

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

Rogilene Aparecida Prado

**“Clonagem gênica e caracterização de uma enzima tipo-
luciferase de coleópteros não bioluminescente e sua relação com
a origem da atividade luminescente”**

**São Carlos – SP
2012**

“Clonagem gênica e caracterização de uma enzima tipo-luciferase de coleópteros não bioluminescentes e sua relação com a origem da atividade luminescente”

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

Rogilene Aparecida Prado

**“Clonagem gênica e caracterização de uma enzima tipo-
luciferase de coleópteros não bioluminescentes e sua relação com
a origem da atividade luminescente”**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientação: Prof. Dr. Vadim R. Viviani

**São Carlos – SP
2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

P896cg

Prado, Rogilene Aparecida.

Clonagem gênica e caracterização de uma enzima tipo-luciferase de coleópteros não bioluminescentes e sua relação com a origem da atividade luminescente / Rogilene Aparecida Prado. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
99 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Bioquímica. 2. *Protoluciferase*. 3. *Zophobas morio*. 4. Túbulos de Malpighi. 5. Desintoxicação metabólica. I. Título.

CDD: 574.192 (20^a)

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

“Clonagem Gênica e Caracterização de uma enzima tipo-luciferase de Coleópteros não Bioluminescentes e as suas Relações com a Origem da Atividade Luminescente”

Tese de Doutorado de
ROGILENE APARECIDA PRADO

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Vadim Viviani

Prof. Dr. Fábio de Lima Leite

Prof. Dr. Flavio Henrique Silva

Prof. Dr. Jorg Kobarg

Prof. Dr. Jonas Contiero

Agradecimentos

Em primeiro lugar, ao professor e amigo Dr. Vadim Viviani pela orientação e por ter me dado a oportunidade de conhecer esse fascinante “mundo de luz”.

Ao CNPq e à FAPESP (Proc. nº 2007/07950-3) pelos recursos financeiros.

Ao professor Marcos de Afonso Marins (*in memoriam*) pela montagem do laboratório provisório na UNISO e pelo constante apoio.

Ao professor Dr. João A. Barbosa (Universidade Católica de Brasília) pela modelagem da protoluciferase.

Ao Dr. Frederico Arnoldi pela ajuda na elaboração do projeto e nas primeiras análises filogenéticas.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Genética e Evolução e a todas as secretárias da Pós-Graduação em Genética e Evolução da UFSCar-São Carlos.

A todos da UFSCar-Sorocaba, sem exceção, ao pessoal da limpeza, da manutenção, da administração, aos técnicos, professores e alunos.

À Universidade de Sorocaba (UNISO) pela infra-estrutura cedida no início do doutorado e a todos os amigos que tive a felicidade de lá encontrar.

A todos os orientados do professor Vadim, meus irmãos de coração! Obrigada por fazerem parte da minha vida! Amo todos vocês.

E principalmente à minha família, por toda a compreensão e apoio.

*“Caminante,
Caminante, son tus hellas
el camino y nada más;
Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace el camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se há de volver a pisar.
Caminante no hay camino
sino estelas en la mar”*

Antonio Machado (1875-1939)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Aspectos gerais	4
1.2. Revisão bibliográfica	5
1.2.1. Histórico	5
1.2.2. Diversidade biológica e funcional	9
1.2.2.1. Organismos marinhos	9
1.2.2.2. Organismos terrestres	13
1.2.3. Bioluminescência em coleópteros	15
1.2.4. Mecanismo da bioluminescência dos coleópteros	18
1.2.5. Mecanismo de modulação do espectro de bioluminescência	19
1.2.6. Estrutura tridimensional da luciferase de coleópteros	23
1.2.7. Origem e evolução da bioluminescência em insetos	25
1.2.8. Super-família das AMP/CoA ligases	27
1.2.9. Aplicações biotecnológicas das luciferases	29
2. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Material biológico	32
3.2. Imagem da bioluminescência e quimioluminescência em câmara CCD	32
3.3. Construção da biblioteca de cDNA	33
3.3.1. Extração do RNA total	33
3.3.2. Purificação do mRNA	33
3.3.3. Síntese de cDNA e construção da biblioteca de cDNA	34
3.3.4. Excisão <i>in vivo</i> da biblioteca para obtenção da forma plasmidial	34
3.3.5. <i>Screening</i> de clones positivos por fotodeteção	34
3.4. Técnicas gerais de biologia molecular	
3.4.1. Preparação de células competentes	35
3.4.2. Transformação de bactérias	36
3.4.3. Extração de DNA plasmidial	36
3.4.4. Eletroforese em gel de agarose	37
3.4.5. Sequenciamento de DNA	37
3.4.6. Subclonagem do cDNA da enzima tipo-luciferase	37
3.4.7. Purificação de DNA do gel de agarose	38
3.4.8. Mutagênese sítio-dirigida	39
3.5. Expressão, purificação e ensaio da enzima tipo-luciferase	
3.5.1. Indução da expressão heteróloga de proteínas	40
3.5.2. Medidas de atividade da enzima tipo-luciferase <i>in vivo</i>	40
3.5.3. Extração da proteínas	40
3.5.4. Medidas de atividade da enzima tipo-luciferase <i>in vitro</i>	41
3.5.5. Quantificação de proteínas totais	41

3.5.6. Atividade específica	41
3.5.7. SDS-PAGE	41
3.5.8. <i>Western Blotting</i>	42
3.5.9. Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade matriz de Ni.	42
3.6. Caracterização cinética e físico-química da enzima tipo-luciferase	
3.6.1. Determinação do K_M para ATP e Luciferina	43
3.6.2. Determinação do pH ótimo	43
3.6.3. Teste de termoestabilidade	44
3.6.4. Teste de inibição por ácidos carboxílicos	44
3.6.5. Espectros de quimioluminescência	44
3.7. Análise bioinformática	
3.7.1. Análise filogenética	45
3.7.2. Modelagem do sítio ativo da enzima tipo-luciferase	45
4. RESULTADOS	
4.1. Bioimagem e origem anatômica da enzima tipo-luciferase em <i>Z. morio</i>	46
4.2. Clonagem do cDNA da Enzima tipo-luciferase	47
4.3. Estrutura do cDNA e da proteína	48
4.4. Filogenia molecular	50
4.5. Expressão e purificação	
4.5.1. Expressão	53
4.5.2. Purificação	57
4.6. Caracterização cinética	
4.6.1. pH ótimo	61
4.6.2. Termoestabilidade	62
4.6.3. K_M para ATP e Luciferina	63
4.6.4. Teste de inibição por ácidos carboxílicos	65
4.6.5. Espectro de quimioluminescência	66
4.7. Mutagênese sítio-dirigida no sítio de ligação da luciferina	67
4.7.1. K_M para ATP e luciferina dos mutantes	71
4.7.2. Espectro de quimioluminescência dos mutantes	72
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÕES	83
7. PERSPECTIVAS	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	
9. TAMPÕES E REAGENTES	98
10. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AK: Adenilato quinase
ATP: Trifosfato de Adenosina
BSA: Albumina de Soro Bovino
CCD: Dispositivo de carga acoplada (Charge-Coupled Device)
CHES: Ácido N-Ciclohexil-2-aminoetanosulfônico
CoA: Coenzima A
cps: *Counts* por segundo
DEPC: Dietilpirocarbonato
DLSA: 5'-O-[N-(desidroluciferil)-sulfamoyl]adenosina
DMSO: Dimetilsulfóxido
DpnI: Endonuclease de *Diplococcus pneumoniae* I
DTT: Ditioneitol
EcoRI: Endonuclease de *Escherichia coli*
EDTA: Ácido etilondiamina tetracético
g: Gravidade
HRP: Peroxidase de raiz forte
IPTG: Isopropil 2-D-tiogalactopiranosídeo
K_M: Constante de Michaelis-Menten
LB: Lúria Bertani (Meio de Cultura bacteriano)
LDH: Lactato desidrogenase
LH₂: D-luciferina
NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo
Ni-NTA: Níquel-ácido nitriloacético
OD: Densidade óptica
PAUP: Análise Filogenética por Parsimônia
PBS: Tampão Salino de Fosfato
PBS-T: Tampão Salino de Fosfato acrescido de Tween
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PEP: Ácido fosfoenolpirúvico
pfu: Unidade formadora de placa
PIPES: Ácido 1,4-Piperazinadietanosulfônico
PK: Piruvato quinase
PxRE : Luciferase vermelha de *Phrixotrix hirtus*
rpm: Rotações por minuto
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida
TAE: Tris-acetato-EDTA
TB: Tampão de transformação
T-Rex: Reconstrução de árvore e reticulograma
TRIS: Tris-hidroximetilaminometano
ZOP: *Zophobas morio*

RESUMO

A bioluminescência em coleópteros é dependente das luciferases, enzimas que evoluíram das AMP-CoA ligases. O cDNA de uma enzima tipo-luciferase foi clonado dos túbulos de Malpighi de larvas de *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae). O produto gênico deste cDNA mostra naturalmente uma fraca luminescência na presença de MgATP e luciferina e possui 528 aminoácidos com sequências sinal na região N-terminal e C-terminal endereçadas a membrana do retículo endoplasmático liso. Apesar de ter uma baixa identidade (26-32%) com as luciferases de vaga-lumes, esta enzima é um modelo apropriado de protoluciferase para investigar a origem e evolução das luciferases de besouros. O sítio de ligação da luciferina é altamente conservado entre todas as luciferases de besouros; na protoluciferase de *Z. morio* porém, a maioria dos resíduos desta região é substituído por outros. Utilizando-se a técnica de mutagênese sitio-dirigida, alguns resíduos de aminoácidos desta protoluciferase, que são localizados na correspondente região do sítio ativo das luciferases, foram substituídos pelos resíduos conservados das luciferases. A maioria das substituições teve um efeito negativo sobre a atividade luminescente. Porém, a substituição I327T, cujo resíduo é localizado em um motivo grampo β , perto do sítio de ligação da luciferina, aumentou sua atividade luminescente. Tal substituição mostra a importância deste motivo para a atividade luciferásica e indica uma possível rota de evolução das luciferases de coleópteros. Uma vez que esta enzima foi extraída dos túbulos de Malpighi, é possível que esteja envolvida com a excreção de algum composto químico. Independente de sua função, os resultados do presente trabalho sugerem que o potencial para atividade bioluminescente é bem antigo nas ligases e provavelmente evoluíram antes da divergência das famílias de coleópteros bioluminescentes.

Palavras-Chave: Protoluciferase. Túbulos de Malpighi. AMP-CoA ligase. Desintoxicação

ABSTRACT

Bioluminescence in beetles is dependent on luciferase which evolved from AMP/CoA ligases. The cDNA of a luciferase-like enzyme was cloned from the Malpighian tubules of *Zophobas morio* mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). The gene product of this cDNA displays weak luminescence and it is composed of 528 aminoacids residues with N-terminal and C-terminal sequences signal addressed to smooth endoplasmic reticulum membrane. Although having a low identity (26-32%) with beetle luciferases, this enzyme is a reasonable protoluciferase model to investigate the origin and evolution of beetle luciferases. The luciferin binding site is highly conserved among the beetle luciferases. However, in this protoluciferase of *Z. morio*, most of these residues of this motif are substituted by others. Using a site-directed mutagenesis survey some of aminoacids residues of this protoluciferase, which are located at correspondent luciferin binding site of luciferases, were replaced by the conserved residues of beetle luciferases. Most of the substitutions had negative effect on the luminescent activity, however, the substitution I327T, which is located in a β -hairpin motif close to the luciferin binding site, improved the luminescence activity. Such substitution indicates the importance of this motif for luciferase activity and indicates a possible route for the evolution of bioluminescence function of beetle luciferase. Since this enzyme is located in the Malpighian tubules, which are involved in excretion and metabolization of carboxylic substrates, this enzyme could be involved to excretion the some type of chemical compound. Regardless of the function the results show that the potential for bioluminescent activity is older and probably arose before the divergences of the Coleoptera bioluminescent families.

Key words: Protoluciferase. Malpighian tubules. AMP-CoA ligase. Detoxification.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

A bioluminescência é a emissão de luz por organismos vivos como bactérias, fungos, anelídeos, equinodermas, insetos e peixes. É um tipo especial de quimioluminescência que não depende de temperatura ou absorção de luz pelo organismo como fonte de energia, mas de oxidações altamente exergônicas de um substrato – a luciferina – onde a energia é liberada na forma de luz 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 fluorescência (WILSON, 1995). Esta luz pode ser usada de diferentes modos e para diferentes funções, dependendo do organismo, como atração sexual, defesa, camuflagem e atração de presas (HASTINGS, 2001). É um fenômeno predominante dos organismos marinhos e entre os organismos terrestres a bioluminescência é mais abundante em insetos, especialmente nos coleópteros. Em coleópteros, espécies bioluminescentes ocorrem principalmente na superfamília Elateroidea composta pelas principais famílias de vaga-lumes. Nestes insetos observa-se uma ampla variedade de padrões e espectros de emissão. Apesar disto, as diferentes famílias de coleópteros bioluminescentes compartilham a mesma reação bioluminescente, com substratos (luciferina e ATP) idênticos e luciferases homólogas compartilhando de 45 a 99% de similaridade umas com as outras (WOOD et al., 1989; VIVIANI, 2002).

Com relação à origem evolutiva, sugere-se que as luciferases de coleópteros surgiram a partir de enzimas AMP-CoA ligases (SCHROEDER, 1989; SUZUKI et al., 1990; TOH, 1990; SCHOLTEN et al., 1991; BABBIT; KENYON, 1992; FUJINO; YAMAMOTO, 1992). Porém, ainda não existe um elo consistente entre as ligases não-luminescentes e as luciferases,

tornando o conhecimento das estruturas um tema interessante para inferir como se originou a função luminescente das lucíferases.

1.2. Revisão bibliográfica

1.2.1. Histórico

Acredita-se que o Homem de Neandertal conhecia “coisas” luminescentes como aurora boreal, vermes luminescentes ou troncos luminosos, mas infelizmente não há nenhum registro a respeito. Mesmo no início da civilização o homem pré-histórico, que tinha alto talento artístico, não deixou nenhum registro sobre a luminescência. Além disso, um dos problemas do início da história sobre luminescência é separar os verdadeiros dos falsos relatos. Luzes misteriosas vistas sobre as águas, campos ou montanhas eram descritas como dragões ou deuses. Histórias de jóias e pedras luminosas também foram proferidas desde os tempos remotos, mas é provável que muitos casos a luz fosse resultado de reflexos e não de emissão luminosa (HARVEY, 1957). Um dos tipos de reflexo que foi confundido com a verdadeira emissão de luz é o brilho dos olhos de alguns animais como os gatos. O reflexo dos olhos desses animais à noite quando iluminados pelo fogo era vista como luz que emanava dos próprios olhos com o objetivo de possibilitar a visão (SALVETTI, 2008).

O primeiro registro a respeito de organismo luminescente data de aproximadamente 1.500-1.000 a.C no “Shi Jing”, conhecido como “Livro das Canções” onde é mencionado “I-yao hsiao-hsing”, traduzido como “Os vaga-lumes são intermitentemente brilhantes” (HARVEY, 1957; KIM, 2000). Depois disso, os vaga-lumes ou outros organismos bioluminescentes foram negligenciados por muito tempo, inclusive por escritores bíblicos, pois não há menção sobre bioluminescência na Bíblia ou no Alcorão, talvez pela raridade destes organismos em regiões desérticas do oriente médio (HARVEY, 1957).

É com Aristóteles (384-322 a.C) que um conhecimento bastante amplo sobre a produção de luz fria tem início (SALVETTI, 2008). Aristóteles foi o primeiro a registrar observações detalhadas e reconhecer a luz própria dos organismos bioluminescentes. Ele também registrou a luminescência de peixes mortos, o que hoje é sabido que se tratava de colônias de bactérias bioluminescentes (HARVEY, 1957; SHIMOMURA, 2006).

No início da era cristã Gaius Plinius Secundus, Plínio o Velho (AD 23-79), comandante naval e militar do império Romano, também naturalista e escritor, passou a maior parte do seu tempo livre investigando fenômenos naturais. Ele registrou suas observações sobre vermes, águas-vivas, peixes e fungos luminescentes em seu livro *Naturalis Historia*, considerado o primeiro registro completo e específico sobre organismos bioluminescentes. Também mencionou que o brilho dos olhos de gatos, veados e hienas não era uma verdadeira luminescência e sim reflexo de luz (HARVEY, 1957).

Após um longo período de escuridão científica da Idade Média - pois as mentes intelectuais da época, influenciadas pela supremacia da Igreja católica, eram centradas no céu e não na natureza - os fenômenos naturais começaram a ser notados. Colombo (1446-1506), antes de desembarcar em San Salvador (1492), atentou-se para as misteriosas luzes vindas das águas marinhas, provavelmente provenientes dos vermes luminosos *Odontosyllis* (HARVEY, 1957).

Nesta época, um dos mais importantes registros de história natural do Novo Mundo foi feito por Gonzalo Fernández de Oviedo (1478-1557), historiador e escritor espanhol. Em seu *Historia* menciona quatro tipos de “coisas luminosas”, centípedes, vermes, luz de troncos de árvores e o *Cucuyo* (*Pyrophorus noctilucus*), um besouro elaterídeo (HARVEY, 1957; EZQUERRA, 1997).

Outras formas luminosas de insetos foram incluídas no primeiro importante tratado sobre insetos, o *De Animalibus Insectis* (Bologna, 1602), de Ulisses Aldrovandi onde há

registros de Cicindela (Carabidae) e referências sobre coleópteros luminescentes (HARVEY, 1957).

São atribuídos a Francis Bacon (1561-1626) os primeiros experimentos com material orgânico luminoso. Robert Boyle (1627-1691), utilizando uma bomba a vácuo construída por ele mesmo, demonstrou que a luminescência de pedaços de carne e madeira dependia do ar. Benjamim Franklin (1706-1790) inicialmente acreditou que a bioluminescência era um fenômeno elétrico, porém, mudou sua opinião quando descobriu que a luz emitida no oceano podia ser filtrada com auxílio de um pedaço de pano (SHIMOMURA, 2006).

No século 19 os naturalistas aumentaram grandemente a lista das espécies luminosas como o tunicado *Pyrosoma* por Francois Péron (1775-1810), o anelídeo *Spirographis* por D. Viviani (1805), os radiolários por W. G. Tilesius (1769-1857), os sifonóforos por F. J. F. Meyer (1834) entre outros. Paolo Panceri (1833-1877) é conhecido por suas publicações sobre anatomia e histologia de vários tipos de organismos luminosos e Raphael Dubois (1849-1877) como o descobridor da luciferina e a luciferase (HARVEY, 1957; SHIMOMURA, 2006).

A grande revolução no pensamento biológico influenciada por Charles Darwin (1809-1882) repercutiu entre os pesquisadores de bioluminescência que passaram a considerar as possíveis funções (HARVEY, 1957).

O termo luminescência para “todo o fenômeno de luz no qual não é condicionado pelo aumento de temperatura” foi usado pela primeira vez por Eilhard Wiedmann (1852-1929) e também pela primeira vez Harvey (1887-1957) usou o termo “bioluminescência” para a emissão de luz por seres vivos.

A natureza química dos componentes de muitos sistemas bioluminescentes foi elucidada na segunda metade do século XX (BODE; HASTINGS, 1963; HOPKINS et al., 1967, McCAPRA, 1973; DUNLAP; HASTINGS, 1981).

Em 1947 McElroy elegantemente demonstrou o requerimento de ATP como substrato essencial na reação bioluminescente de vaga-lumes.

Em 1962 a descoberta da proteína Ca^{+2} dependente (aequorina) e da proteína fluorescente verde (GFP) por Shimomura et al. (1962) rendeu décadas mais tarde, em 2008, o prêmio Nobel de Química dividido com outros dois pesquisadores, Martin Chalfie e Roger Tsien.

Na década de 1980 e 1990 luciferases de coleópteros (deWET et al., 1985; TATSUMI et al., 1989; VIVIANI et al., 1999a; b) e de bactérias (COHN et al., 1985; JOHNSTON et al., 1986; MANCINI et al., 1988; FRANCKMAN, et al., 1990) foram clonadas.

A utilização da GFP como sonda marcadora de expressão gênica (CHALFIE et al., 1994) e a primeira resolução da estrutura tridimensional de uma luciferase, a luciferase de *Photinus pyralis* (CONTI et al., 1996) são exemplos dos resultados de pesquisas do final do século XX e merecem ser registrados na história da bioluminescência.

Atualmente a bioluminescência é usada como uma ferramenta analítica em vários campos da ciência e tecnologia. Por exemplo, o sistema de vaga-lumes é universalmente usado como um método acurado para medidas de ATP, as fotoproteínas Ca^{2+} dependentes são amplamente usadas no monitoramento intracelular de cálcio que regula vários processos biológicos importantes, a proteína fluorescente verde (GFP) é utilizada como uma marcadora altamente eficiente no campo das pesquisas biomédicas. Todas essas aplicações são derivadas de longos anos de estudos que focaram o entendimento do fenômeno bioluminescente, que apesar disso, apresentam ainda muitas questões em aberto.

1.2.2. Diversidade biológica e funcional

1.2.2.1. Organismos marinhos

A maioria dos organismos bioluminescentes se encontra nos oceanos; dos 700 gêneros que contêm espécies luminescentes, 80% são marinhos. Espécies bioluminescentes são distribuídas nos grandes filos, de bactérias a peixes. Em alguns filos, uma substancial porcentagem de gêneros é luminosa (cnidária, cefalópodes ~50%,) enquanto em outros (diatomáceas e quetognatas) poucos são os representantes (HASTINGS, 2001; WIDDER, 2010). Esses organismos são encontrados nas mais variadas regiões, dos pólos aos trópicos, em águas superficiais ou profundas (HADDOCK et al., 2010) e usam a emissão de luz para as mais variadas funções, em geral para comunicação biológica, defesa ou dispersão (HASTINGS, 2001). A diversidade não está limitada apenas aos aspectos ecológicos, mas também aos aspectos anatômicos, fisiológicos e bioquímicos. Alguns animais têm órgãos luminosos altamente desenvolvidos que se assemelham a olhos e estão sob controle do sistema nervoso (peixes e lulas). Em outros, cada célula fotogênica contém todos os componentes para emissão de luz (bactérias e fungos), outros ainda liberam os reagentes bioluminescentes diretamente na água (moluscos). A reação bioluminescente também é bastante diversificada, podendo ser do tipo luciferina-luciferase ou utilizando uma fotoproteína e GFP. Luciferina é o nome genérico do substrato que gera luz mediante oxidação em qualquer reação bioluminescente. Há uma grande variação na estrutura da luciferina para diferentes organismos (figura 1). Uma luciferina comum em ambientes marinhos é a Celenterazina, uma imidazolpiridazinona (figura 1A) que foi descoberta primeiramente em celenterados, mas também está presente em peixes, moluscos e protozoários. Em alguns organismos marinhos a luciferina aparentemente é associada firmemente a outra proteína dependente de Ca^{+2} , formando um complexo estável que recebe o nome de fotoproteína. Além disso, alguns

organismos emitem luz verde devido à presença de uma proteína fluorescente verde (GFP). Nestes organismos a energia produzida por uma fotoproteína ou pelo sistema celenterazina-luciferase é transferida à molécula GFP resultando na emissão de luz verde (SHIMOMURA, 2005, 2006).

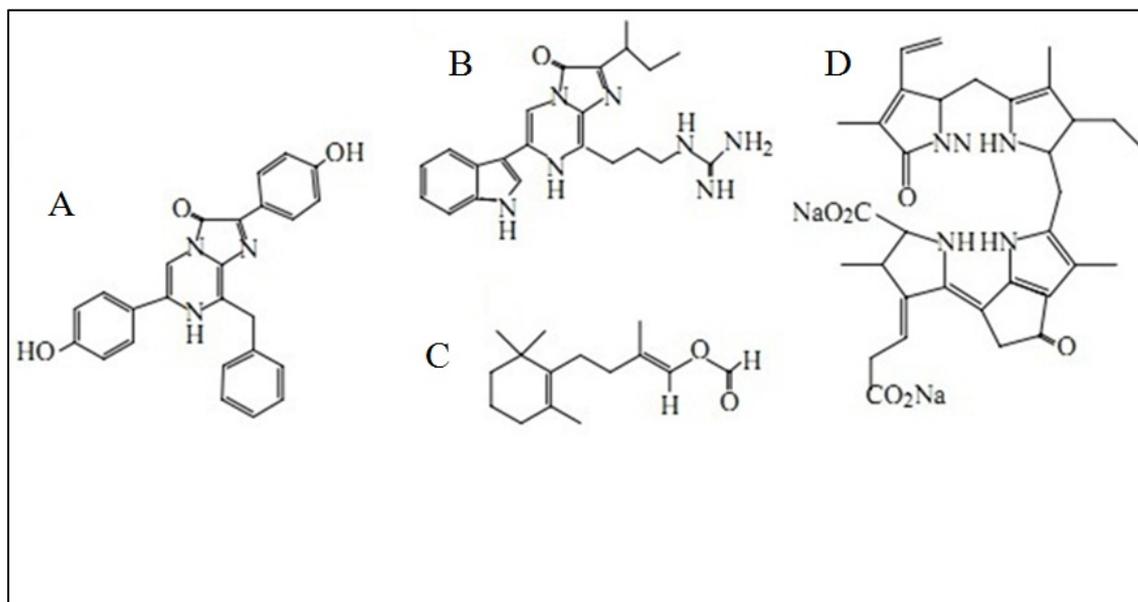


Figura 1. Estrutura de diferentes luciferinas presentes em organismos bioluminescentes marinhos. (A) Celenterazina, (B) Luciferina do crustáceo *Vargula*, (C) Luciferina do anelídeo *Diplocardia*, (D) Luciferina de dinoflagelados (REES et al., 1998).

Em bactérias, que podem ser de vida livre ou simbiontes (TU, 2004), a reação luminescente envolve a oxidação de uma riboflavina reduzida (FMNH_2) e um aldeído de cadeia longa pelo oxigênio molecular. O espectro de emissão apresenta um pico em aproximadamente 490 nm. A luciferase de bactérias é classificada como monooxigenase flavina-dependente (AST et al., 2007) e consiste de um heterodímero com as subunidades (α e β) codificadas pelos genes *lux A* e *lux B*, respectivamente (TU, 2004). *Vibrio harveyi*, *V. fischeri*, *Photobacterium phosphoreum* (figura 2A) são exemplos de 3 espécies marinhas intensivamente estudadas (BOURGOIS et al., 2001; Tu, 2004)

Um dos fenômenos bioluminescentes marinhos mais impressionantes e evidentes é o dos dinoflagelados (figura 2B) que contribuem para a chamada “fosforescência marinha” geralmente vista a noite quando a água do mar é agitada. Os dinoflagelados emitem flashes na faixa de 474-476 nm a partir de organelas especializadas chamadas *scintillons*, formadas por projeções citoplasmáticas para dentro de vacúolos (NICOLAS et al., 1987). Estes *scintillons* contêm os três componentes necessários para emissão de luz: luciferase, luciferina e uma proteína ligadora de luciferina (HASTINGS; DUNLAP, 1986). Funções como coloração aposemática ou sinal de alarme são atribuídos a bioluminescência em dinoflagelados (ABRAHAMS; TOWNSEND, 1993).

O subfilo Crustacea possui vários grupos de organismos bioluminescentes (figuras 2 I, J) como os representantes da subclasse Ostracoda e Copepoda e os da ordem Anphipoda e Decapoda (HERRING, 1985; BRUSCA; BRUSCA, 2007). A subclasse Ostracoda inclui gêneros *Cypridina* e *Pyrocypris* (Cypridinidae) e *Conchoecia* (Halocypridae) (HERRING, 1985; OBA et al., 2004a). Atualmente *Cypridina hilgendorffii* Muller é a espécie de ostracoda bioluminescente mais importante e bem conhecida. É um organismo pequeno de aproximadamente 2 mm, com formato oval (figura 2I) e emite luz azul. É abundante em águas rasas ao redor do Japão e Sul da Ásia e sua luciferase tem sido amplamente usada como biomarcador celular (NAKAJIMA et al., 2004; WU et al., 2009). Nos crustáceos, a reação bioluminescente é basicamente do tipo luciferina-luciferase, que requer somente três componentes: luciferina (celenterazina), luciferase e oxigênio molecular (SHIMOMURA, 2006).

