes termoestáveis I232R, N35R/I232R e N35R/I232R/I182R. A maior termoestabilidade foi devida a um aumento da rigidez na estrutura destes mutantes pela substituição de resíduos polares neutros e apolares por resíduos com cargas positivas, sendo que, a Arg possui alta tendência de formar pontes salinas aumentando as interações locais e estabilizando a região de *loops*. Este aumento de termoestabilidade pela rigidez também foi observado nos mutantes Q35, I182, I232 e L300 pelo resíduo arginina no estudo de Mortazi & Hosseinkhani (2016).

Com a luciferase de *Luciola mingrelica* foram obtidos os mutantes termoestáveis G216N/A217L/S398M, C146S, o mutante múltiplo chamado 4TS (com oito mutações S118C/ T213S/ K156R/ R211L/ A217V/ C146S/ E356K/ S364C) e A534R (KOKSHAROV & UGAROVA, 2011; MODESTOVA, 2011; KOKSHAROV &

UGAROVA, 2011b; MODESTOVA *et al.*, 2014), indicando aumento da estabilidade da luciferase devido a mudanças conformacionais.

1.4. Luciferases de besouros brasileiros

Nosso grupo de pesquisa clonou ao longo dos anos várias luciferases a partir de besouros brasileiros, muitas das quais com propriedades de bioluminescência únicas, como as luciferases dos elaterídeos: *Pyrearinus termitilluminans* (VIVIANI *et al.*, 1999) que emite a luz mais deslocada para o azul entre todas as luciferases clonadas (534 nm) e apresenta considerável termoestabilidade; *Fulgeochlizus bruchi* (AMARAL *et al.*, 2012) que emite luminescência verde (543 nm) apresentando pH-ótimo 9, o maior já reportado entre todas as luciferases, e decaimento de luminescência lento; *Pyrophorus angustus* (AMARAL *et al.*, 2016) que emite na região do laranja (584 nm), sendo uma adaptação a reflectância do ambiente e competição inter/intraespecífica, e pH ótimo de aproximadamente 8,5.

A luciferase dos fengodídeos de *Phrixotrix hirtus*, a única a produzir bioluminescência vermelha (620 nm), e a luciferase de *Phrixotrix vivianii* (VIVIANI *et al.*, 1999b) produzindo bioluminescência verde (546 nm).

E por fim, as luciferases de lampirídeos sensíveis ao pH: *Cratomorphus distinctus* (VIVIANI *et al.*, 2004) emissor de luz verde (550 nm), *Macrolampis* (VIVIANI *et al.*, 2005) que produz bioluminescência com espectro bimodal (568 nm); e a luciferase de *Amydetes vivianii* (VIVIANI *et al.*, 2011) com o espectro de bioluminescência mais deslocado para o azul (538 nm) entre todas as luciferases clonadas desta família.

Algumas destas luciferases já são utilizadas como genes repórter para células de mamíferos, entre as quais as luciferase de *Phrixotrix hirtus* e *Pyrearinus termitilluminans* (NAKAJIMA *et al.*, 2005). Entretanto, existe a necessidade de melhorar a termoestabilidade destas para aplicações como genes repórter de células de mamíferos e como reagentes analíticos.

1.4.1. A luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix hirtus*

A luciferase de *Phrixotrix hirtus* (Coleóptera: Phengodidae) é alvo de grande interesse, pois esta luciferase emite naturalmente luz vermelha (620 nm), podendo ser

utilizada como gene repórter em células de mamíferos e outros tecidos pigmentados, como tecidos que contem a hemoglobina que absorve ondas de comprimento curto (RICE *et al.*, 2001).

Um primeiro estudo foi feito com a luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix hirtus* em que foram produzidos cinco mutantes – I212L, N351K, S463R, I212L/N351K e I212L/S463R - com a finalidade de aumentar a atividade enzimática e a termoestabilidade (LI *et al.*, 2010). Os resultados mostraram que os mutantes não sofreram grandes modificações no espectro de bioluminescência. Os mutantes I212L/S463R, I212L e I212L/N351K foram os mais estáveis a 37°C, sendo que o último foi considerado a melhor combinação otimizada, pois além da estabilidade, alcançou uma maior atividade específica (LI *et al.*, 2010).

1.4.2. Luciferases pH-sensitivas

Nas luciferases pH-sensitivas, pertencentes a família Lampyridae, o espectro de emissão de bioluminescência sofre deslocamento para o vermelho em pH ácido, temperaturas elevadas e/ou na presença de metais como zinco, chumbo, mercúrio (SELIGER & McELROY, 1964).

As diferentes cores da bioluminescência das luciferases de vagalumes pH-sensitivas podem ser explicadas pelas mudanças na razão entre as duas espécies emissoras, enquanto que nas luciferases pH-insensitivas a mudança de espectros pode ser ocasionada pela mudança do microambiente de apenas uma espécie emissora (VIVIANI *et al.*, 2001; 2008). Estudos posteriores mostraram que em luciferases pH-sensitivas, o rendimento quântico da emissão de luz verde diminui com o pH, enquanto que o rendimento quântico de luz vermelha não é modificado (ANDO *et al.*, 2008; NIWA *et al.*, 2010). No entanto, a identidade dos emissores ainda não está totalmente elucidada sendo que, alguns estudos sugerem que a forma “ceto” da oxiluciferina excitada emitiria luz vermelha, e a forma “enol” luz verde amarela (WHITE *et al.*, 1968; BECHARA & VIVIANI, 2015) porém, dados experimentais e teóricos sugerem que a forma “ceto” é o único emissor e que as cores de bioluminescência seriam moduladas a nível de interações do grupo fenolato (HIRANO *et al.*, 2012, VIVIANI *et al.*, 2013). Desta forma, podemos concluir que o mecanismo básico para a determinação da cor da bioluminescência não é o mesmo entre as luciferases pH-sensitivas e pH-insensitivas (VIVIANI *et al.*, 2001).

Por meio da comparação das sequências das luciferases pH-sensitivas e pH-insensitivas, sugeriu-se que a sensibilidade ao pH ocorre devido a um sítio-ativo mais flexível, devido à presença de um conjunto de resíduos conservados que difere nestes dois grupos de luciferases, que gera duas espécies emissoras, cada uma dependente de uma conformação do sítio-ativo. Por outro lado, a insensibilidade ao pH resultaria de uma maior rigidez do sítio-ativo e maior estabilização (VIVIANI, 2002; VIVIANI *et al.*, 1999b; 2008).

1.5. Uso de luciferases de vagalumes pH-sensitivas como indicador intracelular de pH e metais

Existe uma demanda crescente para ensaios bioanalíticos que estimam o pH intracelular pois, existem flutuações de pH intracelulares em processos biológicos ou patológicos como, apoptose, câncer e inflamações (BREEUWER *et al.*, 1996; AMARANTE-MENDES, 2003; BIZZARRI *et al.*, 2006; SRIVASTAVA *et al.*, 2007; KRULWICH *et al.*, 2011; van BEILEN & BRUL, 2013; HU *et al.*, 2014).

A bioluminescência apresenta vantagens sobre o uso de fluorescência em ensaios analíticos, pois esta exige a prévia irradiação com luz azul exógena para emitir a fluorescência, podendo gerar danos na célula e perturbar a fisiologia em tecidos ou células sensíveis (BREEUWER *et al.*, 1996; ASAI *et al.*, 2007; NAKAJIMA *et al.*, 2010; BENCINA, 2013). Portanto, um ensaio que não seja invasivo utilizando a luciferase e o substrato luciferina, que é estável e permeável em células, é uma tecnologia em ascensão (NAKAJIMA *et al.*, 2010; OHMIYA, 2014).

Nosso grupo de pesquisa, foi o primeiro a considerar a utilização da sensibilidade espectral das luciferases de vagalumes para monitorar ratiometricamente variações de pH intracelular (VIVIANI *et al.*, 2006; 2008). Gabriel & Viviani (2014) demonstraram a utilização da luciferase do lampírideo *Macrolampis* sp2 e outras luciferases pH-sensitivas recombinantes como um biosensor ratiométrico intracelular de pH em células de bactérias *E. coli*. Um princípio semelhante, vêm sendo utilizado para avaliar ratiometricamente a presença e concentração de metais (GABRIEL & VIVIANI, 2016).

Enquanto o efeito de pH e concentrações de metais tem sido estudados e a aplicação de análises ratiométricas destes fatores foram propostas (GABRIEL & VIVIANI, 2014, 2016), ainda não foi estudado comparativamente o efeito da temperatura

nos espectros de diferentes luciferasas pH-sensitivas e nem sua potencial aplicabilidade em análises raciométricas.

2. JUSTIFICATIVA

Existe uma demanda crescente por luciferases mais termoestáveis para fins bioanalíticos. Desta maneira é de grande importância estudar, conhecer e estabelecer fatores que afetam a estabilidade em altas temperaturas das diversas luciferases selvagens clonadas em nosso laboratório, antes de modifica-las com ferramentas de biologia molecular para melhorar sua termoestabilidade. As luciferases que emitem luz vermelha, são especialmente importantes para finalidades de bioimagem de células de mamíferos e em ensaios bioanalíticos em amostras pigmentadas (RICE *et al.*, 2001). A luciferase de *Phrixotrix* é a única que produz naturalmente a luz vermelha, sendo a que apresenta o espectro mais deslocado para o vermelho entre as luciferases já clonadas. Entretanto esta luciferase apresenta uma aplicabilidade ainda limitada devido a sua baixa termoestabilidade natural, por isso, existe a necessidade de melhorar a sua estabilidade em altas temperaturas através de ferramentas da biologia molecular, como a mutagênese sítio-dirigida.

3. OBJETIVOS

Nesta tese estudamos o efeito da temperatura na estabilidade de luciferases recombinantes de besouros bioluminescentes brasileiros, estabilizar a luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix hirtus*, e investigar o efeito da temperatura nos espectros de bioluminescência de luciferases pH-sensitivas e sua aplicabilidade em análises ratiométricas de temperatura. Os objetivos principais foram:

- 1) Comparar a termoestabilidade das luciferases selvagens das três famílias de Coleópteros bioluminescentes, Lampyridae, Elateridae e Fengodidae;
- 2) Investigar o efeito da temperatura sobre os espectros das luciferases pH – sensitivas e obter relações ratiométricas entre intensidades de bioluminescência na região do verde e vermelho e temperatura, e sua utilização em análises ratiométricas;
- 3) Obtenção de mutantes termoestáveis da luciferase do fengodídeo *Phrixotrix hirtus*, visando resíduos que supostamente podem influenciar a estabilidade da enzima;
- 4) Caracterizar cineticamente os mutantes termoestáveis e correlacionar o efeito das mutações com as alterações a nível de estrutura terciária.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COMPARAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DAS LUCIFERASES RECOMBINANTES DE BESOUROS

Em um primeiro momento foram analisados comparativamente a termoestabilidade *in vivo* e *in vitro* das luciferases recombinantes selvagens disponíveis em nosso laboratório: dos fengodídeos *Phrixotrix hirtus* e *Phrixotrix vivianii*; dos lampírideos *Macrolampis* sp2; *Amydetes vivianii*; *Cratomorphus distinctus*; e dos elaterídeos *Fulgeochlizus bruchi*; *Pyrophorus angustus* e *Pyrearinus termitilluminans*.

No teste *in vivo* após a transformação em células competentes BL21, foram repicadas três colônias contendo a luciferase de interesse, as colônias cresceram a 37°C *overnight*, e então foram induzidas a expressar a enzima a 18°C por 18h, após expressão a placa foi inicialmente exposta em câmera CCD, e então incubada à alta temperatura e depois submetida novamente a câmera CCD para visualizar a bioluminescência remanescente (**Fig. 6**).

No teste de termoestabilidade *in vitro* após a transformação em células competentes BL21, foi feita uma cultura líquida de bactérias contendo o plasmídeo com o gene da luciferase de interesse, esta cultura foi induzida por 18h a 18°C, centrifugada, e o *pellet* extraído. Os extratos brutos ou luciferases purificadas foram separados em três alíquotas que ficaram expostos a diferentes temperaturas e então foram feitas medidas das atividades luciferásicas em diferentes tempos (**Fig. 6**).

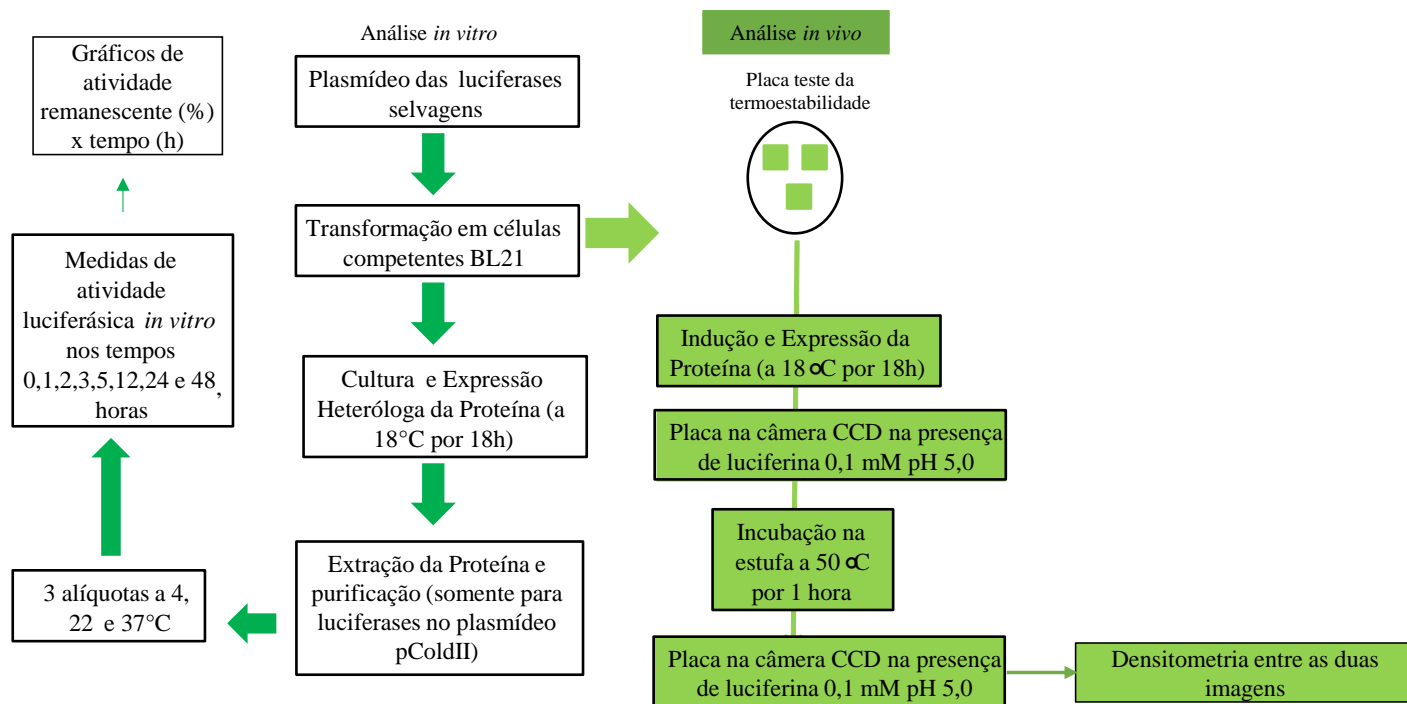


Figura 6. Delineamento da metodologia utilizada na primeira etapa do projeto.

4.1.2. cDNAs das luciferases

Todos os cDNAs das luciferases de coleópteros foram previamente clonados no nosso laboratório (VIVIANI *et al.*, 1999 a, b; 2004; 2005; 2011; AMARAL *et al.*, 2012; 2016). Os cDNAs do elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans* (VIVIANI *et al.*, 1999), os fengodídeos *Phrixotrix hirtus* e *Phrixotrix vivianii* (VIVIANI *et al.*, 1999b) e o lampirídeo *Macrolampis* sp2 foram subclonados no vetor pCold II (Takara), a luciferase do lampirídeo *Cratomorphus distinctus* (VIVIANI *et al.*, 2004) no vetor pBluescript e do lampirídeo *Amydetes vivianii* (VIVIANI *et al.*, 2011) e os elaterídeos *Fulgeochlizus bruchi* (AMARAL *et al.*, 2012) e *Pyrophorus angustus* (AMARAL *et al.*, 2016) foram subclonados no vetor pSport – 1 (Invitrogen).

4.1.3. Transformação

Preparação de células de *Escherichia coli* competentes. Uma colônia da linhagem de células de *E. coli* (XL1-Blue ou BL21/DE3) foi repicada a partir de placa LB ágar com ampicilina (100 µg/mL), inoculada em uma pré-cultura com 30 mL de meio LB líquido e incubada a 37° C sob agitação de 225 rpm. Posteriormente, a pré-cultura foi

adicionada a uma cultura com 500 mL de meio líquido SOB a qual foi incubada a 37°C sob agitação de 225 rpm até atingir absorvância entre 0,4 e 0,8 (OD₆₀₀). A cultura então foi incubada no gelo por 10 minutos e as células foram centrifugadas por 15 minutos a 4°C a 2.500 g para separação do meio de cultura. O *pellet* resultante foi ressuspensão delicadamente com pincel em 10 mL de tampão TB (PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂ 55 mM, pH 6,7 ajustado com KOH 0,1 M) e foi submetido novamente à centrifugação e ressuspensão em 4,2 mL de tampão TB mais 294 µL de DMSO. As células foram subdivididas em alíquotas de 50 µL e foram armazenadas a -80°C até serem utilizadas para a transformação bacteriana. Todas as etapas de ressuspensão foram executadas sob baixa temperatura utilizando-se caixa de gelo.

Transformação bacteriana com DNA plasmidial. Para a transformação bacteriana, 50 µL de células competentes (XL1-Blue ou BL21) e 1-3 µL (~50 ng) do DNA plasmidial (VIVIANI *et al*, 2005) da luciferase recombinante, selvagem ou mutante, foram misturados em microtubo e incubados no gelo por 30 minutos. Em seguida, a mistura foi submetida a um choque térmico de 45 segundos a 42°C. Após isto a mistura foi incubada no gelo por 2 minutos e subsequentemente, 200 µL de meio LB líquido foram adicionados. Esta solução foi mantida a 37°C em agitação a 225 rpm por 1 hora e posteriormente foi plaqueada em meio LB Ágar/Ampicilina (100 µg/mL).

4.1.4. *Screening* da termoestabilidade *in vivo*

Três colônias frescas de bactérias contendo os plasmídeos recombinantes das luciferases selvagens foram selecionadas e transferidas como quadrados de 1 cm² para uma placa contendo meio ágar LB/Ampicilina (100 µg/mL)/ IPTG (10 µg/mL) para crescimento em estufa a 37°C *overnight* e então induzidas a expressar a enzima por 18h a 18°C. Após indução foi aplicada D-luciferina 1 mM em tampão citrato 0,10 M pH 5,0 seguida de exposição por 1-5 minutos em Câmera CCD (ATTO, Japão). A mesma placa foi exposta adicionando D-luciferina 1 mM em tampão citrato 0,10 M pH 5,0, por 1-5 minutos em Câmera CCD (ATTO, Japão) após ser incubada a 50°C por uma hora. As atividades residuais em relação aos controles foram calculadas por densitometria utilizando o *software* CS Analyzer 2.0. O experimento foi feito em triplicata.

4.1.5. Indução da expressão heteróloga de proteína

Células competentes BL21/DE3 foram transformadas com o plasmídeo contendo DNA recombinante das luciferases. Foi crescida uma pré-cultura de 5 mL à 37°C em meio LB líquido/Ampicilina 1 µg/mL com uma colônia de bactéria contendo o plasmídeo recombinante de interesse. A pré-cultura foi adicionada à 100 mL de meio LB líquido a 37°C até a absorbância de 0,4 (OD₆₀₀), e então foram induzidas com IPTG (0,4 mM) a 18°C sob agitação de 225 rpm durante a noite. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 2.500 g por 15 minutos a 4°C, e o *pellet* foi estocado a -80°C ou utilizado para extração da luciferase.

Para acompanhar a expressão da luciferase nas bactérias a atividade luminescente *in vivo* foi medida adicionando-se 10 µL de luciferina 10 mM pH 5,0 diretamente a 90 µL da cultura em tubo de luminômetro. A atividade luminescente foi medida em luminômetro AB2200 (ATTO, Tóquio) em cps (*counts* por segundo).

4.1.6. Extração e Purificação de proteína por cromatografia de afinidade

Extração. O *pellet*, contendo o material celular, foi ressuspensão em 1-10 mL de tampão de extração gelado A (Tampão Fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, 1 mM EDTA e coquetel anti-protease (ROCHE) caso da purificação da luciferase ou em tampão fosfato de sódio 0,10 M, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 10% Glicerol e coquetel anti-protease (ROCHE), quando a luciferase não pode ser purificada. A lise celular foi feita por sonicação com 4 pulsos de 10 s em ultrasonicador (Sonicator Ultrasonic Processor – Misonix). O lisado foi então centrifugado em 15.000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo a enzima solúvel foi utilizado nos ensaios de atividade luminescente e para purificação.

Purificação de proteína por cromatografia de afinidade com matriz de Níquel. Este método se baseia na afinidade da cauda de histidina fundida a proteínas recombinantes por íons de níquel (Ni-NTA) imobilizados em uma resina de agarose, portanto, o mesmo só pode ser utilizado com as luciferases clonadas no vetor pColdII que possui um gene que codifica a cauda. A resina de Ni-NTA-Agarose (Qiagen) foi equilibrada com tampão de extração (Tampão Fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM) e foi misturada com o extrato bruto por 45 minutos sob agitação

moderada a 4°C, para permitir a ligação da cauda de histidina da proteína ao níquel da resina. A resina complexada com luciferase foi então aplicada em uma mini coluna e lavada com 10 mL de tampão de lavagem (Tampão Fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM). A proteína recombinante foi eluída da resina com tampão de eluição (Tampão Fosfato de sódio 50 mM, pH 7, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) em alíquotas de 1 mL/cada. Cada alíquota foi analisada em ensaio *in vitro* da atividade luciferásica, e as frações com maior atividade foram dialisadas em tampão de diálise (Tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, glicerol 10%).

