

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

MARIÉLE C. DE CARVALHO

**“Clonagem e caracterização das isoformas de luciferases de lanternas e corpo gorduroso do vagalume *Aspisma lineatum* (Lampyridae: Cratomorphini): Origem estrutural e evolutiva das luciferases pH-sensitivas mais eficientes a partir de ancestrais pH-insensitivas”**

São Carlos - SP

2020

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

MARIÉLE C. DE CARVALHO

**“Clonagem e caracterização das isoformas de luciferases de lanternas e corpo gorduroso do vagalume *Aspisma lineatum* (Lampyridae: Cratomorphini): Origem estrutural e evolutiva das luciferases pH-sensitivas mais eficientes a partir de ancestrais pH-insensitivas”**

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

Orientação: Prof. Dr. Vadim R. Viviani

São Carlos - SP

2020

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos nº 2016/07312-6, 2010/05426-8, sendo que, as opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP; da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Mariéle Cristina de Carvalho, realizada em 30/10/2020.

#### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Vadim Viviani (UFSCar)

Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva (UFSCar)

Profa. Dra. Marystela Ferreira (UFSCar)

Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara (USP)

Prof. Dr. Anderson Garbuglio de Oliveira (USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

*Para meus pais Cida e Mário*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Maria Aparecida e Mário por todo amor, apoio e incentivo. Vocês são minha fortaleza e eu lhes amo incondicionalmente.

Agradeço ao Dr. Vadim Viviani pela oportunidade de trabalho e ensinamentos.

A todos os colegas e ex-colegas do grupo de pesquisa, que me ajudaram durante todos esses anos seja com observações científicas ou com palavras de apoio e incentivo nos momentos de desmotivação. Um agradecimento especial ao Dr. Atílio Tomazini e ao Dr. Danilo T. Amaral, que colaboraram diretamente na execução do projeto e aos colegas Raone Reis Mariano, Daniel Rangel e Gabriel Pelentir que me ajudaram com as coletas dos insetos. Meu muito obrigada a todos vocês!

A todos os docentes do Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) e do *campus* Sorocaba da Universidade Federal de São Carlos por contribuírem com a minha formação desde a graduação até o doutorado.

A todos os técnicos e funcionários do *campus* Sorocaca da Universidade Federal de São Carlos que mantém a estrutura, limpeza e organização da universidade. O trabalho árduo de todos vocês é o que permite que tenhamos estrutura e boas condições na realização de qualquer tipo de pesquisa.

À FAPESP (2016/07312-6), CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

## Resumo

Luciferases de vagalumes emitem luz verde-amarela com alta eficiência em pH fisiológico. No entanto, sob condições ácidas, na presença de metais pesados ou altas temperaturas, elas emitem luz vermelha. Para entender a origem estrutural das diferentes cores de bioluminescência e da sensibilidade ao pH, mais de 30 luciferases de vagalumes já foram clonadas, sequenciadas e caracterizadas. Recentemente, o sítio de ligação para prótons e metais em luciferases foi identificado. Entretanto, como as atuais luciferases pH-sensíveis encontradas nas lanternas dos vagalumes se originaram e evoluíram ainda não está claro. Assim sendo, neste trabalho foi feita a clonagem, caracterização e comparação dos cDNAs das isozimas de luciferases das lanternas e corpo gorduroso do vagalume *Aspisma lineatum* (Lampyrinae: Cratomorphini). A isoforma AL2 do corpo gorduroso possui 545 aminoácidos, apresenta uma cinética extremamente lenta e um espectro de emissão insensível à variações de pH. Em contraste, a isoforma AL1, encontrada na lanterna possui 548 aminoácidos, cinética rápida do tipo *flash*, espectro pH-sensível e uma eficiência catalítica 10 vezes maior que a isoforma AL2. Análises de estabilidade térmica e de CD mostraram que a AL2, além de ser pH-insensível, é muito mais termoestável e rígida do que a isoforma AL1 e outras luciferases de vagalumes investigadas até o momento. A posição 310, cujos resíduos estão envolvidos na sensibilidade ao pH, é substituída por uma glutamina na isoforma da lanterna AL1 e por glutamato na isoforma AL2 do corpo gorduroso, indicando que a substituição E310Q pode ter sido determinante na origem do fenótipo pH-sensível. Estes resultados demonstram que as luciferases pH-sensíveis, encontradas nas lanternas de vagalumes, se originaram por flexibilização estrutural à partir de uma luciferase ancestral mais rígida, pH-insensível, menos eficiente. Estes resultados também mostram que a isoforma AL2, devido à sua alta termoestabilidade, tem potencial para aplicabilidade biotecnológica em bioimagem.