Dentre os Cnidaria, três classes possuem espécies bioluminescentes. O exemplo mais conhecido é o Hydrozoa *Aequorea aequorea* (figura 2 E) que contém uma fotoproteína e emite luz na presença de Ca^{+2} (CHALFIE, 1995; HADDOCK, et al., 2005) geralmente acompanhada pela proteína fluorescente verde. As outras duas classes de Cnidaria também possuem espécies

bioluminescentes: Scyphozoa, com as conhecidas águas-vivas, incluem os gêneros *Pelagia*, *Periphylla* (figura 2 D) e *Atolla*. Em *Pelagia* o sistema envolve uma fotoprotéina cálcio sensível (MORIN; REYNODS, 1972), porém, em *Periphylla* a luz é emitida por uma reação luciferina-luciferase na presença de oxigênio (SHIMOMURA; FLOOD, 1998), similar aos representantes da classe Anthozoa (MIYAWAKI, 2002; SHIMOMURA; JOHNSON, 1975).

Em Mollusca (figura 2 F), a bioluminescência ocorre em uma grande variedade de organismos das principais classes. Em gastrópodos, a reação ainda não é bem estabelecida, mas acordo com Shimomura (2006), somente com a presença de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ a reação produz um significativo nível de luz, sugerindo que uma espécie ativa de oxigênio, como o ânion superóxido, pode estar envolvida no sistema bioluminescente destes organismos. Os Bivalvia são historicamente importantes uma vez que o conceito de luciferina-luciferase foi estabelecido por Dubois (1887) a partir de estudos com um bivalvia do gênero *Pholas* (SHIMOMURA, 2006). Os Cephalopoda possuem vários gêneros de grande interesse bioquímico, alguns usam o sistema luciferina-luciferase e outros usam um sistema luminescente tipo fotoproteína (MATSUI, et al., 1988).

O representante bioluminescente mais conhecido dos Anelida é o *Chaetopterus* (figura 2H) um poliqueta de aparência bizarra que vive dentro de tubos em forma de U geralmente enterrado na areia e emite *flash* de luz através de vários segmentos do corpo (HERRING, 1978, 1987; OSBORN et al., 2007). O sistema luminescente desses organismos ainda não está bem estabelecido, provavelmente usam oxigênio molecular na reação, porém, o sistema luciferina-luciferase é negativo (SHIMOMURA, 2006).

Todos os peixes bioluminescentes são marinhos, tanto os grupos de águas costeiras rasas quanto de mares profundos (figura 2 L). A maioria do primeiro grupo utiliza bactérias luminescentes como fonte de luz, como os *Anomalops* (MORIN et al., 1975) e *Photobelpharon*

(HANEDA; TSUJI, 1971). Por outro lado, a maioria dos peixes de águas profundas é luminescente e provavelmente utiliza celenterazina na reação (SHIMOMURA, 2006).

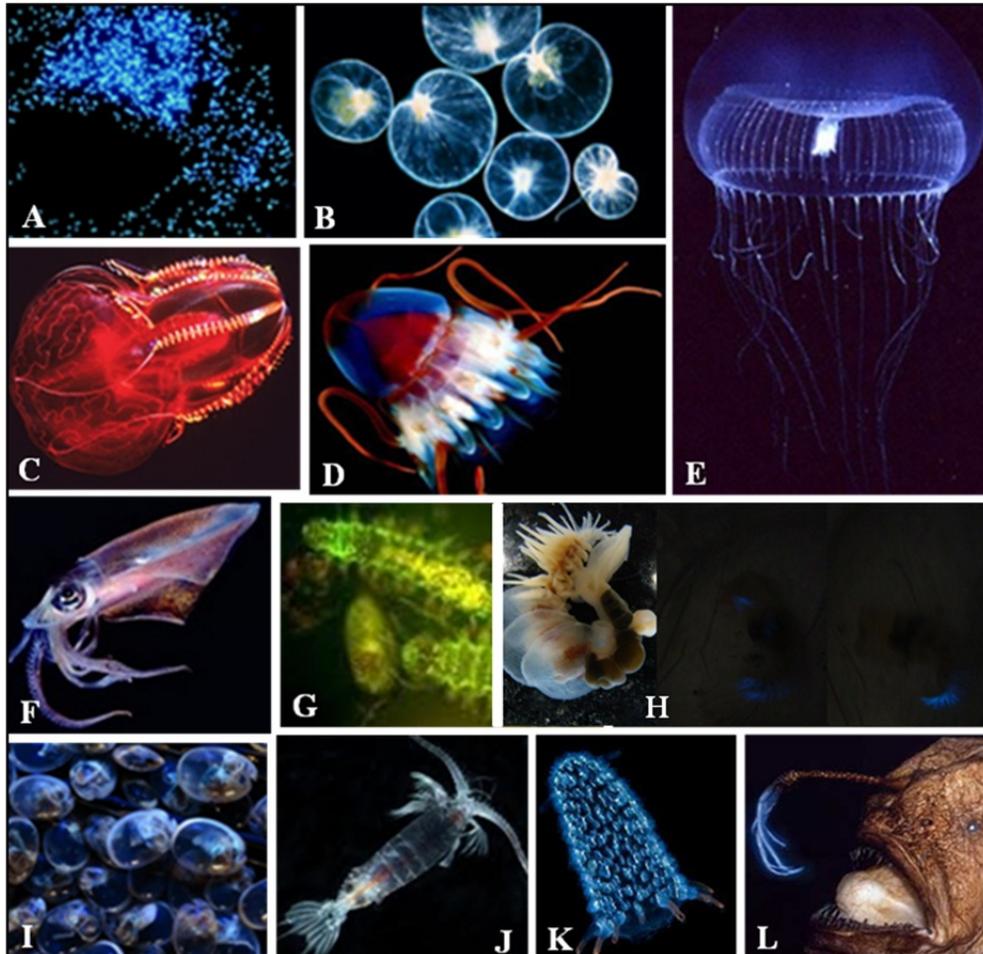


Figura 2. Exemplos de organismos bioluminescentes marinhos. (A) Bactérias: *Photobacterium*, (B) Dinoflagelados: *Noctiluca*, (C) Ctenóforo: *Deiopea*, (D) Cnidário: *Periphylla*, (E) Cnidário: *Aequorea*, (F) Molusco: *Abraliopolis*, (G) Anelídeo: *Odontosyllis*, (H) Anelídeo: *Chaetopterus*, (I) Crustáceo: *Cipridina*, (J) Crustáceo: *Gaussia*, (K) Tunicado, (L) Cordado: *Cryptosaras*. Autoria: A: American Society for Microbiology, B: Jolanda Iperen, C, D, E, F: Steve Haddock, H: Vadim Vivani, G, I: Paul A. Zahl, J: Solvin Zankl, K, L: Edith Weidder.

1.2.2.2. Organismos terrestres

Os organismos bioluminescentes terrestres são representados por bactérias, fungos, anelídeos, quilópodes e insetos (figura 3A-F).

A luminescência em fungos é conhecida desde Aristóteles (384-322 a.C) e Plínio (23-79 a.D), porém, apesar de longo tempo de estudo a reação bioluminescente ainda não está totalmente estabelecida, mas apresenta algumas similaridades com o sistema de bactérias (OLIVEIRA; STEVANI, 2009).

A classe dos insetos é a mais rica e mais diversa com espécies bioluminescentes encontradas em Collembola, Diptera e principalmente em Coleoptera (LLOYD, 1983; VIVIANI, 2002).

Nos dípteros a bioluminescência ocorre apenas em Mycetophilidae (*Arachnocampa*) e Keroplatinae (*Orfelia*, *Keroplatus*) (VIVIANI et al., 2002; Meyer-ROCHOW, 2007; BAKER et al., 2008). As larvas são carnívoras e usam a bioluminescência para atrair suas presas. O exemplo mais conhecido é o das larvas de *Arachnocampa luminosa* (figura 3 E) que habitam cavernas de Waitomoo na Nova Zelândia. Estas se penduram em teias por elas construídas no teto das cavernas as quais capturam insetos voadores atraídos pela luminescência azulada (MEYER-ROCHOW, 2007). A emissão de luz se dá através de lanternas derivadas da porção terminal dos túbulos de Malphigi. A bioquímica da reação bioluminescente foi preliminarmente estudada em *Arachnocampa* por Shimomura et al., (1966) e por Lee (1976) que demonstraram a dependência por oxigênio e MgATP e determinaram o espectro que culmina na faixa do azul (488 nm). Apesar da dependência de oxigênio e MgATP semelhante ao sistema de vaga-lumes, não foi encontrada nenhuma reação cruzada entre os dois grupos. Viviani et al., (2002) conseguiram separar a luciferina e luciferase dessas larvas. A luciferase é uma enzima relativamente pequena de 36 kDa, porém ainda pouco se conhece como exatamente o ATP ativa o sistema.

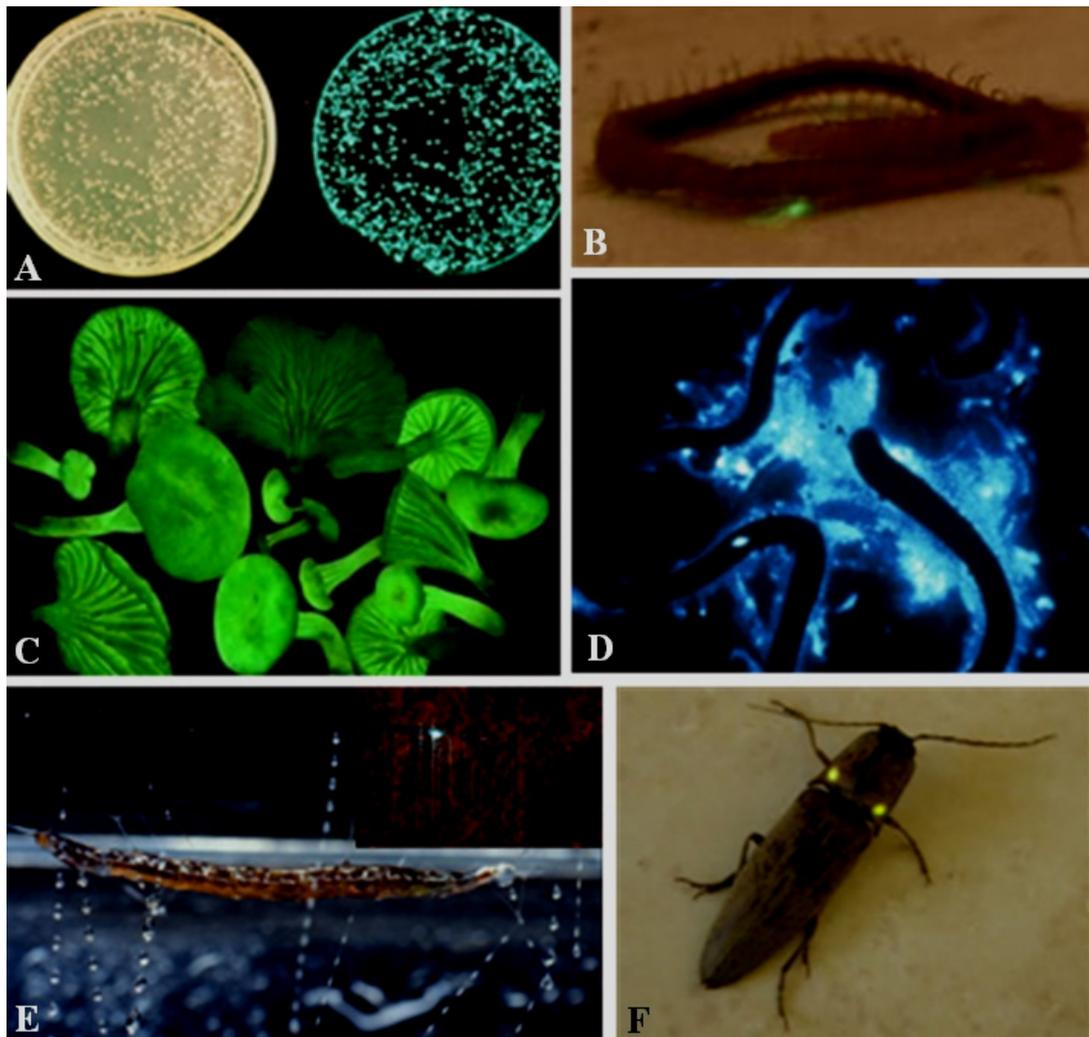


Figura 3. Exemplos de organismos bioluminescentes terrestres. (A) Bactérias: *Vibrio*, (B) Chilopoda: *Orphaneus*, (C) Fungos, (D) Anellida: *Diplocardia*, (E) Diptera: *Archnocampa*, (F) Coleoptera: *Pyrophorus*.

1.2.3. Bioluminescência em coleópteros

Coleoptera é a ordem mais rica e variada da Classe Insecta com mais de 350.000 espécies descritas, correspondendo a 40% do total dos insetos (COSTA, 2003).

De acordo com algumas características morfológicas, a fauna mundial dos coleópteros pode ser agrupada em quatro subordens: Archostemata, Myxophaga, Adephaga e Polyphaga (LAWRENCE; NEWTON, 1982). Dentro da subordem dos Polyphaga, a superfamília

Elateroidea inclui as principais famílias de insetos luminescentes: Lampyridae, Elateridae e Phengodidae (figura 4) (COSTA, 2003).

A família Lampyridae possui aproximadamente 1.800 espécies descritas (LLOYD, 1971) e são conhecidos como vaga-lumes que na fase adulta emitem flashes por meio de lanternas ventrais com função de atração sexual (LLOYD, 1983). Todas as larvas nesta família também são bioluminescentes, porém, a função desta pode estar relacionada com a defesa do organismo (SIVINSKY, 1981). Diferentes espécies de vaga-lumes apresentam variações no espectro de emissão de acordo com o período em que são ativos. As espécies ativas durante o crepúsculo em geral emitem bioluminescência amarela e as espécies noturnas emitem na faixa do verde (LALL et al., 1980).

A família Elateridae é representada por aproximadamente 9.000 espécies descritas (COSTA et al., 1988). Apenas cerca de 200 destas, pertencentes à subfamília Agrypinae, são luminescentes. Na fase adulta estes insetos emitem luminescência contínua na região do verde através de duas lanternas dorsais protorácicas quando são perturbados, além de luz contínua na faixa verde-alaranjada também contínua através de órgãos abdominais enquanto o inseto voa (BECHARA, 1988). Nestes insetos a luminescência está relacionada com a corte em adultos e no estágio larval pode estar associada à defesa, além de atração de presas, como o caso das larvas de *Pyrearinus termitilluminans* que habitam as galerias dos cupinzeiros da região central do Brasil e durante a noite se posicionam na superfície dando origem ao fenômeno dos cupinzeiros luminosos (REDFORD, 1982; BECHARA, 1988).

Os membros da família Phengodidae, conhecidos como larvas trenzinhos, apresentam a mais exuberante bioluminescência entre os coleópteros. As fêmeas desta família são neotênicas, ou seja, apresentam aparência de larva, mas são sexualmente maduras. As fêmeas e as larvas possuem lanternas puntiformes laterais ao longo do corpo que emitem luz na faixa do verde ao laranja, além de lanternas na cabeça que emitem luz na faixa do verde-amarelo ao

vermelho, dependendo da espécie, como as espécies de *Phrixotrix* que emitem luz vermelha (VIVIANI; BECHARA, 1993, 1997). Em Phengodini, com exceção dos *Pseudophengodes* (VIVIANI; BECHARA, 1997), os machos adultos não apresentam luminescência e a função da bioluminescência nesta tribo não é bem compreendida. Os machos nesta família possuem antenas plumosas bem elaboradas e é provável que encontrem suas parceiras por meio de feromônios sexuais que estas exalam, assim a bioluminescência nestes insetos possui uma função secundária (TIEMANN, 1967). Em Mastinocerini a função das lanternas laterais está associada à defesa, pois o inseto quando é perturbado emite luz na região verde-amarela, uma faixa espectral visível para a maioria dos animais terrestre (VIVIANI; BECHARA, 1997). A bioluminescência vermelha por meio das lanternas cefálicas de *Phrixotrix* spp pode estar relacionada com a iluminação durante a caça de presa, uma vez que esta é usada continuamente quando o animal se desloca durante a noite (SIVINSKY, 1981; VIVIANI; BECHARA, 1997). Provavelmente estes fengodídeos passam despercebidos por predadores e por presas, uma vez que a maioria dos organismos é insensível a esta região do espectro (VIVIANI; BECHARA, 1997).

A bioluminescência nos coleópteros é gerada por órgãos especializados (BUCK, 1948). No caso mais primitivo os órgãos fotógenos consistem de simples células gigantes originárias provavelmente de enócitos, sem aparente controle nervoso (BASSOT, 1974). Nos casos mais complexos, encontrados em adultos de vaga-lumes lampirídeos, as lanternas consistem em um conjunto de milhares de fotócitos interpenetrados por uma vasta rede de traquéias, traquéolas e ramificações nervosas (GHIRANDELA, 1998). Nos fotócitos a luciferina é encontrada na forma de grânulos altamente fluorescentes no interior do citoplasma (SMALLEY et al., 1980) enquanto a luciferase está associada aos peroxissomos (HANNA et al., 1976). Todas as espécies de coleópteros bioluminescentes emitem luz durante o estágio larval, porém, nem todas essas larvas mantêm a bioluminescência na fase adulta. Em larvas de lampirídeos os

fotócitos são originados do corpo gorduroso, mais especificamente dos trofócitos (VIVIANI et al., 2008; TONOLLI et al., 2011).

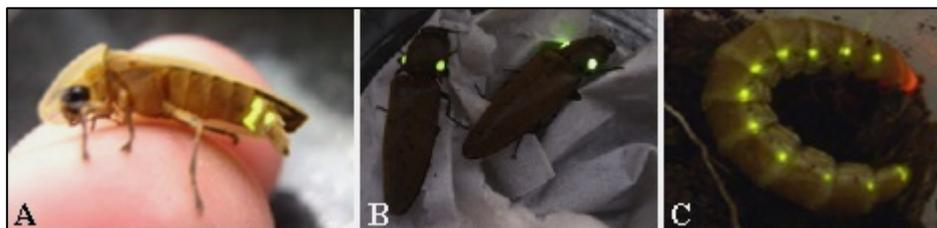


Figura 4. Famílias de coleópteros bioluminescentes. (A) Lampirídeo: *Cratomorphus concolor*, (B) Elaterídeo: *Pyrophorus divergens*, (C) Fengodídeo: *Phrixotrix hirtus*.

1.2.4. Mecanismo da bioluminescência dos coleópteros

O mecanismo de bioluminescência terrestre mais bem estudado é o de vaga-lumes. O substrato usado na reação é a D-luciferina, um composto benzotiazólico comum às espécies de lampirídeos, elaterídeos e fengodídeos (COLEPICOLO et al., 1986; VIVIANI; BECHARA, 1993). A luciferase catalisa a oxidação da luciferina na presença de ATP, Mg^{2+} e O_2 , produzindo luz em uma reação de duas etapas (McELROY; DELUCA, 1978). Na primeira etapa a luciferina é adenilada à custa de ATP formando adenilato de luciferina com a liberação de pirofosfato (figura 5A). Na segunda etapa, o adenilato de luciferina é oxidado (figura 5B) produzindo uma díoxetanona que rapidamente se cliva gerando dióxido de carbono e oxiluciferina em um estado singlete (figura 5C) eletronicamente excitado que decai emitindo um fóton de luz visível (figura 5D).

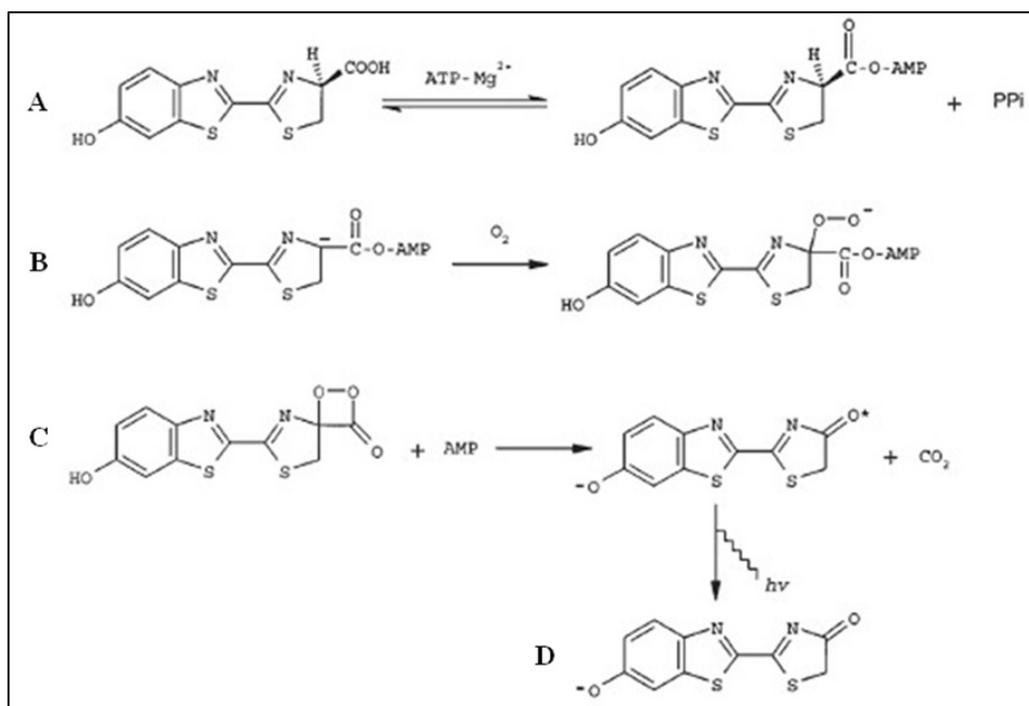


Figura 5. Etapas da reação bioluminescente catalisada pela luciferase de coleópteros. (A) Inicialmente, a luciferina, ATP-Mg^{2+} e luciferase formam um complexo ternário levando a adenilação da luciferina (adelinato de luciferina) e liberação de pirofosfato, (B) em seguida este adenilato de luciferina é oxidado, (C) levando a formação de um peróxido cíclico que se cliva com a formação de CO_2 e oxiluciferina excitada, (D) que decai emitindo um fóton de luz visível (cf, DAY, et al., 2004).

1.2.5. Mecanismos de modulação do espectro de bioluminescência

A faixa de cores emitida pelos coleópteros constitui importante adaptação da bioluminescência em diferentes ambientes fóticos e para diversas funções biológicas (atração sexual, defesa, iluminação). Os lampirídeos emitem flashes de luz que variam do verde ao amarelo (SELIGER; MCELROY, 1964; BIGGLEY et al., 1967), os elaterídeos emitem luz contínua na faixa do verde-laranja (COLEPICOLO et al., 1986) e os fendodídeos na faixa do verde ao vermelho (VIVIANI; BECHARA, 1993; VIVIANI; BECHARA, 1997). Uma vez que o substrato luciferina é o mesmo nas três famílias, a variedade dos espectros de emissão é atribuível a diferentes estruturas das luciferases que determinam o ambiente físico-químico do

sítio ativo em torno do emissor (WOOD, 1995; VIVIANI, 2002). Baseados em estudos teóricos e observações experimentais, diferentes mecanismos foram propostos para explicar as variações de cores em coleópteros:

- 1) *Tautomerização ceto-enólica da oxiluciferina*. De acordo com mudanças de cores emitidas por luciferases de vaga-lumes em diferentes pH, foi proposto que a forma ceto da oxiluciferina no estado excitado pode relaxar emitindo luz vermelha, enquanto que a forma enol da oxiluciferina emite luz verde-amarela (WHITE et al., 1971). Portanto, a cor resultante dependeria do equilíbrio tautomérico ceto-enólico da oxiluciferina (figura 6A). Porém, foi demonstrado recentemente que a emissão de diferentes cores é dependente somente da forma ceto da oxiluciferina (HIRANO et al., 2009).
- 2) *Mecanismo de transferência de carga por torção intramolecular*. McCapra et al. (1994) propuseram que a forma ceto é suficiente para a emissão de cor verde e vermelha e que a variação da cor está associada a torção dos anéis tiazólicos ao redor dos carbonos $N=C-C=N$ dos anéis tiazólicos da oxiluciferina. Em um extremo, a emissão vermelha é atribuída a uma conformação relaxada de energia mínima com ângulo de 90° entre a ligação $C2-C2'$ e a emissão verde de uma conformação de alta energia com ângulo menor que 90° (figura 6B). Desta forma, a geometria do sítio ativo determinaria as cores de bioluminescência.
- 3) *Grau de ressonância da oxiluciferina excitada*. Branchini et al. (2004) sugeriram que a modulação da cor está baseada na ressonância do estado excitado da oxiluciferina. O estado excitado $-N=C-C=N-$ relaxaria emitindo luz verde e outro com ligação $=N-C=C-N=$ emitiria luz vermelha (figura 6C).
- 4) *Polarização do microambiente da oxiluciferina*. Nesta hipótese, emissão deslocada para o vermelho é dependente de uma maior polaridade do sítio ativo (DeLUCA, 1969; UGAROVA; BROVKO, 2001).

- 5) *Conformação da cavidade da luciferase.* Nakatsu et al. (2006) propuseram um mecanismo controle das cores baseado no tamanho da cavidade da enzima. Neste caso, uma forma não relaxada da oxiluciferina ceto deveria emitir luz verde-amarela, ao passo que após o relaxamento deveria emitir luz vermelha. Este relaxamento seria controlado pela cavidade da luciferase.
- 6) Mais recentemente, Viviani et al. (2008), baseado nas propostas 1, 2, 4 e 5, além de observações experimentais, sugeriram que a conformação do sítio ativo da luciferase, inclusive do lado do anel benzotiazólico da oxiluciferina, afetaria a polaridade do mesmo e conseqüentemente o espectro (figura 6D). Uma conformação fechada influenciada pela rigidez e hidrofobicidade do microambiente catalítico seria responsável pela bioluminescência verde- amarela.

Apoiando a hipótese anterior (6), Hirano et al. (2009) baseados em estudos espectroscópicos sugeriram que um compromisso entre grau de basicidade de algum resíduo de aminoácido ao redor do grupo fenolato da oxiluciferina e a polaridade do microambiente determinariam toda a faixa de cores encontradas em luciferases de besouros.