4.1.7. Eletroforese em gel de SDS (SDS – PAGE)

Para a análise da pureza e quantificação da proteína foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 10% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de acordo com o protocolo da Bio-Rad. As alíquotas contendo 30 µl das amostras de proteína foram diluídas em 30 µl de tampão de amostra (TRIS-HCl 0,5 M pH 6,8, 20% de glicerol, 40% SDS 10%, 10% 2-mercapetanol e 2% de bromofenol-blue), e foram desnaturadas a 95°C por 10 minutos sobre a chapa aquecedora. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a corrida de 100 volts por aproximadamente 1 hora em tampão de corrida (16,3% de TRIS, 78% de glicina e 5,4% de SDS pH 8,3). Para a coloração do gel foi utilizado o corante Comassie Blue por 30 minutos sob leve agitação, e para visualização das bandas o gel foi subsequentemente imerso em água também sob agitação para a descoloração. O gel foi envolvido por papel celofane para ser preservado.

4.1.8. Medidas de atividade da luciferase *in vitro*

Após a expressão, extração e purificação, a atividade luminescente foi medida na presença de ATP e luciferina. No ensaio, foram usados 85 µL de Tris-HCl 0,10 M pH 8,0; 5 µL do extrato bruto ou da luciferase purificada, 5 µL de luciferina 10 mM e 5 µL de ATP 40 mM e MgSO₄ 80 mM. A intensidade de luminescência foi medida em triplicata em luminômetro AB2200 (ATTO, Tóquio) em *counts* por segundo (cps) para três experimentos independentes.

4.1.9. Quantificação de proteínas totais

Para medir a concentração de proteínas totais foi utilizado o método de Bradford (1976), considerado um método rápido, sensível e com pouca ou nenhuma interferência. A técnica se baseia na ligação da proteína com o corante Comassie Blue, com absorvância máxima de 590 nm. Primeiramente foi montada uma curva padrão (**Fig. 7**) de concentração de proteínas utilizando o BSA (1mg/ml) para o cálculo do Fator. A concentração de proteínas totais foi então determinada pela expressão: [Proteína] = Fator x Absorvância da amostra purificada.

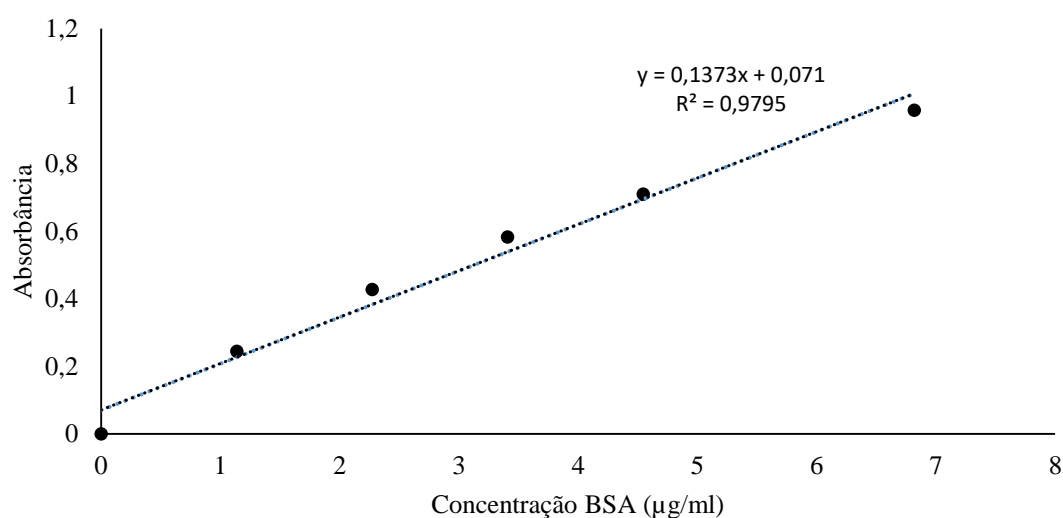


Figura 7. Curva Padrão de concentração de soroalbumina bovina (BSA).

4.1.10. Atividade específica

A atividade específica da luciferase foi calculada dividindo a atividade luminescente (em *counts* por segundo) pelas respectivas concentrações de proteína total em mg/mL.

4.1.11. Análise da termoestabilidade *in vitro* de luciferases recombinantes selvagens

Amostras das luciferases selvagens foram incubadas em diferentes temperaturas, 4°C, 22°C e 37°C. A atividade luciferásica residual das alíquotas foi medida no luminômetro em intervalos de 0, 1, 2, 3, 5, 12, 24 e 48 horas, conforme o item “4.1.8.

Medidas de atividade da luciferase *in vitro*". As medidas foram realizadas em triplicatas para três experimentos independentes. Foi gerado um gráfico de atividade bioluminescente residual (%) versus tempo (1-48 horas) com os desvios padrões.

4.1.12. Espectros de bioluminescência

Os espectros de bioluminescência das luciferases foram medidos em espectroluminômetro AB – 1850 Lumi FI Spectro Capture (ATTO, Tóquio) em triplicata. No ensaio foram usados 85 µL de Tris-HCl 0,10 M pH 8,0; 5 µL do extrato ou enzima purificada, 5 µL de luciferina 10 mM e 5 µL de ATP 40 mM e MgSO₄ 80 mM.

4.2. EFEITO DA TEMPERATURA NO ESPECTRO DE LUCIFERASES pH-SENSITIVAS

Após transformação, expressão e extração das luciferases analisadas (métodos “4.1.3, 4.1.5 e 4.1.6”), foram analisados os espectros em diferentes temperaturas das luciferases pH-sensitivas de *Macrolampis* sp2, *Amydetes vivianii*, *Cratomorphus distinctus* e da luciferase comercial de *Photinus pyralis*. Gerando curvas ratiométricas para comparação com suas respectivas termoestabilidades.

4.2.1. Efeito da temperatura nos espectros de bioluminescência de luciferases pH-sensitivas

O efeito da temperatura nos espectros de bioluminescência foi analisado para 4 luciferases pH-sensitivas. Os espectros foram medidos em espectrofluorímetro F-4500 (Hitachi, Japão) acoplado ao banho termostático TE-184 (Tecnal). Em cubeta de espectrofluorímetro foram misturados 450 µL de Tris-HCl 0,10 M pH 8,0 (incubado por mais ou menos 5 minutos para chegar na temperatura a ser analisada); 50 µL do extrato, 25 µL de luciferina 10 mM e 25 µL de ATP 40 mM e MgSO₄ 80 mM. O experimento foi feito em triplicata.

4.2.2. Análise racionométrica do efeito da temperatura na razão de intensidade de luz vermelha e verde

Para verificar a se a temperatura pode ser racionometricamente estimada usando a variação espectral em luciferases pH-sensitivas, as intensidades da bioluminescência na região do vermelho (I_{vermelho}) e verde (I_{verde}) foram utilizadas para calcular a razão de intensidades no espectro de bioluminescência (R) das luciferases pH – sensitivas a 616 e 593 nm para *Macrolampis* sp2; 596 e 537 nm para *Amydetes vivianii*; 614 e 554 nm para *Cratomorphus distinctus* e 616 e 558 nm para *Photinus pyralis*. Foi então plotada a razão $R = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$, com seus desvios padrões, versus temperaturas de 5-35°C, para estimar a sensibilidade destas luciferases a variação de temperatura.

4.2.3. Efeito da temperatura na fluorescência do triptofano na luciferase pH-sensitiva de *Macrolampis* sp2

A fluorescência do triptofano em proteínas foi medida em triplicata sendo utilizada para verificar se existe alguma mudança conformacional da luciferase pH-sensitiva de *Macrolampis* sp2 em diferentes temperaturas. Para a medida do branco foram misturados 100 µL de tampão de diálise (Tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, glicerol 10%) e 900 µL de tampão fosfato pré-filtrado 0,1 M pH 8 em cubeta de quartzo. Para a medida da amostra em diferentes temperaturas, foram misturados 100 µL de luciferase purificada para concentração final de 50 e 100 µg/ mL e 900 µL de tampão fosfato pré-filtrado 0,1 M pH 8 (VIVIANI *et al.*, 2014). As amostras foram excitadas a 280 nm em diferentes temperaturas (5-35°C), e o espectro de fluorescência varrido de 200 a 600 nm no espectrofluorímetro F-4500 (Hitachi, Japão) acoplado ao banho termostatizador TE-184 (Tecnal).

4.3. OBTENÇÃO DE MUTANTES TERMOESTÁVEIS DA LUCIFERASE EMISSORA DE LUZ VERMELHA DE *Phrixotrix hirtus*

Para aumentar a termoestabilidade da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix hirtus*, produzimos mutantes por mutagênese sítio-dirigida e analisamos a termoestabilidade *in vivo* e *in vitro* (Fig. 8).

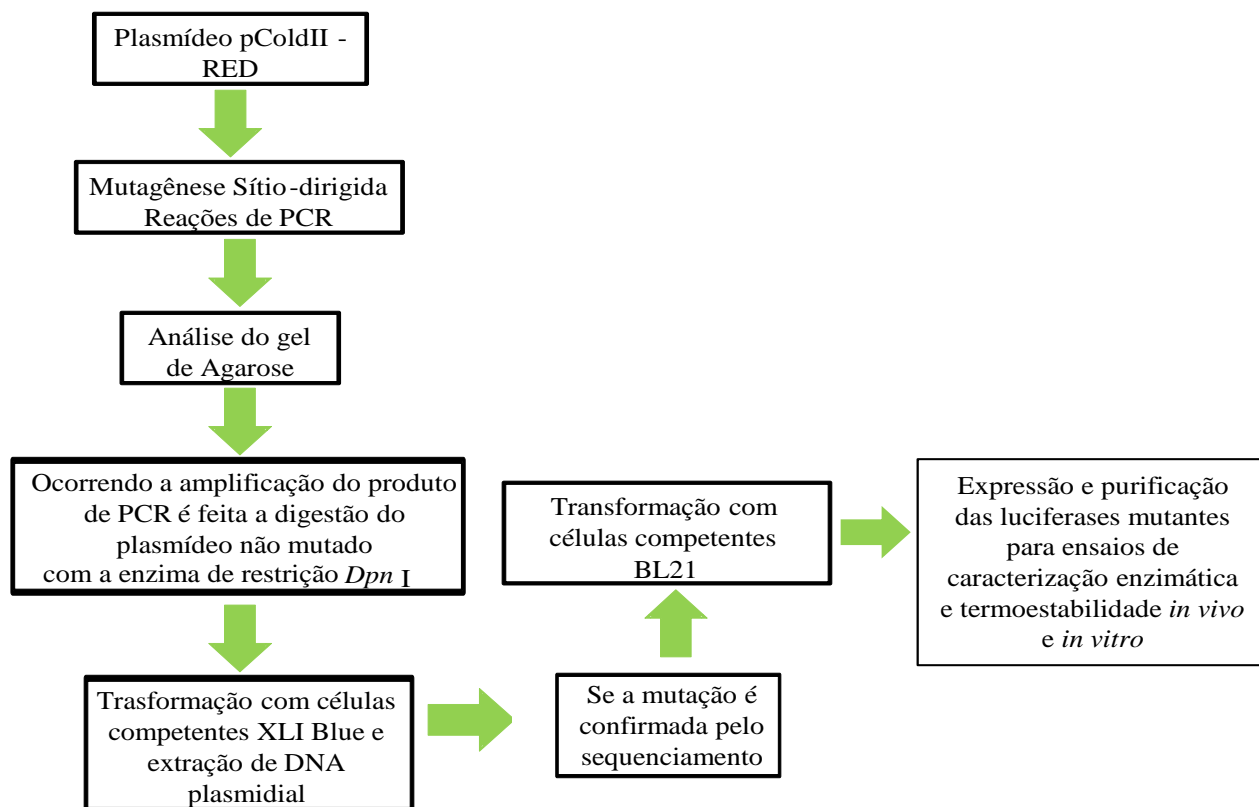


Figura 8. Delineamento da metodologia utilizada.

4.3.1 Mutagênese Sítio-Dirigida

A técnica se baseia em obter mutações pontuais no DNA, utilizando-se dois oligonucleotídeos complementares contendo as modificações desejadas na sequência original do cDNA da luciferase. Durante a PCR ocorre a incorporação da mutação. Por último o DNA parental não-mutado é digerido com a enzima de restrição *DpnI*, que reconhece regiões metiladas do plasmídeo original.

Todos os mutantes foram produzidos com o objetivo de aumento da termoestabilidade da luciferase selvagem do fengodídeo *P. hirtus*. A relação completa dos alvos de mutação e a literatura em que os mesmos foram baseados se encontram detalhados na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo de todos os mutantes sítio dirigidos obtidos e suas interações.

Mutantes	Literatura Baseada	Interações
N351E	Li <i>et al.</i> 2010; White <i>et al.</i> 1996; Tisi <i>et al.</i> , 2002; Kitayama <i>et al.</i> , 2003; Viviani <i>et al.</i> , 2005	Ponte salina com resíduo R353 (8-13 Å)
N351C	Li <i>et al.</i> 2010	Ponte dissulfeto com mutante T307C (8-11 Å)
R353E	Inserção na luciferase de <i>P. hirtus</i>	Ponte salina com o resíduo K356 ou K357 (8-13 Å)
S314T	S314 é substituído por uma alanina conservada nas luciferases de coleópteros	Substituímos um resíduo hidrofóbico por outro com a mesma característica, mas de cadeia maior
T307C		Ponte dissulfeto com mutante N351C (8-11 Å)
G312A	Furnham <i>et al.</i> , 2012; Malabanan <i>et al.</i> , 2010; Yu <i>et al.</i> 2015; Yu <i>et al.</i> 2017	Importância dos <i>loops</i> para aumento da rigidez da estrutura
G358P	Furnham <i>et al.</i> , 2012; Malabanan <i>et al.</i> , 2010; Yu <i>et al.</i> 2015; Yu <i>et al.</i> 2017	
E268C		Ponte dissulfeto com o mutante L297C (8-11 A°)
L297C		Ponte dissulfeto com o mutante E268C (8-11 A°)
K323C	Karimzadeh, Moradi & Hosseinkhani, 2012	Ponte dissulfeto com o mutante A293C (8-11 A°)
A293C	Karimzadeh, Moradi & Hosseinkhani, 2012	Ponte dissulfeto com o mutante K323C (8-11 A°)
A229R	Karimzadeh, Moradi & Hosseinkhani, 2012	Interações com T232 e R227
E341A		Região conservada, mudamos para aumentar a rigidez da estrutura.
T307C/N351C	Li <i>et al.</i> 2010, Karimzadeh, Moradi & Hosseinkhani, 2012	Ponte dissulfeto (8-11 A°)

As mutagêneses foram realizadas misturando 5,0 µl de tampão 10x, 1,0 µl de dNTP 2 mM, 1,0 µl de DNA plasmidial pColdII-RE (50 ng), 1,0 µl de cada primer (125 µg/µl) (**Tab. 2**), 0,25 µl de polimerase Phusion (ThermoFisher cod. F530-S) e água estéril ultrapura completando o volume de 25 µl.

A termociclagem utilizou 25 ciclos: (1) desnaturação do DNA (98° C por 30 segundos), (2) síntese do DNA (55° C por 1 minuto) e (3) extensão (72° C por 6 minutos e outro ciclo por 10 minutos a mesma temperatura).

Tabela 2. Sequência dos iniciadores (*primers*) utilizados para mutagênese sítio-dirigida na luciferase de *Phrixotrix hirtus*.

<i>Primer</i>	Sequência
REN351E_Foward	CTGAGCCCC <u>GAG</u> GATAGAGAGC
REN351E_Reverse	GCTCTCTATC <u>CTC</u> GGGGCTCAG
RER353E_Foward	CCCCAACGAT <u>GAA</u> GAGCTGAAGA
RER353E_Reverse	TCTTCAGCTC <u>TTC</u> ATCGTTGGGG
RES314T_Foward	CTGTGGCGGC <u>ACC</u> CTCTGGG
RES314T_Reverse	CCCAGAGG <u>GGT</u> GCCGCCACAG
REN351C_Foward	CCTGAGCCCC <u>TGC</u> GATAG
REN351C_Reverse	CTATC <u>GCA</u> GGGGCTCAGG
RET307C_Foward	GTCCAGCCTG <u>TGC</u> GAGATCGCCTG
RET307C_Reverse	CAGGCGATCTC <u>GCA</u> CAGGCTGGAC
REE268C_Foward	GTTTGAGGGC <u>TGCT</u> TCTTCTGAAG
REE268C_Reverse	CTTCAGGAAGA <u>GCA</u> GCCCTCAAAC
REL297C_Foward	AAGAGCCCT <u>TGCG</u> TGGATGAGTAC
REL297C_Reverse	GTA ^T CTCATCCAC <u>GCA</u> AGGGCTCTT
REG312A_Foward	GATCGCCTGT <u>GCC</u> GGCTCCCCTC
REG312A_Reverse	GAGGGGAGCC <u>GGC</u> ACAGGCGATC
REK323C_Foward	CATCGCCGACT <u>TGCG</u> TGGCCAAGA
REK323C_Reverse	TCTTGGCCAC <u>GCA</u> GTCGGCGATG
REG358P_Foward	GCTGAAGAAG <u>CCC</u> GCCATCGGCA
REG358P_Reverse	TGCCGATGGC <u>GGG</u> CTTCTTCAGC
REA293C_Foward	GGTGTATCTG <u>TGCA</u> AGAGCCCTCGG
REA293C_Reverse	CCGAGGGCTCTT <u>GCA</u> CAGATACACC
REA229R_Foward	CACCCGCATC <u>CGCC</u> CAGATACAT
REA229R_Reverse	ATGTATCTGG <u>GCG</u> GATGCGGGTG
REE341A_Foward	TGGCCTGACC <u>GCG</u> ACCTGTAGCG
REE341A_Reverse	CGCTACAGGT <u>CGCG</u> GGTCAGGCCA

4.3.2. Eletroforese em gel de agarose

A análise das ampliações foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE 1x (Tris-acetato 20 mM e EDTA 0,5 mM pH 8) mais corante de DNA Nancy – 520 (Sigma). Foram aplicados nos poços do gel 1,0-2,0 µl do padrão de peso molecular de DNA *Ladder* 1 Kb (Ludwig) e, alíquotas de 5 µl de DNA plasmidial mais 0,5 µl do corante para marcação de corrida (glicerina, azul bromofenol e xileno cianol). A corrida foi a 100 volts por 40 minutos e as amostras do gel foram reveladas por fluorescência em transluminador U.V. (ATTO).

4.3.3. Mini-prep de DNA plasmidial

Para os mutantes obtidos através de mutagênese sítio dirigida, quatro colônias aleatórias foram escolhidas para o cultivo e extração do DNA plasmidial utilizando o “Kit Miniprep” (GE *Healthcare*), segundo o protocolo do fornecedor.

As colônias contendo a luciferase mutante foram selecionadas e cultivadas *overnight* em 5 mL de meio de cultura LB/ampicilina (100 µg/mL). A cultura foi centrifugada a 12000g por 15 minutos para a remoção do meio de cultura. O *pellet* foi ressuspensão e as células lisadas em condições alcalinas por 5 minutos (soluções de ressuspensão e de lise, respectivamente) e então a solução foi centrifugada a 12000g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado cuidadosamente e transferido para uma mini-coluna dentro de um tubo coletor. Esta mini-coluna foi centrifugada a 12000g por 30 segundos e o lisado foi descartado. A mini-coluna foi então lavada com tampão de lavagem e após o DNA plasmidial foi eluído, com tampão de eluição. O DNA plasmidial foi armazenado a -20 °C para posterior sequenciamento.

4.3.4. Sequenciamento de DNA

Para a confirmação dos mutantes foi realizado o sequenciamento de acordo com o método de reações terminadas com dideoxi nucleotídeos (método de Sanger), utilizando *primers* desenvolvidos para a luciferase de *Phrixotrix*. O procedimento foi realizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal (FCAV) - Departamento de Tecnologia (UNESP - Jaboticabal) em um sequenciador ABI PRISM®

3100 Genetic Analyzer (Hitachi). Após o sequenciamento as sequências obtidas foram alinhadas, com auxílio dos programas BLAST e BioEdit, e comparadas com a sequência de nucleotídeos da luciferase selvagem de *P. hirtus*. Após foi possível dar seguimento a metodologia já exposta nos itens “4.1.3” a “4.1.7”, e “4.1.9” a “4.1.12”.

4.3.5. Determinação dos valores de K_M para a D-luciferina e ATP

Para determinação do K_M dos mutantes para a D-luciferina foram realizadas medições, em triplicata, das atividades luminescentes das enzimas em diferentes concentrações do substrato (concentração final de luciferina: 1 a 500 μ M), diluídas em água ultrapura. As atividades foram ensaiadas de acordo com o item “4.1.8. Medidas da atividade luciferásica *in vitro*”. Para a determinação do K_M dos mutantes para o ATP foi utilizado o mesmo ensaio, utilizando-se diferentes concentrações de ATP (concentração final de ATP: 0,01 a 3 mM), diluídas em solução de $MgSO_4$ 80mM. Os valores foram obtidos através de um gráfico de Lineweaver-Burk (ou duplo-recíproco), em que os valores de concentração de D-luciferina e ATP e das atividades luminescentes normalizadas (como medidas de velocidade inicial) foram invertidos e plotados no gráfico, encontrando o valor do K_M pela intersecção da reta com o eixo “x”, conforme Nelson e Cox (2011).

4.3.6. Análise da termoestabilidade *in vitro* dos mutantes da luciferase de *P. hirtus*

Amostras das luciferase selvagem de *P. hirtus* e mutantes foram incubadas a 37°C. A atividade luciferásica residual das alíquotas foram medidas no luminômetro em intervalos de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 120 minutos conforme o item “4.1.8. Medidas de atividade da luciferase *in vitro*”. As medidas foram realizadas em triplicatas para três experimentos independentes. Foi produzido um gráfico de atividade bioluminescente residual (%) versus tempo (0-120 minutos) com os desvios padrões.