**Palavras-chave:** Bioluminescência, Luciferases, sensibilidade ao pH, *Aspisma lineatum*.

**Abstract**

Firefly luciferases emit yellow-green light with high efficiency at physiological pH. However, under acidic conditions, in the presence of heavy metals or high temperatures, they emit red light. To understand the structural origin of the different colors of bioluminescence and the sensitivity to pH, more than 30 luciferases of fireflies have already been cloned, sequenced and characterized. Recently, the binding site for protons and metals in luciferases has been determined. However, how the efficient pH-sensitive luciferases of firefly lanterns emerged and evolved is not clear. Therefore, in this work, the cloning, characterization and comparison of the cDNAs of the isozymes of the luciferases of the lanterns and the fatty body of the firefly *Aspisoma lineatum* (Lampyrinae: Cratomorhini) was carried out in order to better understand the origin and evolution of the sensitivity to pH. The isoform AL2 from the fat body has 545 amino acids, extremely slow kinetics and an emission spectrum insensitive to pH variations. In contrast, the AL1 isoform found in the adult lantern has 548 amino acids, flash-type kinetics, pH-sensitive spectrum and a catalytic efficiency 10x greater than the AL2 isoform. Analysis of thermal stability and CD spectra showed that the pH-insensitive form is much more thermostable and rigid than the lanterns isoform and other firefly luciferases investigated so far. The position H310, which is involved in the pH sensitivity of firefly luciferases, is replaced by a glutamine in the lantern isoform and by glutamate in the fat body one, indicating that the substitution E310Q may be determinant for the origin of the phenotype pH-sensitive. These results indicate that the pH-sensitive luciferases, found in firefly lanterns, originated from a more rigid, pH-insensitive, less efficient ancestral luciferase. These results also show that the isoform AL2, due to its high thermostability, has potential for biotechnological applicability.

**Keywords:** Bioluminescence, Luciferases, pH-sensitivity, *Aspisoma lineatum*.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Linha do tempo contendo alguns dos principais estudos dentro da bioluminescência. .... 21

**Figura 2.** Alguns representantes de organismos bioluminescentes marinhos: **(A)** Bactéria- *Photobacterium phospherum*; **(B)** Anelídeo- *Tomopteris*; **(C)** Cordado- *Linophryne coronata*; **(D)** Tunicado – *Pyrosoma atlanticum*; **(E)** Molusco- *Watasenia scintillans*; **(F)** Dinoflagelado- *Pyrocystis fusiformis*; **(G)** Ctenóforo- *Bathyctena*; **(H)** Radiolários; **(I)** Equinodermo- *Plutonaster bifrons*; **(J)** Anelídeo- *Chaetopterus*; **(K)** Cnidário- *Aequorea Victoria*; **(L)** Nudibrânquio- *Phylliroe* e **(M)** Quetognatas – *Caecosagitta macrocephala*. Autoria: A, D, F, I : Edith Widder; B, C, G, H, L, M: Steve Haddock; E: BBC natural history; K: Duane W. Sears; J: Vadim Viviani. .... 24

**Figura 3.** Estrutura molecular das principais luciferinas encontradas em organismos marinhos. **(A)** Luciferina tetrapirrólica; **(B)** Celenterazina; **(C)** FMNH<sub>2</sub>; **(D)** *Cypridina*. Fonte: HADDOCK *et al.*, 2010 (adaptado). .... 25