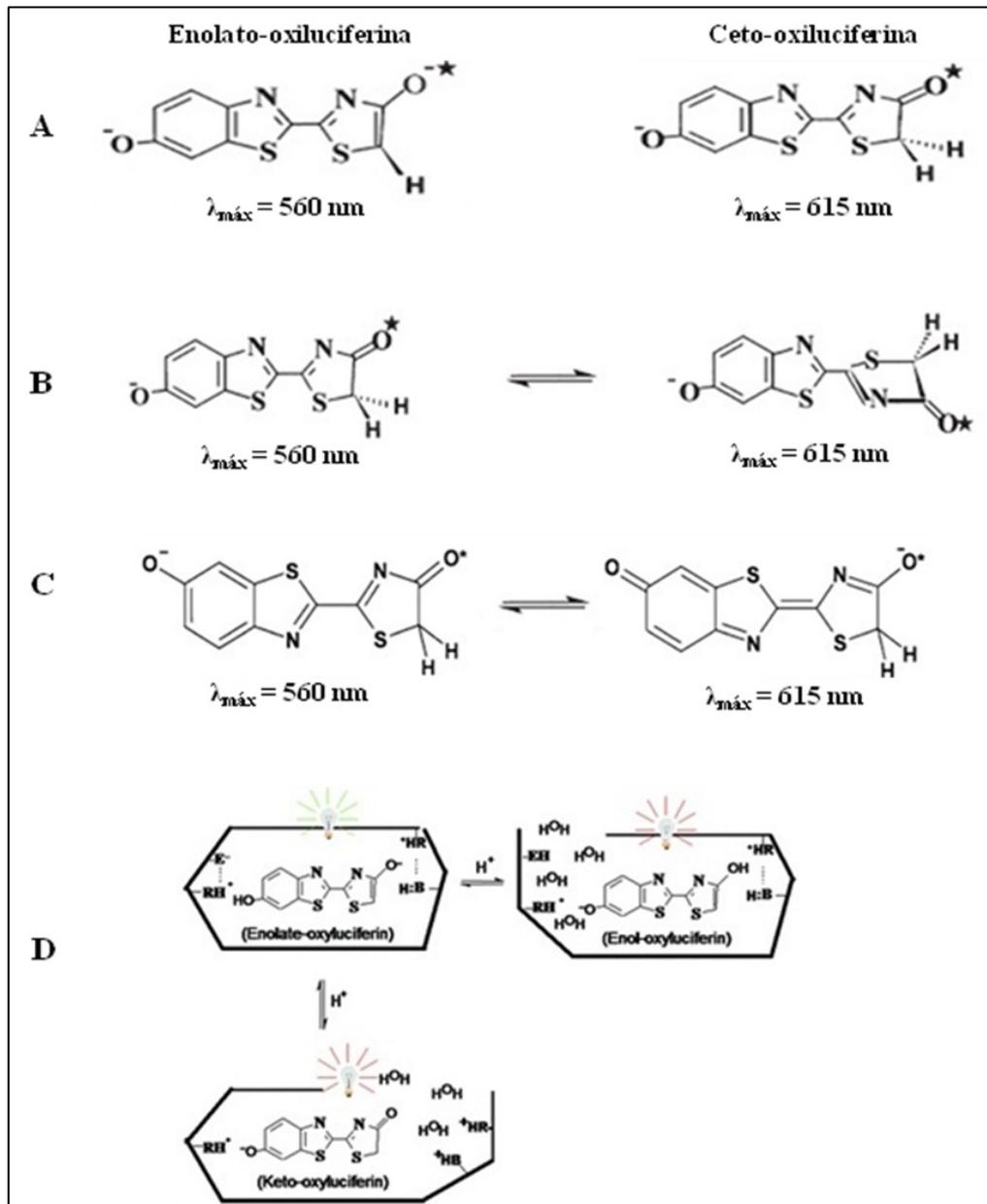


Figura 6. Mecanismos propostos para a modulação de cores em bioluminescência de coleópteros. (A) Tautomerização ceto-enólica da oxiluciferina, (B) Transferência de carga por torção intramolecular, (C) Conformação da oxiluciferina excitada, (D) Conformação do sítio de ligação da luciferina.

1.2.6. Estrutura tridimensional da luciferase de coleópteros

A luciferase de vaga-lumes consiste de um monômero cataliticamente ativo de 62 kDa (DeWET et al., 1985) com cerca de 550 resíduos de aminoácidos. A estrutura tridimensional da luciferase do lampirídeo americano *P. pyralis* foi resolvida a 2,0Å na ausência de substrato (CONTI et al., 1996). A molécula possui dois domínios distintos, um domínio N-terminal conectado por um *loop* flexível a um domínio menor C-terminal (figura 7A e B). O domínio N-terminal possui três subdomínios: um barril- β antiparalelo (subdomínio C) e duas folhas β flanqueadas por hélices α formando uma estrutura $\alpha\beta\alpha\beta$ (subdomínio A e B). O domínio C-terminal é composto de uma estrutura $\alpha+\beta$. As superfícies N-terminal e C-terminal formam um sulco, provavelmente o sítio ativo, onde são encontrados vários resíduos conservados. Durante a bioluminescência, a luciferase provavelmente sofre uma mudança de conformação considerável e os domínios N e C terminal se aproximam o suficiente para se ligarem ao substrato (CONTI et al., 1996).

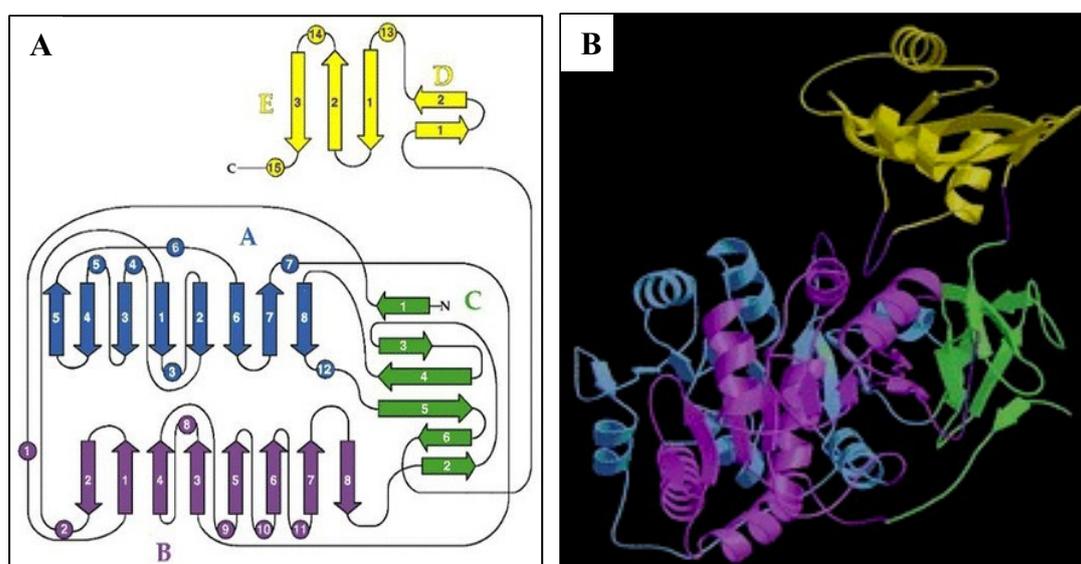


Figura 7. Estrutura tridimensional da luciferase de *Photinus pyralis* resolvida na ausência de substratos. (A) O domínio N-terminal: subdomínio A em Azul, subdomínio B em lilás e C em verde, e o domínio C-terminal em amarelo, (B) Diagrama topológico da luciferase (CONTI et al., 1996).

Posteriormente Nakatsu et al. (2006) determinaram a estrutura tridimensional da luciferase do vaga-lume japonês *Luciola cruciata* complexada com DLSA - um análogo do adenilato de luciferina, com MgATP e com a oxiluciferina. Essa nova estrutura complexada mostrou alguns resíduos do sítio ativo importantes para a ligação com o substrato. A estrutura mostra que o DLSA está localizado em uma região hidrofóbica composta pelos resíduos de aminoácidos da hélice $\alpha 8$ (248-260), fitas $\beta 12$ (286-289), $\beta 13$ (313-316), $\beta 14$ (339-342), $\beta 15$ (351-353) e um *loop* (343-350), enquanto a entrada da região é bloqueada pela porção adenosina do DLSA. A porção benzotiazólica do DLSA está em contato com as cadeias laterais de Phe249, Thr253, Ile288, Ala350 e com a cadeia principal das regiões $\beta 13$ e $\beta 14$. Uma molécula de água faz uma ligação de hidrogênio com N31 do DLSA (2,83Å) e ao oxigênio γ da Ser349(2,7Å).

Essa estrutura simula as três etapas do processo catalítico com as alterações conformacionais das cadeias laterais dos resíduos do sítio ativo. Na estrutura resolvida com DLSA, o sítio ativo da luciferase apresenta-se numa conformação mais fechada, onde a fita $\beta 12$ aproxima-se do sítio de ligação da oxiluciferina principalmente o $C\alpha$ da cadeia lateral da Ile288. Esta diferença de conformação parece ser devido a alteração na rede de ligações de hidrogênio envolvendo as cadeias laterais dos resíduos S286, onde no complexo luciferase(WT)-AMP-oxiluciferina a cadeia lateral da Ser 286 faz uma ligação de hidrogênio com Glu313 enquanto na estrutura luciferase(WT)-DLSA essa ligação não está presente. No lugar desta, a Ser 286 do complexo Luciferase-DLSA forma ligação de hidrogênio com Tyr257 e Asn231 via molécula de água. Estas mudanças conformacionais são acompanhadas de uma rotação da cadeia lateral da F249 em direção ao anel benzotiazólico da DLSA que está firmemente estabilizado dentro desse sulco hidrofóbico com as cadeias laterais de I288, F249, A350 e G341. Na estrutura resolvida de um mutante S286N complexado com DLSA observa-

se que este não possui a alteração conformacional que gera a forma mais fechada do sítio ativo e com isso o espectro é deslocado para o vermelho (NAKATSU et al., 2006).

1.2.7. Origem e evolução da bioluminescência em insetos

As reações bioluminescentes de diferentes organismos diferem quanto a composição da luciferina, estrutura das luciferases e co-fatores envolvidos, indicando que a bioluminescência evoluiu independentemente muitas vezes (HASTINGS, 1995; 2001). Porém, a maneira como se originou em diferentes organismos ainda continua sendo uma das questões mais intrigantes da bioluminescência. Foi sugerido que a bioluminescência surgiu para desintoxicar o oxigênio molecular nas formas iniciais de vidas anaeróbicas quando o processo de fotossíntese começou a liberar oxigênio tóxico na atmosfera primitiva (SELIGER; MCLEROY, 1965). Uma hipótese alternativa é que as luciferases eram provavelmente oxigenases de funções mista e evoluíram a fim de utilizar o oxigênio molecular como um aceptor de elétrons na oxidação de compostos aromáticos acumulados durante a fase anaeróbica da evolução (SELIGER, 1975). Porém, embora as luciferases possuam a função de oxigenase, elas não apresentam homologia com as oxigenases clássicas indicando que as luciferases não se originaram a partir de oxigenases, como havia sido proposto originalmente (REES et al., 1998). Oxigenases são geralmente metaloproteínas com grupos protéticos e sem similaridade com luciferases em nível de estrutura primária. É mais provável que a função oxigenásica das luciferases tenha sido aperfeiçoada após a origem do fenótipo luminescente, sendo que a bioluminescência dirigiu a evolução de novas oxigenases e não o contrário (REES et al., 1998). Hastings (1983) sugeriu que a maioria das luciferases se originou mais tarde após o desenvolvimento da visão.

Com o advento da biologia molecular, o sequenciamento de luciferases de besouros mostrou que estas enzimas são homologas a AMP/CoA-ligases (SCHROEDER, 1989; SUZUKI et al., 1990; TOH, 1990; SCHOLTEN et al., 1991; BABBIT; KENYON, 1992; FUJINO; YAMAMOTO, 1992) que catalisam a adenilação de diferentes compostos carboxílicos e subsequente tioesterificação à Coenzima A levando a conclusão que as luciferases se originaram de AMP-ligases com alguma função metabólica por duplicação gênica (WOOD, 1995; VIVIANI, 2002).

Enzimas tipo-luciferase, com a capacidade de emitir luminescência fraca na presença de luciferina e ATP, foram encontradas em larvas não-luminescentes de *Tenebrio molitor* e outras larvas de coleópteros (VIVIANI; BECHARA, 1996). Sugeriu-se que estas ligases poderiam ser enzimas parálogas às luciferases muito semelhantes às protoluciferases que deram origem as luciferases de coleópteros. Além disso, elas poderiam catalisar a formação do adenilato de luciferina, que é espontaneamente quimioluminescente em meio aquoso alcalino, embora com baixo rendimento (VIVIANI; OHMIYA, 2006).

Em princípio, a ligase ancestral poderia catalisar a adenilação de luciferina que era um substrato natural ou adventício produzindo adenilato de luciferina. A síntese de adenilato de luciferina deve ter sido um passo chave no desenvolvimento da bioluminescência, pois testes mostraram que este composto apresenta uma fraca quimioluminescência em meio aquoso (VIVIANI, 2002). O próximo passo em direção ao desenvolvimento de um novo e eficiente sítio ativo da luciferase foi o alinhamento de um resíduo básico nas proximidades do próton C4 da luciferina para aumentar o rendimento químico da reação de oxigenase e quimioexcitação e para realçar a hidrofobicidade aumentando a emissão de luz (VIVIANI, 2002).

Genes homólogos a luciferases de vaga-lumes foram recentemente clonados de coleópteros *Agrypnus binodolus* e *Tenebrio molitor*, e também de *Drosophila melanogaster*, mostrando atividade de acil-CoA sintetase, o que sugere que as luciferases possam ter

evoluído de acil-graxo CoA sintetase após processos de duplicação gênica (OBA, et al., 2004b; 2006; 2008). Entretanto nenhum desses homólogos apresentou atividade luminescente.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que micelas e proteínas como a BSA, que tem sítios hidrofóbicos para compostos aromáticos, aumentam consideravelmente o rendimento de quimioluminescência vermelha do adenilato de luciferina em sistema aquoso (VIVIANI; OHMIYA, 2006).

Além disso, as luciferases devem ter coevoluído com a estrutura anatômica dos órgãos fotogênicos para produzirem diferentes padrões de luminescência (luz contínua ou flashes) e diferentes espectros (verde/vermelho) apropriados para diferentes meios fóticos e funções biológicas (VIVIANI, 2002).

1.2.8. Super-família das AMP/CoA-ligases

AMP-ligases são uma superfamília de enzimas que catalisam reações de ativação de substratos carboxílicos por adenilação à custa de ATP. Estas enzimas possuem motivos altamente conservados para a ligação de AMP. Esta família inclui as peptidil-sintetases encontradas em bactérias e fungos que catalisam a adenilação não ribossômica de aminoácidos e subsequente tioesterificação, as acil-CoA sintetases que catalisam a adenilação de ácidos graxos e ácidos aromáticos seguido de tioesterificação a CoA durante o metabolismo de lipídios, as cumarato CoA-ligases envolvidas com o metabolismos fenilpropanóide em vegetais e outros caminhos biossintéticos, e as luciferases de besouros (WOOD, 1995). Uma diversidade estrutural muito grande existe com relação aos substratos carboxílicos, mas apesar desta diversidade, estas enzimas usam o mesmo mecanismo dependente de ATP em dois passos (figura 8), o primeiro caracterizado pela formação de um acil-AMP intermediário (adenilato) com a liberação de pirofosfato e no segundo passo, o grupo acil é transferido para

um aceptor, que na maioria dos casos é um CoA e o AMP é liberado (BABBIT; KENYON, 1992; FUJINO; YAMAMOTO, 1992; DAY et al., 2009).

Estas enzimas estão presentes em diversos tipos de organelas celulares. As acil graxo-CoA sintetases são enzimas de membrana que se co-distribuem com outras proteínas de transporte de ácidos graxos (GARGIULO, et al., 1999; SCHMELTER, et al., 2004), são as primeiras enzimas da via da β -oxidação que catalisam a esterificação ou ativação de ácidos graxos de cadeia longa. As 4-cumarato:CoA ligases catalisam a ativação de vários ácidos hidroxicinâmicos para a biossíntese de monolignóis e outros metabólicos fenólicos secundários em plantas superiores (SCHNEIDER, et al., 2005; GUI et al., 2011). As clorobenzoato dehalogenases são importantes enzimas de bactérias com capacidade de biodegradação de poluentes entre os quais agrícolas (BABBITT; KENYON, 1992). Ácidos-graxo sintetases também participam de processos desintoxicantes em organismos superiores no qual xenobióticos se conjugam com aminoácidos após uma ativação via ligação tioéster entre o ácido carboxílico e CoASH fazendo com que se tornem menos ativos biologicamente (KNIGHTS; DROGEMULLER, 2000).

No caso das luciferases, diferentemente das outras enzimas citadas acima, no segundo passo, a função de tioesterificação é substituída pela função oxigenásica (figura 8) que culmina com a produção de luz (VIVIANI, 2002). As luciferases podem também catalisar a tioesterificação da CoA com o isômero L-luciferina e sua estereoconversão em D-luciferina, apesar do isômero L ser um forte inibidor competitivo da bioluminescência (NAKAMURA et al., 2005; VIVIANI et al., 2010).

Como as luciferases de vaga-lumes possuem similaridade de mecanismos de reação com as Acil-CoA sintetases de cadeia longa (LACS), uma nova aplicação da luciferase foi demonstrada. As LACS são envolvidas também no processo de dextrimerização de ácido 2-arilpropanóico. Este ácido e seu enantiômero, R ibrupofren, são compostos

farmaceuticamente importantes. A forma S é ativa como droga anti-inflamatória não esteróide (HUTT; CALDWELL, 1984) e sugere-se que a forma R possui atividade anti-câncer (MORIHARA et al., 2002). Kato et al. (2007) demonstraram que as luciferase exibem uma atividade enantioselectiva de formação de tioéster com a forma R do ácido 2-arilpropanóico em preferência a forma S na presença de MgATP e CoASH.

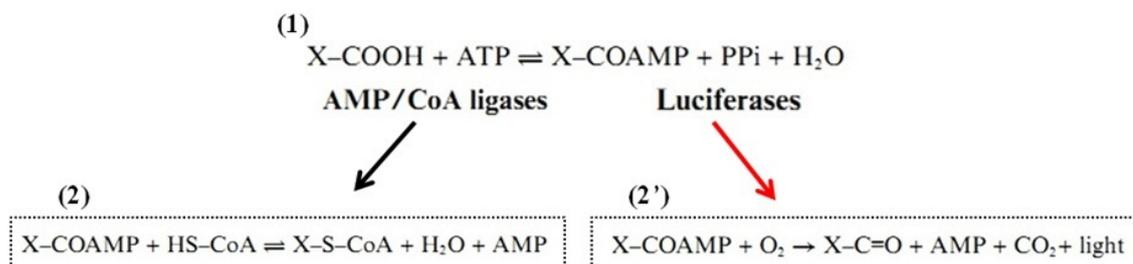


Figura 8. Reação catalisada pelas AMP-ligases. (1) Reação geral de adenilação, (2) Segundo passo comum a maioria das Acil-CoA ligases = Tioesterificação, (2') Segundo passo das luciferases de besouros = Oxigenação.

1.2.9. Aplicações biotecnológicas das luciferases

Instrumentos para medidas de emissão de luz fornecem respostas rápidas, são extremamente sensíveis e livres de interferências. Estas são algumas das razões que fazem da bioluminescência uma refinada ferramenta analítica aplicada em diferentes campos como ciências, análises clínicas e ambientais, indústrias alimentícia e farmacêutica, etc.

O sistema bioluminescente luciferina-luciferase de coleópteros é um dos mais amplamente utilizado em medidas de ATP para diferentes finalidades. Aplicações envolvendo medidas de ATP para monitoramento da biomassa, análise de contaminação microbiológica de fluidos biológicos, avaliação da viabilidade celular, testes enzimáticos envolvendo a geração ou degradação de ATP são alguns exemplos da aplicação direta das luciferases de vaga-lumes (VIVIANI, 2002).

Após a clonagem do cDNA de luciferases de vaga-lumes, surgiu um novo grupo de aplicações usando o gene da luciferase como um dos mais sensíveis genes repórteres de 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, 2011). Na área médica aplicações incluem o uso dos genes da luciferases para estudo de progressão e regressão viral e de bactérias (KOVACS; METTELNLEITER, 1991; ANDREU et al., 2010), avaliação não invasiva de proliferação e regressão tumoral em modelos animais (ZUMSTEG et al., 2010; HORST et al., 2011). Estas aplicações utilizam luciferases com espectro na região do amarelo e verde. Além dessas, luciferase de *Phrixotrix hirtus*, a única a ser clonada que emite luz naturalmente vermelha (NAKAJIMA et al., 2010; VIVIANI et al., 1999b) tem sido apropriadamente usada para estudos com tecidos de mamíferos outros tecidos ricos em pigmentos como hemoglobina que absorvem comprimento de ondas mais curtos (NAKAJIMA et al., 2010).

Mais recentemente, técnicas têm sido desenvolvidas para monitorar os padrões de expressão de múltiplos genes simultaneamente empregando-se luciferases verde e vermelha com um único substrato luminescente (KWON et al., 2010; NOGUCHI et al., 2010).

2. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

O mecanismo de bioluminescência de coleópteros é um dos mais compreendidos e suas luciferases mais bem estudadas. Isto faz com que este sistema seja um dos mais aplicados biotecnologicamente. Apesar disso, a origem evolutiva das luciferases ainda é uma questão enigmática. Sabe-se que as luciferases de coleópteros são derivadas de AMP-ligases, porém não se sabe como uma ligase adquiriu a função bioluminescente. Neste contexto, o presente projeto teve como objetivo a clonagem gênica e caracterização de enzimas tipo-luciferase pertencentes à família das AMP-CoA ligases de *Zophobas morio*, um coleóptero não bioluminescente. A caracterização de uma enzima com características de luciferase ancestral oferece bases para entender a origem estrutural da atividade bioluminescência das luciferases que além de ajudar a compreender o caminho evolutivo da bioluminescência, poderá ajudar na identificação de partes da estrutura enzimática que estão envolvidas com os mecanismos de modulação espectral das luciferases. Além da curiosidade científica, estas ligases poderão ser interessantes para aplicações biotecnológicas assim como são as verdadeiras luciferases.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia empregada está mostrada na figura 9:

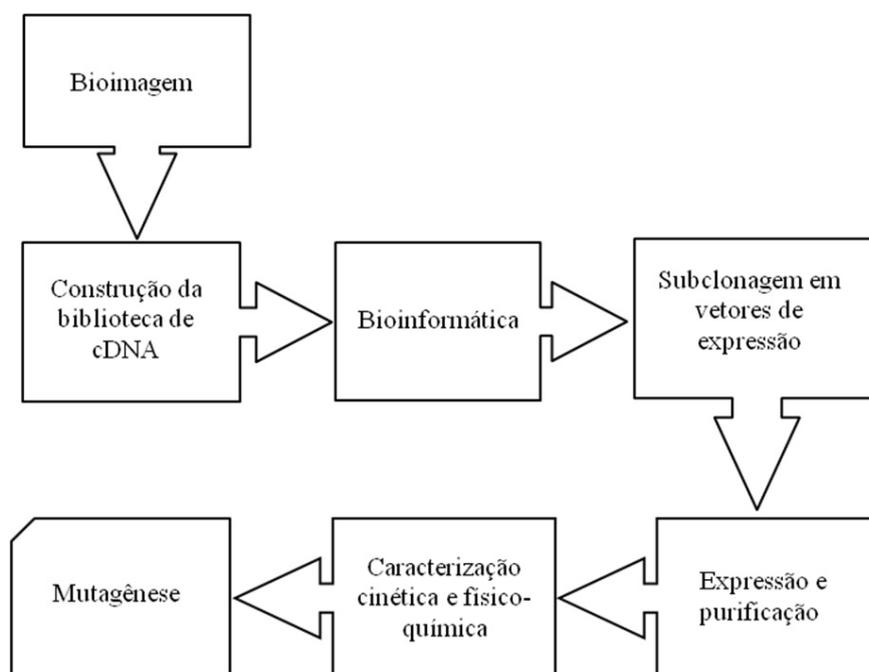


Figura 9. Esquema demonstrativo das principais etapas desenvolvidas neste trabalho.

3.1. Material biológico: Larvas de *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae) foram compradas em lojas de pesca ou pet shops ou criadas em nosso laboratório em terrários protegidos contra a incidência direta de luz e alimentados com farelo de arroz e farinha de trigo. Os primeiros exemplares para a criação foram cedidos pelo Biotério do Instituto de Biociências da UNESP/Rio Claro.

3.2. Imagem da bioluminescência e quimioluminescência em câmara de fotodeteção CCD: Imagens em câmara de fotodeteção foram obtidas em câmara CCD IVIS (Xenogen, CA) na universidade de Harvard ou em câmara LightCaptureII (ATTO, Tóquio) em nosso

laboratório. Larvas previamente anestesiadas com clorofórmio foram injetadas com 10 µL de D-luciferina 10 mM (diluída em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0) e após 20 minutos de incubação foram expostas na câmara Light Capture II. Larvas injetadas apenas com citrato foram usadas como controle. Diferentes tecidos (corpo gorduroso e túbulos de Malpighi) de larvas previamente injetadas com D-luciferina foram dissecados em Solução Fisiológica para Insetos e expostos ao sistema de captura separadamente.

3.3. Construção da biblioteca de cDNA: A construção da biblioteca de cDNA foi realizada em colaboração com prof. Vadim Viviani, de acordo com as técnicas abaixo:

3.3.1. Extração do RNA total: Túbulos de Malpighi de larvas de *Z. morio* foram isolados e macerados em Trizol (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante que é uma modificação do protocolo proposto por Chomczynsky e Sacchi (1987). Ao extrato obtido, foi adicionado clorofórmio e o RNA total isolado na fase aquosa. O RNA foi então precipitado com isopropanol para obtenção do *pellet*, lavado com etanol 75%, brevemente secado e dissolvido em água tratada com DEPC 0,1%.

3.3.2. Purificação do mRNA: O isolamento do mRNA foi realizado com o uso de látex Oligo-dT de acordo com o protocolo sugerido pela empresa fornecedora (Qiagen) e Sambrook et al. (1989). O RNA total foi desnaturado por aquecimento a 70°C e uma quantidade apropriada de resina com oligo-dT foi adicionada a amostra. O mRNA com sua cauda poli-A hibridizado com o oligotex foi então lavado com etanol 70% e eluído da resina em tampão de eluição pré-aquecido.

3.3.3. Síntese de cDNA e construção da biblioteca de cDNA: o cDNA foi sintetizado a partir do RNA mensageiro usando o kit da Stratagene (LaJolla,CA) seguindo o protocolo do fabricante. O cDNA foi inserido direcionalmente em vetor Uni-ZAP XR, que é particularmente apropriado para seleção de clones funcionais. Aproximadamente 50 ng de cDNA foram ligados em 1 µg de vetor. O processo de ligação foi feito durante a noite a 4° C. A reação de ligação foi empacotada com extrato de fagos GoldGigapack da Stratagene. A biblioteca na forma de fago foi então amplificada conforme protocolo da mesma empresa. O título da biblioteca original foi de $2,15 \times 10^5$ pfu.

3.3.4. Excisão *in vivo* da biblioteca para obtenção da forma plasmidial. Para a seleção de clones funcionais, optou-se por converter a biblioteca na forma de fago em plasmídeo pBlueScript, um processo chamado de excisão *in vivo*. Para isto, alíquotas da biblioteca na forma de fago foram misturadas com células *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' e com fago *helper* fl cujos produtos gênicos removem os braços do fago da biblioteca liberando a sequência correspondente ao plasmídeo pBluescript. Após transfecção em células bacterianas *E.coli* SOLR, colônias de bactéria contendo os plasmídeos circularizados foram selecionadas em meio seletivo com ampicilina e X-Gal usando o padrão de coloração branco (recombinantes) e azul (não recombinantes).

3.3.5. Screening de clones positivos por fotodeteção. Células de *E. coli* SOLR foram transfectadas com fagemídeo, plaqueadas em meio LB-canamicina (100 µg/mL) e mantidas a 37° C durante a noite. As colônias resultantes foram subseqüentemente transferidas com auxílio de filtro de nitrocelulose para placas com meio LB Ágar suplementado com ampicilina e IPTG 1 mM e mantidas a 20°C por 12 horas para indução de expressão protéica. O filtro foi

subsequentemente borrifado com luciferina 10 mM pH 5 e exposto em câmara CCD IVIS (Xenogen). Os clones positivos foram repicados em placa LB Agar-ampicilina e em seguida foi feita minicultura para extração de DNA plasmidial. As técnicas descritas acima foram realizada no laboratório do prof. Hastings da Universidade de Harvard. No Brasil foi feito um “screening” secundário para isolar os clones positivos. Considerando que nossa câmara CCD não tinha sensibilidade suficiente para detectar a emissão de luz *in vivo*, optamos expressar a enzima em meio líquido para extração da proteína e ensaio da atividade luciferásica em luminômetro com luciferina e MgATP. Células *E. coli* BL21/DE3 foram transformadas com o DNA plasmidial e plaqueadas em meio LB-ampicilina (100 µg/mL). Colônias resultantes foram inoculadas em meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL), crescidas a 37°C e induzidas com IPTG conforme item 3.5.1.