4.4. ANÁLISES COM FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

A sequência de amino ácidos das luciferases foram alinhadas utilizando o ClustaW 1.8 (HIGGINS *et al.*, 2004).

Hidrofobicidade e outras propriedades físico químicas. Analisamos a hidrofobicidade com a escala de Kyte & Doolittle (KYTE & DOOLITTLE, 1982) que é baseada em um programa que determina a hidropatia média da sequência de amino ácidos resultando em uma visualização gráfica; e para complementar utilizamos imagens indicando as regiões mais hidrofóbicas das luciferases selvagens mais termoestáveis, geradas no *software* Chimera. Com o *Software* BioEdit pudemos analisar resíduos importantes para a termoestabilidade das luciferase como: a quantidade de resíduos hidrofóbicos, resíduos de Arg e ponto isoelétrico.

Predição de pontes dissulfeto. A predição de pontes dissulfeto para as luciferases recombinantes foram preditas com o *software* DiANNA (FERRÈ & CLOTE, 2005) e o pacote do *software* Scratch Protein Predictor, Dipro (CHENG *et al.*, 2005). Ambos os *softwares* trabalham de forma parecida, primeiro diferenciando as cisteínas em estado oxidado (covalentemente ligadas) das cisteínas reduzidas, somente estes monômeros que tem pelo menos duas cisteínas são submetidas ao segundo passo; em que baseado em algoritmos e na estrutura secundária das enzimas são estabelecidos *scores* para as possíveis pontes dissulfeto formadas.

Modelagem de luciferases. Usamos a estrutura tridimensional da luciferase do vagalume *Luciola cruciata* com o análogo DLSA (NAKATSU *et al.*, 2006) como *template*, e analisamos se existem resíduos de aminoácidos carregados dentro das regiões mais hidrofóbicas das luciferases do lampirídeo *A. vivianii*, do elaterídeo *P. minutilluminans*, e do fengodídeo *P. vivianii*. Para os modelos com a luciferase do fengodídeo *P. hirtus*, utilizamos o *template* da estrutura tridimensional da própria luciferase sem os seus substratos disponibilizada pelos autores Carrasco-López *et al.* (2018) e o *software* PyMOL, sendo possível calcular as distâncias entre os resíduos de aminoácidos de interesse e suas possíveis interações com outros resíduos.

5. RESULTADOS

5.1. COMPARAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE DAS LUCIFERASES RECOMBINANTES DE COLEÓPTEROS BIOLUMINESCENTES

Considerando o repertório de oito luciferases de coleópteros de diferentes famílias clonados em nosso laboratório, decidimos comparar suas termoestabilidades *in vivo* e *in vitro*. Primeiramente comparamos a termoestabilidade *in vivo* de colônias de bactérias contendo plasmídeos com as luciferases selvagens recombinantes e então comparamos a termoestabilidade *in vitro*. Dentre as luciferases analisadas existem enzimas que não puderam ser purificadas ainda por não estar em vetor de expressão com cauda de afinidade, desta maneira analisamos separadamente as enzimas purificáveis (*P. termitilluminans*, *P. hirtus*, *P. vivianii* e *Macrolampis* sp2) e então todas as enzimas em seus extratos brutos (*P. termitilluminans*, *P. hirtus*, *P. vivianii*, *Macrolampis* sp2, *C. distinctus*, *A. vivianii*, *F. bruchi* e *P. angustus*).

5.1.1. Termoestabilidade *in vivo*

Comparamos a termoestabilidade *in vivo* das enzimas recombinantes expressas em colônias de bactérias controle antes e depois da incubação a 50°C por 1 hora utilizando a câmera CCD. Os resultados demonstraram que as colônias expressando a luciferase dos lampirídeos *A. vivianii* e *C. distinctus*; dos elaterídeos *F. bruchi* e *P. angustus*, e dos fengodídeos *P. vivianii* e *P. hirtus* perderam mais de 90% da sua intensidade luminescente após incubação a 50 °C por 1 hora (**Fig 9 A, C, E-H**). Por outro lado, a luciferase do vagalume *Macrolampis* sp2 perdeu 60-80% da sua intensidade luminosa (**Fig. 9B**) e aquela do elaterídeo *P. termitilluminans* manteve a sua bioluminescência (**Fig. 9D**), demonstrando a melhor estabilidade dentro da célula bacteriana.

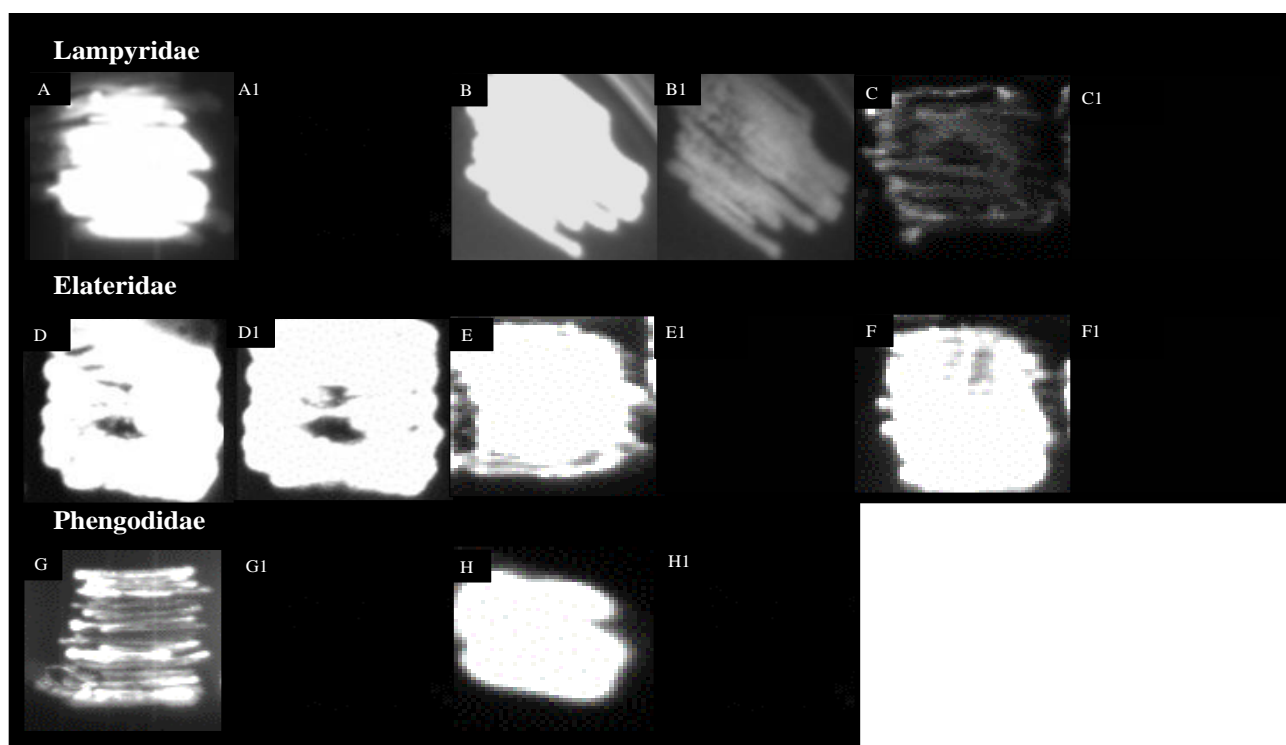


Figura 9. Termoestabilidade *in vivo* de bactérias expressando as luciferases recombinantes selvagens: (A e A1) *A. vivianii*, (B e B1) *Macrolampis* sp2, (C e C1) *C. distinctus*, (D e D1) *P. termiutilluminans*, (E e E1) *F. bruchi*, (F e F1) *P. angustus*, (G e G1) *P. hirtus*, (H e H1) *P. vivianii*.

*o número “1” representa incubação após 50°C.

5.1.2. Comparação da termoestabilidade das luciferases em extratos brutos

Algumas luciferases ainda não puderam ser purificadas, desta forma comparamos suas termoestabilidades em extratos brutos na presença de inibidor de proteases. A termoestabilidade a 37°C de proteínas em extratos brutos pode ser difícil de analisar por causa da presença de atividade de proteases, mesmo na presença de inibidores. Entretanto a termoestabilidade relativa das mesmas pode ser comparada utilizando-se as mesmas condições experimentais de extração e ensaio.

Luciferases de Lampyridae. A 4°C as luciferase do vagalume lampirídeo *Macrolampis* sp2 não apresentou mudanças em sua atividade enzimática, enquanto, *A. vivianii* e *C. distinctus* perderam respectivamente 11% e 21% das suas atividades enzimáticas (**Fig. 10A**) após 48 horas.

A 22°C, as luciferases de *Macrolampis* sp2, *A. vivianii* e *C. distinctus* perderam respectivamente 63%, 2% e 58% (**Fig. 10B**) após 48 horas. A 37°C as luciferases de

Macrolampis sp2, *A. vivianii* e *C. distinctus* perderam 99% da sua atividade enzimática já na primeira hora de experimento (**Fig. 10C**). Assim, dentre as luciferases recombinantes de lampirídeos analisadas, a luciferase de *A. vivianii* apresentou maior termoestabilidade a 37°C seguida da luciferase de *C. distinctus* e *Macrolampis* sp2.

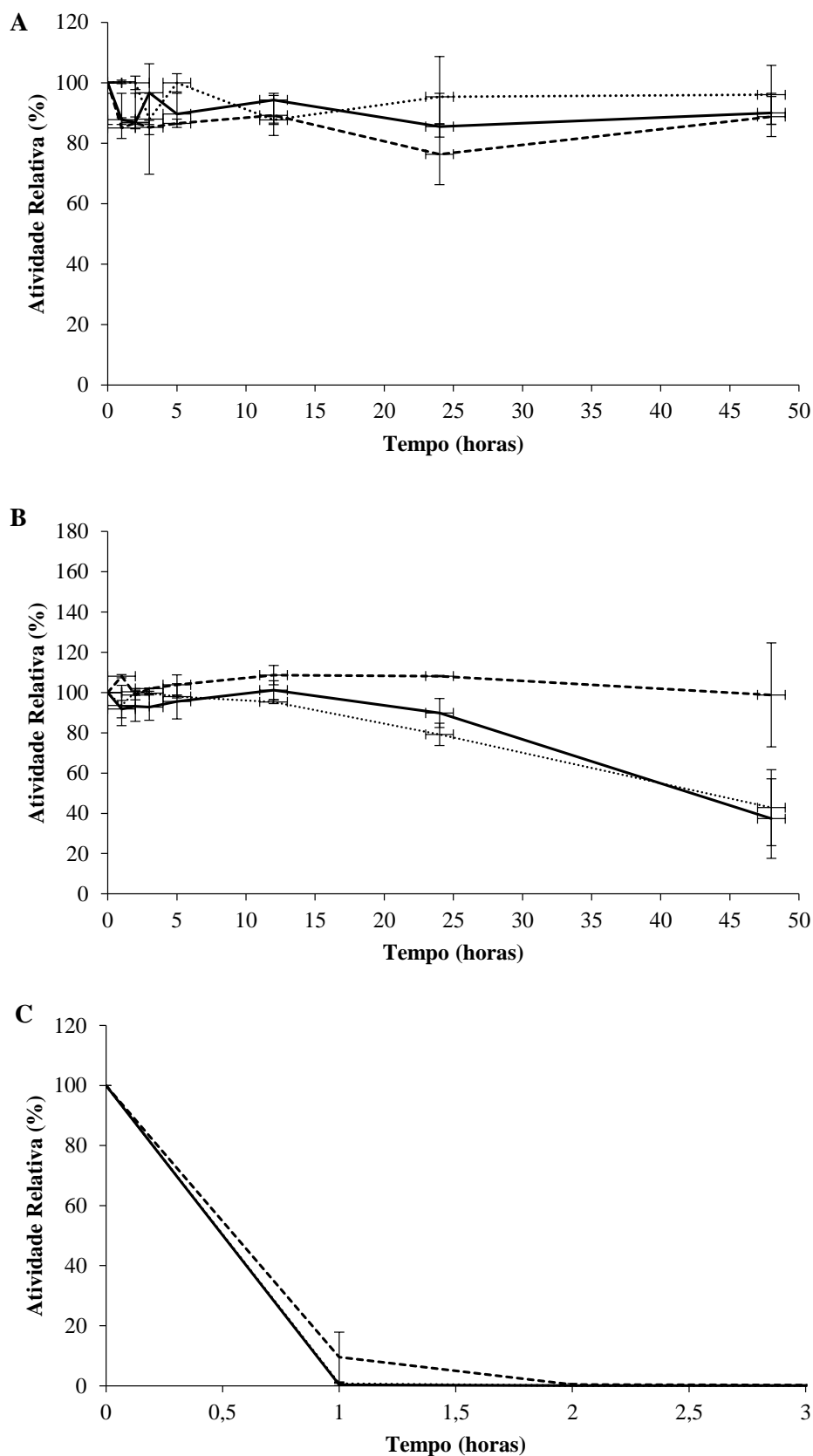


Figura 10. Termoestabilidade das luciferases de vagalumes lampirídeos em extratos brutos: (linha preta) *Macrolampis* sp2, (tracejado) *Amydetes vivianii* e (pontilhado) *Cratomorphus distinctus* após incubação durante 1-48 horas a (A) 4°C; (B) 22°C e (C) 37°C.

Luciferases de Elateridae. Para as luciferases de elaterídeos, as luciferases de *P. termitilluminans*, *F. bruchi* e *P. angustus* perderam respectivamente, 5%, 19% e 82% das suas atividades enzimáticas a 4 °C após 48 horas (**Fig. 11A**). A 22 °C, as luciferases de *P. termitilluminans*, *F. bruchi* e *P. angustus* perderam 0%, 99% e 99% (**Fig. 11B**) após 48 horas. A 37 °C, a luciferase de *P. termitilluminans* perdeu 4% após 5 horas, 58% após 12 horas e 99% após 24 horas; a luciferase de *F. bruchi* perdeu 97% já na primeira hora de experimento e aquela de *P. angustus* perdeu 87% após 1 hora, 92% após 2 horas e 97% após 3 horas (**Fig. 11C**).

Desta forma, entre as luciferases de elaterídeos, a luciferase de *P. termitilluminans* foi a mais termoestável seguida das luciferases de *P. angustus* e *F. bruchi*.

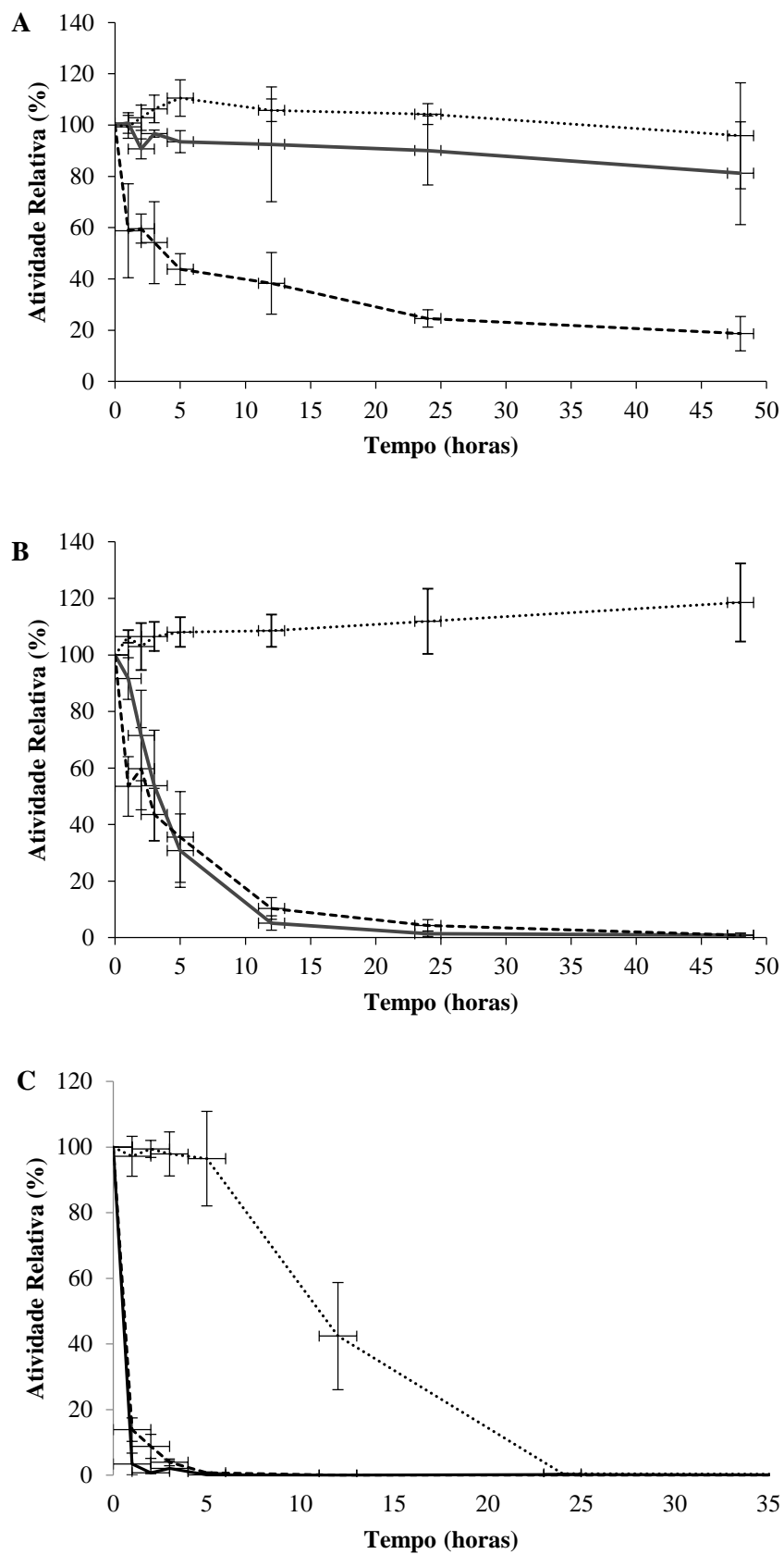


Figura 11. Termoestabilidade das luciferases de elaterídeos em extratos brutos: (linha preta) *Fulgeochlizus bruchi*, (tracejado) *Pyrophorus angustus* e (pontilhado) *Pyrearinus termitilluminans* luciferase após incubação durante 1-48 horas a (A) 4°C; (B) 22°C e (C) 37°C.

Luciferases de Phengodidae. Para as luciferases de fengodídeos a 4 °C, *P. hirtus* perdeu 66% da atividade enzimática após 48 horas, e *P. vivianii* perdeu 46% nas primeiras 12 horas, 86% após 24 horas e 99% após 48 horas (**Fig. 12A**). A 22 °C, *P. hirtus* perdeu 80% após 12 horas e 99% após 48 horas; *P. vivianii* perdeu 42% após 12 horas, e 99% após 48 horas (**Fig. 12B**). A 37 °C, *P. hirtus* perdeu 99% após 1 hora, enquanto *P. vivianii* perdeu 31% após 5 horas, 98% após 12 horas e 99% após 48 horas, sendo a mais termoestável (**Fig. 12C**). É importante salientar que a enzima de *P. vivianii* também sofre ativação gradual quando incubada em gelo, a temperatura ambiente e a 37°C (VIVIANI *et al.*, 2006), este processo pode explicar as maiores atividades remanescentes após as primeiras horas de incubação (**Fig. 12**).

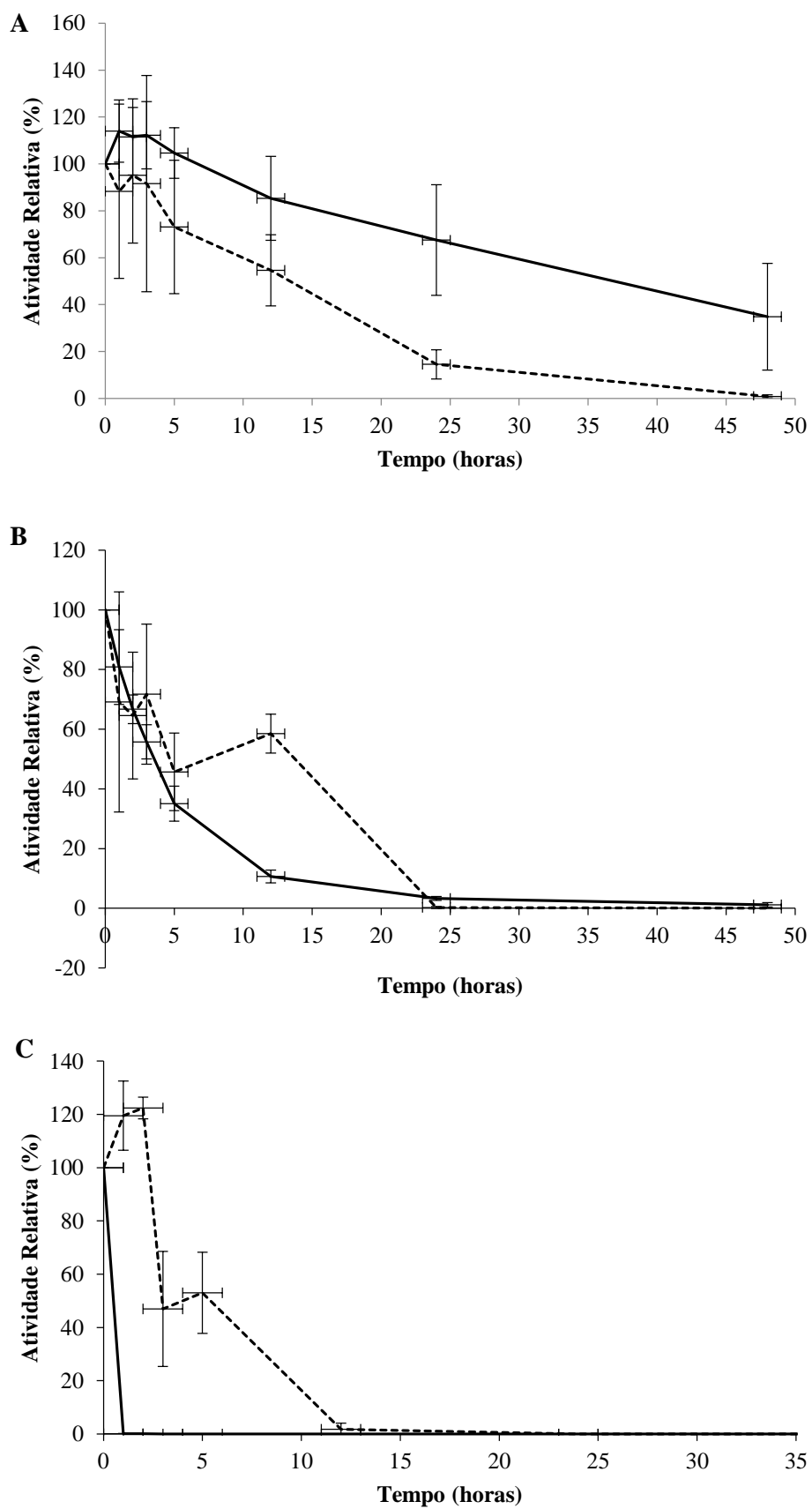


Figura 12. Termoestabilidade das luciferases de fengodídeos em extrato bruto: (linha preta) *Phrixotrix hirtus* e (tracejado) *Phrixotrix vivianii* após incubação durante 1-48 horas a (A) 4°C; (B) 22°C e (C) 37°C.