**Figura 4.** Exemplos de organismos bioluminescentes terrestres: **(A)** Díptero *Neoceroplatus betaryiensis*; **(B)** Anelídeo *Microscolex phosphoreus*; **(C)** Fungo *Neonothopanus gardneri*; **(D)** Vagalume *Macrolampis* sp2. Fontes: (A) Adaptado de Falaschi *et al.*, 2019.; (B) Adaptado de OBA *et al.*, 2017 – fotografia de Yuichi Oba; (C) Fotografia de Cassius Stevani; (D) Fotografia de Vadim Vivivani. .... 26

**Figura 5.** Representantes bioluminescentes das diferentes famílias de coleópteros: **(A)** Lampirídeo *Cratomorphus concolor*, **(B)** Fengodídeo *Phrixotrix hirtus*, **(C)** Elaterídeo *Pyrophorus divergens*. Autoria: Vadim Viviani. .... 27

**Figura 6.** **(A)** Cupinzeiro boluminescente; **(B)** Larva de *P. termitilluminans* responsável pela bioluminescência em cupinzeiros. Autoria: (A) Fotografia de Ary bassous (adaptado); (B) Fotografia de Pedro Busana (adaptado de AMARAL *et al.*, 2015)..... 28

**Figura 7.** Luciferina de besouros e seu produto de oxidação oxiluciferina. Fonte: VIVIANI, 2002 (adaptado). .... 29

- Figura 8.** Mecanismo da reação catalisada por luciferases de besouros. Fonte: Branchini *et al.*, 2003 (adaptado). ..... 30
- Figura 9.** (A) Diagrama topológico da enzima. (B) Estrutura tridimensional da luciferase de *P. pyralis*. Domínio C-terminal em amarelo e domínio N-terminal com seus subdomínios: Subdomínio A em azul, Subdomínio B em lilás, Subdomínio c em verde. Fonte: CONTI *et al.*, 1996 (adaptado). ..... 32
- Figura 10.** Cor da bioluminescência da luciferase do lampirídeo *Macrolampis sp2* em diferentes valores de pH. Fonte: VIVIANI *et al.*, 2018<sup>B</sup> (adaptado). ..... 34
- Figura 11.** Comparativo entre os mecanismos de reação de AMP-ligases e luciferases. (I) Etapa de Adenilação; (II) Etapa de tioesterificação com CoA das ligases em preto e etapa oxidativa das luciferases de besouros destacado em vermelho. .... 37
- Figura 12.** (A) Larva intacta do tenebrionídeo *Z. morio*, (B) Túbulos de Malpighi de *Z. morio* isolados, (C) Imagem da bioluminescência dos mesmos após 20 minutos de exposição em câmara CCD ATTO com injeção de D-luciferina 10 Mm. Fonte: VIVIANI *et al.*, 2009 (adaptado). ..... 38
- Figura 13.** Ensaios *in vitro* mostrando a enzima tipo-luciferase selvagem (esquerda) e o mutante I237S (direita), ambas expressas em vetor pColdII. Fonte: VIVIANI *et al.*, 2013 (adaptado). ..... 39
- Figura 14.** Estrutura tridimensional do domínio catalítico da protoluciferase *Z.morio*: (A) dobra global; (B) Sobreposição estrutural da luciferase *Luciola cruciata* complexada com AMP e oxiluciferina (em ciano) sobre a enzima do tipo luciferase (em lilás). Fonte: PRADO *et al.*, 2016 (adaptado). ..... 40
- Figura 15.** Mecanismo proposto para modulação de cor da bioluminescência por pH e presença de metais divalentes nas luciferases de lampirídeos. Fonte: VIVIANI *et al.*, 2018<sup>B</sup>(adaptado)..... 43