3.4. Técnicas gerais de biologia molecular

3.4.1. Preparação de células competentes: Uma colônia da linhagem de células de *E. coli* (XL-Blue ou BL21/DE3) cultivada em placa LB ágar com ampicilina (100 µg/mL) foi inoculada em 5 ml de meio LB líquido e incubada a 37°C sob agitação 225 rpm durante a noite. Desta pré-cultura 1 mL foi inoculado em 500 mL de meio SOB pH 7,0 que foram mantidos sob agitação de 225 rpm a 18°C até a cultura atingir absorvância entre 0,4 e 0,7 (OD₆₀₀). Após o crescimento, as células foram centrifugadas por 30 minutos a 4°C a 2.500g para separação do meio de cultura. O *pellet* resultante foi ressuspensão delicadamente em tampão TB estéril pH 6,8 (100 mL de tampão para 1 L de cultura) com o auxílio de um pincel de cerdas macias. Novamente submetido a centrifugação e ressuspensão nas mesmas condições. A última ressuspensão foi feita com tampão TB (15 mL/1000 mL de cultura) acrescido com 7 % de DMSO. Esta suspensão foi então subdividida em alíquotas de 50 µL e armazenada a -80° C.

Todas as etapas de ressuspensão foram executadas sob baixa temperatura utilizando-se caixa de gelo.

3.4.2. Transformação de bactérias: Amostras de 50 μ L de células competentes (XL-Blue ou BL21/DE3) e 5 μ L da biblioteca plasmidial foram misturadas em tubo de microcentrífuga gelado incubados por 30 minutos no gelo e submetidas a um choque térmico de 45 segundos a 42° C. Novamente a solução foi incubada no gelo por mais 2 minutos e subseqüentemente 200 μ L de meio LB líquido foram adicionados. Esta solução foi então mantida a 37°C em agitação a 225 rpm por 1 hora e posteriormente plaqueada em meio LB Ágar/Ampicilina (100 μ g/mL).

3.4.3. Extração de DNA plasmidial: Os clones, nos quais os insertos de interesse foram identificados, foram cultivados e o DNA plasmidial extraído utilizando-se o kit “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega), de acordo com os protocolos sugeridos pela empresa e por Sambrook et al. (1989). Colônias bacterianas XL1Blue foram cultivadas durante a noite em 5 mL meio de cultura LB/ampicilina (100 μ g/mL). Desta cultura, 1,5 mL foram centrifugados por 5 minutos a 4.000g para remoção do meio de cultura. O *pellet* resultante foi ressuspensão e as células foram lisadas em condições alcalinas extremas por 5 minutos (solução de ressuspensão e de lise, respectivamente). Para degradação das proteínas foi adicionado proteinase K por 5 minutos. Em seguida a solução foi neutralizada e ajustada para condições ótimas de ligação do DNA à membrana de purificação com solução neutralizante. Após a neutralização, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 12.000g em temperatura ambiente. O DNA plasmidial presente no sobrenadante foi então transferido a uma coluna de retenção e adsorvido seletivamente a resina. Esta coluna foi centrifugada por 1 minuto e após o fluxo da solução, a coluna foi lavada com etanol para remover as impurezas.

Após nova centrifugação o DNA, agora puro, foi eluído com água ultrapura estéril e armazenado a -20° C.

3.4.4. Eletroforese em gel de agarose: A análise de DNA (resultante de purificação, digestão e extração plasmidial, entre outros), foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% (peso/volume) em tampão TAE 1x corrida em 100 volts por 25 minutos e revelado por fluorescência do corante Blue Green (LCG Biotecnologia).

3.4.5. Sequenciamento de DNA: Os sequenciamentos foram inicialmente realizados pelo Laboratório Nacional de Luz Síncron (LNLS) em Campinas, no Instituto de Química da USP (São Paulo) por meio de reações terminadas com dideoxi nucleotídeos (método de Sanger) conforme sugerido pelo próprio laboratório, utilizando os *primers* M13 e M13 Reverse e um *primer* interno desenhado a partir da seqüência parcial do cDNA (ZOP1: 5' CGA TGA TAC CGC AGT CAT GTT C 3'). Para confirmação das mutações, os mutantes foram seqüenciados pelo mesmo método usando *kit* para seqüenciador automático ABI PRISM 377 (Perkin Elmer) utilizando os *primers*: **(Zop 1)** CGA TGA TAC CGC AGT CAT GTT C, **(Z2)**: GGA CTA CTG TCT ATT TTT CAC C, **(Z3)** CAG ACA TCG ATG ATA CCG CAG.

3.4.6. Subclonagem do cDNA da enzima tipo-luciferase em vetores de expressão: Com o objetivo de intensificar a expressão da enzima, o cDNA foi subclonando em vetor pTrcHisC (Invitrogen) e posteriormente em vetor pColdII (Takara) (figura 10). A digestão dos insertos e do vetor de expressão foi realizado com enzimas *EcoR* I (Promega), sendo o vetor posteriormente desfosforilado com fosfatase alcalina de camarão da mesma marca para maior eficiência da ligação. Após a digestão os fragmentos foram separados por eletroforese em gel

de agarose 1% e as bandas de interesse foram recortadas do gel e purificadas conforme 3.4.7. A reação de subclonagem foi feita com enzima T4 ligase (Promega) conforme protocolo sugerido pela empresa. Para a técnica de ligação uma solução de 4 μ L de vetor (100 ng), 4 μ L do cDNA, 1 μ L de tampão concentrado 10 X e 1 μ L de ligase foram incubados a 4°C por uma noite e subsequente a mistura usada para transformar células competentes XL 1Blue.

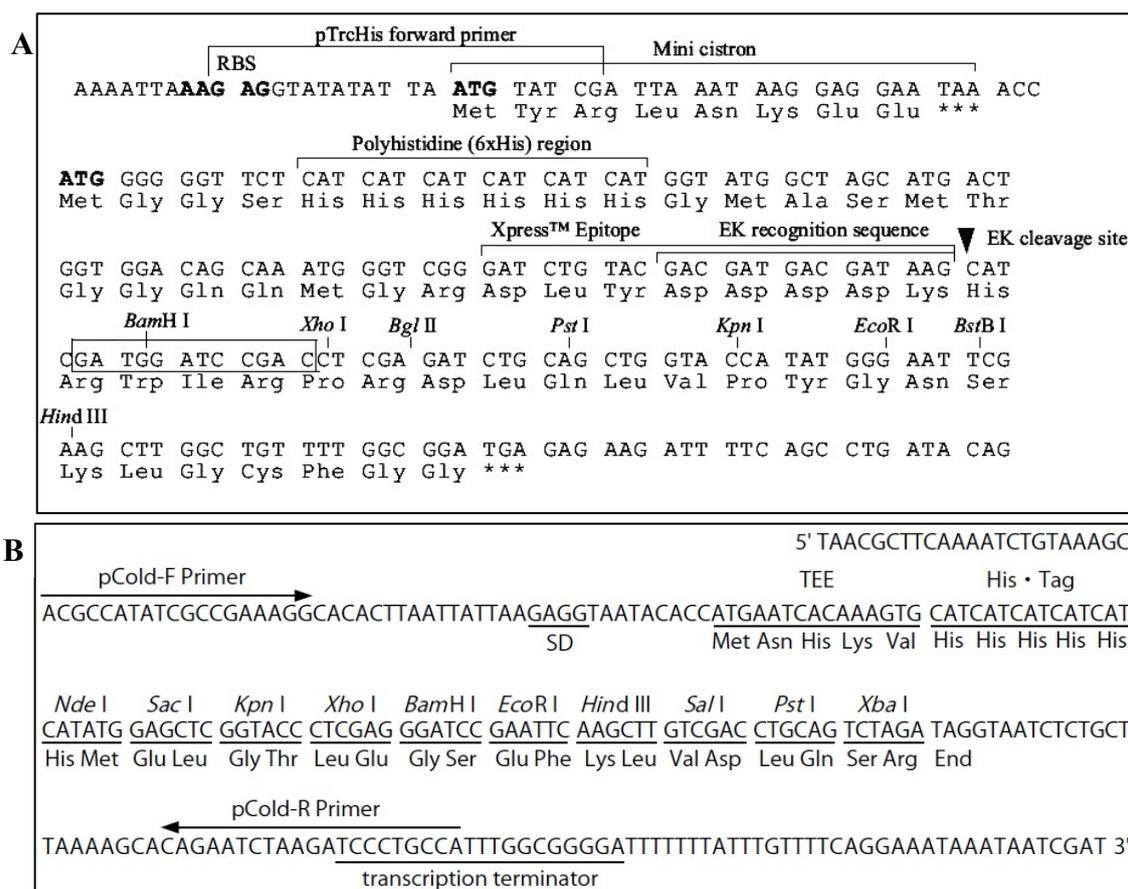


Figura 10. Sítio de clonagem de vetores de expressão utilizados para expressar a enzima tipo-luciferase. (A) Vetor pTrcHisC (Invitrogen), (B) Vetor pColdII (Takara).

3.4.7. Purificação de DNA do gel de agarose: Para purificar fragmentos de DNA obtidos por digestão foi utilizado o kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega), conforme protocolo sugerido pelo fornecedor. As bandas de interesse foram recortadas do gel de agarose e diretamente purificadas. O método do kit se baseia na adsorção seletiva de DNA em

membrana de sílica na presença de agentes caotrópicos. A membrana com o DNA adsorvido é então lavada com etanol e o DNA é eluído em água ultrapura autoclavada.

3.4.8. Mutagênese sitio-dirigida: Para a técnica de mutagênese sítio-dirigida foi utilizado o kit “QuikChange Site-Directed Mutagenesis” (Stratagene) segundo o protocolo do fornecedor. A técnica se baseia em obter mutações pontuais no DNA. No procedimento utilizam-se dois oligonucleotídeos complementares contendo a mutação desejada. Durante a PCR com a DNA polimerase *PfuTurbo*, ocorre a incorporação da mutação. Por último o DNA parental não-mutado é digerido com a enzima de restrição *Dpn I*. Para a técnica foram utilizados 2,5 µL de tampão 10 x, 0,5 µL do plasmídeo (50 ng), 0,5 µL de dNTP (2mM), 0,5 µL de cada *primer* (125 ng), 0,5 µL polimerase *PfuTurbo*, 20 µL de água ultrapura estéril e submetidas a técnica de PCR. A termociclagem da reação envolveu as seguintes etapas: (1) 95°C por 30 seg (desnaturação); (2) 25 ciclos com 30 seg. a 95° C (desnaturação), 1 minutos a 55°C (pareamento), 7 minutos a 68°C (extensão); (3) um estágio final de extensão com 5 minutos à 68°C. Os *primers* utilizados para a mutagênses foram os seguintes: **(I218R)** GTT TTT TAC AAC GCG TAG AAA CAT C, **(M243F)** CAT TTC ACA ACT TTC TAC TGG ATT AC, **(Y244F)** C ACA ACT ATG TTC TGG ATT ACC, **(W245H)** CAA CTA TGT ACC ACA TTA CCG GTA TG, **(I246A)** CT ATG TAC TGG GCA ACC GGT ATGG, **(T247F)** G TAC TGG ATT TTC GGT ATG GCA ATT, **(L313A)** CGT TGT TTA GCA ACA GGC GGT AC, **(F338Q)** GCAA GTT CTT CAA GGT TAC GGA ATG, **(S343T)** GGT TAC GGA ATG ACC GAA ATA GGA C, **(I345T)** GGA ATG TCC GAA ACT GGA CTA CTG TC, **(G346T)** G TCC GAA ATA ACT CTA CTG TCT AT, **(L347S)** C GAA ATA GGA CTA GCA TCT ATT TTT C.

3.5. Expressão, purificação e ensaio da enzima tipo-luciferase

3.5.1. Indução da expressão heteróloga de proteína: Células competentes BL21/DE3 foram transformadas com DNA recombinante e cultivadas em 500 mL de meio LB líquido/Ampicilina 100 µg/ml a 37° C até a absorbância de 0,4 (OD₆₀₀), e então induzidas com IPTG (0,4 mM) a 18° C sob agitação de 225 rpm. Para avaliar o nível de expressão, as coletas da cultura foram efetuadas em diferentes absorbâncias: 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 e 1,5. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 2.500 g por 15 min a 4°C. Para cada vetor de expressão usado, uma determinada temperatura de indução foi determinada: 18°C para o vetor pTrcHisC e 15° C para o vetor pColdII.

3.5.2. Medidas de atividade da enzima tipo-luciferase *in vivo*: Para acompanhar a expressão da enzima das bactérias *in vivo* a atividade luminescente 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, Tokyo) em cps (*counts* por segundo).

3.5.3. Extração da proteína: O *pellet*, contendo o material celular, foi ressuspense em 1-10 mL de tampão de extração gelado acrescido com 20-100 µL de coquetel anti-protease livre de EDTA (ROCHE) e 2-10 µL DTT 1 M. A lise celular foi feita por congelamento e descongelamento em gelo seco por três vezes. O lisado foi então centrifugado em 15.000g por 20 min a 4° C e o sobrenadante contendo a enzima solúvel foi utilizado nos ensaios posteriores. Para expressão da proteína em vetor pColdII e subsequente purificação por cromatografia de afinidade, foram feitas algumas modificações. O *pellet*, correspondente a 100 mL de cultura, foi ressuspense em 10 ml de tampão de extração modificado (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, TRITON X 1%), acrescido de 100 µL de antiprotease. A lise celular, além da

técnica de congelamento e descongelamento, foi intensificada submetendo-se a amostra à alta pressão em prensa francesa. O lisado foi centrifugado como acima especificado e o sobrenadante (extrato bruto) foi ensaiado ou submetido imediatamente a purificação.

3.5.4. Medidas de atividade da enzima tipo-luciferase *in vitro*: Após a expressão e extração, a atividade luminescente foi medida na presença de ATP e luciferina. No ensaio típico, foram usados 75 μL de Tris-HCl 0,10 M pH 8,5; 10 μL do extrato contendo a enzima, 10 μL de luciferina 10 mM e 5 μL de 40 mM ATP e 80 mM MgSO_4 . A intensidade de luminescência foi medida em luminômetro TDIII em mV/s ou AB2200 (ATTO, Tokyo) em *counts* por segundo (cps).

3.5.5. Quantificação de proteínas totais: Para medir a concentração de proteínas totais foi utilizado o método de Bradford (1976), considerada uma das técnicas mais simples, rápidas e com mínimo de interferência. A técnica se baseia na ligação da proteína com o corante Comassie Blue que tem uma absorvância máxima em 590 nm. Inicialmente foi montada uma curva-padrão (para cálculo do Fator) de concentração de proteína utilizando-se BSA. A concentração de proteínas totais foi determinada pela expressão: $[\text{Proteína}] = F \times \text{Abs}$, onde F é igual a $\Delta x / \Delta y$, obtido por pontos da curva-padrão.

3.5.6. Atividade específica: A atividade específica da enzima tipo luciferase foi calculada dividindo-se a atividade luminescente (em cps/mL) pelas respectivas concentrações de proteína total em mg/mL.

3.5.7. SDS-PAGE: A análise da pureza e quantidade das proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida 10% em condições desnaturantes de acordo com protocolo da Bio-Rad. As

alíquotas contendo as amostras de proteína foram diluídas em tampão de amostra, desnaturadas a 95° C por 4 min, aplicadas no gel e submetidas a corrida de 100 volts por 1 hora em tampão de corrida. Para coloração do gel foi utilizado o corante Comassie Blue por 20 min sob leve agitação e para visualização das bandas o gel foi subsequentemente imerso em solução descorante também sob agitação. Para preservação, o gel foi envolvido por papel celofane.

3.5.8. Western Blotting: A detecção e quantificação específica da enzima tipo luciferase e luciferases de besouros foi realizada por meio da técnica de *Western Blotting*. Após a corrida em SDS-PAGE o gel foi imediatamente usado na transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose em tampão de transferência a 100 volts por uma hora, conforme protocolo (Bio-Rad). Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada em solução bloqueadora (5% de leite em pó desnatado) por 20 minutos. Posteriormente a membrana foi lavada com tampão PBS-T 1% e incubada por uma hora sob leve agitação com anticorpo primário policlonal anti PxRE (luciferase de *Phrixothrix*) na concentração de 1:3000 (v/v) diluído em tampão PBS-T 1%. Após a incubação, a membrana foi novamente lavada com PBS-T 1% e incubada por 15 min com anticorpo secundário de coelho (marcado com HRP) na concentração de 1:5000 também com leve agitação. A imunodeteção foi visualizada por quimioluminescência em câmara CCD utilizando-se o kit ECL (Amersham) seguindo o protocolo da empresa.

3.5.9. 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. A resina de Ni-NTA-Agarose (Qiagen) foi equilibrada com tampão de extração, misturada com o extrato bruto por

45 min e submetida a agitação moderada por 45 min a 4°C para permitir a ligação da cauda de histidina da proteína ao níquel da resina. A mistura foi então aplicada em uma mini coluna e lavada com 10 mL de tampão de lavagem. A proteína recombinante foi eluída da resina com tampão de Eluição em alíquotas de 1 mL/cada. Cada alíquota foi analisada em ensaio padrão de enzima tipo-luciferase e as frações com maior atividade foram dialisadas em tampão de diálise. Esta amostra foi imediatamente utilizada para os ensaios de caracterização: proteínas totais, K_M para ATP e luciferina, atividade específica e SDS-PAGE.

3.6. Caracterização cinética e físico-química da enzima tipo-luciferase

3.6.1. Determinação do K_M para ATP e luciferina: O K_M para ATP foi calculado por meio da medida da atividade luminescente (conforme item 3.5.4) utilizando-se diferentes concentrações de MgATP (cc final 0,03; 0,1; 0,3; 0,7; 1; 3; 4 mM) com uma concentração de luciferina 1 mM. Os valores de concentração e atividade luminescente foram colocados em gráfico para elaboração de uma curva de saturação. Os inversos destes valores foram plotados no gráfico de Lineaweaver-Burk. Para o cálculo do K_M para luciferina foi utilizado o mesmo ensaio utilizando-se diferentes concentrações de luciferina (cc final 0,03; 0,1; 0,3; 0,7; 1; 5; 10 mM) na presença de ATP em concentração 2 mM. Os valores de K_M também foram calculados por meio de gráfico de Lineaweaver-Burk.

3.6.2. Determinação do pH ótimo: O pH ótimo para a enzima tipo-luciferase foi determinado a partir da atividade luminescente utilizando-se diferentes tampões para cada faixa de pH: tampão citrato 0,1 M (pH 5,0 a 6,0), tampão fosfato 0,1 M (6,0 a 8,0), tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5 a 9,0) e tampão 0,1 M CHES (7,0 a 9,5). Um gráfico com a curva do

efeito do pH foi construído com os valores de atividade normalizados em pHs de interseção de cada tampão.

3.6.3. Teste de termoestabilidade: Após purificação e diálise, amostra contendo a enzima tipo-luciferase foi incubada a 4°C, 23°C e 37°C e a atividade luminescente residual foi medida em intervalos de 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h (conforme item 3.5.4).

3.6.4. Teste de inibição por ácidos carboxílicos: Para identificação do possível substrato carboxílico natural desta enzima, foram realizados primeiramente testes de inibição com diferentes ácidos orgânicos. Os testes de inibição foram conduzidos utilizando diferentes ácidos carboxílicos comercialmente disponíveis. Para este teste, acrescentou-se 5 µL de ácido 10 mM de diferentes ácidos carboxílicos (ácido, indoleacético, cumárico, hidroxibenzóico, benzóico, salicílico, succínico, lipóico, linoléico, palmítico, tiazínico, glicina e cisteína) ao ensaio de atividade luminescente convencional. A intensidade luminescente foi medida em luminômetro AB2200 (ATTO, Tokyo) em cps (conforme item 3.5.4), e os valores de intensidade na presença de inibidor foram divididos pelos valores do controle sem ácido para obter a porcentagem de inibição.

3.6.5. Espectros de quimioluminescência. Espectros de quimioluminescência da enzima tipo-luciferase foram primeiramente medidos em espectroluminômetro ATTO no AIST (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) de Osaka no Japão em 2010 para enzima expressão em vetor pTrcHisC, e então, após a expressão em larga escala em vetor pColdII, em nosso laboratório, em espectrofluorímetro Hitachi F4500 com a janela de excitação fechada em sensibilidade máxima (950 V).

3.7. Análise bioinformática

3.7.1. Análise filogenética: Após seqüenciamento do cDNA da enzima tipo-luciferase, foram realizadas análises moleculares do cDNA, tais como comprimento da seqüência, janeça de leitura, número de nucleotídeos da região codificante e não-codificantes, tamanho da cauda poli-A e mapa de restrição, utilizando-se os programas Genetyx versão 6 e *software* Bioedit 7.0. Também foram realizados análises da proteína como pI (ponto isoelétrico), massa molecular esperada, hidrofobicidade, entre outros, utilizando-se do programa Bioedit 7.0 e o *server* “ExPASy”, disponível no site do “Swiss Institute of Bioinformatic” (<http://swissmodel.expasy.org/>). Subsequentemente, foi realizado a procura de seqüências homólogas no software BLAST, disponível no Banco de Dados “GenBank” do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). As seqüências das proteínas com maior identidade foram alinhadas com a enzima por meio do programa ClustalW 1.6 (THOMPSON et. al, 1994). Por meio do alinhamento, foram realizadas análises das diferenças entre as seqüências, as quais foram utilizadas para seleção de resíduos alvos para a etapa de mutagênese sítio-dirigida. A construção das topologias filogenéticas foi realizada utilizando-se o programa PAUP* v 4.0 beta (SWOFFORD, 2002) no método *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987). Os valores de *Bootstrap* foram calculados utilizando 5.000 pseudorepetições (FELSENSTEIN, 1985). A árvore foi construída utilizando-se o program TreeView (PAGE, 1996).

3.7.2. Modelagem do sítio ativo da enzima tipo-luciferase: A modelagem por homologia foi realizada pelo professor Dr. João Barbosa usando como template a luciferase de *Luciola cruciata* complexada cm DLSA ou com AMP e oxiluciferina usando o programa Modeller 9v6 (PDB ID: 2DIR) (VIVIANI et al., 2010).

4. RESULTADOS

4. 1. Bioimagem e origem anatômica da enzima tipo-luciferase

Para o presente projeto, foi escolhido como material biológico, a larva de *Zophobas morio*, um coleóptero não-bioluminescente da mesma família de *Tenebrio molitor* - no qual foram descobertas as enzimas tipo-luciferase - e de *Tribolium castaneum* que tem seu genoma completo já seqüenciado (RICHARDS, et al., 2008). Este besouro é popularmente conhecido como tenebrio gigante e sua larva mede aproximadamente 5 cm o que facilita sua dissecação tornando-o um bom modelo para o estudo biológico em geral.

Larvas de *Z. morio* injetadas com D-luciferina acidificada emitem fraca quimioluminescência detectável após 20 minutos de exposição em alta sensibilidade em câmara CCD de nosso laboratório. Entretanto, em câmara CCD ultra-sensível (Xenogen) do laboratório do Prof. Hastings da Universidade de Harvard, a luminescência é detectada por toda a extensão do corpo da larva após 5 min de exposição (Fig. 11A, B). A dissecação da larva mostra que a luminescência origina-se de estruturas filiformes adjacentes ao tubo digestivo, estruturas esta identificadas como túbulos de Malpighi com a colaboração do Prof. Fabio Abdalla. Para confirmar qual o tecido luminescente, o corpo gorduroso, o tubo digestivo e os túbulos de Malpighi foram isolados e submetidos à captura de imagem separadamente e novamente foi comprovado que a bioluminescência é originada apenas dos túbulos de Malpighi (figura. 11C, D).

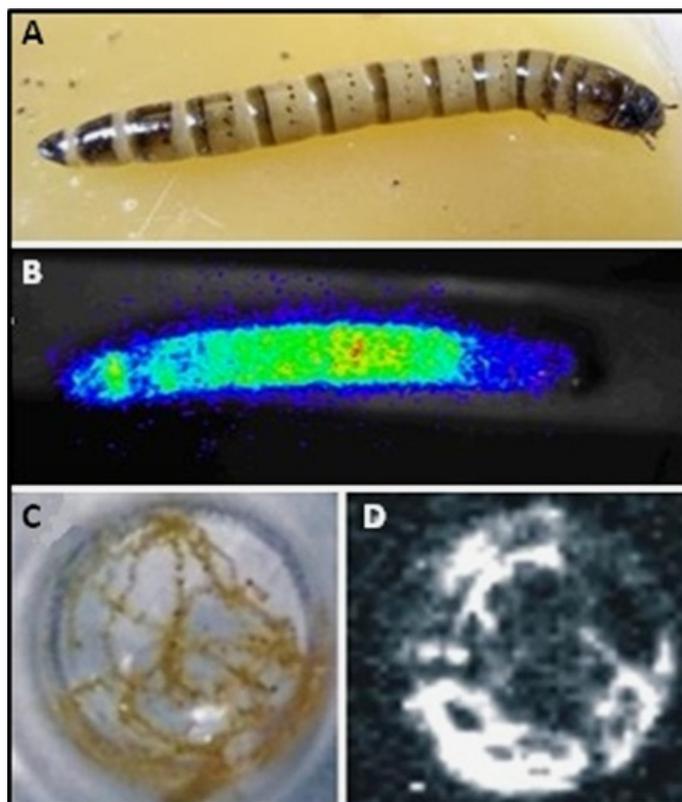


Figura 11. Bioimagem da quimioluminescência de larva e túbulos de Malpighi de *Z. morio* detectada em câmara CCD (A) Larva intacta, (B) Luminescência da larva após injeção com D-luciferina 10 mM em câmara CCD Xenogen após 5 min de exposição, (C) Túbulos de Malpighi isolados, (D) Após injeção com D-luciferina 10 mM e exposição de 20 minutos em câmara CCD ATTO. Conforme Viviani et al., 2009.

4. 2. Clonagem do cDNA da enzima tipo-luciferase

Para a clonagem do cDNA da enzima tipo-luciferase, optamos pela construção de biblioteca de cDNA a partir dos túbulos de Malpighi e posterior *screening in vivo* por fotodeteção em câmara ultra-sensível. Após excisão e plaqueamento da biblioteca de cDNA, na forma plasmidial, as colônias resultantes foram induzidas a expressão de proteína e selecionadas por fotodeteção. Após serem borrifadas com D-luciferina, usando a câmara CCD IVIS-Xenogen do laboratório do Prof. Hastings, uma colônia produzindo uma fraca luminescência foi isolada. O DNA plasmidial desta colônia foi subsequentemente extraído e

usado em nosso laboratório para transformação de células *E.coli* BL21-DE3 que foram também submetidas à expressão protéica para teste de atividade luciferásica *in vitro*. Portanto, este clone, positivo por fotodecção, foi também validado por atividade luciferásica.

Para uma caracterização preliminar, a enzima foi expressa usando o vetor de clonagem pBlueScript, extraída e usada em ensaios luminométricos. No ensaio padrão, utilizando tampão Tris-HCl, D-luciferina e MgATP, a enzima tipo-luciferase mostra uma fraca luminescência. Além disso, a análise em espectrofluorímetro após concentração da enzima mostra uma emissão na região do vermelho com pico na região de 600 nm.