Analisando todas as luciferases recombinantes em extratos brutos, a luciferase do elaterídeo *P. termitilluminans* foi a mais termoestável, no entanto, quando comparamos as luciferases das três famílias separadamente verificamos que a luciferase do vagalume *A. vivianii* é a mais estável dentro de Lampyridae, a luciferase de *P. termitilluminans* é a mais termoestável dentro de Elateridae e *P. vivianii* é a mais estável dentro de Phengodidae.

5.1.3. Comparação da termoestabilidade de luciferases purificadas *in vitro*

Com exceção da luciferase comercial de *Photinus pyralis* (0,18 mg.mL⁻¹), usada para fins comparativos, as luciferases recombinantes selvagens de *P. hirtus* (0,54 mg.mL⁻¹), *P. termitilluminans* (0,51 mg.mL⁻¹), *P. vivianii* (0,53 mg.mL⁻¹) e *Macrolampis* sp2 (0,20 mg.mL⁻¹) foram purificadas para os testes *in vitro*.

A 4°C, as luciferases do elaterídeo *P.termitilluminans* e do lampirídeo *Macrolampis* sp2 não demonstraram mudanças em sua atividade enzimática após 48 horas de experimento, enquanto que as luciferases dos fengodídeos *P. hirtus* e *P. vivianii* perderam respectivamente, 7% e 19% de suas atividades enzimáticas (**Fig. 13A**).

A 22°C, as luciferases de *P. termitilluminans* e *Macrolampis* sp2, perderam respectivamente, 2% e mais de 90% das suas atividades enzimáticas após 48 horas, enquanto que *P. hirtus* e *P. vivianii* perderam respectivamente 47% e 53% após 48 horas (**Fig. 13B**).

A 37°C (**Fig. 13C**) a luciferase de *P. termitilluminans* perdeu cerca de 2% da sua atividade enzimática após 5 horas, 59% após 12 horas e 99% após 24 horas. Na mesma temperatura, a luciferase do vagalume *Macrolampis* sp2 perdeu 76% da sua atividade enzimática já na primeira hora de experimento, 83% após 2 horas e 90% após 3 horas. Comparativamente, a luciferase comercial do lampirídeo *P. pyralis* perdeu 30% da sua atividade enzimática durante a primeira hora de experimento, 58% após 2 horas, 93% após 3 horas e >99% após 5 horas de experimento. A luciferase de *P. hirtus* perdeu 90% de sua atividade enzimática na primeira hora enquanto *P. vivianii* perdeu 77% da atividade enzimática após 5 horas e 97% após 24 horas.

Nota-se que as luciferases do fengodídeo *P. vivianii* e do elaterídeo *P. termitilluminans* sofrem ativação gradual a 37°C, desta forma, a termoestabilidade foi medida após o termino do processo de ativação. Entre as luciferases analisadas em nossas condições experimentais, a luciferase emissora de luz verde do elaterídeo *P.*

termitilluminans foi a enzima mais termoestável seguida pela luciferase emissora de luz verde da larva trenzinho *P. vivianii*, das luciferases emissoras de luz verde-amarela dos vagalumes lampirídeos *P. pyralis*, *Macrolampis* sp2 e da luciferase emissora de luz vermelha do fengodídeo *P. hirtus*.

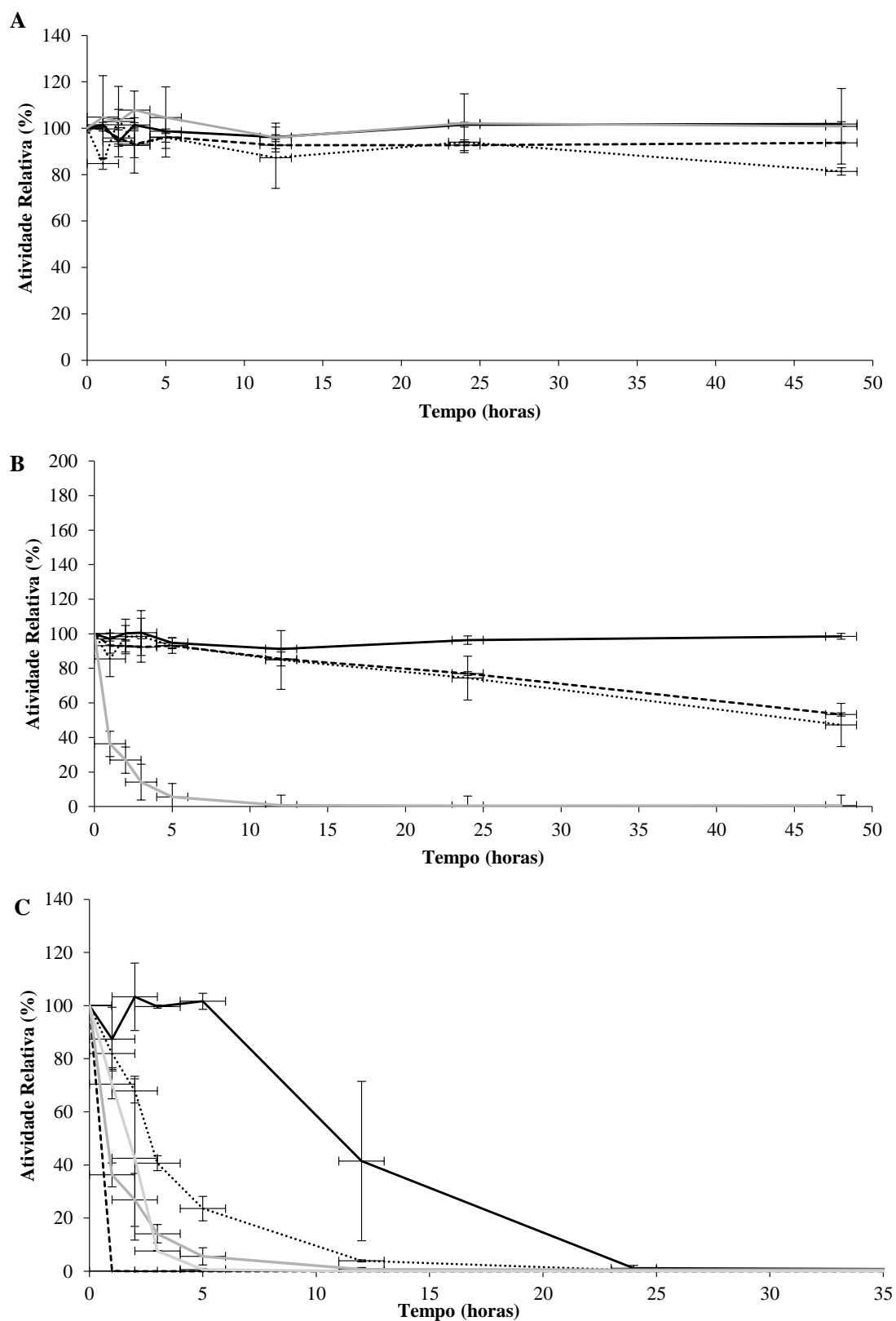


Figura 13. Termoestabilidade das luciferases purificadas: da família Lampyridae *Macrolampis* sp2 (linha cinza) e comercial de *P. pyralis* (linha cinza claro); da família Elateridae *Pyrearinus termitilluminans* (linha preta); e da família Phengodidae *Phrixothrix hirtus* (tracejado) e *Phrixothrix vivianii* (pontilhado) após incubação durante 1-48 horas a (A) 4°C; (B) 22°C e (C) 37°C.

Desta forma, verificamos que os resultados entre as luciferases em seus extratos brutos e purificadas corroboram, pois, as luciferases em extratos brutos do elaterídeo *P. termitilluminans*, do fengodídeo *P. vivianii*, também são mais termoestáveis do que as luciferases do lampirídeo *Macrolampis* sp2 e do fengodídeo *P. hirtus*.

5.1.4. Análise da estrutura primária das luciferases selvagens

As diferentes termoestabilidades das luciferases recombinantes selvagens podem ser explicadas com base nas suas estruturas primárias, que afetam o grau de empacotamento da proteína e a estabilização da estrutura tridimensional através de forças hidrofóbicas, pontes salinas e pontes dissulfeto. Desta forma, analisamos comparativamente características conferidas pelas estruturas primárias como hidrofobicidade, resíduos carregados e cisteínas.

Hidrofobicidade. Comparamos os gráficos de hidrofobicidade gerados com as sequências primárias das luciferases analisadas. As luciferases mais termoestáveis e com espectro de bioluminescência mais deslocado para o azul, do elaterídeo *P. termitilluminans*, do lampirídeo *A. vivianii* e do fengodídeo *P. vivianii*, apresentaram oito regiões hidrofóbicas principais que as diferenciaram das luciferases menos termoestáveis dentro de suas respectivas famílias, especialmente a região entre os resíduos 101-300 (**Fig. 14-15 e Tab. 3**).

Tabela 3. Oito regiões mais hidrofóbicas das luciferases mais termoestáveis.

Luciferase	Regiões dos resíduos mais hidrofóbicas
<i>A. vivianii</i>	10-40; 60-70; 130-140; 160-170; 190-210; 220-240; 270-290; 330-360
<i>P. vivianii</i>	40-50; 100-110; 180-210; 260-270; 290- 320; 360-370; 410-430; 490-600
<i>P. termitilluminans</i>	120-140; 160-170; 190-220; 260-280; 320-340; 400-410; 480-510; 520-560

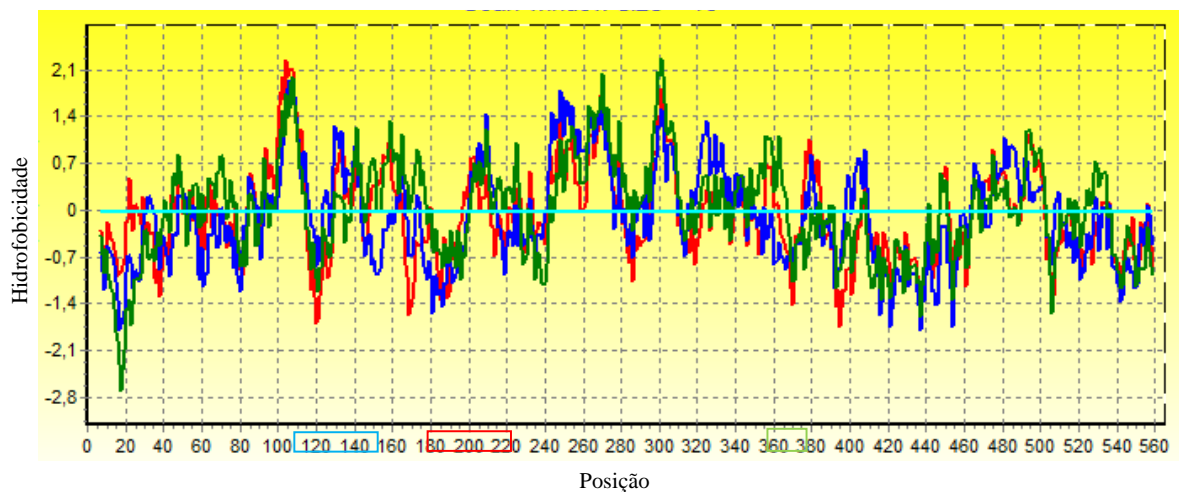


Figura 14. Plotes de hidrofobicidade de acordo como Kyte & Doolittle baseados nas estruturas primárias das luciferases, com destaques para os picos mais hidrofóbicos do lampirídeo *Amydetes vivianii* (vermelho), do elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans* (azul) e fendodídeo *Phrixotrix vivianii* (verde).

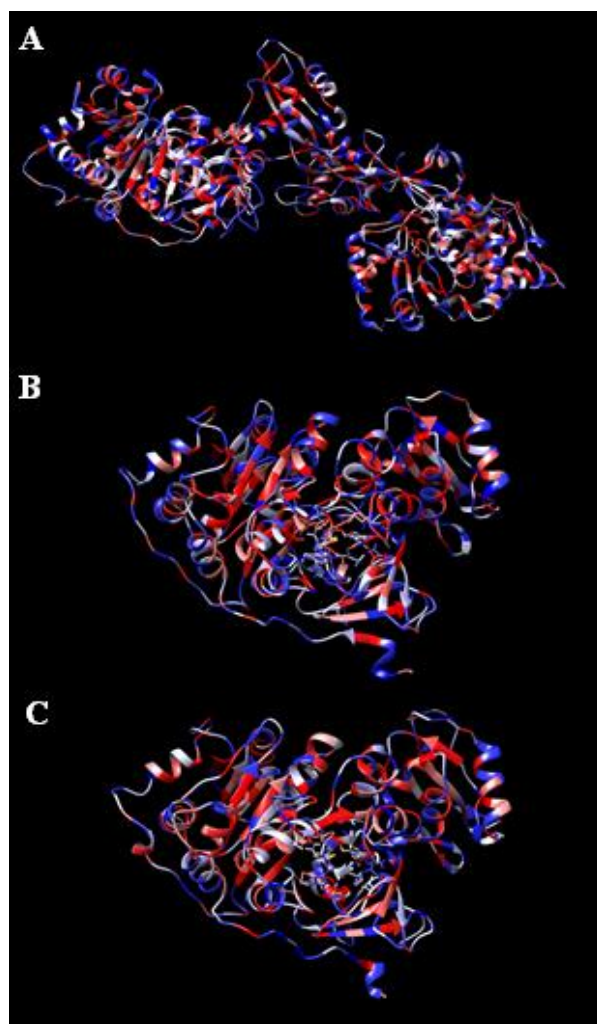


Figura 15. Imagens mostrando porções hidrofílicas (azul) e hidrofóbicas (vermelho) nas luciferases de: (A) do lampirídeo *Amydetes vivianii*, (B) do elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans* e (C) fendodídeo *Phrixotrix vivianii*.

Modelagem da estrutura tridimensional baseada em homologia. Usamos também, a estrutura 3D das luciferases recombinantes usando estrutura tridimensional da luciferase do vagalume *Luciola cruciata* com o análogo DLSA (NAKATSU *et al.*, 2006) como *template*, e analisamos se existem resíduos de aminoácidos carregados dentro das regiões mais hidrofóbicas, que poderiam estar envolvidos em pontes salinas estabilizadoras assim como verificado em estudos anteriores com outras luciferases (MORTASZAVI & HOSSEINKHANI, 2011; KARIMZADEH, MORADI & HOSSEINKHANI, 2012).

Para a luciferase de lampirídeo mais termoestável, *A. vivianii*, encontramos que na região hidrofóbica 190-210 (**Fig. 14**) os resíduos K206 e D209, estão a cerca de 8 angstroms de distância, podem interagir formando uma ponte salina estabilizadora na região (**Fig. 16**). Na região hidrofóbica 120-140 (**Fig. 14**) da luciferase de elaterídeo *P. termitilluminans*, qualquer um dos resíduos K121, R129, K130, que estão de 8-13 angstroms de distância do resíduo carregado negativamente, possuem o potencial para interagir com o resíduo E137 formando uma ponte salina estabilizadora na região (**Fig. 17**). Para a luciferase do fengodídeo *P. vivianii*, a região hidrofóbica 360-370 (**Fig. 14**) é muito pronunciada comparada com a região do fengodídeo *P. hirtus*, porém não há aminoácidos carregados que tenham potencial para a formação de pontes salinas.

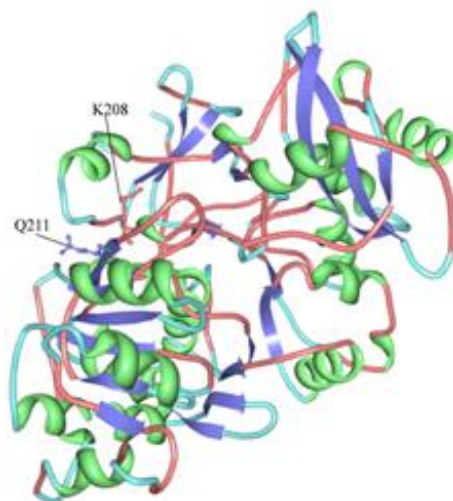


Figura 16. Estrutura da luciferase do vagalume *Luciola cruciata* mostrando os resíduos K208 e Q211 que correspondem aos resíduos K206 e D209 na luciferase de *A. vivianii*.

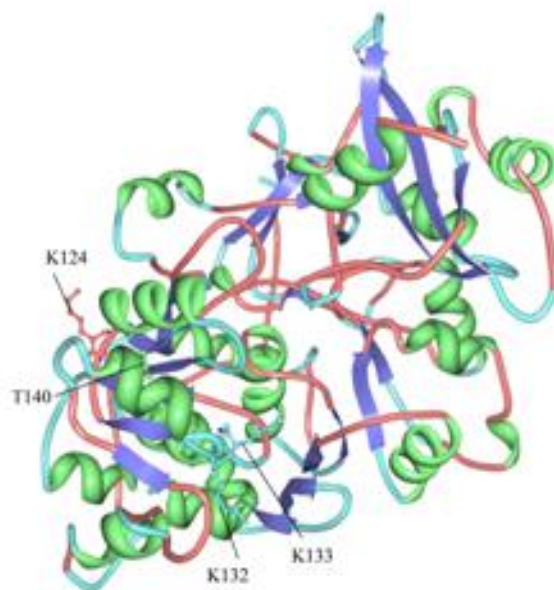


Figura 17. Estrutura da luciferase do vagalume *Luciola cruciata* mostrando os resíduos K124, K132, K133 e T140 que correspondem aos resíduos K121, R129, K130 e E137 da luciferase pH-insensível de *P. termitilluminans*.

Conteúdo de cisteínas e inferências de pontes dissulfeto. Analisamos também o conteúdo de cisteínas e inferimos a quantidade de pontes dissulfeto presentes nas luciferases. As luciferases analisadas apresentam quantidades de cisteínas que variam de 7 (presente no fengodídeo *P. vivianii*) a 13 (presente no elaterídeo *F. bruchi*) (**Tab. 4**).

Predizemos o conteúdo de pontes dissulfeto nas luciferases analisadas com os softwares DiANNA e Dipro (**Tab. 4**). O software DiANNA mostrou que luciferases pH-insensíveis de *A. vivianii*, a mais termoestável dentro da família Lampyridae, apresentou a maior potencial de formação de pontes dissulfeto seguida da luciferase de *C. distinctus*, a segunda mais termoestável e *Macrolampis* sp2, a luciferase de vagalume menos estável no entanto, utilizando o software Dipro, verificamos que as luciferases de lampirídeos *A. vivianii* e *Macrolampis* sp2, apresentaram a mesma predição de conteúdo de pontes dissulfeto. Para as luciferases pH-insensíveis ambos os softwares apresentaram predição de baixo conteúdo de pontes dissulfeto para as luciferases mais termoestáveis, do elaterídeo *P. termitilluminans* e do fengodídeo *P. vivianii*. Sendo assim, observamos que

os *softwares* não apresentaram o mesmo padrão, a melhor forma seria obter as estruturas tridimensionais destas luciferases para obter análises mais acuradas.

Por fim, analisamos o ponto isoelétrico das luciferases recombinantes selvagens (**Tab. 4**) e verificamos que para as luciferases pH-sensitivas existe um padrão de maior PI quanto mais termoestável for a luciferase, no entanto, não pudemos observar um padrão para as luciferases pH-insensitivas.

Tabela 4: Pontes dissulfeto preditas pelos *softwares* DiANNA e *Dipro*, e pontos isoelétricos das luciferases recombinantes selvagens.

Luciferase	Número total de cisteínas	Número de pontes dissulfeto preditas pelo <i>software</i> DiANNA	Número de pontes dissulfeto preditas pelo <i>software</i> <i>Dipro</i>	Ponto isoelétrico
Lampyridae				
<i>Macrolampis</i> sp2	9	2	3	6,04
<i>A. vivianii</i>	9	7	3	6,48
<i>C. distinctus</i>	8	3	2	5,90
Phengodidae				
<i>P. hirtus</i>	9	5	3	6,74
<i>P. vivianii</i>	7	3	2	6,37
Elateridae				
<i>F. bruchi</i>	13	10	4	6,81
<i>P. angustus</i>	8	8	4	8,38
<i>P. termitilluminans</i>	10	6	3	6,92

5.2. EFEITO DA TEMPERATURA NOS ESPECTROS DE BIOLUMINESCÊNCIA DE LUCIFERASES pH – SENSITIVAS

As luciferases pH-sensitivas tem seu espectro afetado por fatores como pH, altas concentrações de metais e temperatura (SELIGER & Mcelroy, 1964; VIVIANI & BECHARA, 1995). Anteriormente nosso grupo analisou o efeito do pH e da concentração de metais nos espectros de bioluminescência de luciferases pH-sensitivas (VIVIANI *et al.*, 2005, GABRIEL e VIVIANI, 2014). A partir da mudança espectral, o grupo utilizou a razão de intensidades de luz na região do verde e vermelho para quantificar ratiometricamente mudanças de pH intracelular em bactérias (GABRIEL & VIVIANI, 2014) e também a concentração de metais como Zinco, Níquel e Mercúrio (GABRIEL &

VIVIANI,2016). Entretanto, o efeito da temperatura nos espectros e sua potencial aplicabilidade ratiométrica ainda não foram investigados em diferentes luciferases pH-sensitivas.