- Figura 16.** Lampirídeo *Aspisma lineatum*: **(A)** Larva; **(B)** Vista dorsal do adulto e **(C)** Vista ventral do adulto evidenciando a lanterna. Autoria: Raone Reis Mariano. ....44
- Figura 17.** Sequência de cDNA e de aminoácidos da isoforma de luciferase AL1 da lanterna de *A. lineatum* (AMARAL *et al.*, 2017). Em destaque a sequência sinalizadora SKL ..... 63
- Figura 18.** Sequência de cDNA e de aminoácidos da isoforma de luciferase AL2 do corpo gorduroso de *A. lineatum* (AMARAL *et al.*, 2017). Em destaque a sequência sinalizadora SKL. .... 64
- Figura 19.** Filogenia molecular de luciferases de vagalumes usando abordagens bayesianas e de máxima verossimilhança. Os clados bem suportados com probabilidade maior que 1 e *bootstrap* de 100 foram marcados com asterisco \* .....65
- Figura 20.** Análise SDS-PAGE do processo de purificação da luciferase do corpo gorduroso da larva AL2 (à esquerda) e da lanterna do adulto AL1 (à direita). **(MM)** marcador de peso molecular, **(1)** extrato bruto, **(2)** lisado celular, **(3)** primeiro eluato, **(4)** lavagem e **(4-8)** amostras eluídas. .... 66
- Figura 21.** Atividade relativa de ambas luciferases de *A. lineatum* com adenilato de luciferina (cinza claro) e luciferina + ATP (cinza escuro). .... 67
- Figura 22.** Comportamento cinético da reação bioluminescente das luciferases de *A. lineatum* em condições padrão (0,5 mM de luciferina; 4 mM de ATP; 85 µL de tampão Tris-HCl 0,1M pH8; ~ 1 µg de enzima), sem Coenzima-A, e após adição de Coenzima-A na concentração final de 0,05 mM. As setas indicam o momento em que a Co-A foi adicionada à mistura reacional: **(A)** Luciferase AL 1 da lanterna do adulto; **(B)** Luciferase AL 2 do corpo gorduroso. .... 68
- Figura 23.** Curvas de saturação e gráficos duplo-recíproco para obtenção dos valores de  $K_M$  para ATP e Luciferina. **(A)** Luciferase AL2; **(B)** Luciferase AL1...70

**Figura 24.** Curvas de pH ótimo das luciferases de *A. lineatum*: **(A)** luciferase do corpo gorduroso da larva AL2 e **(B)** Luciferase da lanterna do adulto AL1. .... 72

**Figura 25.** Comparação entre os espectros de emissão das luciferases da lanterna (AL1) e do corpo gorduroso (AL2) de *A. lineatum*. **(Cinza claro)** AL1, **(Cinza escuro)** AL2. .... 73

**Figura 26.** Comparativo entre os espectros de emissão em reações feitas com luciferina (cinza) e LH<sub>2</sub>-AMP (preto). **(A)** Isoforma AL1 e **(B)** Isoforma AL2.....73

**Figura 27.** Sensibilidade espectral ao pH das isoformas de luciferase AL1 e AL2 do vagalume *A. lineatum*. **(A)** Espectros da isoforma AL2, **(B)** Espectros da isoforma AL1. .... 74

**Figura 28.** Efeito de metais na concentração de 1 mM na a atividade luminescente das luciferases de *A. lineatum*: (Cinza claro) AL1 pH sensível; (Cinza escuro) AL2 pH insensível. .... 75

**Figura 29.** Efeito da presença de metais na concentração de 1 mM nos espectros de bioluminescência da luciferase pH-sensível AL1 de *A. lineatum*. .... 77

**Figura 30.** Efeito da presença de metais na concentração de 1 mM no o espectro de bioluminescência da luciferase pH-insensível do corpo gorduroso de *A. lineatum*. .... 78

**Figura 31.** Estabilidade térmica das isoformas AL 1 e AL2 4°C, 22°C e 37°C. **(A)** Luciferase AL2. O tempo de ensaio para essa enzima foi de 0-120 horas; **(B)** Luciferase AL1. O tempo de ensaio para essa enzima foi de 0-48 horas; **(C)** Comparação da estabilidade térmica de ambas luciferases à 37°C. .... 79

**Figura 32.** Termoestabilidade da luciferase pH-insensível AL2 de *A. lineatum*. **(A)** Imagem da bioluminescência *in vitro* da AL2 incubada à 37°C (0-120 horas),

50°C (0-6 horas) e 60°C (0-15 minutos); **(B)** Medida luminométrica da estabilidade térmica à 50°C; **(C)** Medida luminométrica da estabilidade térmica à 60°C. .... 80