4. 3. Estrutura do cDNA e da proteína

Concomitantemente aos ensaios da atividade luminescente, foi realizado o sequenciamento do cDNA usando-se inicialmente primers M13 e M13Reverse, e então o *primer* interno Zop1, desenhado a partir da sequencia parcial. O cDNA deste clone contém 1.733 bp e uma região codificadora de 1.587 bp resultando em um polipeptídio de 528 resíduos (figura 12) com sequências sinalizadoras de membrana de retículo endoplasmático na região N-terminal (Ser-Ala-Arg-Ile) e na região C-terminal (Ala-Glu-Lys-Phe).

```

21  atgtctgctgcgcatTTTTAAAAGGGAAAGAATTTcatccaaatttcgacaaaataagtttc
    M S A R I L K G K E F H P N F D K I S F
81  ggcgaatttttattttgaatgctgtgaaaaatacgcagacagaatttgtcagatagatgga
    G E F L F E C C E K Y A D R I C Q I D G
141 gatttagacaaatcagaaacttactccagtggtgaaaacaagaagtactcgagttgcattg
    D L D K S E T Y S S V K T R S T R V A L
201 aatctccaaaaaaagggaatcacttccaccgatgtagtttgcttttgttctactaattcc
    N L Q K K G I T S T D V V C F C S T N S
261 ttggataactctataaccattaatagcatcctcatatntagtagcgaaagttgtaaactca
    L D N S I P L I A S S Y L G A K V V N L
321 gatccaactctgtcggttagaaacattcaacatttgcttagtctcgtaacccctagaatt
    D P T L S V R N I Q H L L S L V T P R I
381 attttcgtggaagaagagtcactaaagttgattgaaaaatctcttaaaggggctaatta
    I F V E E E S L K L I E K S L K G A K L
441 tcttgcgaaattatagttttcggcaaatccaaaaacatggacttttgccgaaatgacg
    S C E I I V F G K S T K H G T F A E M T
501 ttgccttgtggcgacgaaaaagcattcaaaccgtcaaaaacagacatcgatgataccgca
    L P C G D E K A F K P S K T D I D D T A
561 gtcatgttcttcagcagcggactacgggtcttccaaaagctatctgccacagtcaccgt
    V M F F S S G T T G L P K A I C H S H R
621 agttttttacaaatcgtagaaacatcattctattgtgggtacgattgtcgatccatatta
    S F L Q I V E T S F Y C G Y D C R S I L
681 catttcacaactatgtactggattaccgggtatggcaattctgggacggactttcctggat
    H F T T M Y W I T G M A I L G R T F L D
741 ggaagtacccgggtttttgcacgtagcatggaaggcgaaaagacgctccaaatgatcgaa
    G S T R V F A R S M E G E K T L Q M I E
801 aaatacaaaactcacatcacttttcgtagccccaatttacacctaccagttaactaacgtt
    K Y K L T S L F V A P I Y T Y Q L T N V
861 ccaaatccagaacggtagcacccttctcgtttcgttactgacaggcggactccg
    P N P E R Y D L S S F R C L L T G G T P
921 atgagtaccgatcaatataaaaaactgacacaactgtttccaaagcgcaagttcttttt
    M S T D Q Y K K L T Q L F P K A Q V L F
981 ggttacggaatgtccgaaataggactactgtctatttttcaccgccgaagacgacaaaat
    G Y G M S E I G L L S I F H P E D D K H
1041 ctcatagataactaaagtgggttcttgtggcaaagtctcaccacgaactcttctcaaaatt
    L I D T K V G S C G K V S P R T L L K I
1101 gttaatccagacaatgaagagatcgtcggaccaaatacagaaaggtgagcttcgagtgaaa
    V N P D N E E I V G P N Q K G E L R V K
1161 tcagatgctatgatgacagggactaccggaacgacagtgctgagtggttcgatgggtgac
    S D A M M T G Y Y R N D S A E C F D G D
1221 ggtttcctgaaaacgggtgatattgggtactatgatgacgatgggttcggtttacgttatt
    G F L K T G D I G Y Y D D D G C V Y V I
1281 gagagaattaaggaaaatgtttaagtaccagtcgtggcatatagtaccgtcgtcgatcgaa
    E R I K E M F K Y Q S W H I V P S S I E
1341 gcggtgcttttggaaacatccggatattgaagaaactgttgtttttggacttctggaggt
    A V L L E H P D I E E T V V F G L P G G
1401 gcggaaggagacgtacctgctgtgtgtggtgctaaaggatggctgtactaccgacaag
    A E G D V P A A C V V L K D G C T T D K
1461 gaggaaattgaaaagtttgtgacagaggggttccgacaaggaaaaactaagaggtgga
    E E I E K F V T E R V S D K E K L R G G
1521 gtgattttcgttgagagtataaccgaaaacgccgactggaaagttgataaggaaagaggcg
    V I F V E S I P K T P T G K L I R K E A
1581 aaggagattgctgaaaaatttgttttaa 1607
    K E I A E K F V *

```

Figura 12. Sequência da região de leitura (ORF) do cDNA da enzima tipo-luciferase e sua respectiva tradução.

4. 4. Filogenia Molecular

O cDNA foi submetido a busca por homologia usando a ferramenta BLAST disponível no Banco de Dados do NCBI e mostra alta identidade com várias AMP-ligases. Dentre as sequencias obtidas, a maior identidade é encontrada com uma AMP-CoA ligase de *Tribolium castaneum* (64%), seguida de diversas enzimas hipotéticas de *Tribolium* (51 a 56%), AMP-CoA ligases de outros insetos (~30%), luciferases de besouros (32-34%) e 4-cumarato-CoA ligase de plantas (27-30%) (tabela 1).

O alinhamento da sequencia de aminoácidos da protoluciferase com outras luciferases clássicas clonadas mostra que a primeira possui de 14 a 20 resíduos a menos dependendo da luciferase comparada (figura 13).

Tabela 1. Identidade da enzima tipo-luciferae com enzimas relacionadas segundo NCBI.

ENZIMA	IDENTIDADE (%)	Nr. DE ACESSO
Similar a AMP CoA ligase [<i>Tribolium castaneum</i>]	64	XP 966770.1
Similar a Luciferase [<i>Tribolium castaneum</i>]	56	XP001809806.1
Similar a CG6178 [<i>Tribolium castaneum</i>]	51	XP970362.2
Luciferase [<i>Brasilocerus sp</i>]	34	ACT68596.1
Luciferase [<i>Phrixothrix hirtus</i>]	32	ACT68597.1
Luciferase [<i>Rhagophthalmus ohbai</i>]	32	BAF34360.1
AMP-CoA ligase [<i>Aedes aegypti</i>]	31	XP001657679.1
4-Cumarato-CoA ligase [<i>Gynura bicolor</i>]	30	BAJ17664.1
4-Cumarate-CoA ligase [<i>Rubus idaeus</i>]	27	AAF91309.1

Ppy	---	MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVNI	TYAEYF	57	
Lcr		MENMENDENIVVGPKPFYPIEEGSAGTQLRKYMER	YAKL-GAIAFTNAVTGVDYSYAEYL	59	
PxRE	---	ME-EENIVNGDRPRDLVFPGTAGLQLYQS	LYKYSYI--TDGIIDAHTNEVISYAQIF	54	
Pte	---	MMKREKNVVYGPPEPKHPLGNFTAGEMLYNAL	KHSHI--PQAILDVNGNESLSYQEFF	56	
Zop	-----	MSARILK	GKEFHPNFDKISFGFELFECCEKYADR---ICQIDGDL	DKSETYSSVK	52
		..	*	..	:
Ppy		EMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCS	ENSLQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNERELLNS	117	
Lcr		EKSCCLGKALQNYGLVVDGR	IALCSENCEEFFIPVIAGLFIGVGVAPTNEIYTLREL	VHS	119
PxRE		ETSCRLAVSLEKYGLDHN	NVVAICSENNIHFFGPLIAALYQGI	PMATSNDMYTEREMIGH	114
Pte		DTTVKLGQSLQNCGYKMNDVVS	ICAENNRFFIPIISAWYIGMVVAPVNEDY	IPDELCKV	116
Zop		TRSTRVALNLQKGITSTDVVCF	CSTNSLNDNSIPLIASSYLGAKVVNLDPTLSVR	NIQHL	112
		*	:
		*	:
		*	:
		*	:
		*	:
		*	:

De acordo com os resultados obtidos no BLAST, esta enzima tipo-luciferase de *Z. morio* apresenta alta identidade com várias proteínas de função inferida ou hipotéticas, referidas como “AMP-ligases”, “firefly luciferase” ou “luciferase-like” de diversos organismos, que se tratam de proteínas da superfamília das AMP-ligases. Por outro lado, as AMP-ligases de funções conhecidas como Acil-CoA ligase, Cumarato-CoA ligase, Benzoato-CoA ligases, etc que possuem suas sequências depositadas no *genebank*, são de organismos filogeneticamente distantes a *Z. morio*. Isto faz com que um alinhamento refinado dessas sequencias seja difícil. Porém, um alinhamento aproximado pode ser gerado possibilitando a reconstrução evolutiva de todas essas ligases. De acordo com a árvore gerada com este alinhamento aproximado, observa-se que a enzima tipo-luciferase de *Z. morio* e as luciferases são agrupadas em um ramo separado das outras ligases juntamente com 4-Cumarato-CoA ligases compartilhando ancestral distante e incomum (figura 14).

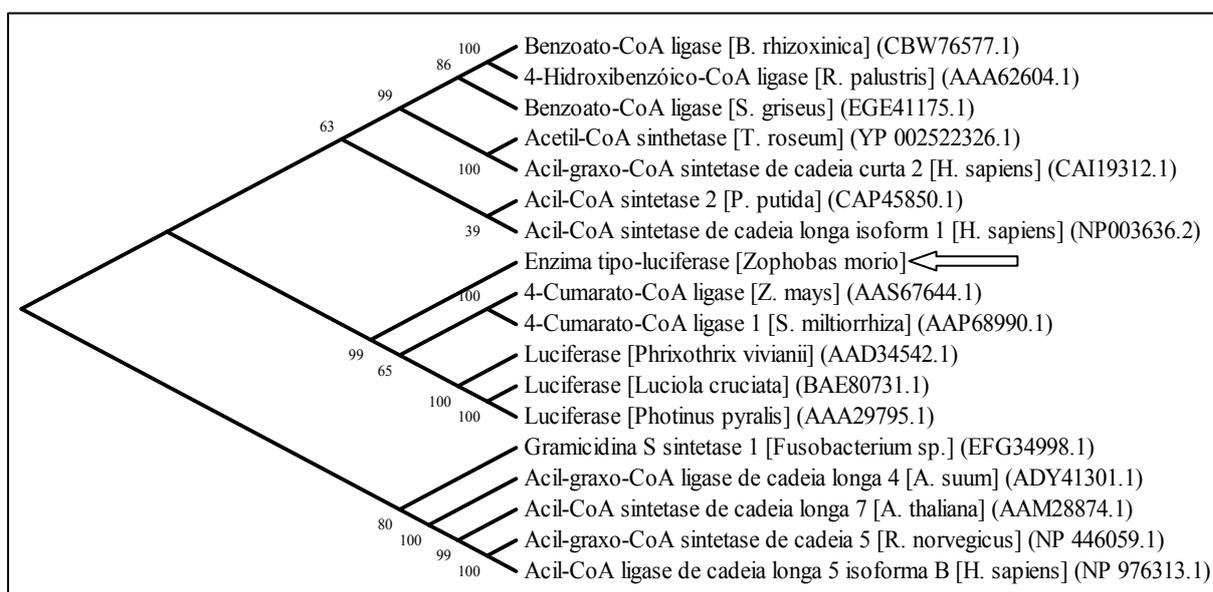


Figura 14. Reconstrução evolutiva da enzima tipo-luciferase e AMP-ligases de organismos filogeneticamente distantes com o método *Neighbor-joining*.

histidina que funcionam, na proteína traduzida, como um domínio de ligação de níquel o que facilita a purificação da proteína recombinante (figuras 10A, B).

Enzima tipo-luciferase expressada no vetor pTrcHisC apresenta uma atividade luminescente bem maior quando comparadas a enzimas expressas usando o vetor pBlueScript, comprovando assim a maior eficiência deste vetor de expressão. O aumento de expressão com este vetor, propiciou uma primeira caracterização cinética da enzima tipo-luciferase, com a determinação do K_M , pH ótimo, inibição enzimática e espectro de quimioluminescência.

Como avaliação da eficiência de expressão protéica do vetor pTrcHisC, as culturas induzidas foram coletadas em diferentes absorbâncias. Neste vetor, a máxima atividade luciferásica é observada em culturas crescidas até absorbância de 0,9. Após esta absorbância a atividade diminui substancialmente chegando a ausência de atividade em culturas mantidas *overnight* (figura 16). O conteúdo protéico das diferentes culturas foi analisado em SDS-PAGE 10% que evidencia menor quantidade de proteínas totais em culturas crescidas por mais de 12 horas (figura 17).

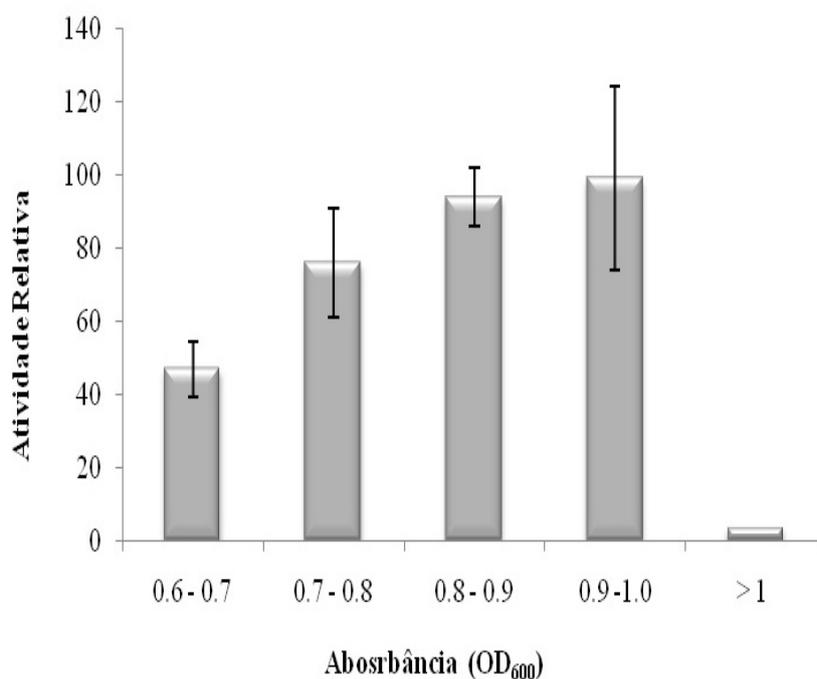


Figura 16. Perfil da atividade luminescente *in vitro* da enzima tipo-luciferase expressa em vetor pTrcHis-Zop coletadas em diferentes aborbâncias.

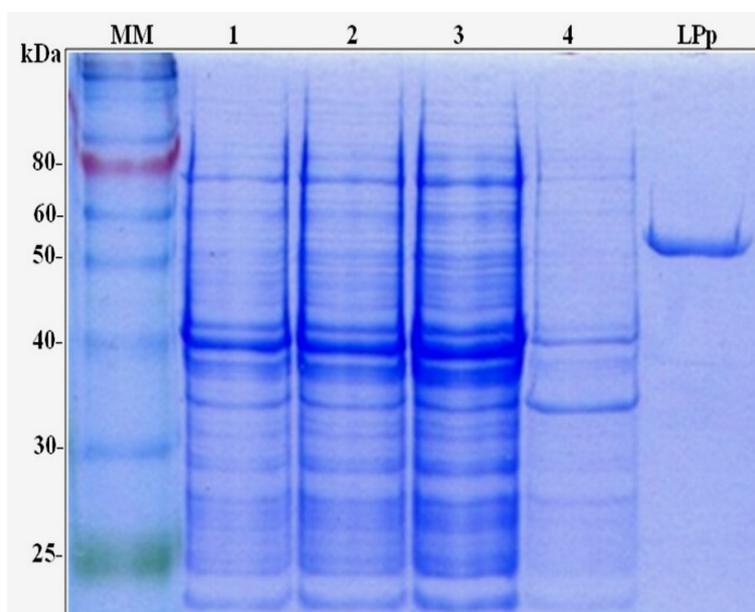


Figura 17. Gel de SDS 10 % de extratos brutos contendo enzima tipo-luciferase expressa em vetor pTrcHis-Zop e coletados em diferentes aborbâncias. (1) Extrato bruto de cultura crescida entre $Abs_{600} = 0,7 - 0,8$, (2) $Abs_{600} = 0,8-0,9$, (3) $Abs_{600} = 0,9 - 1,0$, (4) *Overnight*, (MM) Marcadores de peso molecular, (LPp) Luciferase *Photinus Pyralis* comercial 60 kDa (10 μ g).

Inicialmente foi sugerido que este decaimento drástico na atividade luciferásica e na quantidade de proteínas totais era devido a uma provável toxicidade desta enzima para as células bacterianas, porém, a análise por *Western Blotting* revela grande concentração da enzima tipo-luciferase retida no *pellet* após extração protéica (figura 18), mostrando, portanto, a insolubilidade da proteína em altas concentrações nesta temperatura de indução.

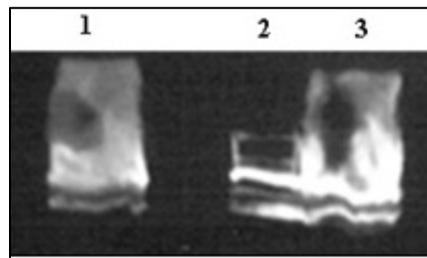


Figura 18. *Western Blotting* mostrando a localização preferencial do precipitado da enzima tipo-luciferase usando anticorpo contra luciferase de *Phrixothrix hirtus*. (1) Lisado celular, (2) Extrato bruto, (3) Ressuspensão do *pellet* bacteriano.

Na técnica de *Western Blotting* foi utilizado como sonda o anticorpo policlonal primário obtido contra luciferase de *Phrixothrix hirtus*. Foi também usada a luciferase comercial de *Photinus pyralis* como marcador de peso molecular e de antigenicidade para este anticorpo. O resultado é positivo para ambas as proteínas mostrando, portanto, que esta enzima tipo-luciferase de *Z. morio* tem antigenicidade para anticorpo contra luciferase verdadeira. A técnica mostra também que a densidade óptica ideal para coleta das células induzidas com o sistema *E. coli* BL21-DE3/vetor pTrcHis-Zop é de $Abs_{600} = 0,9$ (figura 19).

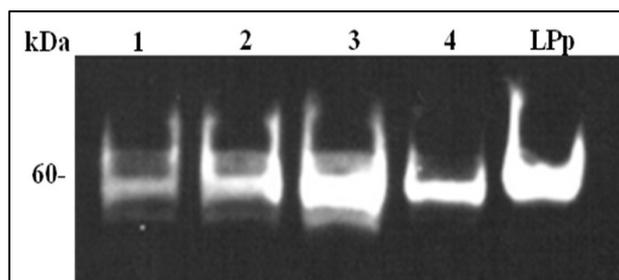


Figura 19. *Western Blotting* de extratos brutos contendo enzima tipo-luciferase, usando anticorpo contra luciferase *Phrixothrix hirtus*, expressa em vetor pTrcHisC-Zop e coletada em diferentes absorvâncias. (1) cultura crescida entre $Abs_{600} = 0,7-0,8$, (2) $Abs_{600} = 0,8-0,9$, (3) $Abs_{600} = 0,9 - 1,0$, (4) *overnight*, (LPP) Luciferase *Photinus Pyralis* comercial de 60 kDa (10 μ g).

4.5.2. Purificação

Tendo em vista que o protocolo de purificação em coluna HisTag da Qiagen é bem padronizado em nosso laboratório para outras luciferases clonadas pelo grupo (SILVA-NETO et al., 2009), este método foi utilizado também para a purificação da enzima tipo-luciferase usando condições semelhantes. Os extratos brutos contendo as frações solúveis obtidas após indução foram submetidos à purificação conforme descrito no item 3.5.9 de Material e Métodos.

Notavelmente, usando o sistema BL21-DE3/pTrcHis-Zop a proteína não aderiu a resina de níquel, não podendo ser purificada por esta técnica apesar da proteína ter a cauda de histidina N-terminal.

Com o objetivo de aumentar a expressão de proteína solúvel e também solucionar o problema da purificação em coluna de afinidade de níquel, o cDNA da enzima tipo-luciferase foi subclonado em vetor pColdII, que também confere a cauda de histidina (figura 9) além de expressar elevados níveis de proteínas insolúveis em baixas temperaturas, aumentando a fração de proteína solúvel recuperada. Com este vetor observa-se um grande aumento no nível de

expressão da proteína bem como na atividade luminescente específica, aproximadamente 30 vezes maior em relação a enzima expressa com o vetor pTrcHisC.

Uma avaliação para otimização do tempo de indução foi realizado também para este vetor. Diferente do vetor pTrcHisC e similarmente a expressões de luciferases verdadeiras, culturas com maior tempo de indução fornecem maior quantidade de proteínas e conseqüentemente maior atividade luciferásica, com atividade máxima atingida em culturas crescidas *overnight* (figura 20-22). Para comparar a eficiência dos vetores, a expressão protéica nos vetores pTrcHisC e pColdII foi conduzida concomitantemente nas mesmas condições de tempo, agitação e temperatura. Os resultados confirmam a maior eficiência do pColdII, tanto para a quantidade de proteínas expressas quanto na solubilidade destas e sua conseqüente atividade luciferásica.

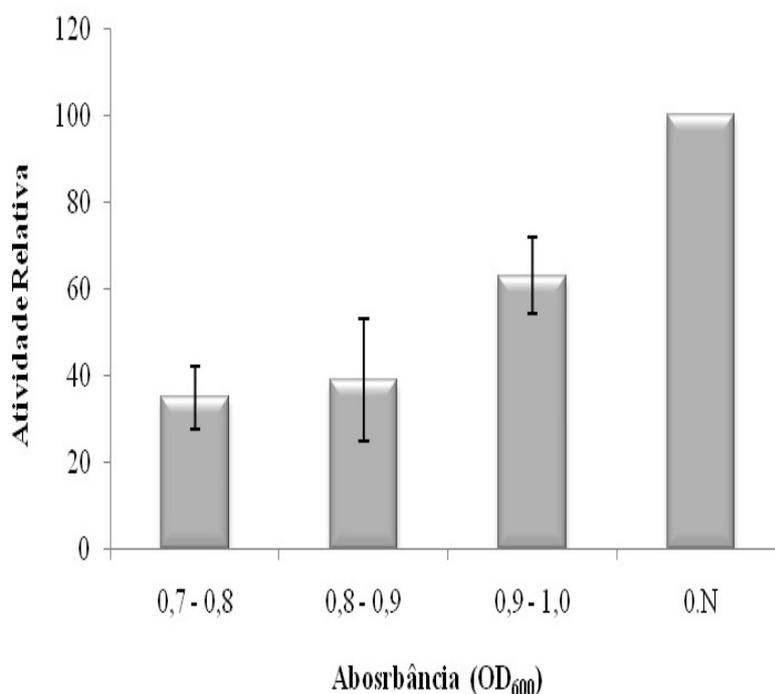


Figura 20. Perfil da atividade luminescente *in vitro* da enzima-tipo luciferase expressa em vetor pColdII-Zop coletada em diferentes absorbâncias.

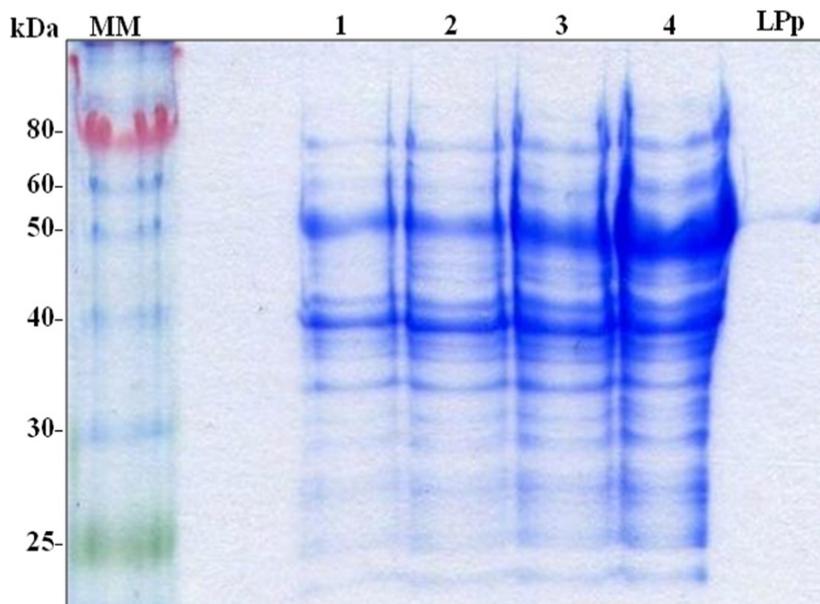


Figura 21. Gel de SDS 10 % de extratos brutos contendo enzima tipo-luciferase expressa em pColdIIC-Zop e coletada em diferentes absorvâncias. (1) Cultura crescida entre Abs_{600} 0,6 - 0,7, (2) Abs_{600} 0,7 - 0,8, (3) Abs_{600} 0,8 - 0,9, (4) Abs_{600} 0,9 - 1,0 (5) *Overnight*, (MM) Marcadores de peso molecular, (LPP) Luciferase *Photinus Pyralis* comercial de 60 kDa (10 μ g).

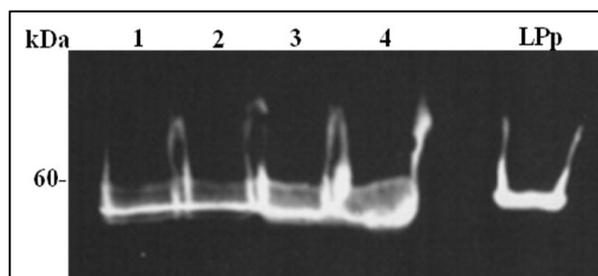


Figura 22. *Western Blotting* de extratos brutos da enzima tipo-luciferase, usando anticorpo contra luciferase *Phrixothrix hirtus*, expressa em vetor pColdII-Zop e coletada em diferentes absorvâncias. (1) Cultura crescida entre Abs_{600} = 0,7-0,8, (2) Abs_{600} = 0,8-0,9, (3) Abs_{600} = 0,9 - 1,0, (4) *Overnight*, (LPP) Luciferase *Photinus Pyralis* comercial de 60 kDa (10 μ g).

Tabela 2. Comparação das médias de atividades específicas da enzima tipo-luciferase expressa em células BL21 com vetores pTrcHisC e pColdII e entre luciferases de besouros.

Vetor	Atividade Espec. (cps/mg)
pTrcHisC-ZOP	89.405.359
pColdII-ZOP	4.028.767.241
pColdRE (e)	13.000.000.000
pcPY (a)	150.000.000.000

A purificação da enzima tipo-luciferase de *Z. morio* expressa com o sistema BL21/pColdII por cromatografia de afinidade com resina de níquel foi realizada em condições não-desnaturantes, condições semelhantes àquelas padronizadas para outras luciferases. As alíquotas purificadas com maior atividade foram então dialisadas em tampão apropriado. A análise em gel de poliacrilamida mostra a pureza e a quantidade das proteínas obtidas neste processo de purificação (figura 23). A quantidade de proteínas também foi avaliada pelo teste de Bradford e mostra uma produção de 10 mg/L de cultura.

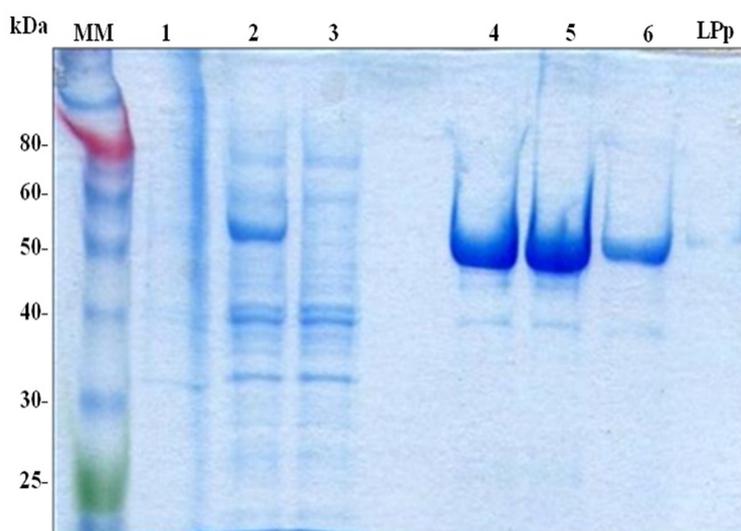


Figura 23. Gel de SDS 10 % da purificação por cromatografia de afinidade com resina níquel-agarose da enzima tipo-luciferase expressa em vetor pColdII-Zop. (1) Lisado celular, (2) Extrato bruto, (3) Produto de lavagem, (4 – 6) Frações eluídas de maior atividade, (MM) Marcador de peso molecular, (LPp) Luciferase *Photinus Pyralis* comercial de 60 kDa (10µg).

4.6. Caracterização Cinética

4.6.1. pH ótimo.

O pH ótimo foi medido para proteínas expressas em ambos os vetores. Inicialmente o teste foi realizado com o extrato bruto da enzima tipo-luciferase expressa em pTrcHisC e mostra um pH ótimo de 8,5, próximo do valor da enzima tipo-luciferase originalmente descoberta em larvas de *Tenebrio molitor* por Viviani e Bechara (1996). Com a enzima expressa em vetor pColdII e purificada, o pH ótimo diminui para 8,0 (figura 24), similar ao pH ótimo de luciferases de fengodídeos como *Phrixotrix viviani* e *P. hirtus*.