Para melhor entendermos os efeitos da temperatura na estrutura, função e estabilidade das luciferases pH-sensitivas, resolvemos comparar o efeito da temperatura nos espectros de bioluminescência das luciferases pH-sensitivas que emitem diferentes cores de luz de nosso laboratório (*Macrolampis* sp2, *Photinus pyralis*, *Cratomorphus distinctus* e *Amydetes vivianii*) e investigar se existe uma relação entre a razão das intensidades nas regiões do vermelho e verde ($R = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$) do espectro de bioluminescência que possa ser utilizada para fins analíticos.

5.2.1. Efeito da temperatura nos espectros de bioluminescência

Das quatro luciferases de vagalumes usadas, o espectro de bioluminescência da luciferase de *Macrolampis* foi o mais sensível a temperatura pois apresentou um maior deslocamento para a região do vermelho conforme o aumento da temperatura, seguida das luciferases de *P. pyralis*, *C. distinctus* e finalmente aquela de *A. vivianii* (**Fig. 18**).

A luciferase de *A. vivianii* (538 nm), que possui o espectro menos deslocado para o vermelho em altas temperaturas, apresenta uma variação de apenas 6 nm no espectro de bioluminescência entre 5-35°C, mantendo a sua meia-banda (**Tab. 5**). A luciferase de *C. distinctus* (550 nm), possui uma variação de 7 nm entre 5-35°C e uma variação de meia-banda de 2,8 nm. Por fim as luciferases mais sensíveis a temperatura, *P. pyralis* (554 nm) e *Macrolampis* sp2 (569 nm), apresentaram variações no espectro de 8 e 22 nm respectivamente, durante a variação de temperatura e um aumento na meia-banda de cerca de 14 nm, indicando uma influência maior da temperatura nas suas sensibilidades espectrais (**Tab. 5**).

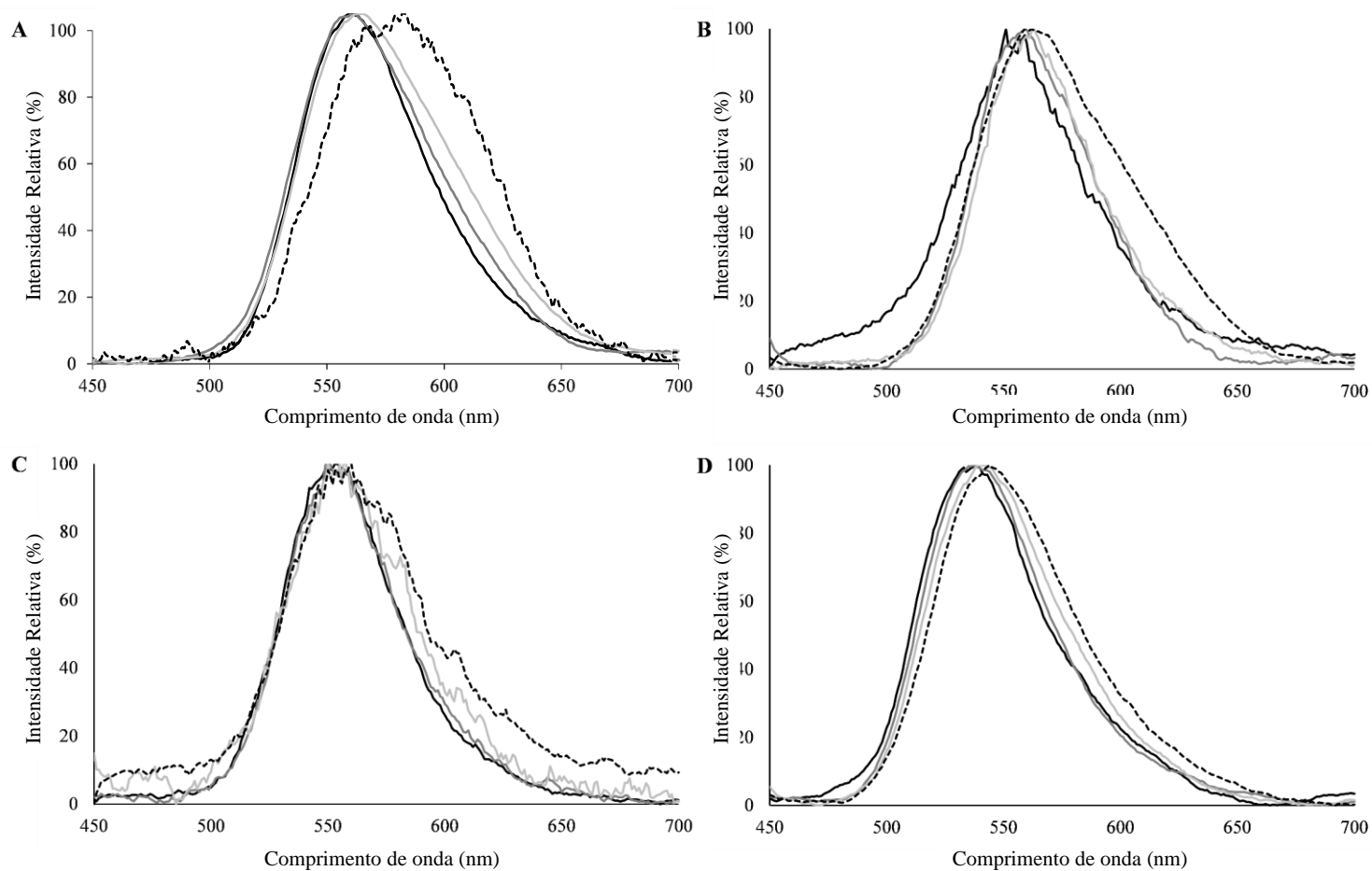


Figura 18. Efeito da temperatura nos espectros de bioluminescência das luciferases: (A) *Macrolampis* sp2, (B) *P. pyralis*, (C) *C. distinctus* e (D) *A. vivianii*; 5°C (preto), 15°C (cinza escuro), 25°C (cinza claro), 35°C (pontilhado).

Tabela 5. Espectro de bioluminescência, inclinação da reta e a diferentes meia-bandas entre 5-35°C, das luciferases pH- sensitivas.

	<i>Macrolampis</i> <i>sp2</i>		<i>Photinus</i> <i>pyralis</i>		<i>Cratomorphus</i> <i>distinctus</i>		<i>Amydetes</i> <i>vivianii</i>	
	λ_{\max} (nm)	Meia Banda (nm)	λ_{\max} (nm)	Meia Banda (nm)	λ_{\max} (nm)	Meia Banda (nm)	λ_{\max} (nm)	Meia Banda (nm)
Temperatura °C								
5	562	64,2	551,0	60,6	553	55,5	538	71,8
10	561	67,7	558,0	68,7	554	55,0	536	61,3
15	563	70,0	559,0	61,4	550	54,4	537	67,3
20	563	73,8	569,0	67,9	551	61,6	541	68,5
25	565	77,7	563,0	67,9	555	63,0	542	70,2
30	564	73,8	564,0	68,9	552	56,7	541	70,2
35	584	79,6	559,0	74,7	560	58,3	544	70,6
$\Delta\lambda$ (35°-5°C)	22,0	15,4	8,0	14,2	7,0	2,8	6,0	-1,2
Inclinação da reta		0,013		0,010		0,005		0,004

5.3.2. Análise ratiométrica do efeito da temperatura

Analizamos então se existia uma relação ratiométrica entre a razão ($R = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$) das intensidades de bioluminescência no verde e vermelho, sendo a $I_{\text{verm.616}}$ e I_{verde593} nm para *Macrolampis* sp2; $I_{\text{verm.596}}$ e I_{verde537} nm para *Amydetes vivianii*; $I_{\text{verm.614}}$ e I_{verde554} nm para *Cratomorphus distinctus* e $I_{\text{verm.616}}$ e I_{verde558} nm para *Photinus pyralis*; e a temperatura (**Fig. 19 e Tab. 5**), para finalidades de estimativa de temperatura baseado na mudança de espectro. De fato, foi encontrada uma relação linear entre a razão R e a temperatura, que mostra que as luciferases mais sensíveis ao pH são também as mais sensíveis a temperatura e apresentam uma curva mais inclinada, na seguinte ordem *Macrolampis* sp2 > *P. pyralis* > *C.distinctus* > *A. vivianii*.

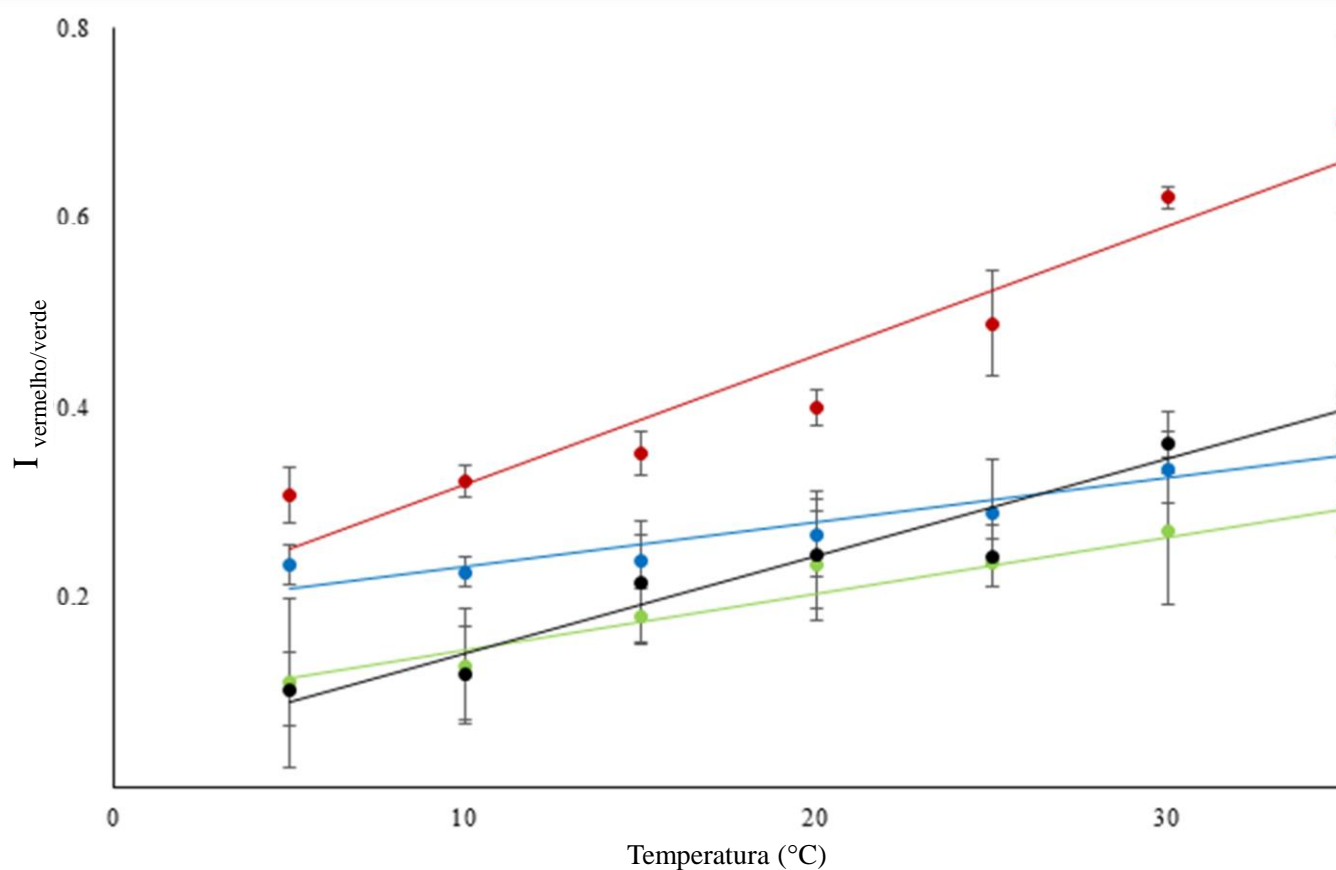


Figura 19. Curva Racionométrica do efeito da temperatura nas intensidades de bioluminescência verde e vermelha nas luciferases pH-sensitivas, *Macrolampis sp2* (vermelho), *P. pyralis* (preto), *C. distinctus* (verde) e *A. vivianii* (azul).

A existência de curvas racionométricas de efeito da temperatura na razão de intensidades na região verde e vermelho do espectro de bioluminescência abre a possibilidade de se utilizar a sensibilidade espectral para medir também temperatura.

5.2.2. Efeito da temperatura na fluorescência do triptofano como indicador de mudança conformacional

Foi também medido o espectro de fluorescência dos triptofanos na luciferase de *Macrolampis sp2* (W417 e W426), em diferentes temperaturas (5-35°C) como indicador de mudanças conformacionais. Entretanto não há mudança considerável nos espectros em diferentes temperaturas, indicando que não ocorre mudança conformacional apreciável entre 5-35°C.

5.3. SELEÇÃO DE MUTANTES TERMOESTÁVEIS DA LUCIFERASE EMISSORA DE LUZ VERMELHA DE *Phrixotrix hirtus*

Como foi visto, a luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix hirtus* sofre de baixa estabilidade em altas temperaturas. Para estabilizar esta luciferase realizamos então, mutagênese sítio-dirigida de alguns resíduos que poderiam afetar potencialmente a termoestabilidade.

5.3.1. Embasamento e estratégias das mutagêneses

Através da técnica de mutagênese sítio dirigida e embasado em estudos que utilizaram formação de pontes dissulfeto e pontes salinas, maior rigidez estrutural e hidrofobicidade para aumento da termoestabilidade das luciferases, produzimos os mutantes: N351C, N351E, R353E, S314T, T307C, N351C/T307C, E268C, L297C, G312A, K323C, G358P, A293C, A229R e E341A.

Baseado nos estudos de aumento de termoestabilidade de Li *et al.* (2010) com a luciferase do fengodídeo *P. hirtus* e os estudos de Karimzadeh, Moradi & Hosseinkhani (2012) e Xu *et al.* (2018) para aumento da estabilidade da luciferase do lampirídeo *P. pyralis* através da formação de pontes dissulfeto, produzimos os mutantes N351C, com o objetivo de formar uma possível ponte dissulfeto estabilizadora com o mutante T307C (**Fig. 20A**); K323C para interação com o mutante A293C (**Fig. 20B**); e por fim o mutante A268C para interação com o mutante L297C (**Fig. 20C**).

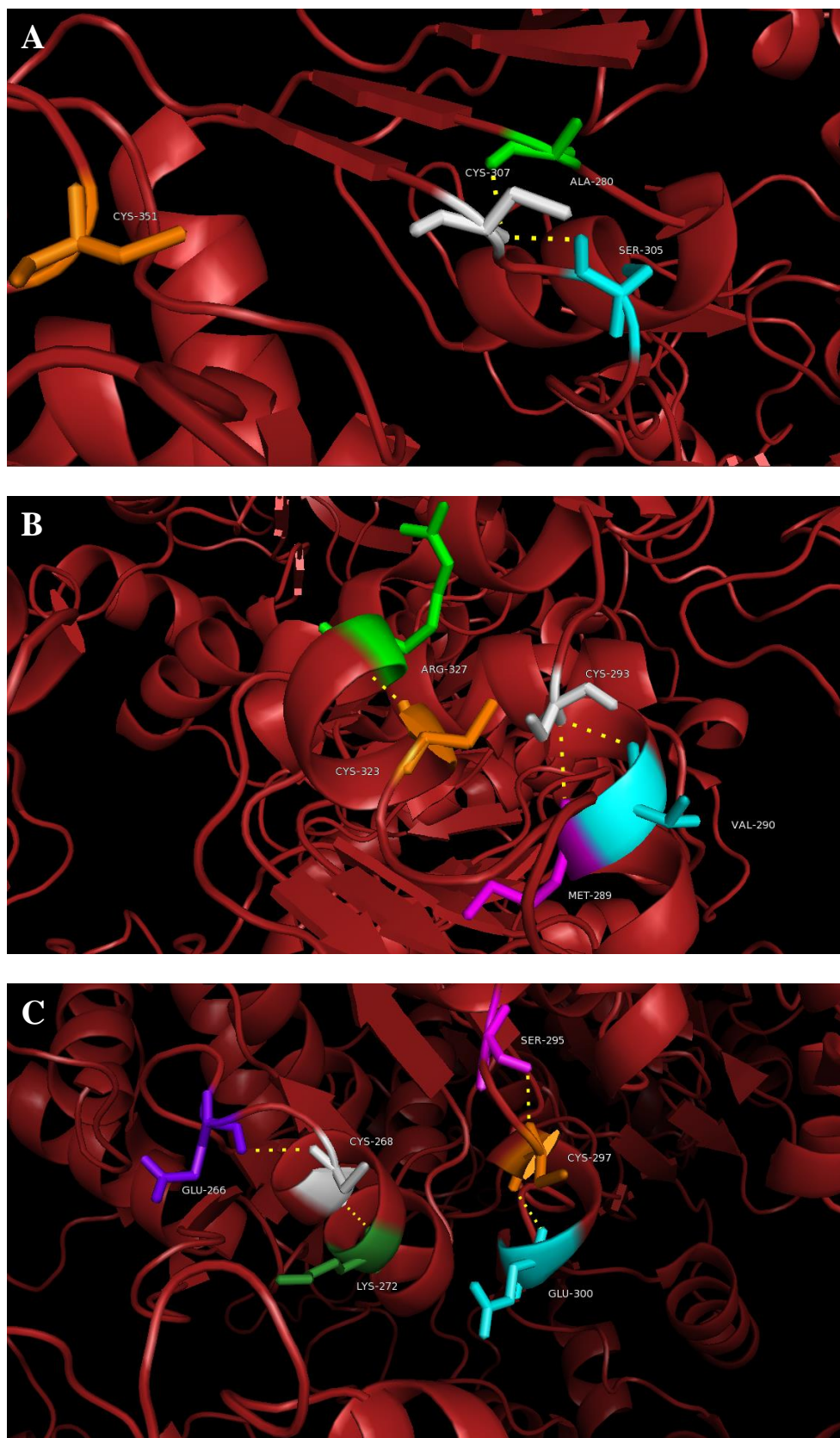


Figura 20. Estrutura dos mutantes duplos da luciferase de *P. hirtus* e suas interações: (A) N351C (laranja)/ T307C (branco); (B) K323C (laranja)/ A293C (branco); (C) E268C (branco)/ L297C (laranja).

White *et al.* (1996) obtiveram o mutante E354K na luciferase de *Photinus pyralis*, que mostrou uma maior termoestabilidade devido à mutação de um resíduo com carga negativa por uma carga positiva. De acordo com a estrutura tridimensional da luciferase de *P. pyralis*, E354 está localizado em um *loop* e interage através de uma ponte salina com o resíduo H310. Desta forma produzimos o segundo mutante nessa posição, o N351E, que substitui um resíduo hidrofílico por um resíduo negativamente carregado, para verificar se a enzima se tornaria mais termoestável com a possível formação de ponte salina com o resíduo R353, o único resíduo carregado positivamente próximo o suficiente (cerca de 8 ângstroms) para que ocorra esta interação (**Fig. 21A**). A introdução de pontes salinas também foi verificada nos estudos de Karimzadeh, *et al.* (2012), com o mutante I232R na luciferase de *P. pyralis*, desta forma, produzimos o mutante A229R (**Fig. 21B**) correspondente na luciferase de *P. hirtus* para enrijecer a região.

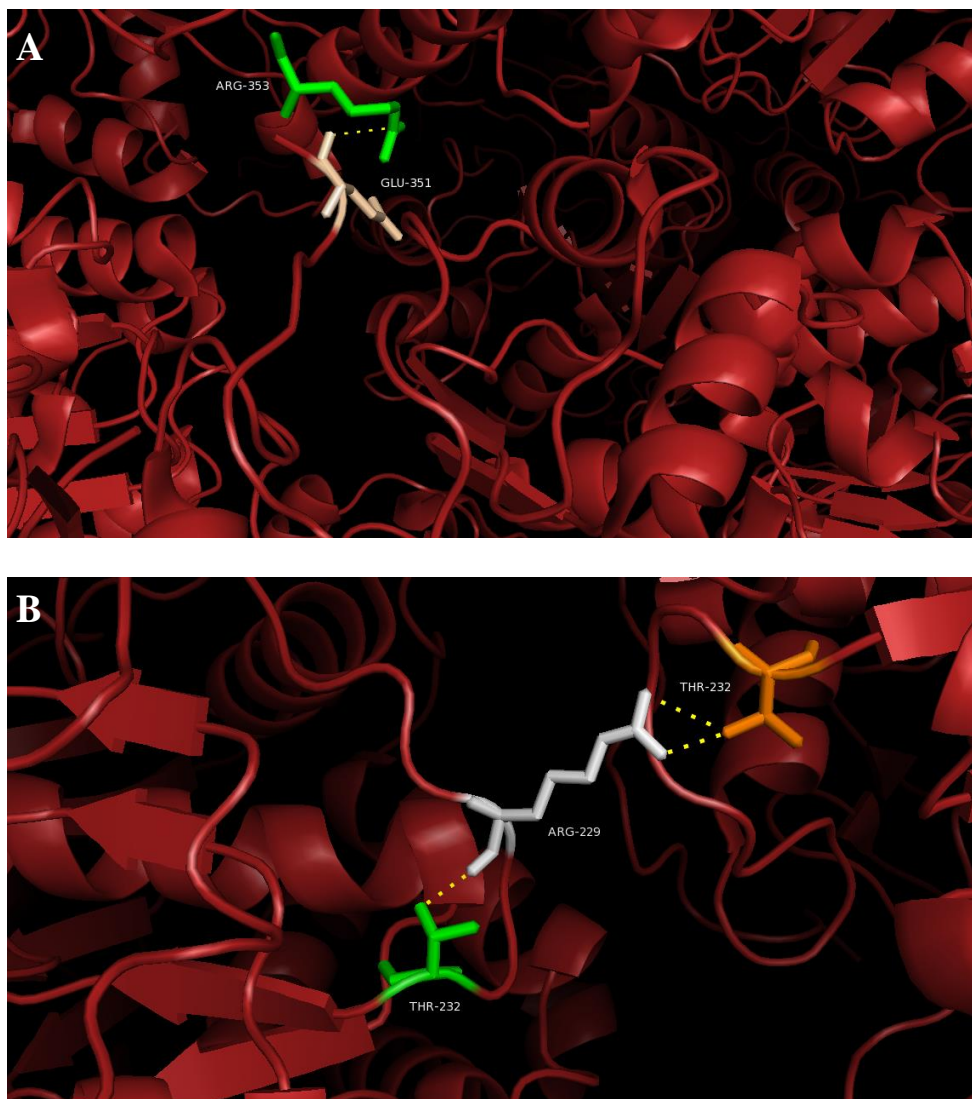


Figura 21. Estrutura dos mutantes da luciferase de *P. hirtus* e suas possíveis interações: (A) N351E (branco); (B) A229R (branco).