**Figura 33.** Espectro de dicroísmo circular e efeito da temperatura no desdobramento proteico. **(A)** Espectros de CD. O espectro UV-distante foi obtido em 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 120 mM NaCl, pH 7.5 usando um caminho óptico de 1 mm. **(B)** Desenovelamento térmico de 3.5 μM de luciferases. Foi monitorado pela mudança no sinal do CD à 222 nm em resposta ao aquecimento. A temperatura foi elevada de 20 a 100°C na escala de 1°C/min. A fração desenovelada da proteína e os valores de T<sub>m</sub> (T\*) foram calculados usando OriginLab, função Boltzmann, curva sigmoideal. .... 81

**Figura 34.** Multialinhamento das sequências das luciferases de *A. lineatum* (AL1 e AL2) com outras luciferases. **(pH-sensitivas):** *L. cruciata* (LCR1 e LCR2), *Macrolampis* sp2 (MAC), *C. distinctus* (CRT), *A. vivianii* (AMY), *P. pyralis* (PPY), *P. pennsylvanica* (PPE), *L. lateralis* (LLA), *H. parvula* (HPA), *L. noctiluca* (LNO). **(pH-insensitivas):** *P. termitilluminans* (PTE), *P. vivianii* (PVGR) e *P. hirtus* (PHRE). Em destaque os resíduos do sensor de pH..... 83

**Figura 35.** Alinhamento entre sequências de luciferases pH-sensitivas, luciferase pH-insensitiva de *P. termitilluminans* e luciferases pH-insensitivas basais de outros lampirídeos. Em destaque as posições que apresentam substituições de resíduos do *loop* 352-361 entre enzimas sensíveis e insensíveis. .... 83

**Figura 36.** Modelagem do sítio ativo das luciferases de *A. lineatum* evidenciando os resíduos do sensor de pH das luciferases de lampirídeos. **(A)** Sobreposição dos modelos da AL1 (em verde) que tem a substituição H310Q e da AL2 (em azul) que tem a substituição H310E. **(B)** Modelos das luciferases de *A. vivianii* (em rosé) e *Macrolampis* sp2 (em amarelo) para comparação. .... 85

**Figura 37.** Larva de *Aspisoma lineatum* (esquerda) e bioimagem em câmara CCD mostrando a luminescência difusa do corpo gorduroso. (Autoria Vadim Viviani). ..... 87

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Algumas luciferases de coleópteros cujos cDNAs já foram clonados e suas suas principais propriedades moleculares e físico-químicas. .... 35
- Tabela 2.** Sequência dos primers utilizados para clonagem das luciferases AL 1 e AL 2 de *A. lineatum*. .... 50
- Tabela 3.** Sequência dos *primers* utilizados para seqüenciamento das luciferases AL1 e AL2. .... 52
- Tabela 4.** Espécies e número de acesso GenBank das sequências primárias utilizadas nas análises filogenéticas. .... 59
- Tabela 5.** Composição de aminoácidos das luciferases AL1 e AL2. .... 61
- Tabela 6.** Valores de identidade e similaridade das luciferases AL1 e AL2 com outras luciferases já clonadas de lampirídeos, elaterídeos e fengodídeos. .... 62
- Tabela 7.** Comparativo entre propriedades físico-químicas das luciferases de *A. lineatum* e isoformas Luc 1 (lanterna) e Luc 2 (corpo gorduroso) de outras espécies de lampirídeos já estudadas. .... 69
- Tabela 8.** Comparativo entre as propriedades cinéticas das isoenzimas de *A. lineatum* e outras luciferases de besouros. .... 71
- Tabela 9.** Valores dos picos de emissão e meia-banda dos espectros de bioluminescência da luciferases de *A. lineatum* em diferentes pHs. .... 75
- Tabela 10.** Valores dos picos de emissão em meia-banda das luciferases pH-sensível e pH-insensível de *A. lineatum* na presença de metais na concentração final de 1 mM. .... 76

<b>Tabela 11.</b> Análise da dinâmica estrutural das luciferasas com base nos dados de CD da figura 16. ....	82
--	----