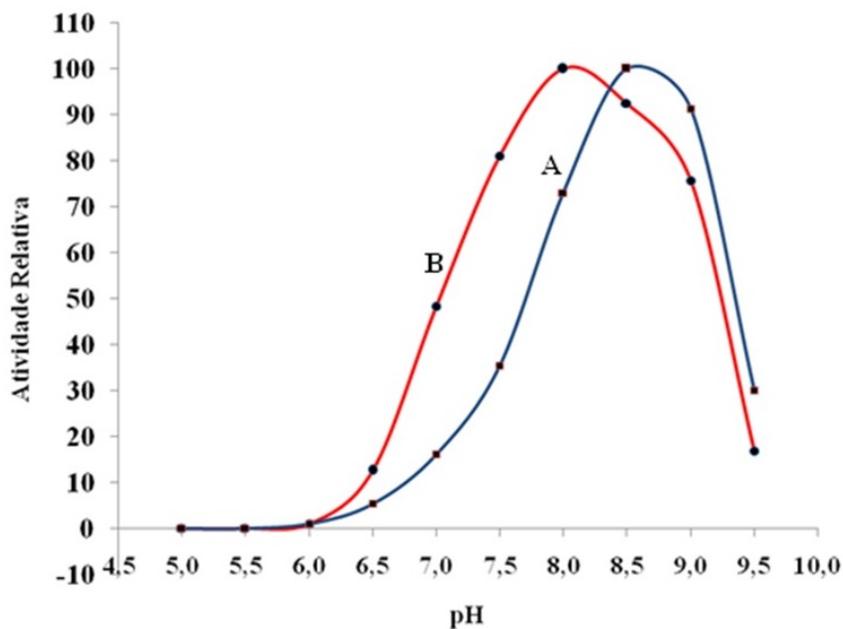


Figura 24. Efeito do pH sobre a atividade enzimática da *protoluciferase*. (A) Enzima expressada em vetor pTrcHisC, (B) Enzima expressa em vetor pColdII e purificada.

4.6.2. Termoestabilidade

A estabilidade da enzima tipo-luciferase purificada foi avaliada a 4° C, 22° C e 37° C (figura 25). A 37° C nas 12 primeiras horas, a enzima mostra um modesto declínio em sua atividade e a partir deste período um declínio acentuado é observado. A temperatura ambiente (23° C) a proteína tipo-luciferase se mantém estável até 24 horas e a 4° C se mantém estável por mais de 48 horas conservando, portanto, seu enovelamento correto e funcional por um tempo relativamente longo.

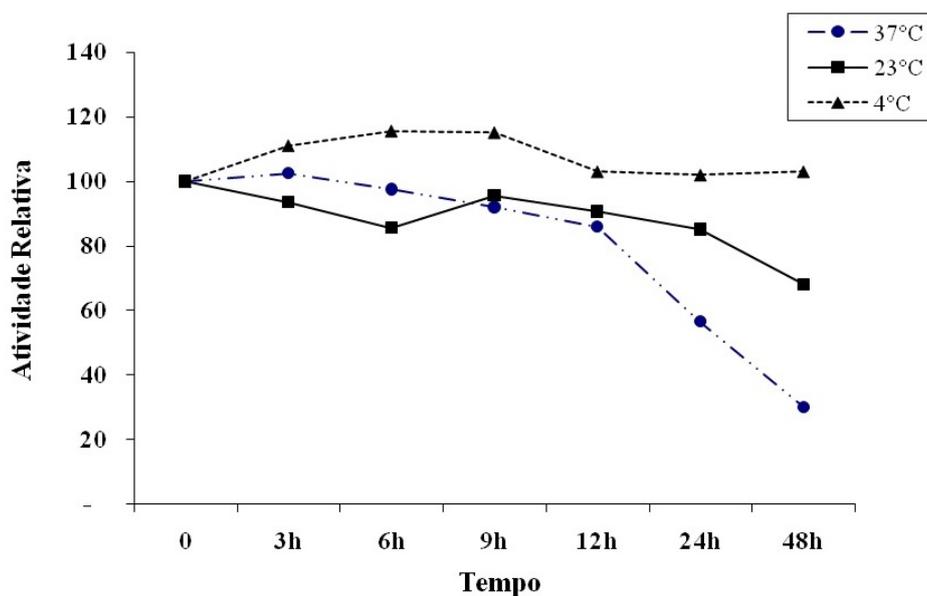


Figura 25. Efeito da temperatura na estabilidade da atividade luminescente da enzima tipo-luciferase expressa em BL21 com vetor pColdII e purificada.

4.6.3. K_M para ATP e luciferina (LH_2)

Os valores de K_M também foram calculados primeiramente com a enzima expressa em vetor pTrcHisC e posteriormente com a enzima expressa em vetor pColdII e purificada. Para ATP o valor obtido é de 260 μM (figura 26) tanto para enzima expressa em vetor pTrcHisC quanto para enzima expressa em vetor pColdII. Este valor é relativamente similar às luciferases típicas de coleópteros (tabela 3) bem como à enzima tipo-luciferase originalmente descoberta em *T. molitor* (VIVIANI E BECHARA, 1996). Entretanto, o valor do K_M para LH_2 , calculado com a enzima expressa em pTrcHisC é de 800 μM (figura 27), similar ao valor de K_M encontrado em enzima tipo-luciferase de *Tenebrio molitor*, enquanto que com a enzima expressa em pColdII e purificada o valor de K_M diminui para 500 μM . Apesar da diminuição, o K_M ainda permanece bem acima dos valores obtidos para luciferases verdadeiras indicando a baixa afinidade para este substrato.

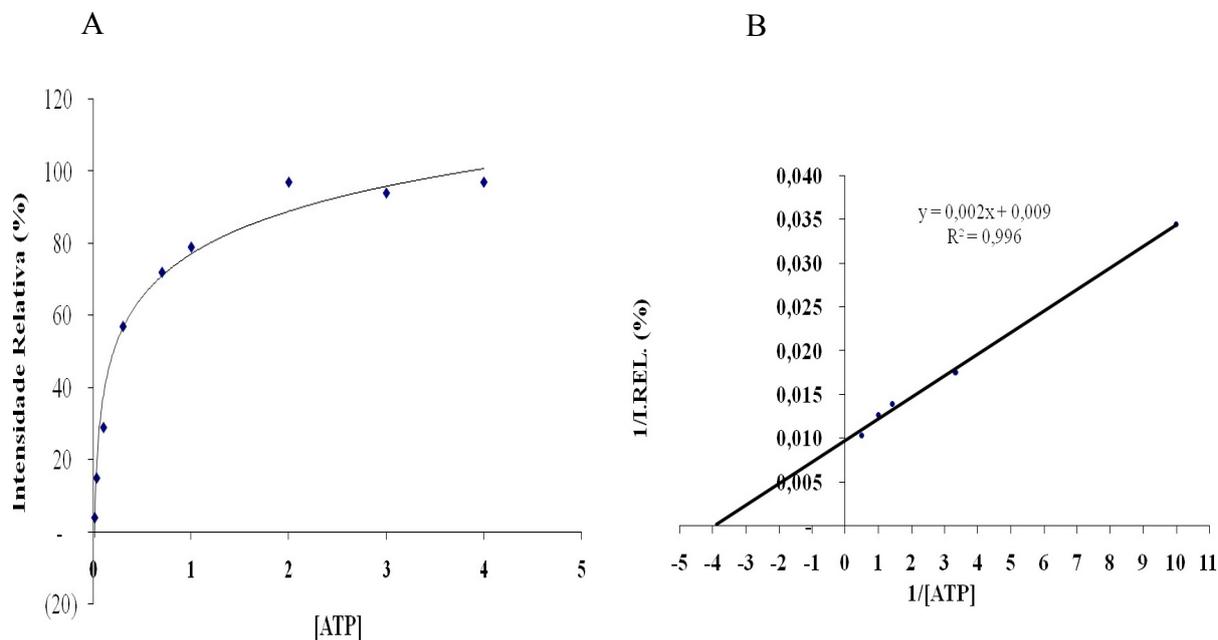


Figura 26. (A) Efeito da concentração de ATP na atividade da enzima tipo-luciferase expressa em vetor pTrcHis, (B) Gráfico de Lineweaver-Burk do efeito do ATP na atividade da tipo-luciferase expressa em vetor pTrcHisC.

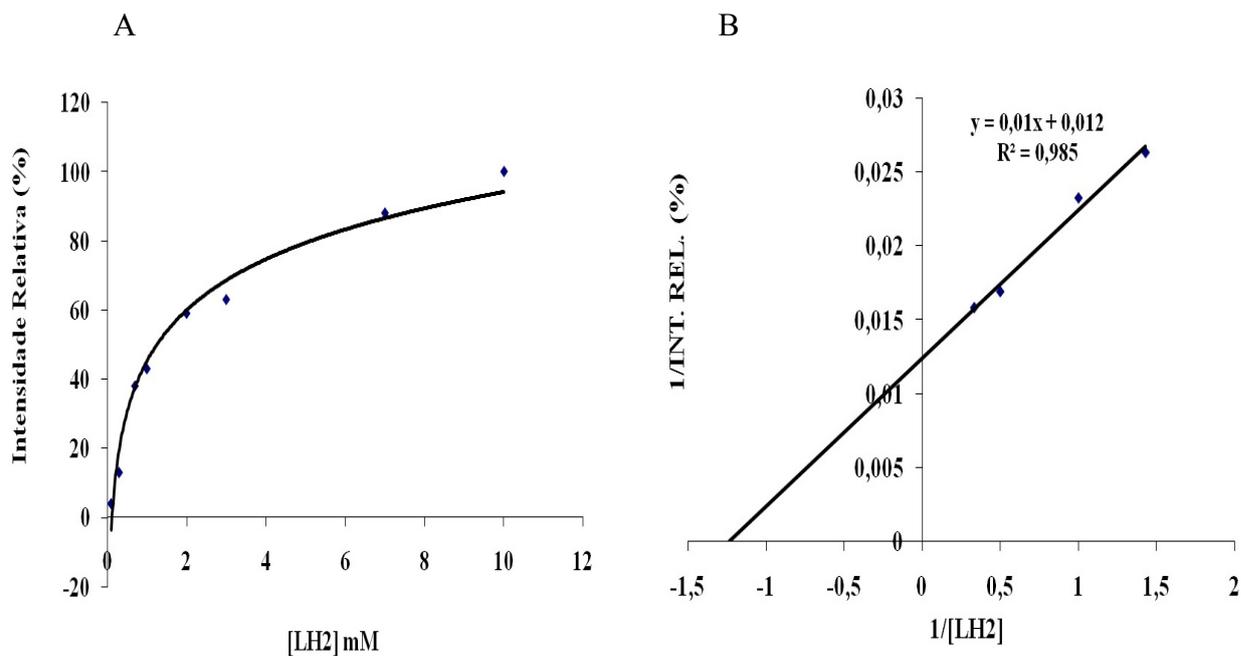


Figura 27. (A) Efeito da concentração de luciferina na atividade da tipo-luciferase expressa em vetor pTrcHisC, (B) Gráfico de Lineweaver-Burk para cálculo de K_M de luciferina para tipo-luciferase expressa em vetor pTrcHis.

Tabela3. Propriedades da enzima tipo-luciferase expressa em vetor pTrcHis e pColdII e de algumas luciferases de besouros.

	λ	pH ótimo	KM (μM)	
			LH2	ATP
<i>Zophobas morio</i> (pTrcHis)	615	8,5	860	260
<i>Zophobas morio</i> (pColdII)	613	8,0	500	260
<i>P. termitiluminans</i>	534	8,2	80	370
<i>Cratomorphus distinctus</i>	548	8,0	10	110
<i>Macrolampis sp2</i>	569	8,2	19	83
<i>Photinus pyralis</i>	562	7,9	10	250
<i>Phrixotrix viviani</i>	546	8,0	64	330
<i>Phrixotrix hirtus</i>	623	8,2	7	130

4.6.4. Teste de Inibição por ácidos carboxílicos

Para ajudar na identificação do possível substrato natural desta enzima, foi primeiramente analisada a ação inibidora de diferentes tipos de ácidos carboxílicos na atividade luciferásica. Os ácidos indoleacético, benzóico, hidroxibenzóico e o aminoácido glicina não têm nenhum efeito sobre a atividade enzimática. Os ácidos 4-tiazólico, cumárico, salicílico, caféico, tiazínico e o amino ácido cisteína tem uma pequena inibição de aproximadamente 40%. Porém, os ácidos palmítico, lipóico e linoléico têm efeito inibitório mais acentuado na atividade luciferásica, sendo que o ácido linoléico resulta em 99% de inibição enzimática (Figura 28).

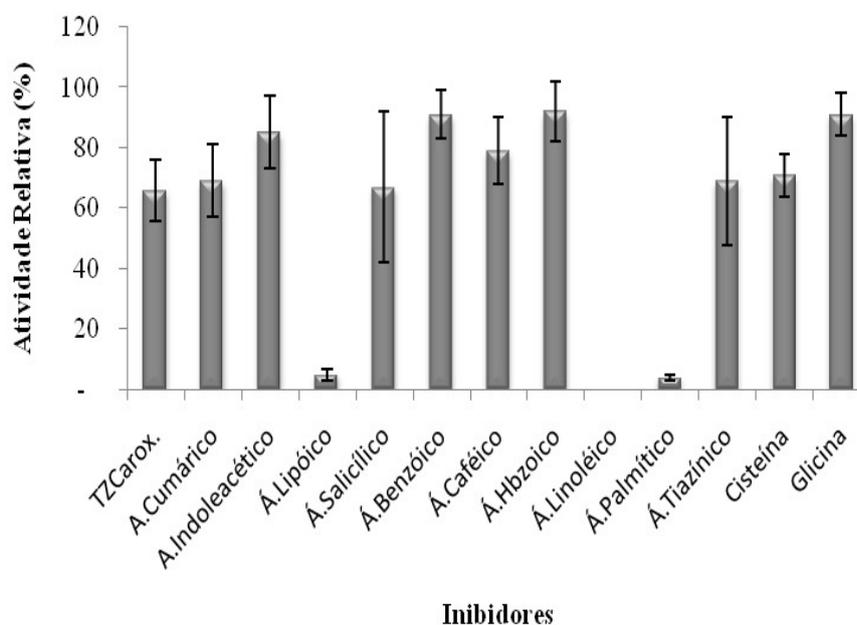


Figura 28. Efeito inibitório de ácidos carboxílicos na atividade luminescente da enzima tipo-luciferase expressa em pColdII.

4.6.5. Espectro de quimioluminescência

O espectro de quimioluminescência da enzima tipo-luciferase de *Z. morio* foi medido para a enzima expressa nos vetores pTrcHisC e pColdII e purificada. Nas primeiras medidas, feitas com baixa resolução devido à falta de sensibilidade do equipamento e ao baixo nível de expressão da enzima, o pico do espectro é em torno de 605 nm. Entretanto, durante visita ao AIST de Osaka, o Prof. Viviani conseguiu medir o espectro da enzima expressa a partir do vetor pTrcHisC em equipamento mais sensível, obtendo um pico em 615 nm, próximo ao valor da luciferase vermelha de *Phrixotrix* (VIVIANI et al., 1999). Entretanto, após a superexpressão em vetor pColdII e purificação, uma nova medida foi feita em nosso laboratório e o valor do pico muda para 610 nm, ou seja sofre um deslocamento para o azul (Figura 29).

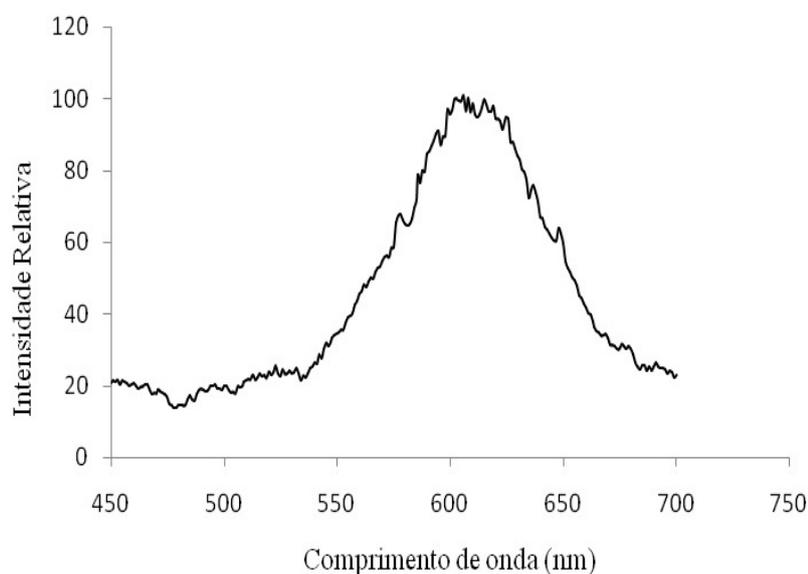


Figura 29. Espectro de quimioluminescência da enzima tipo-luciferase e purificada a partir de vetor pColdII.

4.7. Mutagênese sítio-dirigida no sítio de ligação da luciferina

Baseado na estrutura tridimensional da luciferase de *Photinus pyralis* e *Luciola cruciata* e no alinhamento das estruturas primárias de várias luciferases de besouros, observa-se que o sítio de ligação de luciferina contém resíduos altamente conservados entre as luciferases de besouros. Na enzima tipo-luciferase de *Z. morio*, porém, vários destes resíduos são substituídos. Com o objetivo de analisar o efeito das substituições na atividade luminescente e identificar os possíveis resíduos importantes para atividade luciferásica, o cDNA da enzima tipo-luciferase foi submetido a mutagênese sítio-dirigida, substituindo seus resíduos pelos encontrados nas luciferases.

A figura 30 mostra o alinhamento parcial de luciferases e da enzima tipo-luciferase e assim facilita a visualização dos resíduos que foram submetidos à mutagênese. A sequência da luciferase de *Photinus pyralis* foi usada como referência.

Ppy	NEYDFVPESFDRDKTIALIMN	SSGSTGLPKGVALPHRTACV	RFSHARDPIFGNQIIPDTA	236
Lcr	QASSFKTVEVDRKEQVALIMN	SSGSTGLPKGVQLTHENTVT	RFSHARDPIYGNQVSPGTA	238
PxRE	DPVKFNPKFDFPLERTALIMT	SSGTTGLPKGVVISHRSITIR	FVHSSDPIYGTRIAPDTS	233
Pte	NLQTFKPLHYDPVDQVAAILC	SSGTTGLPKGVMQTHRNICV	RLTHASDPRVGTQLIPGVS	233
Zop	DEKAFKP-SKTDIDDTAVMFF	SSGTTGLPKAICHSHRSFLQ	IVETSFYCG-----YDCRS	218
	: .	: :. ***:*****.: . : .	:	
Ppy	ILSVVP	FHHGFGMFTTLGYLICGF	RVVLMYRFEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFA	296
Lcr	VLTVVP	FHHGFGMFTTLGYLICGF	RVVMLTKFDEETFLKTLQDYKCTSVILVPTLFAILN	298
PxRE	ILAIAP	FHHAFGLFTALAYFPVGL	KIVMVKKFEFEFFLKIQNYKIASIVVPPPIMVYLA	293
Pte	VLAYLP	FHHAFGFSINLGYFMVGL	RVVMLRRFNQEVFLKAIQDYEVRSVINVPSTILFLS	293
Zop	ILHFTT	MYWITGMAILGRTEFLDGS	TRVFARSMEGEKTLMIEKYKLTSLFVAPIYTYQLT	278
	:* . . *	* *	:: * :..* . *	:
Ppy	KSTLIDKYDLSNLHEI	ASGGA	PLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAILITPEG-	355
Lcr	KSELLNKYDLSNLVEI	ASGGA	PLSKEVGEAVARRFNLPGVRQGYGLTETTSAILITPEG-	357
PxRE	KSPLVDEYNLSSLTEI	ACGGS	PLGRDIADKVAKRLKVHGIQGYGLTETCSALILSPNDR	353
Pte	KSPLVDKYDLSTLAEI	CCGAA	PLAKEVAEIAVKRLNLPGIRCGYGLTETSANIHTLHN-	352
Zop	NVPNPERYDLSSFRCL	LTGGT	PMSTDQYKLLTQLFPKAQVLF	GYGMS
			SEIGLLSIFHPEDD	338

Figura 30. Alinhamento da sequência de aminoácidos do sítio ativo da tipo-luciferase de *Z. morio* (Zop) e de luciferases de besouros relacionados: (Ppy) *Photinus pyralis*, (Lcr) *Luciola cruciata*, (PxRE) *Phrixotrix hirtus*, (Pte) *Pyrearinus termitilluminans*. Em destaque os motivos de ligação de luciferina (amarelo) e ATP (cinza). Destaque em vermelho: resíduos submetidos à mutação.

A enzima tipo luciferase de *Z. morio* originalmente possui uma baixa atividade luminescente na presença de luciferina e MgATP e baseado na estrutura primária de luciferases verdadeiras, era esperado que algumas mutações causassem o aumento da atividade luminescente desta enzima. Porém, a maioria das mutações tem um efeito negativo na atividade, diminuindo ou até abolindo a atividade luciferásica (figura 31).

As substituições I218R, Y244F, I246A comprometem a atividade em mais de 80 % e com as mutações M243F, T247F, L313A e F338Q e L347S a atividade cai para níveis não detectáveis com nossos equipamentos (PRADO et al., 2011).

Outras mutações causam um efeito mais discreto, como W245H que provoca uma diminuição em aproximadamente 40% e a mutação S343T que não tem efeito significativo mantendo uma atividade equivalente à enzima original.

As únicas substituições que mostram um efeito positivo na atividade luminescente envolvem o resíduo I345 (327 em enzima tipo-luciferase). Nesta posição observa-se 100% de aumento na atividade luminescente mediante sua substituição por Treonina - resíduo que é bem conservado em luciferase de besouros. Para entender melhor a influência desta posição no sítio ativo da enzima tipo-luciferase, I345 também foi substituído por Serina, que é encontrado em luciferase de *P. termitilluminas* e por Alanina. As duas mutações também mostram efeito positivo na atividade, porém, com menor magnitude.

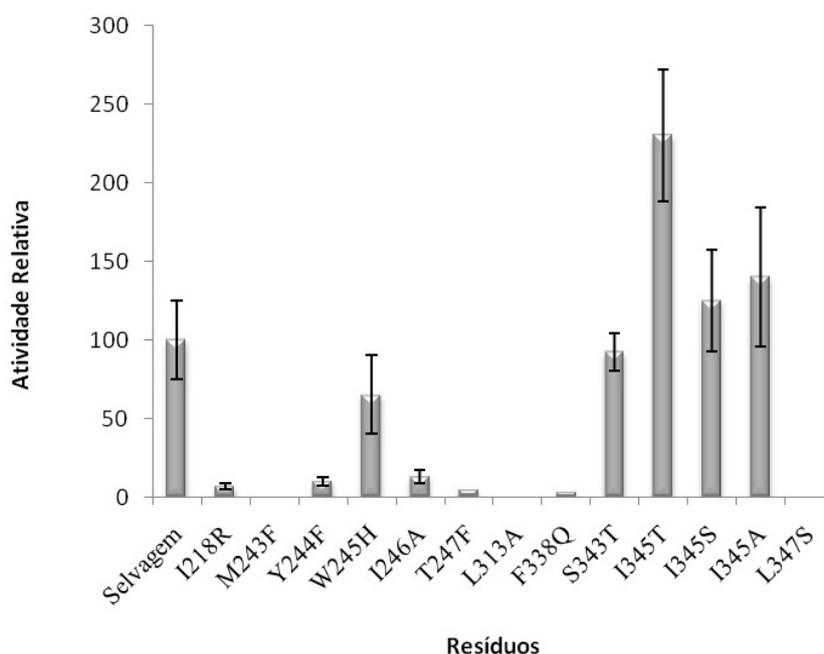


Figura 31. Efeito das mutações sítio-dirigidas em diferentes posições de resíduos da enzima tipo luciferase de *Z. morio*

Para auxiliar o entendimento do efeito da treonina nesta posição, o sítio de ligação da luciferina da luciferase de *Luciola cruciata* e da enzima tipo-luciferase de *Z. morio* foi submetido à modelagem. O modelo mostra que a treonina na posição 345 faz pontes de hidrogênio que estabilizam duas folhas B adjacentes (figura 32A) em *Luciola cruciata*. No caso da protoluciferase, que carece deste resíduo, essas duas folhas aparentam menos estruturadas (figura 32B).

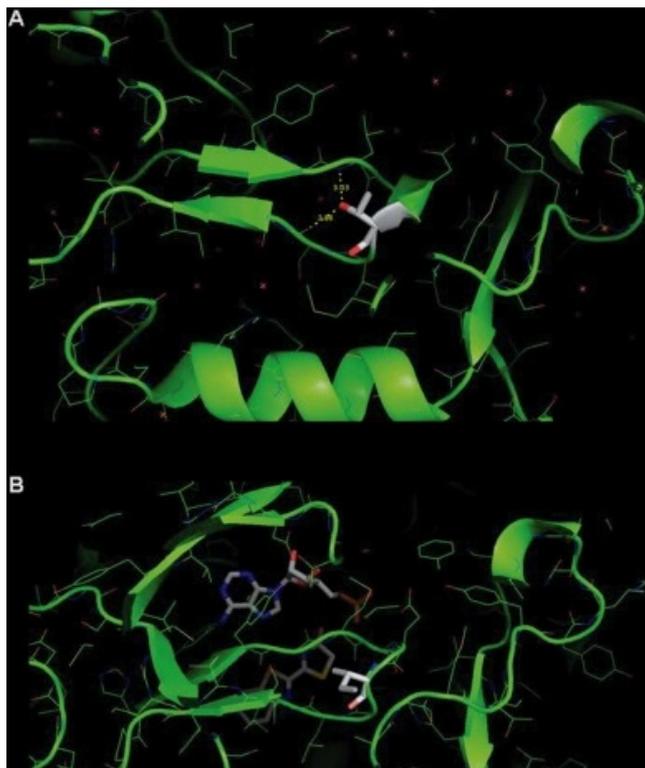


Figura 32. Modelo do sítio de ligação da luciferina mostrando o motivo grampo-Beta 322YGMSEI327. (A) *Luciola cruciata* com as interações estabilizantes do T345 com as duas folhas betas, (B) protoluciferase com I327 que carece das interações tabilizantes. (PRADO et al., 2011).

Para se certificar que o efeito das mutações não é resultado da quantidade de proteínas expressas, as amostras da enzima selvagem e de cada mutante foram analisadas por *Western Blotting*. Na figura 33, observa-se uma pequena variação na quantidade de proteínas, o que não justifica a diferença da atividade luciferásica. Pelo contrário, observa-se que em alguns casos, onde os mutantes tiveram uma grande diminuição na atividade, a quantidade de proteína é maior em relação à enzima selvagem.

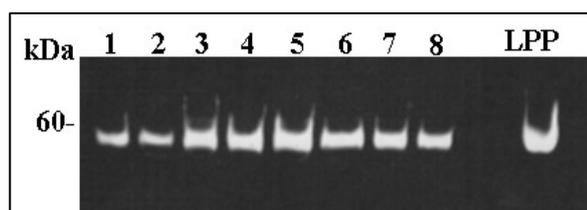


Figura 33. *Western Blotting* do extrato bruto da enzima tipo-luciferase submetida a mutagênese sítio-dirigida. (1) Enzima selvagem (2) Mutante M243F, (3) I246A, (4) Y244F, (5) L347S, (6) T247F, (7) F338Q, (8) I345T, (LPP) Luciferase de *P. pyralis* comercial de 60 kDa (10 µg).