Existem resíduos que são encontrados exclusivamente na luciferase de *P. hirtus* (VIVIANI *et al.*, 2003), como a inserção R353, no loop 351-360, e o resíduo S314 que é substituído por uma alanina conservada nas luciferases. Desta forma produzimos os mutantes R353E que inverte a carga, com o objetivo de formar uma ponte salina estabilizadora com um dos resíduos próximos, K356 ou K357 (**Fig. 22A**); e S314T (**Fig. 22B**), que substituí um resíduo hidrofílico por outro com a mesma característica, mas de cadeia maior.

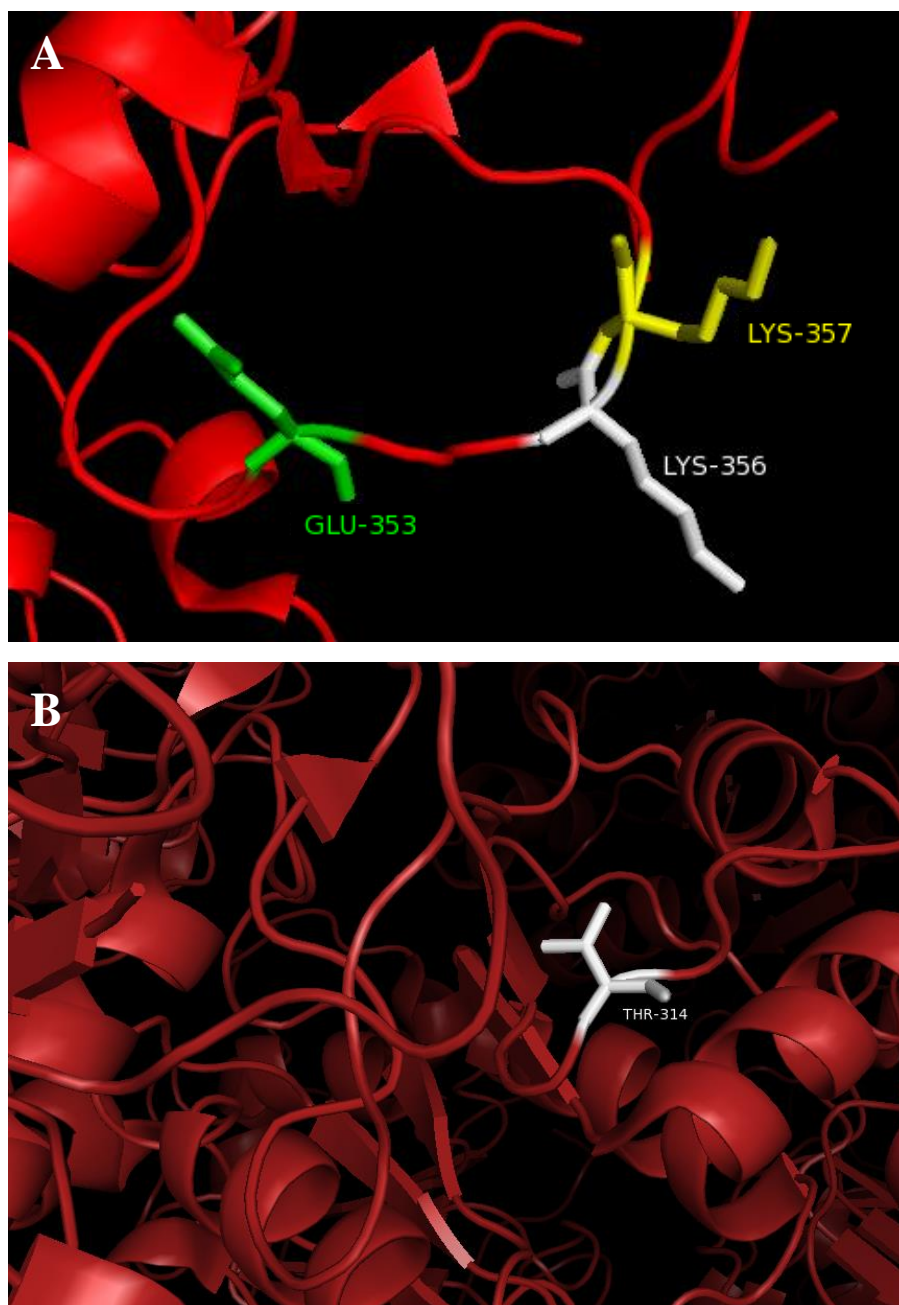


Figura 22. Estrutura dos mutantes da luciferase de *P. hirtus*: (A) R353E (verde) e os resíduos para a possível interação de ponte salina K356 (branco) e K357 (amarelo); (B) S314T.

Baseado em estudos que enrijecem os *loops* para aumento da estabilidade (MALABANAN *et al.*, 2010; FURNHAM *et al.*, 2012; DAMNJANOVIC *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2015, 2017) escolhemos os *loops* da luciferase selvagem de *P. hirtus* (regiões 223-235 e 351-364), que já mostraram ser importantes para a estabilidade e os espectros de bioluminescência (VIVIANI *et al.*, 2007, 2008) e escolhemos alguns resíduos para introduzir as mutações. Foram feitas as mutações G312A (Fig. 23A) e G358P (Fig. 23B),

na primeira foi escolhida a substituição por alanina que é um resíduo maior do que a glicina e poderia tornar a região mais rígida sem causar uma mudança conformacional muito brusca. Já no segundo mutante ocorreu a substituição de uma glicina por um resíduo maior, a prolina e, diferentemente da substituição em G312A, causaria uma mudança brusca.

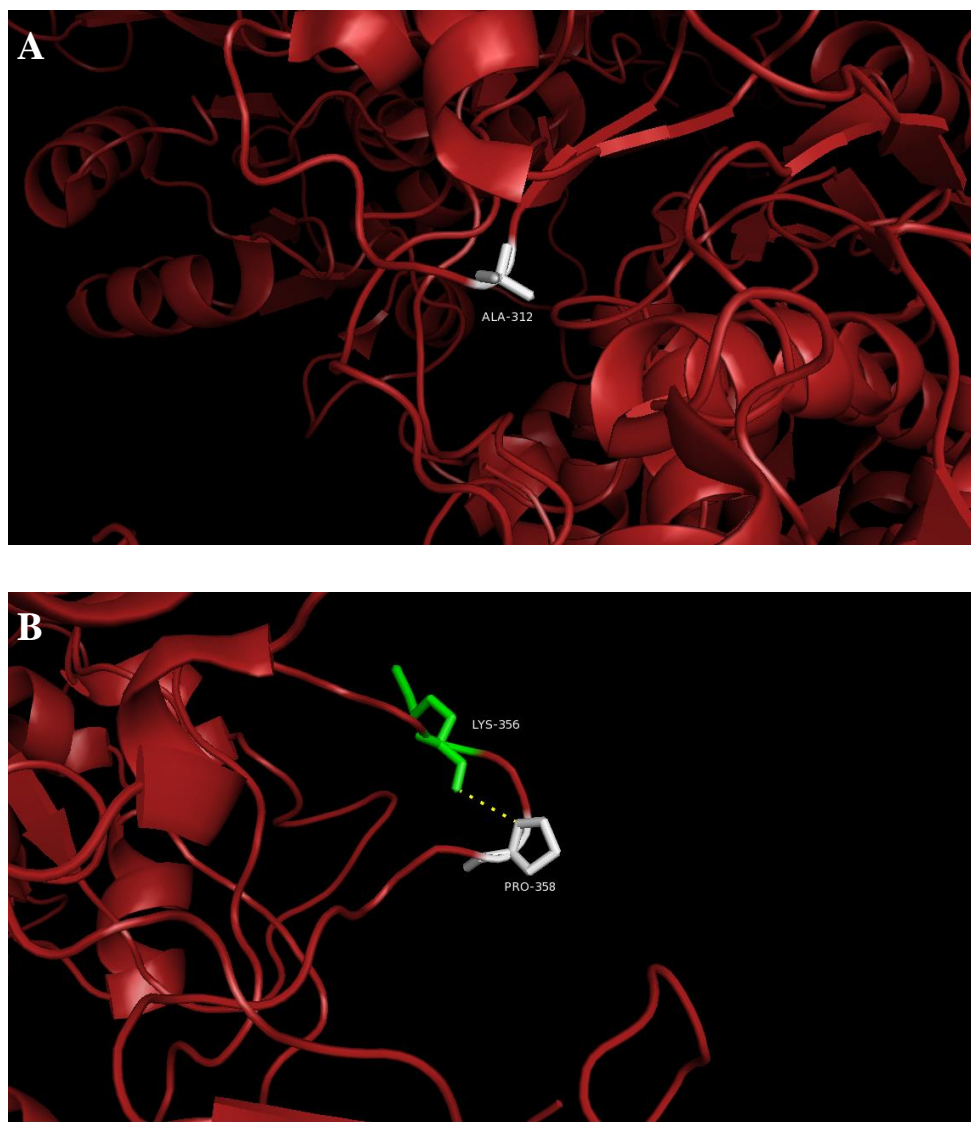


Figura 23. Estrutura dos mutantes da luciferase de *P. hirtus* e suas possíveis interações: (A) G312A (branco); (B) G358P (branco).

Por fim, o mutante E341A foi produzido pois, este aminoácido é conservado nas luciferases e está localizado em um *loop* externo (**Fig. 24**), sendo assim, o objetivo foi verificar se este resíduo possui importância na termoestabilidade da luciferase.

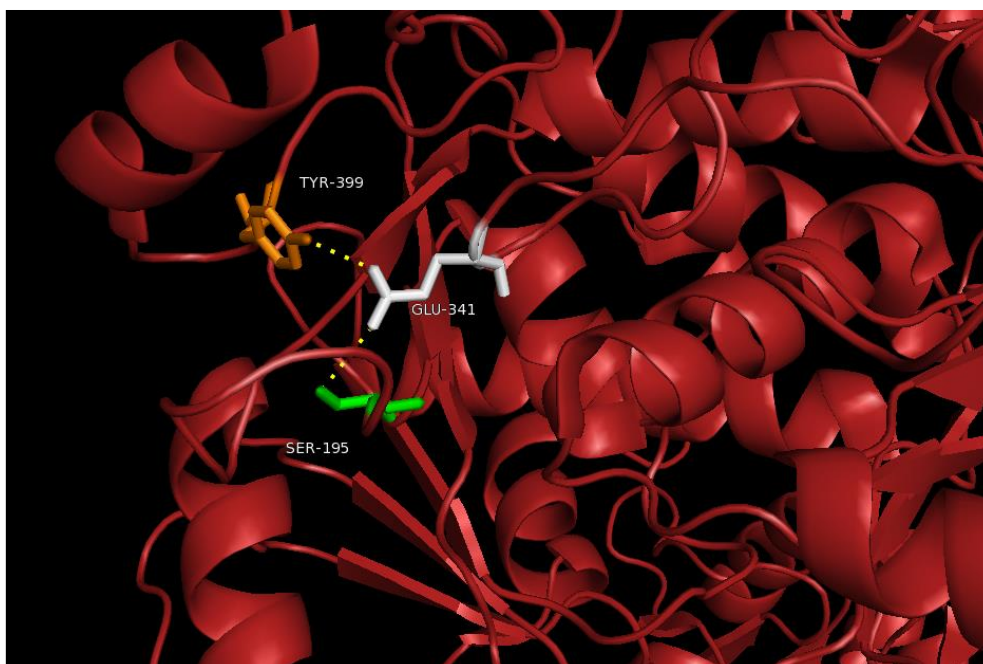


Figura 24. Estrutura do mutante da luciferase de *P. hirtus* E341A (branco) e suas possíveis interações.

5.3.2. Efeito das mutações na termoestabilidade

Os mutantes, E268C, L297C, K323C, G312A e G358P, A293C, A229R, E341A, T307C/N351C não apresentaram atividade luminescente *in vivo* e nem *in vitro* suficiente para serem caracterizados quanto a sua cinética e termoestabilidade. Alguns apresentaram problemas de expressão enquanto que outros produziram proteínas insolúveis. Apesar de termos utilizado várias estratégias para solubilizá-los, como o uso de diferentes detergentes, tampões e diferentes concentrações de DTT, não obtivemos sucesso na solubilização na forma ativa.

Para exemplificar, podemos verificar a insolubilidade do único mutante duplo obtido, T307C/N351C, representado por uma banda de ~60 KDa na análise em gel SDS 10% (**Fig. 25**). Em que foi proposto: I) o aumento da concentração de DTT na extração para que ocorresse a redução da possível ponte dissulfeto formada, resultando em uma atividade enzimática alta, já que os mutantes simples (N351C e T307C) apresentam uma atividade em torno de ~50 milhões cps, e II) extração na presença de luciferina, com o objetivo de impedir a formação de pontes de cisteína que podem estar diminuindo a atividade enzimática do duplo mutante, através da competição no sítio de ligação em que a luciferina se ligaria enquanto estivesse ocorrendo a extração.

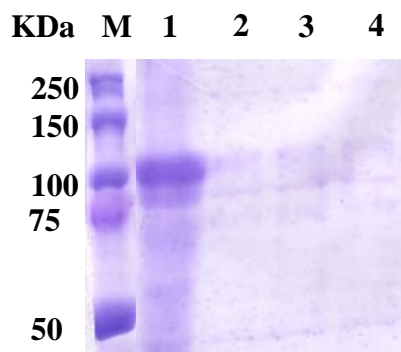


Figura 25. Gel de SDS 10 % com extratos brutos de células *E.coli* BL21 expressando o duplo mutante T307C/N351C da luciferase de *P. hirtus* extraídos de 3 formas diferentes: (M) marcador de massa molecular; (1) *pellet* (produzido após a extração e ressuspenso em água); (2) extrato bruto extraído com a concentração final de 8 mM de DTT; (3) extrato bruto extraído com a concentração final de 1 mM de luciferina; (4) extrato bruto extraído com concentrações final de 8 mM de DTT mais 1 mM de luciferina.

Entre todos os mutantes produzidos, somente os mutantes N351E e R353E apresentaram estabilidade a 37°C ligeiramente maior do que a enzima selvagem nos primeiros 30 minutos de experimento (Fig. 26).

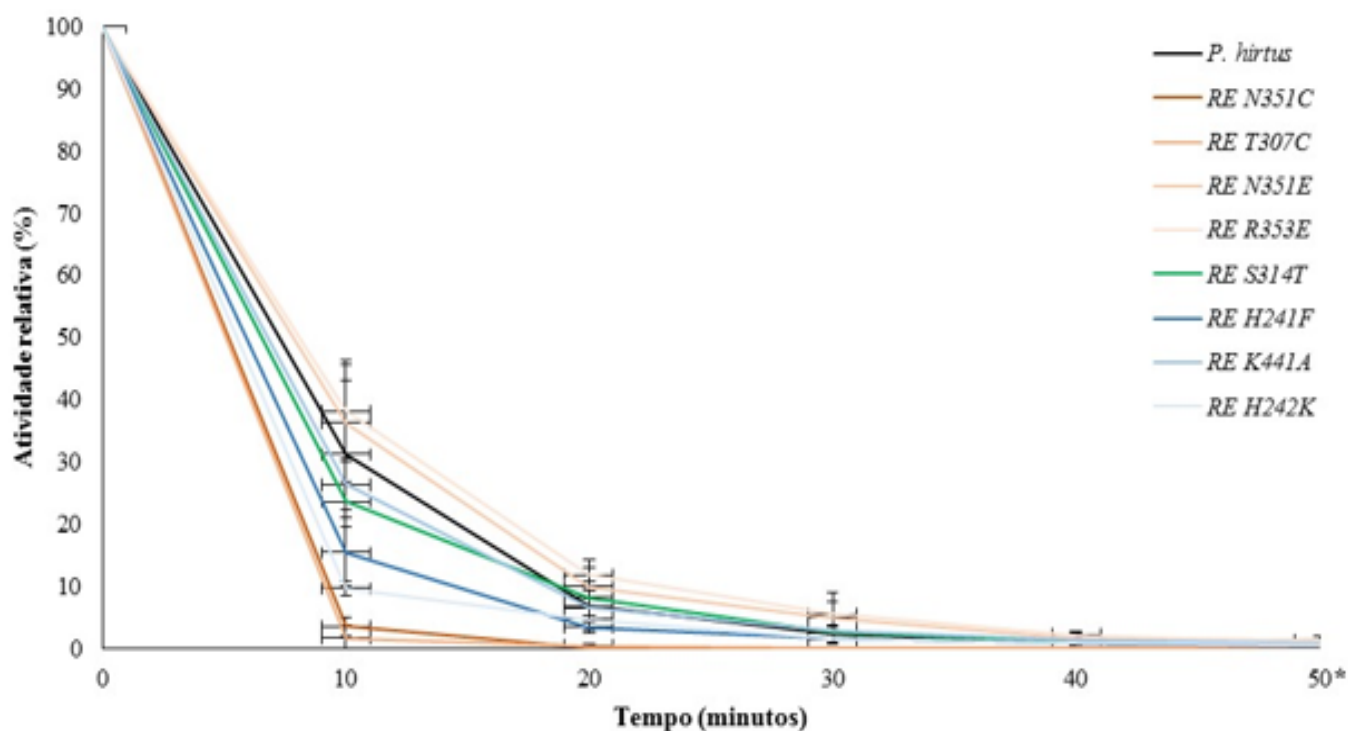


Figura 26. Termostabilidade da luciferase recombinante selvagem de *P. hirtus* e seus mutantes após incubação a 37°C durante 1-120 minutos.

5.3.3. Efeito das mutações nos espectros de bioluminescência

De forma similar a outras mutações realizadas pelo grupo com esta luciferase, os espectros dos mutantes N351C, T307C, R353E, N351E e S314T não mostraram mudanças significativas em seus espectros de bioluminescência comparado com a luciferase selvagem de *P. hirtus* (**Tab. 6**).

5.3.4. Efeito das mutações nos K_M para luciferina e ATP

O K_M da luciferina para a enzima selvagem de *P. hirtus* já é naturalmente um dos mais baixos dentre as luciferases estudadas (VIVIANI *et al.*, 1999b), porém os mutantes S314T, N351C e T307C aumentaram sua afinidade pelo substrato em até 14 vezes maior quando comparado com a enzima selvagem. Já os mutantes N351E, R353E, apresentaram uma afinidade 10 vezes menor. Os resultados indicam que todos os mutantes influenciam o sítio de ligação do substrato luciferina (**Tab. 6**).

Quanto ao K_M para o substrato ATP, verificamos que todos os mutantes, com exceção de R353E e S314T, apresentaram um aumento de até 62 vezes na afinidade com o substrato. O mutante N351C apresentou o menor valor de K_M para ATP (3,7 μ M) sendo de grande interesse para ser utilizado em ensaios bioanalíticos. Os mutantes N353E e S314T apresentaram uma menor afinidade pelo substrato. Estes resultados demonstram que todos os mutantes influenciam no sítio de ligação do ATP e mantiveram sua atividade enzimática relativamente alta, com cerca de 50 a 100 milhões cps (**Tab. 6**).

Tabela 6. Sumário do efeito das mutações na termoestabilidade, propriedades cinéticas e espectros de bioluminescência na luciferase selvagem de *P. hirtus*.

Luciferase	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Atividade específica (cps/mg)	$K_M(\mu\text{M})$ D-luciferina	$K_M(\mu\text{M})$ ATP	Meia-vida (min) à 37°C
<i>P. hirtus</i>	623	10×10^{10}	7	230	~9
RE N351C	621,9	$0,8 \times 10^{10}$	0,7	3,7	~6
RE T307C	626,6	$0,4 \times 10^{10}$	0,5	38	~6
RE N351E	622,5	$3,6 \times 10^{10}$	9,1	137	~10
RE R353E	622	$0,7 \times 10^{10}$	8,4	312	~10
RE S314T	622,5	$4,0 \times 10^{10}$	3	424	~8
RE H241F¹	620	$13,75 \times 10^{10}$	56	43	~7
RE K441A¹	616	$0,2 \times 10^{10}$	74	43	~8
RE H242K¹	628,9	$5,1 \times 10^{10}$	5,1	20	~7

¹ Estes resultados foram produzidos pela estudante de doutorado Vanessa Rezende Bevilaqua, cujo projeto envolve caracterização cinética de mutantes de maior afinidade e eficiência catalítica.