4.7.1. K_M para ATP e Luciferina dos mutantes

Além da atividade luminescente, em alguns mutantes que tiveram os efeitos mais interessantes, foi analisado também o efeito das substituições sobre a afinidade para o ATP e para a luciferina. Os resultados dos K_M são mostrados na tabela 4. A maioria das mutações apresenta um aumento no valor de K_M para ATP indicando uma menor afinidade a este substrato. As mutações I218R, W245H, I345T mostram um efeito bem expressivo, com K_M até 10 vezes maior em relação a enzima selvagem. A mutação I246A praticamente mantém o valor de K_M em relação à enzima selvagem, apresenta apenas um pequeno aumento (tabela 4). Com relação ao K_M para a D-Luciferina, as mutações I218R, I246A, W245H apresentam um valor de K_M ligeiramente menor. Somente a mudança de S343T diminui consideravelmente o K_M para LH₂ indicando um aumento de afinidade para o substrato. Por outro lado, as mutações com efeito positivo sobre a atividade luminescente (resíduo 345) apresentam um K_M para luciferina ligeiramente maior que a enzima selvagem, indicando diminuição de afinidade por este substrato.

Tabela 4. K_M para ATP e Luciferina de enzima tipo-luciferase mutantes

Resíduo (<i>P.pyralis</i>)	Resíduo (<i>Z. morio</i>)	K_M (μ M)	
		ATP	LH ₂
Selvagem		260	800
I218R	205	2700	540
I246A	228	330	530
W245H	227	2460	600
I345T	327	2460	1000
I345A	327	900	1200
S343T	325	550	375

4.7.2. Espectro de quimioluminescência dos mutantes

O espectro de alguns mutantes (I218R e I345T) foi analisado usando espectrômetro ATTO de Osaka (Japão). A mutação I218R tem o espectro deslocado para o vermelho, aproximando-se assim à luciferase vermelha de *Phrixotrix hirtus*. O mutante I345T, que aumenta a atividade luminescente, também sofre um deslocamento hipsocrômico de 15 nm (figura 34).

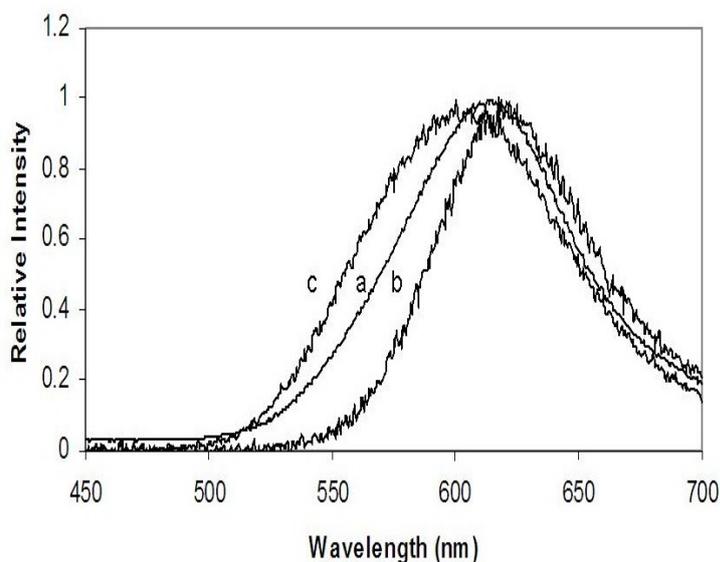


Figura 34. Espectro de quimioluminescência da enzima tipo-luciferase. (A) enzima selvagem, (B) mutante I218R, (C) Mutante I345T. Espectros medidos em espectrômetro AB 18150 da ATTO.

5. DISCUSSÃO

A bioluminescência é uma das formas mais exuberantes de comunicação animal e tem despertado o fascínio de observadores e o interesse científico por séculos. Apesar disto, a origem evolutiva da bioluminescência ainda é um mistério e poucos pesquisadores têm explorados essa questão.

Com relação à evolução da luciferase de coleópteros, os primeiros estudos feitos por McElroy et al. (1967) apontaram as similaridades nos mecanismos funcionais das luciferases e Acil-CoA sintetases de ácidos graxos. Com as primeiras clonagens de cDNA de luciferases (De WET et al., 1985; TATSUMI et al., 1989), ficou evidente a similaridade das sequencias das luciferases com enzimas da superfamília das AMP-ligases.

Em 1996, Viviani e Bechara encontraram uma enzima tipo-luciferase em larvas de *Tenebrio molitor*, um coleóptero não-bioluminescente filogeneticamente distante dos vaga-lumes. Esta enzima produziu fraca luminescência vermelha na presença de D-luciferina e ATP, com propriedades semelhantes às luciferases de besouros. Esta enzima tipo-luciferase poderia, portanto justamente constituir o elo entre as AMP-ligases e luciferases. Entretanto, a identidade da enzima permaneceu desconhecida por muitos anos.

Posteriormente, vários genes homólogos a luciferases de diferentes insetos foram clonados (OBA et al., 2004b, 2006; 2008) e seus produtos gênicos mostraram atividade de Acil-CoA sintetase, porém, nenhum destes mostrou atividade luciferásica.

Apesar da enzima tipo-luciferase de *T. molitor* ter sido originalmente associada ao corpo gorduroso (VIVIANI; BECHARA, 1996), em 2009 foi encontrado, por meio de imagem em câmara CCD e ensaios bioquímicos com larvas de *T. molitor* e seu parente próximo *Zophobas morio*, que estas enzimas tipo-luciferase são oriundas dos túbulos de Malpighi. Como os túbulos de Malpighi são estruturas extremamente finas e delicadas possivelmente não

foram adequadamente separados do corpo gorduroso durante a dissecação nos estudos originais. Este resultado foi reforçado pelo trabalho da estudante de iniciação científica Mirla Gomes (2009) em nosso laboratório, onde após cuidadoso isolamento dos túbulos de Malpighi e do corpo gorduroso de larvas de *T. molitor* foi verificado que a atividade luminescente está presente nos túbulos de Malpighi e não no corpo gorduroso. Além de estar presente no estágio larval, a atividade luminescente também foi encontrada nos adultos.

Estes resultados contribuíram para a clonagem de uma enzima tipo-luciferase similar à originalmente descobertas por Viviani e Bechara (1996). A enzima clonada a partir de túbulos de Malpighi de *Z. morio* é homóloga a luciferase de coleópteros, pertence à superfamília das AMP-ligases e sobretudo, apresenta uma fraca atividade luminescente na região do vermelho na presença de luciferina e ATP.

Apesar de sua baixa identidade com as luciferases (26-32%) e com as outras enzimas homólogas não-luminescentes clonadas por outro grupo (OBA et al., 2004b; 2006; 2008), a enzima de *Z. morio* é a primeira proteína que pode ser considerada como modelo razoável de *protoluciferase* para estudos de origem e evolução de luciferases a partir de AMP-ligases.

Aparentemente o termo *protoluciferase* seria mais apropriado para AMP-ligases oriundas de um organismo filogeneticamente mais próximos aos coleópteros bioluminescentes como *Agrypinus binodulus* (OBA et al., 2008), uma espécie de elaterídeo não-luminescente, ou aos produtos gênicos de *T. molitor*, TmLL-1, TmLL-2 (OBA et al., 2006) que mostraram maior identidade com as luciferases. Porém, embora o produto destes genes homólogos tenha mostrado atividade de Acil-CoA ligase, nenhum deles foi capaz de produzir atividade luminescente.

É possível que neste caso as condições experimentais não tenham sido adequadas, ou que o produto de expressão apresente alguma característica pós-traducional que impede seu enovelamento correto ou ainda que a proteína se torne insolúvel em condições experimentais.

Este último problema foi observado por Arnoldi (2009) ao clonar algumas luciferases de fengodídeos que não apresentaram atividade luminescente, embora tenham sido expressas em bactérias. Por essas razões, a enzima tipo-luciferase dos túbulos de Malpighi de *Z. morio* é até o presente o melhor modelo de *protoluciferase* e assim será referida.

Para melhor entender a origem da atividade luciferásica desta enzima e descobrir a sua função natural, a expressão, purificação e caracterização físico-química tornou-se necessária.

Esta *protoluciferase* é uma enzima relativamente estável, mantendo sua atividade luciferásica por aproximadamente 48 horas a 4°C. O pH ótimo é similar ao de luciferases de fengodídeos (*Phrixotrix viviani* e *P. hirtus*) e o K_M para ATP também é relativamente similar às luciferases (VIVIANI et al., 2006). Entretanto, o valor de K_M para LH₂ é bem maior quando comparado às luciferases. Este resultado não é surpreendente, uma vez que luciferina não é o substrato natural desta enzima.

Em ambiente marinho, suspeita-se que alguns organismos bioluminescentes não sejam capazes de sintetizar o próprio substrato, como é o caso de *Aequorea victoria* (Cnidaria) que provavelmente adquire a celenterazina por meio da dieta (HADDOCK et al., 2001). Além disso, o substrato quimioluminescente (celenterazina) pode ser encontrado também em diversos tecidos de organismos não bioluminescentes (SHIMOMURA, 1987). Porém, a luciferina de vaga-lumes é exclusiva de coleópteros da superfamília Elateroidea, não sendo encontrada em outros coleópteros não-bioluminescentes pesquisados. É provável que os coleópteros bioluminescentes possuam todos os genes necessários para a síntese de enzimas envolvidas no caminho biossintético da luciferina uma vez que a bioluminescência já é evidente na fase de ovo. Entretanto, tenebrionídeos não possuem luciferina, assim, definitivamente não é o substrato para esta protoluciferase (VIVIANI; BEHCARA, 1996).

Acredita-se que a celenterazina em organismos marinhos eram moléculas antioxidantes e tinham a função de desintoxicação do oxigênio (REES et al., 1998;

DUBUISSON et al., 2004). Quando a força da seleção para o mecanismo de defesa antioxidante diminuiu, uma seleção funcional para bioluminescência pode ter ocorrido (REES et al., 1998). No caso de coleópteros, sugere-se que a luciferase surgiu a partir das Acil-graxo CoA ligases a partir de duplicação gênica antes da divergência das diferentes famílias de coleópteros (VIVIANI, 2002; OBA et al., 2008; DAY et al., 2009; VIVIANI, et al., 2009). Saber qual a função original desta enzima de *Z. morio* é um dos nossos objetivos futuros.

Com intuito de inferir qual a função biológica e qual o substrato natural desta protoluciferase, alguns ácidos (ácidos aromáticos, ácidos graxos, aminoácidos) foram utilizados em ensaios de inibição enzimática. Todos os ácidos graxos de cadeia longa possuem um efeito inibitório acentuado na atividade luminescente, em especial o ácido linoléico. Além disto, medidas preliminares da atividade de tioesterificação com CoA também foram realizadas utilizando a protoluciferase e os mesmos ácidos utilizados nos testes de inibição. Os resultados apontam maior taxa de tioesterificação com os ácidos graxos de cadeia longa como o substrato preferencial à tioesterificação, entretanto, estes dados necessitam ser reproduzidos. Apesar destes resultados, ainda é prematuro afirmar que ácidos graxos constituem o substrato desta *protoluciferase* e que ela tenha surgido das Acil-graxo CoA ligases, uma vez que AMP-ligases são conhecidas por atuar uma ampla variedade de ácidos carboxílicos para diferentes propósitos, incluindo transporte através da membrana, biossíntese de lipídios, etc. (BABBITT; KENYON, 1992, GARGIULO, et al., 1999, SCHMELTER, et al., 2004). Como as AMP-ligases são um grupo de enzimas que possuem ampla distribuição celular com diferentes funções, também podem possuir uma ampla variedade de substratos. Também não se descarta a possibilidade desta enzima ter função de degradação e desintoxicação de xenobióticos (KNIGHTS; DROGEMULLER, 2000). Isto é sugerido pelo fato desta enzima ativar a D-luciferina, que para *Zophobas* constitui um xenobiótico. Sabe-se que os túbulos de Malpighi, presentes nos insetos, podem desempenhar importante papel na detoxificação de xenobióticos

através das reações da Fase II (GEARTNER et al., 1998, TORRIE et al., 2004, RUIZ-SANCHES et al., 2007). Como esta protoluciferase foi extraída dos túbulos de Malphigi, é possível que ela esteja envolvida na excreção de xenobióticos.

Independente de sua função, a atividade luminescente desta *protoluciferase* de *Z. morio*, na presença de LH₂ e ATP, mostra que o potencial para a bioluminescência nas AMP-ligasas é bem antigo e deve ter surgido muito antes da divergência das famílias Elateroidea.

Estudos mostraram que, assim como as luciferases de *Phrixotrix hirtus*, *Pyrearinus termitiluminans* e *Photinus pyralis*, a reação luminescente desta protoluciferase mostra uma forte estereoseletividade para a D-luciferina em relação ao seu isômero L (VIVIANI et al., 2010). Este resultado sugere que o evento chave no surgimento da bioluminescência em coleópteros foi a estereoseletividade das AMP ligasas, cuja eficiência na orientação do fosfato α do ATP em direção ao carboxilato do substrato foi alcançada com o isômero D. O próximo passo seria a orientação do carbono C4 ao ataque de oxigênio para um aumento na constante catalítica e no rendimento quântico que foi conseguido pelas atuais luciferases.

Para aumentar a expressão desta proteína em bactérias, subclonamos o cDNA primeiramente em vetor pTrcHisC e então em vetor pCold II. Na primeira subclonagem, em vetor de expressão pTrcHisC, obtivemos uma melhora na expressão protéica em relação ao vetor de clonagem pBlueScript, porém a *protoluciferase* expressa se mostrou parcialmente insolúvel e também, por razão não totalmente clara, não aderiu a coluna de níquel durante a purificação. Provavelmente neste caso a longa cauda N-terminal adicionada pelo vetor afetou a solubilidade da enzima e também a exposição da cauda de histidina a resina de níquel. Entretanto, usando o vetor pColdII, a expressão de protoluciferase solúvel aumentou consideravelmente em relação ao vetor pTrcHisC. Acredita-se que o aumento deva-se em parte à expressão em baixas temperaturas e a menor cauda N-terminal com domínio de histidina neste vetor em relação ao pTrcHisC.

Os únicos organismos terrestres a emitirem luz vermelha são os fengodídeos (*P. hirtus* e *P. vivianii*). Além destes, apenas formas mutantes de luciferases verde-amarela também têm o espectro deslocado para o vermelho (VIVIANI et al., 2002, 2007). Naturalmente, a faixa espectral dos coleópteros é ampla, variando do verde ao vermelho e esta variedade é atribuída exclusivamente a luciferase, uma vez que a luciferina para todos os coleópteros é a mesma.

Apesar do sítio de ligação da luciferina ser altamente conservado entre todas as luciferases de besouros, alguns poucos resíduos diferentes nestas regiões e outras podem ser responsáveis pela variação de cores. Na protoluciferase de *Z. morio*, porém, a maioria dos resíduos desta região de ligação é substituído por outros (VIVIANI et al., 2009).

Com o objetivo de analisar o efeito das substituições dos resíduos do sítio de ligação de luciferina na atividade luminescente, o cDNA da protoluciferase foi submetido a mutagênese sítio-dirigida, substituindo-os pelos resíduos encontrados nas luciferases.

A maioria das mutações provoca a diminuição da atividade original da protoluciferase. Entre elas o I205R (R218 na luciferase de *P. pyralis*) que em luciferases esta Arginina está inserida no fundo do sítio ativo da enzima e é importante para a ligação com o substrato, proporcionando interações eletrostáticas com o fenolato da luciferina (BRANCHINI, et al., 1998, 2001, 2003; VIVIANI et al., 2001; VIVIANI et al., 2002). A luciferase verde de *Phrixothrix viviani* teve seu espectro deslocado para o vermelho quando submetida à mutação R218S (VIVIANI; OHMIYA, 2000). Luciferases verde-amarelo de *Photinus pyralis* submetidas à substituição R218A também tiveram seu espectro deslocado para a região do vermelho (BRANCHINI et al., 2001). Na protoluciferase, o resíduo 205 é uma Isoleucina, que apresenta uma cadeia lateral maior e hidrofóbica e que pode afetar a estabilidade da luciferina no sítio ativo pela formação de um ambiente mais hidrofóbico ao redor do fenolato da oxiluciferina. A mutação I205R resulta em um deslocamento de espectro (7 nm) em direção a região do vermelho se aproximando com o espectro observado na luciferase vermelha de

Phrixotrix (PRADO et al., 2011). Apesar da diminuição na atividade luminescente, esta mutação aumenta a afinidade com a luciferina conforme os valores calculados para K_M , o que mostra a importância da Arginina 218 para a afinidade com a luciferina e a criação de um ambiente mais polar ao redor do fenolato de luciferina.

O motivo 244HHGF247 (luciferase de *P. pyralis*) faz parte de um *loop* que conecta a folha β à hélice 8 ao lado do sítio de ligação da luciferina. Na protoluciferase os resíduos M225, W227 e I228 foram substituídos pelos respectivos encontrados em luciferases. A substituição M225F promove acentuada diminuição da atividade luminescente provavelmente devido à troca de um resíduo com uma grande cadeia lateral o que pode ter ocasionado a diminuição do tamanho da cavidade do sítio ativo e a habilidade de ligação da luciferina. O resíduo Y226 (244H em *P. pyralis*) é substituído por Histidina em luciferases de lampirídeos e por Fenilalanina em luciferases de elaterídeos. Estes resíduos são considerados importantes para estabilização hidrofóbica dos anéis tiazólicos da luciferina. Na *protoluciferase* a mutação Y226F diminui drasticamente a atividade luciferásica possivelmente pela mudança estrutural no sítio de ligação em virtude da substituição por um resíduo apolar. A posição 228 (246 em *P. pyralis*) é composta por Glicina ou por Alanina em luciferases verdadeiras. Estes resíduos são considerados importantes na acomodação da luciferina e na flexibilidade do sítio de ligação (VIVIANI et al., 2001). A presença de um resíduo de Isoleucina na *protoluciferase* pode afetar a ligação com o substrato como observado pela mutação I228A que causa a diminuição no K_M para luciferina, indicando um aumento na afinidade apesar da atividade luminescente ter diminuído. A posição 229 (247 em *P. pyralis*), que se localiza na hélice 8 logo após o sítio de ligação da luciferina, possui Fenilalanina em todas as luciferases de besouros e Treonina na protoluciferase. A mutação T229F, que tem efeito tanto na polaridade quanto no tamanho da cavidade do sítio da luciferina, na protoluciferase também diminui a atividade luminescente. O resíduo H245 em *P. pyralis* é considerado importante cataliticamente por fazer ligações de

hidrogênio com a oxiluciferina e AMP tendo sido associado à função oxigenásica (BRANCHINI et al., 1999). Em luciferase de vaga-lume, a mutação H245A causou uma mudança de espectro para o vermelho com uma constante catalítica menor, mas a mesma substituição não afetou o espectro da luciferase vermelha de *Phrixothrix hirtus* (VIVIANI et al., 2007). A mutação W227H na protoluciferase (245 em *P. pyralis*), aparentemente remove uma ligação de hidrogênio com a oxiluciferina e com o AMP que poderia ser importante para a ligação de luciferina. Porém a reposição do Triptofano pela Histidina surpreendentemente também diminui a atividade luciferásica, sugerindo que esta Histidina por si só não é tão importante para a atividade luminescente como sugerido anteriormente ou que possivelmente a ausência do Triptofano na protoluciferase pode ser compensada por outros resíduos.

Entre as mutações no motivo 338QGYGLTETTS347, a mutação L329S (347 em *P. pyralis*) merece destaque. O resíduo conservado S347 em luciferases, é substituído por Leucina na protoluciferase e em outras enzimas homólogas de *Tenebrio molitor* (OBA et al., 2006). Oba et al. (2009), por meio da mutação L345S, obtiveram uma atividade luminescente fraca em AMP ligases não-luminescentes homólogas a luciferases clonadas de *D. melanogaster* e besouros não-luminescentes e sugeriram que esta substituição é determinante para converter uma Acil-graxo CoA sintetase em luciferase. Porém, embora tal substituição possa estabelecer fraca atividade luminescente nestas AMP-CoA ligases, é provável que tal substituição não seja essencial para converter uma AMP/CoA-ligase em luciferase, considerando que na protoluciferase, o resíduo correspondente é uma Leucina e não Serina, e esta enzima já possui originalmente uma atividade luciferásica considerável (VIVIANI et al., 2009). Ao contrário, a substituição L329S na protoluciferase resulta em uma severa diminuição da atividade luminescente (PRADO et al., 2011). A única substituição que aumenta a atividade luminescente é na posição 327 (T345 em *P. Pyralis*), que resulta em mais de 100% de aumento de atividade mediante a substituição I327T. O respectivo resíduo T345 é conservado em

luciferase de besouros e está localizado no motivo grampo- β 342-348, que tem resíduos participando do sítio de ligação da luciferina. De acordo com Conti et al. (1996), este é um dos poucos loops com estrutura definida e é conservado em luciferases, mas não em Acyl-CoA ligases. Em luciferases este *loop* contém também o resíduo catalítico T343 que é responsável por orientar a carboxila da D-Luciferina para a interação com o fosfato α do ATP e possivelmente também pode estabilizar o estado de transição levando a uma eficiente produção de adenilato (BRANCHINI et al., 2003). De acordo com a modelagem, o resíduo T345 faz pontes de hidrogênio que estabilizam as duas folhas B adjacentes, provavelmente ajudando a estabilizar o *loop* numa conformação cataliticamente ativa. Na protoluciferase I327 é incapaz de formar estas pontes de hidrogênio, tornando o *loop* aparentemente mais flexível e desestruturando parcialmente esta importante região. A mutação I327T, conseqüentemente, pode reestabelecer contatos polares que ajudam na estabilização de uma conformação apropriada para a catálise, aumentando a atividade. Para entender melhor a influência desta posição no sítio ativo da protoluciferase, a I327 também foi substituída por Serina, que é encontrada em luciferase de *P. termitilluminas* e por Alanina. As duas mutações também conservam o efeito positivo, porém, com menor magnitude. Entre os mutantes I327S e I327A, o efeito na atividade é equivalente, sugerindo que a hidroxila não seja essencial para este processo. A mutação I327T também causa um pequeno aumento no K_M para luciferina, sugerindo que tal substituição teve pouco efeito na afinidade pela luciferina, mas um grande efeito no sítio de ligação do ATP evidenciado pelo considerável aumento do K_M para ATP.

Finalmente, os estudos de mutagênese sítio-dirigida mostram que substituições individuais nos resíduos da protoluciferase pelos encontrados em luciferases por si só não são capazes de converter uma “ligase” em luciferase. Evidentemente um sítio ativo apropriado para acomodar eficientemente o substrato quimioluminescente depende da sequencia de vários

resíduos específicos e suas interações, que se refletem não só na estrutura tridimensional da proteína bem como nas interações com o substrato e no estado de transição.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, pela primeira vez, uma enzima tipo-luciferase funcional pertencente à superfamília das AMP-ligases foi clonada, expressada, purificada e caracterizada. Esta enzima apresenta naturalmente uma fraca atividade luminescente na presença de luciferina e ATP e pelas análises filogenéticas ela está distantemente relacionada às luciferases de coleópteros, sugerindo que o potencial para bioluminescência em AMP-ligases seja bem mais antigo do que esperado. Assim, ela apresenta as características que seriam esperadas para uma protoluciferase, embora claramente não seja o ancestral verdadeiro (que deve ter desaparecido durante a evolução) das luciferases. Esta enzima serviu como modelo razoável para os estudos sobre a evolução das luciferases, um dos temas mais intrigantes dentro da bioluminescência. Os estudos de mutagênese sítio-dirigida apresentados começaram a mostrar a origem estrutural da atividade luminescente nas AMP-ligases. Entre eles o loop 322YGMSEI327 (341YGLTETT347 em *Photinus pyralis*) parece desempenhar papel essencial na atividade oxigenásica.

7. PERSPECTIVAS

O presente projeto abriu perspectiva para uma caracterização estrutural e funcional mais detalhada desta enzima. O protocolo de expressão e purificação da protoluciferase poderá ser utilizado para a expressão massiva e sua purificação necessária para a determinação da estrutura tridimensional por cristalografia de raios X. A resolução desta protoluciferase será importante para estudos comparativos com a estrutura das luciferases já resolvida ajudando a entender a origem estrutural da atividade oxigenásica.

A proteína pura será utilizada também na produção de anticorpo que será aplicado em estudos de imunohistoquímica com a finalidade de descobrir a origem celular da protoluciferase.

Além disso, testes específicos serão conduzidos para descobrir o real substrato desta enzima e sua respectiva função biológica nos Túbulos de Malpighi.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMAS, M. V.; TOWNSEND, L. D. Bioluminescence in Dinoflagellates: A test of the burgular alarm hypothesis. **Ecology**, v. 74, p. 258-260, 1993.
- ANDREU, N. et al. Optimisation of bioluminescent reporters for use with Mycobacteria. **PLoS ONE**, v. 5, p. 1-16, 2010.
- ARNOLDI, F. G. C. **Aspectos evolutivos da bioluminescência de Elateroidea (Coleoptera) do Brasil**. 2009. 129f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.
- AST, J. C. et al. *Photobacterium kishitanii* sp. nov., a luminous marine bacterium symbiotic with deep-sea fishes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 57, p. 2073-2078, 2007.
- BABBIT, P. C., KENYON, G. L. Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: analysis of the amino acid sequence identities among families of acyl:adenyl ligases, enoyl-CoA, hydratases/isomerases and acyl-CoA thioesterases. **Biochemistry**, v. 31, p. 5594-5604, 1992.
- BAKER, G. H. et al. Distribution and phylogenetic relationships of Australian glow-worms *Arachnocampa* (Diptera, Keroplatidae). **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 48, p. 506-514, 2008.
- BASSOT, J. M. Les Cellules Lumineuses de Coleoptere Phengodes. **Extrait de Recherches Biologiques Contemporareus**. Imp. Vagner 4 Trim. Nancy, France, 1974.
- BECHARA, E. J. H. Luminescent elaterid beetles: biochemical, biological and ecological aspects. **Adv. Oxygen. Process**, v. 1, p. 123-178, 1988.
- BIGGLEY W. H.; LLOYD, J. E.; SELIGER, H. H. The spectral distribution of firefly light. II. **J. Gen. Physiol.** v. 50, p. 1681-1692, 1967.
- BODE, V. C.; HASTINGS, J. W. The purification and properties of the bioluminescent system in *Gonyaulax polyedra*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 103, p. 488-499, 1963.
- BOURGOIS, J. J. et al. Kinetics of light emission and oxygen consumption by bioluminescent bacteria. **J. Bioenerg. Biomembr.** v. 33, p. 353-363, 2001.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensivite method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 7, p. 248-254, 1976.
- BRANCHINI, B. R. et al. Role of lysine 529, a conserved residue of the acyl-adenylate-forming enzyme superfamily in firefly luciferase. **Biochemistry**, v. 39, p. 5433-5440, 1999.
- BRANCHINI, B.R. et al. Site-directed mutagenesis of histidine 245 in firefly luicferase: a proposed model of the active-site. **Biochemistry**, v. 37, p. 15311-15319, 1998.
- BRANCHINI, B. R. et al. The role of active site residue arginine 218 in firefly bioluminescence. **Biochemistry**, v. 40, p. 2410-2418, 2001.

- BRANCHINI, B.R. et al. A mutagenesis study of the putative luciferin binding site residues of firefly luciferase. **Biochemistry**, v. 42, p. 10429-10436, 2003.
- BRANCHINI, B. R. et al. An alternative mechanism of bioluminescence color determination in firefly luciferase. **Biochemistry**, v. 43, p. 7255-7262, 2004.
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrados**. São Paulo: Editora Guanabara Koogan, 2007, 937 p.
- BUCK J. B. The anatomy and physiology of the light organs in fireflies. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 49, p. 397-483, 1948.
- CHALFIE, M. Green fluorescent protein. **Photochem. Photobiol.**, v. 62, p. 651-656, 1995.
- CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802-805, 1994.
- CHOMCZYNSKY, P., SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acidic guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extractions. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159, 1987.
- COHN D. H. et al. Nucleotide sequence of the luxA gene of *Vibrio harveyi* and the complete amino acid sequence of the alpha subunit of bacterial luciferase. **J. Biol. Chem.**, v. 25, p. 6139-6149, 1985.
- COLEPICOLO, P.; COSTA, C.; BECHARA, E. J. H. Brazilian species of luminescent Elateridae. Luciferin identification and bioluminescence spectra. **Insect Biochem.**, v. 16, p. 803-810, 1986.
- COLEPICOLO, P. et al. Growth and luminescence of the bacterium *Xenorhabdus luminescens* from a human wound. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 55, p. 2601-2606, 1989.
- CONTI, E.; FRANKS, N. P.; BRICK, P. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. **Structure**, v. 4, p. 287-298, 1996.
- COSTA, C. Estado de conocimiento de los Coleoptera neotropicales. **Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa** (Versión Electrónica 32), 2003.
- COSTA, C.; VANIN, S.A.; CESARI-CHEN, S.A. **Larvas de Coleoptera do Brasil**. São Paulo: Museu de Zoologia (Universidade de São Paulo), 1988, 282 p.
- COSTA, C. C.; VANIN, S. A. Coleoptera larval fauna associated with termite nests (Isoptera) with emphasis on the "Bioluminescent Termite Nests" from central Brazil. **Psyche**, v. 2010, p. 1-13, 2010.
- DAY, J. C.; TISI, L. C.; BAILEY, M. J. Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin, **Luminescence**, v. 19, p. 8-20, 2004.

- DAY, J. C.; GOODALL, T. I.; BAILEY, M. J. The evolution of the adenylate-forming protein family in beetles: Multiple luciferase gene paralogues in fireflies and glow-worms, **Mol. Phylogenet Evol.**, v. 50, p. 93-101, 2009.
- DeLUCA, M. Hydrophobic nature of the active site of firefly luciferase. **Biochemistry**, v. 8, p. 160-166, 1969.
- De WET, J. R. et al. Cloning of firefly luciferase cDNA and expression of active luciferase in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 7870-7873, 1985.
- DUNLAP, J.C.; HASTINGS, J. W. Biochemistry of dinoflagellate bioluminescence: purification and characterization of dinoflagellate luciferina from *Pyrocystis lunula*., **Biochemistry**, v. 20, p. 983-989, 1981.
- EZQUERRA, M. A. **Vocabulário de indigenismos en las Crónicas de Indias**, Madrid: EBCOMP, S.A, 1997, 127 p.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.
- FRACKMAN, S.; ANHALT, M.; NEALSON, K. H. Cloning, organization, and expression of the bioluminescence genes of *Xenorhabdus luminescens*. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 5767-5773, 1990.
- FUJINO T.; YAMAMOTO, T. Cloning and functional expression of a novel long-chain acyl-CoA synthetase expressed in brain. **J. Biochem.**, v. 111, p. 197-203, 1992.
- GAERTNER, L. S.; MURRAY, C. L.; MORRIS, C. E. Transepithelial transport of nicotine and vinblastine in isolated Malpighian tubules of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) suggest a P-glycoprotein-like mechanism. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 2637-2645, 1998.
- GARGIULO, C. E.; STUHLSTZ-KROUPER, S. M.; SCHAFFER, J. E. Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane. **J. Lipid Res.**, v. 40, p. 881-892, 1999.
- GHIRANDELLA, H. The anatomy of light production: the fine structure of the firefly lantern. **Microscopic anatomy of invertebrates**, v. 11, p. 363-381, 1998.
- GOMES, M. M. C. C. **Atividade luminescente em túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de Zophobas morio (Coleoptera: Tenebrionidae), espécie não bioluminescente, em duas fases da vida: larva e adulto**. Sorocaba: UFSCar, 2009. 33p. Trabalho de conclusão de curso.
- GUI, J.; SHEN, J.; LI, L. Functional characterization of evolutionary divergent 4-coumarate: CoA ligases in Rice. **Plant Physiology**, v. 157, p. 574-586, 2011.
- HADDOCK, S. H. D.; RIVERS, T. J.; ROBISON, B. H. Can coelenterates make coelenterazine? Dietary requirement for luciferin in cnidarian bioluminescence. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 98, p. 11148-11151, 2001.

- HADDOCK, S. H. D.; MASTROIANNI, N.; CHRISTIANSON, L. M. A photoactivatable green-fluorescent protein from the phylum Ctenophora. **Proc. R. Soc. B.**, v. 277, p. 1155-1160, 2005.
- HADDOCK, S. H.; MOLINE, M. A.; CASE, J. F. Bioluminescence in the sea. **Ann. Ver. Mar. Sci.**, v. 2, p. 443-93, 2010.
- HANEDA, Y.; TSUJI, F. I. Light production in the luminous fishes *Photoblepheron* and *Anomalops* from the Band Islands. **Science**, v. 173, p. 143-145, 1971.
- HANNA, C. H.; HOPKINS, T. A.; BUCK, J. Peroxisomes of the firefly lantern. **Journal of Ultrastructural Research**, v. 57, p. 150-162, 1976.
- HARVEY, E. N. **A history of luminescence. From the earliest times until 1900.** Philadelphia: The American Philosophical Society, 1957, 770 p.
- HASTINGS, J. W. Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. **J. Mol. Evol.**, v. 19, p. 309-321, 1983.
- HASTING, J. W. Bioluminescence: similar chemistries but many different evolutionary origins. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 62, p. 599-600, 1995.
- HASTINGS, J. W. Bioluminescence, In: SPERELAKIS, N., **Cell Physiology**, New York: Academic Press, 2001, p. 1115-1131.
- HASTINGS, J. W.; DUNLAP, J. C. Cell-free components in dinoflagellate bioluminescence. The particulate activity: scintillons, the soluble components: luciferase, luciferin, and luciferin-binding protein. **Method. Enzymol.** v. 133, p. 307-327, 1986.
- HERRING, P. J. Bioluminescence of invertebrates other than insects. In: _____. **Bioluminescence in Action**, London: Academic Press, 1978, p. 199-240.
- HERRING, P. J. How to survive in the dark: Bioluminescence in the deep sea. In: LAVERAK, M. S., **Physiological adaptations of marine animals**, Cambridge: Soc. Exp. Biol. Symp. The company of biologists Ltda, 1985, p. 323-350.
- HERRING, P. J. Systematic distribution of bioluminescence in living organisms. **J. Biolumin. Chemilumin.**, v. 1, p. 147-163, 1987.
- HIRANO, T. et al. Spectroscopic studies of the light-color modulation mechanism of firefly (beetle) bioluminescence, **J. Am. Chem. Soc.**, v. 131, p. 2385-2396, 2009.
- HOPKINS, T. A. et al. The chemiluminescence of firefly luciferin. A model for the bioluminescence reaction and identification of the product excited state. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 89, p. 7148-7150, 1967.
- HORST, G. V. D. et al. 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.

- HUTT, A. J.; CALDWELL, J. The importance of stereo-chemistry in the clinical pharmacokinetics of the 2-aryl-propionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Clin Pharmacokinet**, v. 9, p. 371-373, 1984.
- JOHNSTON, T. C.; THOMPSON, R. B.; BALDWIN, T. O. Nucleotide sequence of the luxB gene of *Vibrio harveyi* and the complete amino acid sequence of the beta subunit of bacterial luciferase. **J. Biol. Chem.**, v. 26, p. 4805-48011, 1986.
- KATO, D. et al. New application of firefly luciferase – it can catalyze the enantioselective thioester formation of 2-arylpropanoic acid. **FEBS Journal**, v. 274, p. 3877-3885, 2007.
- KIM, Y. S. **The natural philosophy of CHU HIS 1130-1200**, Philadelphia: American Philosophical Society, 2000, p. 196.
- KNIGHTS, K. M.; DROGEMULLER, C. J. Xenobiotic-CoA ligases: kinetic and molecular characterization. **Current Drug Metabolism**, v. 1, p. 49-66, 2000.
- KOVÁCS, F.; METTENLEITER, T. C. Firefly luciferase as a marker for herpesvirus (pseudorabies virus) replication *in vitro* and *in vivo*. **J. Gen. Virol.**, v. 72, p. 2999-3008, 1991.
- KWON, H. et al. Bioluminescence imaging of dual gene expression at the single-cell level. **BioTechniques**, v. 48, p. 460-462, 2010.
- LALL, B.A. et al. Ecology of colors of firefly bioluminescence. **Science**, v. 225, p. 512-514, 1980.
- LAWRENCE, J. F.; NEWTON, A. F. Evolution and classification of beetles. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 13, p. 261-290, 1982.
- LEE, J. Bioluminescence of the Australian glow-worm, *Arachnocampa richardsae* Harrison. **Photochem. Photobiol.**, v. 24, p. 279-285, 1976.
- LLOYD, J. E. Bioluminescence communication in insects. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 16, p. 97-122, 1971.
- LLOYD, J. E. Bioluminescence and communication in insects. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 38, p. 131-160, 1983.
- MANCINI, J. A. et al. Cloning and expression of the *Photobacterium phosphoreum* luminescence system demonstrates a unique lux gene organization. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 14308-14314, 1988.
- MATSUI, S. et al. 4-Hydroxyretinal, a new pigment chromophore found in the bioluminescent squid, *Watasenia scintillans*. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 966, p. 370-374, 1998.
- McCAPRA, F. The chemistry of bioluminescence. **Endeavour.**, v. 32, p. 139-145, 1973.
- McCAPRA, F. et al. The chemical origin of color differences in beetle bioluminescence. In: CAMPBELL, A. K.; KRICKA, L. J.; STANLEY, P. E. **Bioluminescence and**

- chemiluminescence: fundamental and applied aspects**, Chichester: John Wiley and Sons, 1994, p. 387-391.
- McELROY, W. D. The energy source for bioluminescence in an isolated system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 33, p. 342-345, 1947.
- McELROY, W. D.; DeLUCA, M.; TRAVIS, J. Molecular uniformity in biological catalysis. **Science**. V. 157, p. 150-157, 1967.
- McELROY W. D.; DeLUCA, M. Chemistry of firefly bioluminescence. In: HERRING, P. J. **Bioluminescence in Action**. New York.: Academic Press, 1978, p. 109-127.
- MEYER-ROCHOW, V. B. Glowworms: a review of *Arachnocampa* spp. and kin. **Luminescence**, v. 22, p. 251-265, 2007.
- MIYAWAKI, A. Green fluorescent protein-like proteins in reef Anthozoa animals. **Cell Struct. Func.**, v. 27, p. 343-347, 2002.
- MORIHARA, T. et al. Selective inhibition of Abeta42 production by NSAID R-enantiomers. **J. Neurochem.**, v. 83, p. 1009-1012, 2002.
- MORIN, J. G.; REYNOLDS, G. T. Spectral and kinetic characteristics of bioluminescence in *Pelagia noctiluca* and other coelenterates. **Biol. Bull.**, v. 143, p. 470-471, 1972.
- MORIN, J. G. et al. Light for All Reasons: Versatility in the Behavioral Repertoire of the Flashlight Fish. **Science**, v. 190, p. 74-76, 1975.
- NAKAJIMA, Y. et al. cDNA cloning and characterization of a secreted luciferase from the luminous Japanese ostracod, *Cypridina noctiluca*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 68, p. 565-570, 2004.
- NAKAJIMA, Y. et al. Enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging. **PLoS ONE**5, e10011, 2010.
- NAKAMURA, M. et al. Firefly luciferase exhibits bimodal action depending on the luciferin chirality. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 331, p. 471-475, 2005.
- NAKATSU, T. et al. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. **Nature**, v. 44, p. 372-376, 2006.
- NAYLOR, L. H. Reporter gene technology: the future looks bright. **Biochem. Pharm.**, v. 58, p. 749-757, 1999.
- NICOLAS, M. T. et al. Characterization of the bioluminescent organelles in *Gonyaulax polyedra* (Dinoflagellates) after fast-freeze fixation and antiluciferase immunogold staining. **J. Cell Biol.** v. 105, p. 723-735, 1987.
- NOGUCHI, T. et al. Dual-color luciferase mouse directly demonstrates coupled expression of two clock genes. **Biochemistry**, v. 49, p. 8053-8061, 2010.

- OBA Y. et al. Identification of the luciferin-luciferase system and quantification of coelenterazine by mass spectrometry in the deep-sea luminous ostracod *Conchoecia pseudodiscophora*. **ChemBiochem.**, v.5, p. 1495-1499, 2004a.
- OBA, Y.; OJIKI, M.; INOUE, S. Characterization of *CG6178* gene product with high sequence similarity to firefly luciferase in *Drosophila melanogaster*. **Gene**, v. 329, p. 137-145, 2004b.
- OBA, Y.; SATO, M.; INOUE, S. Cloning and characterization of the homologous genes of firefly luciferase in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Insect Mol. Biol.**, v. 15, p. 293-299, 2006.
- OBA, Y. et al. Orthologous gene of beetle luciferase in non-luminous click beetle, *Agrypnus binodulus* (Elateridae), encodes a fatty acyl-CoA synthetase. **Gene**, v. 407, p. 169-175, 2008.
- OBA, Y.; IIDA, K.; INOUE, S. Functional conversion of fatty acyl-CoA synthetase to firefly luciferase by site-directed mutagenesis: a key substitution responsible for luminescence activity. **FEBS Letters**, v. 583, p. 2004-2005, 2009.
- OHMIYA, Y.; NIWA, H. Firefly luciferase exhibits bimodal action depending on the luciferin chirality. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 331, p. 471-475, 2005.
- OLIVEIRA, A. G.; STEVANI, C. V. The enzymatic nature of fungal bioluminescence. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 8, p. 1416-1421, 2009.
- OSBORN, K. J. et al. Description and relationships of *Chaetopterus pugaporcinus*, an unusual pelagic Polychaete (Annelida, Chaetopteridae). **Biol. Bull.**, v. 212, p. 40-54, 2007.
- PAGE, R. D. M. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, v. 12, p. 357-358, 1996.
- PENDERGAST, J. S. et al. Disconnected circadian and cell cycles in a tumor-driven cell line. **Commun. Integr. Biol.**, v. 3, p. 536-539, 2010.
- PRADO, R. A. et al. Structural evolution of luciferase activity in *Zophobas* mealworm AMP/CoA-ligase (protoluciferase) through site-directed mutagenesis of the luciferin binding site. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 10, p. 1226-1232, 2011.
- REDFORD, K.H. Prey attraction as a possible function of bioluminescence in the larvae of *Pyrearinus termitiluminans* (Coleoptera: Elateridae). **Rev. Bras. Zool.**, v. 1, p. 31-34, 1982.
- REES, J. F. et al. The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defense mechanisms into deep-sea communication tools. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 1211-1221, 1998.
- RICHARDS et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*, *Tribolium* Genome Sequencing Consortium, **Nature**, v. 452, p. 949-95, 2008.
- RODA, A.; GUARDIGLI, M. Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 402, p. 69-71, 2011.

- RUIZ-SANCHEZ, E. et al. Transepithelial transport of salicylate by Malpighian tubules of insects from different orders. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, p. 1034-1-45, 2007.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 4, p. 406-25, 1987.
- SALA-NEWBY, G. B.; THOMSON, C. M.; CAMPBELL, A. K. Sequence and biochemical similarities between the luciferases of the glowworm *Lampyris noctiluca* and the firefly *Photinus pyralis*. **Biochem. J.**, v. 313, p. 761-767, 1999.
- SALVETTI, A. R. Uma Luz grega, In: _____. **A História da Luz**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2008, p. 17-20.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning**, a laboratory manual.2. ED. New York: Cold Spring Harbor, 1989, 2344 p.
- SCHMELTER, T., et al. Biochemical demonstration of the involvement of fatty acyl-CoA synthetase in fatty acid translocation across the plasma membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 24163-24170, 2004.
- SCHNEIDER, K., et al. A new type of peroxisomal Acyl-Coenzyme A Synthetase from *Arabidopsis thaliana* has the catalytic capacity to activate biosynthetic precursors of jasmonic acid. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 13962-13972, 2005.
- SCHOLTEN, J. D., et al. Novel enzymic hydrolytic dehalogenation of a chlorinated aromatic. **Science**, v. 253, p. 182-185, 1991.
- SCHROEDER, S. Protein sequence homology between plant 4-coumarate:CoA ligase and firefly. **Nucleic Acids Res.**, v. 17, p. 460, 1989.
- SELIGER, H. H.; MCELROY, W.D. Chemiluminescence of firefly luciferin without enzyme. **Science**, v. 138, p. 683-685, 1962.
- SELIGER, H. H.; MCELROY, W. D. The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v. 52, p. 75-81, 1964.
- SELIGER, H. H.; MCELROY, W. D. Bioluminescence enzyme catalyzed chemiluminescence. In: _____. **Light: Physical and biological action**, New York: Academic Press, 1965, p. 169-198.
- SELIGER, H. H. The origin of bioluminescence. **Photochem. Photobiol.**, v. 21, p. 355-361, 1975.
- SHIMOMURA, O. Presence of coelenterazine in non-bioluminescent marine organisms. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 86B, p. 361-363, 1987.
- SHIMOMURA, O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. **J Microscopy**, v. 217, p. 3-15, 2005.

- SHIMOMURA, O. **Bioluminescence. Chemical Principles and Methods**, Massachusetts: Mainland Press Pte Ltd, 2006, 470 p.
- SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F. H.; SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. **J. Cell. Comp. Physiol.**, v. 59, p. 223-239, 1962.
- SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F. H.; HANEDA, Y. Observations on the biochemistry of luminescence in the New Zeland glowworm, *Arachnocampa luminosa*. In: JOHNSON, F. H.; HANEDA, Y. **Bioluminescence in Progress**. Princeton: Princeton University Press, 1978, p. 487-494.
- SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F. H. Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, v. 72, p. 1546-1549, 1975.
- SHIMOMURA, O.; FLOOD, P. R. Luciferase of the scyphozoan medusa *Peryphylla periphylla*. **Biol. Bull.**, v. 194, p. 244-252, 1998.
- SILVA-NETO, A. J., et al. *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. 1748-1754, 2009.
- SIVINSKY, J. The nature and possible functions of luminescence in Coleoptera larvae. **Coleopterists bulletin**, v. 35, p. 167-179, 1981.
- SMALLEY, K.N.; TARWATER, D. E.; DAVIDSON, T. L. Localization of fluorescent compounds in the firefly light organ. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 28, p. 150-161, 1980.
- SUZUKI, H., et al. Structure and regulation of rat long chain fatty acyl-CoA sintetase. **J. Biol. Chem.**, v. 25, p. 8681-8685, 1990.
- SWOFFORD, D. L. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2002.
- TATSUMI, H., et al. Luciferase cDNA from Japanese firefly *Luciola cruciata*: cloning, structure and expression in *Escherichia coli*. **J. Biolumin. Chemilumin.**, v. 3, p. 75-78, 1989.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: 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. 4673-4680, 1994.
- TIEMANN, D. Observation on the natural history of the western banded glow-worm *Zarhipis integripennis*. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v. 35, p. 235-264, 1967.
- TOH, H. N-terminal halves of gramidicin S synthetase and tyrocidine synthetase 1 as novel members of firefly luciferase family. **Protein Seq. Data Anal.**, v. 3, p. 517-521, 1990.
- TONOLLI, P. N., et al. Bioluminescent fat body of larval *Aspisma lineatum* (Coleoptera: Lampyridae) firefly: ontogenic precursor of lantern's photogenic tissue. **Ann. Entomol. Soc. Am.** v. 104, p. 761-767, 2011.

- TORRIE, L. S., et al. Resolution of the insect *Oubain paradox*. **P.N.A.S.**, v. 101, p. 13689-13693, 2004.
- TU, S.C. Bacterial bioluminescence: biochemistry. In: HORSPOLL, W. M.; LENCI, F. **CRC Handbook of organic photochemistry and photobiology**. Washington, DC: CRC Press LLC, 2004, p. 1-17.
- UGAROVA, N. N.; BROVKO, L. Y. Relationship between the structure of the protein globule and bioluminescence spectra of firefly. **Russ Chem. Bull**, v. 50, p. 1752-1761, 2001.
- VIVIANI, V. R. The origin, diversity and structure function relationships of insects luciferases. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 59, p. 1833-1850, 2002.
- VIVIANI, V.R.; BECHARA, E. J. H. Biophysical and biochemical aspects of phengodid bioluminescence. **Photochem. Photobiol.**, v. 58, p. 615-622, 1993.
- VIVIANI, V.R.; BECHARA, J. H. Larval *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) fat body extracts catalyze D-luciferin and ATP-dependent chemiluminescence. A luciferase-like enzyme. **Photochem. Photobiol.**, v. 63, p. 713-718, 1996.
- VIVIANI, V. R.; BECHARA, J. H. Bioluminescence and biological aspects of Brazilian railroadworms (Coleoptera: Phengodidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 90, p. 389-393, 1997.
- VIVIANI, V. R.; BECHARA, E. J. H.; OHMIYA, Y. Cloning, sequence analysis and expression of cDNAs for *Phrixothrix* railroad worm luciferases: Relationship between bioluminescence spectra and primary structures. **Biochemistry**, v. 38, p. 8271-8279, 1999a.
- VIVIANI V.R., et al. Cloning and molecular characterization of cDNA for Brazilian larval click-beetle *Pyrearinus termitiluminans* luciferase. **Photoch. Photobiol.**, v. 70, p. 254-260, 1999b.
- VIVIANI, V. R.; OHMIYA, Y. Bioluminescence color determinants of *Phrixothrix* railroadworm luciferases: chimeric luciferases, site-directed mutagenesis of Arg215 and guanidine effect. **Photochem. Photobiol.**, v. 72, p. 267-271, 2000.
- VIVIANI, V., et al. Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. **Biochem. Bioph. Res. Com.**, v 280, p. 1286-1291, 2001.
- VIVIANI, V. R. ; HASTINGS, J. W. ; WILSON, T. Two bioluminescent Diptera: the North-American *Orfelia fultoni* and the Australian *Arachnocampa flava*. Similar niche, different bioluminescent systems. **Photochem. Photobiol.**, v. 75, p. 22-27, 2002.
- VIVIANI, V. R., et al. Active-site properties of *Phrixothrix* railroad worm green and red bioluminescence-eliciting luciferases. **J. Biochem.**, v. 140, p. 467-474, 2006.
- VIVIANI, V. R.; OHMIYA, Y. Bovine serum albumin displays luciferase-like activity in presence of luciferyl-adenylato: insights on the origin of protoluciferase activity and bioluminescence colors. **Luminescence**, v. 21, p. 262-267, 2006.

- VIVIANI, V. R., et al. The influence of the loop between residues 223-235 in beetle luciferases bioluminescence spectra: a solvent gate for the active site of pH-sensitive luciferases. **Photochem. Photobiol.**, v. 83, p. 1-7, 2007.
- VIVIANI, V. R., et al. CCD imaging of basal bioluminescence in larval fireflies: clues on the anatomic origin and evolution of bioluminescence. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.7, p. 448-452, 2008.
- VIVIANI, V. R., et al. An ancestral luciferase in the Malpighian tubules of a non-bioluminescent beetle. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 8, p. 57-61, 2009.
- VIVIANI, V. R., et al. The origin of luciferase activity in zophobas mealworm AMP/CoA-ligase (protoluciferase): luciferin stereoselectivity as a switch for the oxygenase activity. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 9, p. 1111-1119, 2010.
- WIDDER, E. A. Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and ecological diversity. **Science**, v. 328, p. 704-708, 2010.
- WHITE, E. H., et al. The chemi and bioluminescence of firefly luciferin: an efficient chemical production of excited states. **Bioorg. Chem.**, v. 1, p. 92-122, 1971.
- WHITE, E. H.; BRANCHINI, B. Modification of firefly luciferase with a luciferin analog: a red light producing enzyme. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 97, p. 1243-1245, 1975.
- WILSON, T. Comments on the mechanisms of chemi and bioluminescence. **Photochem. Photobiol.**, v. 62, p. 601-606, 1995.
- WOOD, K. V. The chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence. **Photochem. Photobiol.**, v. 62, p. 662-673, 1995.
- WOOD, K. V., et al. Complementary DNA coding click beetle luciferase can elicit bioluminescence of different colors. **Science**, v. 244, p. 700-702, 1989.
- WU, C., et al. In vivo far-red luminescence imaging of a biomarker based on BRET from *Cypridina* bioluminescence to an organic cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 15, p. 15599-15603, 2009.
- ZUMSTEG, A., et al. A bioluminescent mouse model of pancreatic β -cell carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 1465-147, 2010.

ANEXOS

9. TAMPÕES E REAGENTES

9.1. Meio de cultura LB (Luria Bertani) pH 7,5

Tripona: 10 g, Extrato de Levedura: 5 g, NaCl: 10 g
q.s.p.: 1 L

9.2. Meio de cultura LB Ágar (Luria Bertani) pH 7,0

Triptona: 10 g, Extrato de Levedura: 5 g, NaCl: 10 g, Ágar: 15g
q.s.p.: 1 L

9.3. Meio de Cultura SOB pH 7,0

Triptona: 20 g, Extrato de Levedura: 5 g, NaCl: 0,5 g, KCl 250 mM: 10 ml
q.s.p.: 1 L
Adicionar 5 ml de MgCl₂ 2 M (esterilizado por filtração)

9.4. Solução Bloqueadora (*Western Blotting*)

Leite em pó desnatado 5% em tampão PBS-T

9.5. Solução de Coloração de Gel SDS-PAGE

Metanol 50%, Água deionizada 40%, Ácido Acético Glacial 10%, Coomassie Blue R250 0,2 % (p/v)

9.6. Solução Descorante de Gel SDS-PAGE

Idem a Solução de Coloração sem o Coomassie Blue

9.7. Tampão de Amostra 2X (SDS-PAGE)

TRIS 0,5 M pH 6,8, SDS 25% (p/v), Glicerol 20% (v/v), B-mercaptoetanol 10% , Azul de Bromofenol 0,1%

9.8. Tampão de diálise (Purificação)

Tris-HCl 25 mM, NaCl 10 mM, EDTA pH 8 1 mM, Glicerol 10%, DTT 2 Mm

9.9. Tampão de Eluição (Purificação)

Tampão Fosfato 50 mM pH 7, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM

9.10. Tampão de Extração

TRIS 25mM pH 8, EDTA 1mM pH 8, Glicerol 10%, TRITON X 1%

9.11. Tampão de Extração Modificado (Purificação)

Tampão Tris-HCl 25 mM, Triton 1%

9.12. Tampão de lavagem (Purificação)

Tampão Fosfato 50 mM pH 7, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM

9.13. Tampão PBS 10 X (*Western Blotting*) pH 7,4

Na₂HPO₄ 50 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 1,5 M

9.14. Tampão PBST-T (PBS Tween) (*Western Blotting*)

Tween-20 1% em PBS 1X

9.15. Tampão TAE 50 X

TRIS: 242 g, EDTA 0,5 M pH 8: 100 ml, Ácido acético glacial: 57,2 ml

q.s.p.: 1 L

9.16. Tampão TB (Transformation Buffer) pH 6,8

PIPES final 10 mM, CaCl₂.2H₂O 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂.4H₂O 55 mM

Esterilizar por filtração (0,22 µM)

10. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

10.1. Artigos publicados vinculados ao projeto:

- ❖ VIVIANI, V. R.; PRADO, R. A.; ARNOLDI, F. C. G.; ABDALLA, F. C. 2009. An ancestral luciferase in the Malpighian tubules of a non-bioluminescent beetle. **Photochem. Photobiol. Sci.** v. 8, p: 57-61.

- ❖ VIVIANI, V. R.; SCORSATO, V.; PRADO, R. A. P.; PEREIRA, J. G. C.; NIWA, K.; OHMIYA, Y.; BARBOSA, J. A. R. G. 2010. The origin of luciferase activity in *Zophobas* mealworm AMP/CoA-ligase (protoluciferase): luciferin stereoselectivity as a switch for the oxygenase activity. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 9, p: 1111-1119.

- ❖ PRADO, R. A.; BARBOSA, J. A.; OHMIYA, Y.; VIVIANI, V. R. 2011. Structural evolution of luciferase in *Zophobas* mealworm AMP/CoA-ligase (protoluciferase) through site-directed mutagenesis of the luciferin binding site. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 10, p: 1226-1232.

10.2. Artigos publicados de trabalhos paralelos:

- ❖ VIVIANI V. R.; AMARAL, D.; PRADO, R.; ARNOLDI, F. G. 2011. A new blue-shifted luciferase from the Brazilian *Amydetes fanestratus* (Coleoptera: Lampyridae) firefly: molecular evolution and structural/functional properties. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 10, p: 1879-1886.

10.3. Artigos enviados para publicação:

- ❖ AMARAL, D. T.; PRADO, R. A.; VIVIANI, V. R. Luciferase from *Fulgeochlizus bruchi* (Coleoptera: Elateridae), a Brazilian click-beetle with a single lantern: molecular evolution, biological function and comparison with other click-beetle luciferases.