6. DISCUSSÃO

6.1. COMPARAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE DAS LUCIFERASES DE COLEÓPTEROS BIOLUMINESCENTES

6.1.1. Relação entre a termoestabilidade e o espectro de bioluminescência

Estudos anteriores demonstraram que existe uma tendência de que luciferases que emitem bioluminescência na região do verde apresentam uma maior estabilidade em relação as luciferases que emitem na região do vermelho (SHERF *et al.*, 1996). A forma aberta do sítio ativo determinada com os produtos AMP e oxiluciferina representa a estrutura da luciferase no estado depois da reação, enquanto que a conformação mais fechada com DLSA corresponde a forma ativa da enzima durante a catálise (NAKATSU *et al.*, 2006). Estudos de troca de hidrogênios e CCD mostraram que a luciferase muda a conformação do sítio ativo durante a catálise (DeLUCA, 1978). Nas luciferases emissoras de luz verde a oxiluciferina provavelmente está em um microambiente rígido e não polar, minimizando a perda de energia antes da emissão, enquanto que em luciferases emissoras de luz vermelha o sítio ativo é menos rígido e polar permitindo perda de energia vibracional do estado excitado (VIVIANI *et al.*, 2005; NAKATSU *et al.*, 2006).

Esta tendência é confirmada neste amplo estudo que pela primeira vez compara as luciferases das três famílias que emitem diferentes cores de luz. As luciferases do vagalume *A. vivianii* (Lampyridae) (λ_{\max} 538 nm), *P. termitilluminans* (Elateridae) (λ_{\max} 534 nm) e da larva trezinho *P. vivianii* (Phengodidae) (λ_{\max} 546 nm), são as mais termoestáveis e também apresentam espectros mais deslocados para a região do azul dentro de suas respectivas famílias. Além disso, verificamos que a luciferase de *P. termitilluminans*, que apresenta espectro mais deslocado para o azul dentre todas as luciferases analisadas, é também a mais termoestável.

Em vista destes resultados, podemos inferir que a termoestabilidade pode estar relacionada com a maior rigidez da enzima, especialmente do sítio ativo, indicando que quanto mais deslocado para o azul for o espectro das luciferases mais rígidas e termoestáveis serão estas enzimas. A exceção foi a luciferase emissora de luz laranja do eleterídeo *Pyrophorus angustus*, que se desviou um pouco desta tendência, apresentando uma termoestabilidade ligeiramente maior do que a luciferase emissora de luz verde do elaterídeo *Fulgeoschlizus bruchii*.

6.1.2. Relação entre a termoestabilidade e características cinéticas

Comparando os valores de K_M para luciferina e para o ATP das luciferases recombinantes selvagens (**Tab. 7**) nota-se que as luciferases pH-insensitivas emissoras de luz verde de *P. termitilluminans* e *P. vivianii*, que apresentam a maior termoestabilidade, apresentam também altos valores de K_M para ambos os substratos, luciferina e ATP, indicando menores afinidades por estes substratos (SILVA – NETO *et al.*, 2009). Estes resultados indicam que para luciferases pH-insensitivas emissoras de luz verde existe uma tendência de menores afinidades para os substratos. Notavelmente, estas luciferases também exibem cinéticas de decaimento da luminescência mais lentas, sugerindo que as menores afinidades pelos substratos, especialmente a luciferina, podem estar associadas também a uma menor afinidade pelo produto oxiluciferina, permitindo a saída mais fácil do produto do sítio-ativo e a manutenção de um *turnover* alto por mais tempo.

Em contraste, com as luciferase pH-insensitivas, as luciferases pH-sensitivas exibem um comportamento oposto. A luciferase de *A. vivianii* que tem o espectro mais deslocado para o azul possui valores de K_M mais baixos, indicando maiores afinidades pelos seus substratos. Entretanto nota-se que estas luciferases apresentam cinéticas de luminescência rápidas, tipo *flash*, nas quais as intensidades de luminescência crescem e decaem muito rapidamente. Nestes casos acredita-se que a alta afinidade pela luciferina também se reflita numa alta afinidade pelo produto oxiluciferina, que permanece no sítio-ativo, inibindo rapidamente a reação luminescente. Comportamento semelhante também é encontrado na luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix hirtus*, que apresenta alta afinidade pela luciferina e uma cinética de decaimento muito rápida.

Assim, embora exista uma relação clara entre termoestabilidade e espectros de bioluminescência, não existe uma relação evidente entre termoestabilidade e cinética de luminescência, ou entre cinética e espectros de bioluminescência em luciferases de besouros. A cinética da reação bioluminescente reflete as afinidades pelos substratos, especialmente a luciferina, quanto maior a afinidade, mais rápido o decaimento da reação luminescente.

Tabela 7. Propriedades cinéticas, termoestabilidade e espectro de bioluminescência das luciferases de besouros. Referências: ver página 32.

Luciferase	K _M ATP (μM)	K _M luciferina (μM)	Meia-vida (h) à 37°C	λ _{máx} (nm)
Lampyridae				
<i>Macrolampis</i> sp2	83	20	~ 1,5	568
<i>A. vivianii</i>	11	5	~ 10	538
<i>C. distinctus</i>	110	15	~ 1,5	550
<i>P. pyralis</i>	52	5	~ 1	554
Phengodidae				
<i>P. hirtus</i>	240	20	~ 0,16	620
<i>P. vivianii</i>	330	150	~ 2	546
Elateridae				
<i>F. bruchi</i>	140	12	~ 0,6	543
<i>P. angustus</i>	160	17	~ 0,67	584
<i>P. termitilluminans</i>	370	80	~ 11	534

6.1.3. Relações entre termoestabilidade e estrutura

Segundo Pace *et al.* (2011), as interações hidrofóbicas contribuem menos para a estabilidade de proteínas pequenas como as VHP (subdomínio *villin headpiece*) que possuem 36 resíduos, do que para proteínas grandes como a VlsE (*Borrelia burgdorferi*) com 341 resíduos. As luciferases de vagalumes possuem 60 kDa, são proteínas relativamente grandes com 540 a 550 resíduos de aminoácidos (UGAROVA & BROVKO, 2002), sendo que os conteúdos de resíduos hidrofóbicos apresentam uma porcentagem similar em todas as luciferases recombinantes analisadas, em torno de 40%. No entanto, apesar da proporção de resíduos hidrofóbicos similar, gráficos de hidrofobicidade podem revelar regiões importantes na estabilização destas enzimas, já que resíduos hidrofóbicos internos podem estabilizar as proteínas enquanto que a presença de resíduos hidrofóbicos na superfície pode gerar superfícies de agregação da proteína resultando em precipitação.

Os gráficos de hidrofobicidade gerados com as sequências primárias das luciferases analisadas demonstraram diferenças entre as luciferases mais termoestáveis e as menos termoestáveis principalmente na região do N-terminal, assim como demonstrado no estudo de Sung & Kang (1998) que verificou a importância de todo N-terminal para a termoestabilidade da luciferase do vagalume *Photinus pyralis* através de uma série de mutações sítio-dirigidas e deleções.

6.2. EFEITO DA TEMPERATURA NOS ESPECTROS DE LUCIFERASES PH-SENSITIVAS

Todas as luciferases pH-sensitivas mostraram espectros de bioluminescência sensíveis a temperatura, mas em diferentes graus. As luciferases com espectro mais deslocado para o azul foram as mais sensíveis e seguem a seguinte ordem: *A. vivianii* (538 nm) > *C. distinctus* (550 nm) > *P. pyralis* (554 nm) > *Macrolampis* sp2 (568 nm). Estes resultados mostram que existe uma relação entre termoestabilidade, espectros de bioluminescência e sensibilidade espectral à temperatura nas luciferases pH-sensitivas.

Estes resultados indicam que luciferases que emitem bioluminescência na região do verde-azul são mais estáveis e rígidas em relação às luciferases que emitem na região do vermelho (SHERF *et al.*, 1996, OLIVEIRA & VIVIANI, 2017). A conformação do sítio ativo muda conforme ocorre a reação de catálise. Nas luciferases emissoras de luz verde, a oxiluciferina provavelmente está em um microambiente mais rígido e menos polar, minimizando a perda de energia vibracional antes da emissão, enquanto que na emissão de luz vermelha o sítio ativo é menos rígido e mais polar, permitindo perda de parte da energia do estado excitado, resultando em uma emissão no vermelho (VIVIANI *et al.*, 2005; 2008; 2014; NAKATSU *et al.*, 2006).

A luciferase de *A. vivianii* que possui o espectro de bioluminescência mais deslocado para o azul dentre os lampirídeos (538 nm), é a mais termoestável desta família (OLIVEIRA & VIVIANI, 2017). Verificamos que a curva ratiométrica do efeito da temperatura na razão de intensidades de luz verde e vermelha desta enzima é menos inclinada (com o valor de 0,004), corroborando que a temperatura tem uma menor influência no deslocamento do espectro para a região do vermelho e, conseqüentemente, na estabilidade da enzima.

A luciferase de *C. distinctus*, a segunda mais termoestável, tem espectro com pico em 550 nm, possui uma inclinação intermediária (inclinação da reta 0,005); enquanto que as luciferases de *P. pyralis* e *Macrolampis* sp2, que são as menos termoestáveis, com espectro mais largo e pico em 554 e 568 nm respectivamente, possuem curvas mais inclinadas (inclinações da reta 0,010 e 0,013 respectivamente), indicando uma maior influência da temperatura no espectro e na estabilidade.

Estes estudos também mostraram pela primeira vez que é possível usar estas luciferases pH-sensitivas em análises ratiométricas de temperatura intracelular. Entretanto, a nosso ver, a maior aplicabilidade da análise ratiométrica da temperatura

seria para compensar o efeito da temperatura em análises raciométricas de pH intracelular ou concentração de metais em células e tecidos em altas temperaturas, especialmente em células de mamíferos que estão ativas próximo a 36-37°C.

6.3. EFEITO DE MUTAÇÕES NA TERMOESTABILIDADE DA LUCIFERASE DE *P. hirtus*

A luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix* tem se mostrado refratária a estabilização por mutagênese sítio-dirigida sendo que poucas mutações afetam os espectros de bioluminescência desta luciferase (VIVIANI *et al.*, 2002, 2004, 2006, 2007).

Anteriormente, White *et al.* (1996) concluíram que o resíduo E354 (correspondente a N351 em *P. hirtus*) está localizado num *loop* flexível na superfície da proteína em uma região que é acessível ao solvente, conectando duas folhas beta em uma região pobremente estruturada e suficientemente flexível para acomodar diferentes aminoácidos, sendo uma região importante na determinação da estabilidade da proteína.

Desta forma, os mutantes termoestáveis que foram obtidos nesta região, sugerem uma correlação entre a carga do aminoácido e a estabilidade da enzima. Neste caso, o critério mais importante para o aumento da estabilidade foi a perda da carga negativa com a substituição do glutamato.

Na luciferase de *P. hirtus*, verificamos que o mutante na posição correspondente, N351E, apesar da introdução da carga negativa, promoveu um pequeno aumento na termoestabilidade da enzima, que poderia ser causado pela formação de uma ponte salina com resíduos carregados positivamente próximos. O resíduo único na luciferase emissora de luz vermelha, R353 também foi mutado por glutamato com uma carga negativa (R353E), e novamente o mutante apresentou uma termoestabilidade ligeiramente maior do que a enzima selvagem, o que pode ter ocorrido pela interação de ponte salina que estabilizaria a região com os resíduos próximos, K356 e K357 (localizados a aproximadamente 8 ângstrons de distância), enrijecendo a região.

Os valores aumentados de K_M para luciferina dos mutantes R353E e N351E corroboram com os dados de Oliveira & Viviani (2017), de que as luciferases pH-insensíveis mais termoestáveis apresentam uma menor afinidade pelo substrato luciferina.

Desta forma, das 14 mutações feitas na estrutura inteira da luciferase emissora de luz vermelha de *P. hirtus*, apenas duas mutações aumentaram ligeiramente a estabilidade

a 37°C, R353E e N351E. Estas mutações estão localizadas em um *loop* flexível (351-364) que já foi mostrado ser importante tanto para a termoestabilidade, quanto para os espectros na luciferase de *P. pyralis* (WHITE *et al.*, 1996).

7. CONCLUSÕES

Nesta tese descrevemos pela primeira vez um estudo comparativo do efeito da temperatura na estabilidade, espectros de bioluminescência e cinéticas de luciferases de diferentes famílias de besouros que emitem diferentes cores de luz. As principais conclusões obtidas neste estudo foram:

- Dentre as luciferases estudadas, as mais termoestáveis foram as que emitem luz com espectro mais deslocado para o azul, do elaterídeo *P. termitilluminans*, do lampirídeo *A. vivianii* e a do fengodídeo *P. vivianii*, mostrando que existe uma tendência para maior termoestabilidade nas luciferases com espectro mais deslocado para o azul.
- Nas luciferases pH-insensíveis, as enzimas mais termoestáveis têm uma tendência para uma menor afinidade pelo substrato luciferina, enquanto que nas luciferases pH-sensíveis as enzimas mais termoestáveis têm o comportamento oposto, com uma maior afinidade pela luciferina.
- Todas as luciferases pH-sensíveis também mostram sensibilidade do espectro de bioluminescência à temperatura, mas em diferentes graus. Quanto mais deslocado para o azul o espectro de bioluminescência, menos sensível é a luciferase à temperatura. Estes resultados mostram que nas luciferases pH-sensíveis existe uma relação direta entre termoestabilidade, espectro de bioluminescência e sensibilidade espectral: quanto mais deslocada para o azul, mais estável a temperatura e menos sensível é o espectro a temperatura, quanto mais deslocado para o vermelho a luciferase, mais sensível é a temperatura, e menos termoestável é a luciferase. Estes resultados apontam que as luciferases com espectro mais deslocado para o azul apresentam uma maior rigidez do sítio-ativo do que as luciferases emissoras de luz mais deslocada para o vermelho.
- Foi demonstrada pela primeira vez a existência de uma relação linear entre temperatura e razão de intensidades de luz verde e vermelha nas luciferases pH-sensíveis, de forma semelhante às existentes para pH e concentração de metais, que pode ser utilizada para quantificar ratiometricamente a temperatura ou compensar o efeito da temperatura em análises de pH e metais pesados usando esta luciferases.
- A luciferase emissora de luz vermelha de *P. hirtus* é naturalmente pouco estável a temperatura, e poucas mutações afetaram sua termoestabilidade. Apenas dois

mutantes apresentaram uma termoestabilidade ligeiramente maior do que a luciferase selvagem, N351E e R353E, provavelmente através da estabilização dos *loops* onde se encontram estes resíduos pela formação de pontes salinas.

8. PERSPECTIVAS

Os resultados desta tese abriram portas para aprofundar os estudos e descobrir quais são os fatores que de fato influenciam na termoestabilidade das luciferases, e viabilizando a engenharia molecular das diversas enzimas clonadas em nosso laboratório, com o objetivo de criar uma super enzima, com características cinéticas, espectro e termoestabilidade otimizados.

Foi descoberto também o potencial das luciferases pH-sensitivas como indicadores da temperatura intracelular, assim como pesquisas já tem utilizado o mesmo princípio para medir pH e concentração de metais. Além disso, é possível obter resultados mais acurados para análises ratiométricas de pH e metais em células, já que podemos fazer a compensação do efeito da temperatura.

Apesar de ter obtido apenas dois mutantes ligeiramente mais termoestáveis (N351E e R353E) da luciferase emissora de luz vermelha de *P. hirtus*, abrimos o espaço para pesquisas em novos resíduos desta luciferase para desvendar regiões importantes para a estabilização desta enzima. Os resultados sugerem que esta luciferase emissora de luz vermelha seja muito flexível, requerendo uma engenharia considerável para estabilizá-la.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral, D. T.; Oliveira, G.; Silva, J. R.; Viviani, V. R. A new orange emitting luciferase from the Sourther-Amazon *Pyrophorus angustus* (Coleoptera: Elateridae) click-beetle: structure and bioluminescence color relationship, evolutionary and ecological considerations. **Photochemical & Photobiological Sciences** .2016.

Amaral, D. T.; Prado, R. A.; Viviani, V. R. Luciferase from *Fulgeochlizus bruchi* (Coleoptera: Elateridae), a Brazilian click-beetle with a single abdominal lantern: molecular evolution, biological function and comparison with other click-beetle luciferases. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 11, p. 1259-1267.2012.

Amarantes-Mendes, G. P. Apoptose: programa molecular de morte celular. **Einstein**, v. 1, p. 15–18, 2003.

Ambrish Roy, Jianyi Yang, Yang Zhang. COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Research*, 40: W471-W477, 2012.

Amini-Bayat, Z.; Hosseinkhani, S.; Jafari, R.; Khajeh, K. Relationship between stability and flexibility in the most flexible region of *Photinus pyralis* luciferase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, p. 350-358. 2012.

Ando, Y.; Niwa, K.; Yamada, N.; Enomoto, T.; Irie, T.; Kubota, H.; Ohmiya, Y.; Akiyama, H. Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive Green emission. **Nature**, v. 2. 2008.

Andreu, N.; Zelmer, A.; Fletcher, T.; Elkington, P. T.; Ward, T. H.; Ripolli, J.; Parish, T.; Bancroft, G. J.; Schaible, U.; Robertson, B. D.; Wiles, S. Optimization of bioluminescent reporters for use with Mycobacteria. **Plos ONE**, v. 5, p. 1-16. 2010.

Asai, R. *et al.* Beetle luciferases in measuring gene expression and imaging cell functions. In: VIVIANI, V. R.; OHMIYA, Y. **Luciferases and fluorescent proteins: Principles and advances in biotechnology and bioimaging**. Transworld Research Network: India, 2007. p. 151–160.

Bagget, Brenda; Roy, Rupali; Momen, Shafinaz; Morgan, Sherif; Tisi, Laurence; Morse, David; Gillies, Robert J. Thermoestbility of firefly luciferases affects efficiency of detection by in vivo bioluminescence. **Molecular Imaging**, v. 3, n. 4, p. 324-332. 2004.

Bechara, E. J. H.; Viviani, V. R. Luzes vivas na escuridão: Fatos e casos. **Rev. Virtual Quim.**, v. 7, p. 3–40, 2015.

Bencina, M. Illumination of the spatial order of intracellular pH by genetically encoded pH-sensitive sensors. **Sensors**, v. 13, p. 16736–16758, 2013.

Bizzarri, R. *et al.* Development of a novel GFP-based ratiometric excitation and emission pH indicator for intracellular studies. **Biophys. J.**, v. 90, p. 3300–3314, 2006.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254. 1976.

Branchini B. R., Ablamsky D. M., Murtiashaw M. H., Uzasci L., Fraga H., Southworth T. L. Thermostable red and green light-producing firefly luciferase mutants for bioluminescent reporter applications, **Analytical Biochemistry**, v. 361, p. 253-262. 2007.

Branchini B. R., Magyar R. A., Murtiashaw M.H., Anderson S.M., Zimmer M. Site-directed mutagenesis of histidine 245 in firefly luciferase: a proposed model of the active site. **Biochemistry**, v. 37, p. 15311-15219. 1998.

Branchini B.R., Southworth T.L., Murtiashaw M.H., Boije H., Fleet S.E. A mutagenesis study of the putative luciferin binding residues of firefly luciferase. **Biochemistry**, v. 42, p. 10429-10436. 2003.

Branchini B.R., Southworth T.L., Murtiashaw M.H., Wilkinson S.R., Khattak, N.F., Rosenberg J.C., Zimmer M. Mutagenesis evidence that the partial reactions of firefly bioluminescence are catalyzed by different conformations of the luciferase C-terminal domain. **Biochemistry**, v. 44, p. 1385-1393. 2005.

Breeuwer, P. *et al.* A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6)-carboxyfluorescein succinimidyl ester. **App. Environm. Microbiol.**, v. 62, p. 178–183, 1996.

Campbell, A. K. Chemiluminescence: Principles and applications in biology and medicine. VCH, Chichester. 1988.

Cheng, J.; Randall, A.Z.; Sweredoski, M.J.; Bandi, P. SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 33. 2005.

Chung, Jeong Min; Lee, Sangmin; Jung, Hyun Suk. Effective non-denaturing purification method for improving the solubility of recombinant actin-binding proteins produced by bacterial expression. **Protein expression and purification**. 2016.

Conti E., Franks N. P., Brick, P. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. **Struc.**, v. 4, p. 287-298. 1996.

Damnjanovic, J., Nakano, H. & Iwasaki, Y. Deletion of a dynamic surface loop improves stability and changes kinetic behavior of phosphatidylinositol-synthesizing *Streptomyces* phospholipase D. **Biotechnology and bioengineering**, 674–682. 2014.

DeLuca, M.; McElroy, W. D. Purification and properties of firefly luciferase. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds) *Methods in enzymology*, v. 57, p. 3. 1978.

Devine, J. H.; Kutuzova, G. D.; Green, V. A.; Ugarova, N. N.; Baldwin, T. O. Luciferase from the east European firefly *Luciola mingrelica*: cloning and nucleotide sequence of cDNA, overexpression in *E. coli* and purification of the enzyme. **Biochim. CBiophys. Acta**, v. 1173, p. 121-132. 1993.

Dorsaz S., Coste A.T., Sanglard D. Res-shifted firefly luciferases optimized for *Candida albicans* *in vivo* Bioluminescence imaging. **Frontiers in Microbiology**, v. 8. 2017.

Farnoosh G., Khajeh K., Latifi M. A., Aghamollaei. Engineering introduction of *de novo* disulphide bridges in organophosphorus hydrolase enzyme for thermostability improvement. **J. Biosci. Indian Academy of Sciences**. 2016.

Ferrè F, Clote P. DiANNA: a web server for disulfite connectivity prediction. **Nucleic Acids. Res.**; v. 33, p. 230-2. 2005.

Frankel, Steward; Sohn, Regina; Leinwand, Leslie. The use of sarkosyl in generating soluble after bacterial expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 1192-1196. 1991.

Furnham, N. *et al.* Exploring the evolution of novel enzyme functions within structurally defined protein superfamilies. **PLoS computational biology**. 2012.

Gabriel G.V.M., Lopes P.S., Viviani V.R. Suitability of *Macrolampis* firefly and *Pyrearinus* click beetle luciferases for bacterial light off toxicity biosensor. **Analytical Biochemistry**, v. 445, p. 73-79. 2014.

Gabriel G.V.M., Viviani V.R. Engineering the metal sensitive sites in *Macrolampis* sp2 firefly luciferase and use as a novel bioluminescent ratiometric biosensor for heavy metals. **Anal. Bioanal. Chem.** 2016.

Haddock, S. H. D. Luminous marine organisms. **Photoproteins in Bioanalysis**, p. 25-47. 2006.

Haddock, S. H. D., Moline, M. A., Case, J. F. Bioluminescence in the sea. **Annu. Rev. Mar. Sci.**, v. 2, p. 443-493. 2010.

Hall M. P., Grubber M. G., Hannah R. R., Jennes-Clough M. L., WOOD K.V. Stabilization of firefly luciferase using directed evolution, **Bioluminescence and**

Chemiluminescence Perspectives for the 21st Century Proceedings of 10th International Symposium, p. 392-395. 1998.

Hastings, J. W. Biological diversity, chemical mechanisms and evolutionary origins of bioluminescent systems. **Journal of Molecular Evolution**, v. 19, p. 309-321. 1983.

Hastings, J. W.; Morin, J. G. **Neural and integrative animal physiology**, New York, p. 131-170. 1991.

Hattori M., Haga S., Takakura H., Ozaki M., Ozawa T. Sustained accurate recording of intracellular acidification in living tissues with a photo-controllable bioluminescent protein. **PNAS**, v. 110, p. 9332–9337. 2013.

Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG Gibson TJ. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v. 22, p. 4673–80. 2004.

Hirano, T. *et al.* Spectroscopic studies of the color modulation mechanism of firefly (beetle) bioluminescence with amino-analogs of luciferin and oxyluciferin. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 11, p. 1281–1284, 2012.

Horts, G. V. D.; Asten, J. J.; Figdor, A.; Hoogen, C.; Cheung, H.; Bevers, R. F.; Pelger, R. C.; Pluijm, G. Real-time cancer cell tracking by bioluminescence in a preclinical model of human bladder cancer growth and metastasis. **European Urology**, v. 60, p. 337-343. 2011.

Hu, J. *et al.* A convenient ratiometric pH probe and its application for monitoring pH change in living cells. **Sensors and Actuators B**, v. 196, p. 194–202, 2014.

Imani M., Hosseinkhani S., Ahmadian S., Nazari M. Design and introduction of a disulfide bridge in firefly luciferase: increase of thermostability and decrease of pH sensitivity. **Photochemical and Photobiological Sciences**. 2010.

Jarchi, Samaneh; Ataei Farangis; Hosseinkhani, Saman. Mutation of conserved residues K329 and R330 on the surface of firefly luciferase: effect on proteolytic degradation. **Biological Macromolecules**. 2018.

Je, Jeong Hyeon; Kim, Min Gu; Kwon, Hyuck Joon. Bioluminescence assays for monitoring chondrogenic differentiation and cartilage regeneration. **Sensors**, 17. 2017.

Jianyi Yang, Yang Zhang. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions, *Nucleic Acids Research*, 43: W174-W181, 2015.

Kahrani Z.F., Emamzadeh R., Nazari M., Rasa S.M.M. Molecular basis of thermostability enhancement of *Renilla* luciferase at higher temperatures by insertion of a disulfide bridge into the structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1865, p. 252-259. 2017.

Kajiyama N. and Nakano E. Thermostabilization of Firefly Luciferase by a Single Amino Acid Substitution at Position 217, **Biochemistry**, v. 32, p. 13795-13799. 1993.

Kajiyama N., Nakano E. Isolation and characterization of mutants of firefly luciferase which produce different colors of light. **Prot. Eng.**, v. 4, p. 691–693. 1991.

Karimzadeh, S.; Moradi, M.; Hosseinkhani, S. Delicate balance of electrostatic interactions and disulfide bridges in thermostability of firefly luciferase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 837-844. 2012.

Kitayama A., Yoshizaki H., Ohmiya Y., Ueda H., Nagamune T. Creation of a thermostable firefly luciferase with a pH sensitive luminescent colour, **Photochem Photobiol.**, v. 77, p. 333-338. 2003.

Koksharov, M. I.; Ugarova, N. N. Triple substitution G216N/A217L/S398M leads to the active and thermostable *Luciola mingrelica* firefly luciferase. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, p. 931 – 938. 2011.

Koksharov, M.; Ugarova, N. N. Thermostabilization of firefly luciferase by *in vivo* directed evolution. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 24, no. 11, p. 835-844. 2011b.

Kovacs, F.; Mettenleiter, T. C. Firefly luciferase as a marker for herpesvirus (pseudorabies virus) replication *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of General Virology**, v. 72, p. 2999-3008. 1991.

Kovacs, F.; Mettenleiter, T. C. Firefly luciferase as a marker for herpesvirus (pseudorabies virus) replication *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of General Virology**, v. 72, p. 2999-3008. 1991.

Krulwich, T. A.; Sachs, G.; Padan, E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. **Nature**, v. 9. p. 330–343, 2011.

Kwon, H.; Enomoto, T.; Shimogawara, M.; Yasuda, K.; Nakajima, Y.; Ohmiya, Y. Bioluminescence imaging of dual gene expression at the single-cell level. **BioTechniques**, v. 48, p. 460-462. 2010.

Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J. Mol. Biol.**, v. 157, p. 105-132. 1982.

Lall, B. A. *et al.* Ecology of colors of firefly bioluminescence. **Science**, v. 225, p. 512-514. 1980.

Li X., Nakajima Y., Niwa K., Viviani V. R., Ohmiya Y. Enhanced red-emitting railroad worm luciferase for bioassays and bioimaging. **Protein Science** **2010**, v. 19:26-33. 2010.

Lloyd, J. E. Bioluminescence and communication in insects. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 38, p. 131-160. 1983.

Malabanan, M. M., Amyes, T. L. & Richard, J. P. A role for flexible loops in enzyme catalysis. **Current opinion in structural biology**, p. 702–710. 2010.

McElroy, W. D.; DeLuca, M. Chemistry of firefly luminescence. 1978.

Modestova Yu. A., Lomakina G. Yu., Ugarova N. N. Site-directed mutagenises of cysteine residues of *Luciola mingrelica* firefly luciferase. 2011.

Modestova, Y.; Koksharov, M. I.; Ugarova, N. N. Point mutations in firefly luciferase C-domain demonstrate its significance in Green color of bioluminescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1844, p. 1463-1471. 2014.

Mohammadi M.; Sakhteman A.; Ahrari S.; Hassanpour K.; Hashemi S. E.; Farnoosh G. Disulfite bridge formation to increase thermostability of DFPase enzyme: A computational study. **Computational Biology and Chemistry**. 2018.

Moradi, M.; Hosseinkhani, S.; Emamzadeh, R. Implication of an unfavorable residue (Thr346) in intrinsic flexibility of firefly luciferase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, p. 186-192. 2012.

Mortazavi, M.; Hosseinkhani, S. Design of thermostable luciferases through arginine saturation in solvent-exposed loops. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 24, no. 12, p. 893-903. 2011.

Mortazi, M.; Hosseinkhani, S. Surface charge modification increases firefly luciferase rigidity without alteration in bioluminescence spectra. **Enzyme and Microbial Technology**. 2016.

Nakajima, Y. *et al.* Enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging. **PLoS One**, v. 5, p. 100–111, 2010.

Nakajima, Y.; Kimura, T.; Sugata, K.; Enomoto, T.; Asawaka, A.; Kubota, H.; Ikeda, M.; Ohmiya, Y. Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. **BioTechniques**, v. 38, p. 891-894. 2005.

Nakajima, Y.; Yamazaki, T.; Nishii, T.; Noguchi, T.; Hoshino, H.; Niwa, K.; Viviani, V. R.; Ohmiya, Y. Enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging. **Plos One**, v. 5, p. 1-11. 2010.

Nakatsu, T., Ichiyama, S., Hiratake, J., Saldanha, A., Kobashi, N., Sakata, K., Kato, H. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. **Nature**, v. 440. 2006.

Nakhaee N.; Asad S.; Khajeh K.; Arab S. S.; Amoozegar M. A. Improving the thermal stability of Azoreductase from *Halomonas elongate* by introducing a disulfite bond via site-directed mutagenesis. DOI: 10.1002/bab.1688. 2018.

Naylor, L. H. Reporter gene technology: The future looks bright. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 749-757. 1999.

Niwa, K. *et al.* Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. **Photochem. Photobiol.**, v. 86, p. 1046–1049, 2010.

Niwa, K.; Ichino, Y.; Kumata, S.; Nakajima, Y.; Hiraishi, H.; Kato, D.; Viviani, V. R.; Ohmiya, Y. Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 1046-1049. 2010.

Ohmiya, Y. Cell based assays and imaging. 2014. **Applications of Bioluminescence**. Disponível em: <<http://photobiology.info/Ohmiya.html>>. Acesso em: 05 de Abril de 2016.

Ohmiya, Y.; Ohba, N.; Toh, H.; Tsuji, F. I. Cloning, expression, and sequence analysis of cDNA for the Luciferase from the Japanese fireflies, *Pyrocoelia miyako* and *Hotaria parvula*. **Photochem. Photobiol.**, v. 62, p. 309-313. 1995.

Oliveira G., Viviani V. R. Comparison of the thermostability of recombinant luciferases from Brazilian bioluminescent beetles: relationship with kinetics and bioluminescence colors. **Luminescence**, DOI:10.1002/bio.3411. 2017.

Pace NC, Fu H, Fryar KL, Landua J, Trevino SR, Shirley BA, Hendricks MM, Iimura S, Gajiwala K, Scholtz JM, Grimsley GR. Contribution of hydrophobic interactions to protein stability. **J. Mol. Biol.**; v. 408, p. 514-528, 2011.

Pendergast, J. S.; Friday, R. C.; Yamazaki, S. Distinct functions of period2 and period3 in the mouse circadian system revealed by *in vitro* analysis. **Plos One**, v. 5, p. 1-7. 2010.

Rice, B. W.; Cable, M. D.; Nelson, M. B. In vivo imaging of light-emitting probes. **J. Biomed. Optics.**, v. 6, p. 432-440. 2001.

Roda, A.; Guardigli, M. Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 402, p. 69-76. 2012.

Sala-Newby, G. B.; Thomson, C. M.; Campbell, A. K. Sequence and biochemical similarities between the luciferases of the glow-worm *Lampyrus noctiluca* and the firefly *Photinus pyralis*. **Biochem.**, v. 313, p. 761-767. 1996.

Schlager, Benjamin; Straessle, Anna; Hafen, Ernst. Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression. **BMC biotechnology**. 2012.

Seliger, H. H.; McElroy W. D. The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 52, p. 75-81. 1964.

Sherf, B. A.; Navarro, S. L.; Hannah, R. R.; Wood, K. V. Dual-luciferase TM Reporter Assay: an advanced co-reporter technology integrating firefly and *Renilla* luciferase assays. **Promega Notes Magazine Number**, n. 57, p. 2. 1996.

Shimomura, O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods. Editora: World Scientific. Singapore. 2006. p. 500.

Silva – Neto AJ, Scorsato V, Arnoldi FGC, Viviani VR. *Pyrearinus termitilluminans* larval click beetle luciferase: active site, properties, structure and function relationships and comparison with other beetle luciferases. **Photochem. Photobiol. Sci.**; v. 8, p. 1748-54, 2009.

Song, Jung Min; An, Young Jun; Kang, Mee Hye; Lee, Youn-Ho; Cha, Sun-Shin. Cultivation at 6-10°C is an effective strategy to overcome the insolubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, v. 82, p. 297-301. 2012.

Speed, Margaret A. Wang, Daniel I.C.; King, Jonathan. Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. **Nature biotechnology**, v. 14, p. 1283-1287. 1996.

Srivastava, J.; Barder, D. L.; Jacobson, M. P. Intracellular pH sensors: Design principles and functional significance. **Physiology**, v. 22, p. 30–39, 2007.

Sung D, Kang H. The N-terminal amino acids sequences of the firefly luciferase are important for the stability of the enzyme. **Photochem. Photobiol.**; v. 65, p. 749-53. 1998.

Tafreshi N.K., Hosseinkhani S., Sadeghizadeh M., Sadeghi M., Ranjbar B., Naderi-Manesh H. The influence of insertion of critical residue (Arg356) in structure and bioluminescence spectra of firefly luciferase. **J Biol Chem**, v. 282, p. 8641–8647. 2007.

Tatsumi, H.; Masuda, T.; Kajiyama, N.; Nakano, E. Luciferase cDNA from Japanese firefly *Luciola cruciata*: cloning, structure and expression in *E. coli*. **J. Biolumin. Chemilumin.**, v. 3, p. 75-78. 1989.

Tatsumi, H.; Masuda, T.; Kajiyama, N.; Nakano, E. Luciferase cDNA from Japanese firefly *Luciola cruciata*: cloning, structure and expression in *E. coli*. **J. Biolumin. Chemilumin.**, v. 3, p. 75-78. 1989.

Tisi L.C., White P.J., Squirrel D.J., Murphy M.J., Lowe C.R., Murray J.A.H. Development of a thermostable firefly luciferase. **Analytica Chimica Acta**, v. 457, p. 115-123. 2002.

Ugarova N.N., Brovko L.Y. Protein structure and bioluminescent spectra for firefly bioluminescence. **Luminescence**; v. 17, p. 321–330. 2002.

van Beilen, J. W. A.; Brul, S. Compartment-specific pH monitoring in *Bacillus subtilis* using fluorescent sensor proteins: a tool to analyze the antibacterial effect of weak organic acids. **Frontiers Microbiol.**, v. 4, p. 1–11, 2013.

Viviani V. R. Fireflies (Coleoptera: Lampyridae) from Southeastern Brazil: habitats, life, history, and bioluminescence. **Entomological Society of America**, v. 94, no. 1, p. 129-145. 2001.

Viviani V. R. The origin, diversity and structure function relationships of insect luciferases. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 59, p. 1833-1850. 2002.

Viviani V. R., Ohmiya Y. Bioluminescence coloredeterminants of *Phrixothrix* railroadworm luciferases: chimeric luciferases, site-directed mutagenesis of Arg215 and guanidine effect. **Photochem. Photobiol.**, v. 72, p. 267–271. 2000.

Viviani V. R.; Neves D. R.; Amaral D. T.; Prado R. A.; Matsuhashi T.; Hirano T. Bioluminescence of beetle luciferases with 6'-amino-D-analogues reveals excited keto-oxy luciferin as the emitter and phenolate/luciferin binding site interactions modulate bioluminescence colors. **Biochemistry**, v. 53, p. 5208-20. 2014.

Viviani V.R., Neto A.J.S., Arnoldi F.G.C., Barbosa J.A.R.G., Ohmiya Y. The influence of the loop between residues 223–235 in beetle luciferase bioluminescence spectra: a solvent gate for the active site of pH-sensitive luciferases. **Photochem Photobiol** 84:138–144. 2008.

Viviani V.R., Oehlmeyer T.L., Arnoldi F.G.C., Brochetto-Braga M.R.. A new firefly luciferase with bimodal spectrum: identification of structural determinants of spectral pH-sensitivity in firefly luciferases. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p. 843-848. 2005.

Viviani V.R., Ohmiya Y. Bioluminescence color determinant of *Phrixothrix* railroad-worm luciferase: chimeric luciferase, site-directed mutagenesis of Arg215 and guanidine effect. **Photochem Photobiol**, v. 72, p. 267–271. 2000.

Viviani V. R.; Arnoldi, F. G.; Brochetto-Braga, M.; Ohmiya. Y. Cloning and characterization of the cDNA for the brazilian *Cratomorphus distinctus* larval firefly luciferase: similarities with European *Lampyrus noctiluca* and Asiatic *Pyrocoelia* luciferases. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v. 139, p. 151-156. 2004.

Viviani, V. R., Bechara, E. J. H., Ohmiya, Y. Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worm luciferases: Relationship between bioluminescence spectra and primary structures. **Biochemistry**, v. 38, p. 8271-8279. 1999b.

Viviani, V. R. *et al.* The luciferin binding site residues C/T311 (S314) influence the bioluminescence color of beetle luciferases through main-chain interaction with oxyluciferin phenolate. **Biochem.**, v. 52, p. 19–27, 2013.

Viviani, V. R. *et al.* The structural origin and biological function of pH-sensitivity in firefly luciferases. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 7, p. 159–169, 2008b.

Viviani, V. R. *et al.* Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. **BBRC**, v. 280, p. 1286–1291, 2001.

Viviani, V. R. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. **CMLS**, v. 59, p. 1833–1850, 2002.

Viviani, V. R., Arnoldi F. G. C., Ogawa F. T., Brochetto-Braga M. Few substitutions affect the bioluminescence spectra of *Phrixotrix* (Coleoptera: Phengodidae) luciferases: a site-directed mutagenesis survey. **Luminescence**, v. 22, p. 362-369. 2007.

Viviani, V. R., Bechara, E. J. H. Bioluminescence and biological aspects of Brazilian railroadworms (Coleoptera: Phengodidae). **Ann. Entom. Soc. Ann. Entom. Soc. Am.**, no. 3, v. 90, p. 389 – 398. 1997.

Viviani, V. R., Perez G. O., Silva, A. C. R., Bechara, E. J. H. and Reinach F. R. Molecular Cloning and Characterization of cDNA for Larval *Pyrearinus termitilluminans* luciferase. **Photochem. Photobiol.**, v. 70, p. 254-260. 1999.

Viviani, V. R.; Amaral, D.; Prado, R.; Arnoldi, F. G. C. A new blue-shifted luciferase from the Brazilian *Amydetes fanestratus* (Coleoptera: Lampyridae) firefly: molecular evolution and structural/functional properties. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, p. 1879-1886. 2011.

Viviani, V. R.; Arnoldi, F. G.C.; Venkatesh, B.; Neto, A.J.S.; Ogawa, F.G.T.; Oehlmeyer, A.T.L.; Ohmiya, Y. Active-site properties of *Phrixotrix* Railroad Worm Green and Res Bioluminescence-Eliciting Luciferases. **Journal of Biochemistry**, v. 140, p. 467-474. 2006.

Viviani, V. R.; Brechara, E. J. H. Bioluminescence of Brazilian fireflies (Coleoptera: Lampyridae); spectral distribution and pH effect on luciferase-elicited colors. Comparison with elaterid and phengodid luciferases. **Photochem. Photobiol.**, v. 62, p. 490-495. 1995.

Viviani, V. R.; Brechara, E. J. H. Biophysical and biochemical aspects of phengodid bioluminescence. **Photochem. Photobiol.**, v. 58, p. 615-622. 1993.

Viviani, V. R.; Oehlmeyer, T. L.; Arnoldi, F. G. C.; Brochetto-Braga, M. R. A new firefly luciferase with bimodal spectrum: identification of structural determinants of spectral pH-sensitivity in firefly luciferase. **Photochemistry Photobiol.**, v. 81, p. 843-848. 2005.

White P.J., Squirrell D.J., Arnaud P., Lowe C.R., Murray J.A.H. Improved thermostability of the North American firefly luciferase: saturation mutagenesis at position 354. **Biochem J**, v. 319, p. 343–350.1996.

White, E. H. *et al.* Chemi- and bioluminescence of firefly luciferin. **J. American Chem. Soc.**, v. 91, p. 2178–2180, 1968.

Wilson, T. Comments on the mechanisms of chemi and bioluminescence. **Photochemical & Photobiological**, v. 62, p. 601-606. 1995.

Wood, K. V. The chemical mechanism and evolutionary development of beetle luminescence. **Photochem. Photobiol.**, v. 62, p. 662-673. 1995.

Wood, K. V.; Gruber, M. G. Transduction in microbial biosensors using multiplexed bioluminescence. **Biosen. Bioelet.**, v. 3, n. 11, p. 2. 1989.

Xu Q.; Si M.; Zhang Z.; Li Z.; Jiang L.; Huang H. Rational site chain amino acid substitution in firefly luciferase for improved thermostability. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 584-590. 2018.

Yang Zhang. I-TASSER: Fully automated protein structure prediction in CASP8. *Proteins*, 77 (Suppl 9): 100-113, 2009.

Yu H., Yan Y., Zhang C., Dalby P. A. Two strategies to engineer flexible loops for improved enzyme thermostability. **Scientific reports**, v. 7. 2017.

Yu, H.; Zhao, Y.; Guo, C.; Gan, Y.; Huang, H. The role of proline substitutions within flexible regions on thermostability of luciferase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1854, p. 65-72. 2015.

10. ARTIGOS PUBLICADOS

- Danilo Trabuco Amaral; Gabriela Oliveira; Jaqueline Rodrigues Silva; Vadim Viviani. A new orange emitting luciferase from the Sourther-Amazon *Pyrophorus angustus* (Coleoptera: Elateridae) click-beetle: structure and bioluminescence color relationship, evolutionary and ecological considerations. **Photochemical & Photobiological Sciences** .2016. DOI: 10.1039/c6pp00165c;

- Danilo Trabuco Amaral; Gabriela Oliveira; Vadim Viviani. “Revisiting Coleoptera a+T-rich region: structural conservation, phylogenetic and phylogeografic approaches in mitochondrial control region of bioluminescence Elateridae species (Coleoptera)”. **Mitochondrial DNA**. 2016. DOI: 10.3109/24701304.2016.1174220.

- Oliveira G., Viviani V. R. Comparison of the thermostability of recombinant luciferases from Brazilian bioluminescent beetles: relationship with kinetics and bioluminescence colors. *Luminescence*, 2017. DOI:10.1002/bio.3411.

11. ARTIGOS EM FASE DE PUBLICAÇÃO

- Gabriela Oliveira, Vadim Viviani. Comparative Effect of Temperature on the Bioluminescence Spectra of Four Firefly Luciferases and its Potential Application in Ratiometric Biosensing.

- Gabriela Oliveira, Aline Simões, Frederico C. Arnoldi, Paulo Sérgio Lopes Oliveira, Vadim Viviani. Influence of E270 in pH-sensitivity of *Macrolampis* Firefly Luciferase.

- Bevilaqua, V. R., Matsuhashi, T., Oliveira, P. S. L., Oliveira, G., Hirano, T., Viviani, V. R. Site-directed mutagenesis and 6'-aminoluciferins reveal that a larger phenolate binding cavity is responsible for the red bioluminescence of *Phrixotrix* railroad worm luciferase: promising far red-shifted combinations for bioimaging.