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	19
1.1. Bioluminescência .....	19
1.1.1. Histórico .....	19
1.1.2. Aspectos bioquímicos gerais .....	22
1.1.3. Diversidade biológica .....	22
1.1.3.1. Organismos marinhos .....	23
1.1.3.2. Organismos terrestres .....	25
1.2. Bioluminescência em Coleópteros .....	27
1.2.1. Mecanismos da reação bioluminescente em besouros .....	29
1.2.2. Luciferases de besouros .....	31
1.2.2.1. Estrutura tridimensional .....	32
1.2.2.2. Diversidade molecular e funcional .....	33
1.2.2.3. Origem e evolução das luciferases de besouros .....	35
1.2.2.4. Relação entre estrutura e espectros de emissão .....	40
1.2.2.5. Origem estrutural da sensibilidade ao pH e à metais .....	42
1.2.3. Aplicações biotecnológicas das luciferases de besouros .....	45
2. JUSTIFICATIVA .....	47
3. OBJETIVOS .....	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	49
4.1. Coleta de Insetos .....	49
4.2. Extração do RNA total .....	49
4.3. Síntese do cDNA .....	49
4.4. Amplificação dos cDNAs para as luciferases e subclonagem em vetor de expressão .....	50
4.5. Transformação em <i>Escherichia coli</i> .....	51
4.6. <i>Screening</i> funcional .....	51
4.7. Extração do DNA plasmidial .....	51
4.8. Sequenciamento do DNA .....	52
4.9. Expressão heteróloga de proteínas .....	52
4.10. Extração e purificação de proteínas recombinantes .....	53
4.11. Análise SDS-PAGE .....	53

4.12. Quantificação de proteínas totais .....	54
4.13. Medida da atividade luminescente <i>in vitro</i> .....	54
4.14. Determinação da atividade específica .....	54
4.15. Constantes e eficiências catalíticas .....	54
4.16. Determinação do $K_M$ para ATP e luciferina .....	55
4.17. Determinação do pH-ótimo .....	55
4.18. Espectros de bioluminescência .....	55
4.19. Efeito de metais pesados sobre as atividades e espectros de bioluminescência .....	56
4.20. Fotografia da bioluminescência .....	56
4.21. Estabilidade térmica .....	57
4.22. Espectros de dicroísmo circular (CD) .....	57
4.23. Análises de bioinformática .....	58
4.24. Modelagem .....	58
5. RESULTADOS .....	60
5.1. Análise das sequências de cDNA e dedução das sequências de aminoácidos .....	60
5.2. Filogenia .....	65
5.3. Expressão em <i>E. coli</i> e purificação das luciferases .....	66
5.4. Caracterização cinética .....	66
5.4.1. Atividades e atividades específicas .....	66
5.4.2. Atividade oxidativa .....	67
5.4.3. Padrão cinético da atividade bioluminescente .....	68
5.4.4. Valores de $K_M$ para ATP e luciferina .....	69
5.4.5. Constantes e eficiências catalíticas .....	70
5.4.6. pH-ótimo .....	72
5.5. Espectros de bioluminescência .....	72
5.5.1. Sensibilidade espectral ao pH .....	74
5.6. Sensibilidade a metais .....	75
5.6.1. Efeitos de metais nos espectros de bioluminescência .....	76
5.7. Estabilidade térmica .....	78
5.7.1. Espectros de dicroísmo circular (CD) .....	80
5.8. Evolução molecular da sensibilidade ao pH .....	82
6. DISCUSSÃO .....	86

7. CONCLUSÕES .....	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	96
ANEXO 1- Efeito do fármaco diclofenaco sobre a atividade da enzima tipo-luciferase de <i>Zophobas morio</i> .....	113
ANEXO 2 – Mapa e sítio múltiplo de clonagem do vetor pCold II (Takara Cat.#3362) .....	125
ANEXO 3 – Produção científica .....	126

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Bioluminescência

#### 1.1.1. Histórico

Há muito tempo a emissão de luz fria e visível por organismos vivos tem despertado interesse na humanidade. Aristóteles (384-322 a.C.), foi o primeiro a descrever a luz própria de alguns organismos vivos (HARVEY, 1957). Em 1555, foi publicado por Conrad Gestner o livro intitulado *De Lunariis*, primeiro livro dedicado à luminescência (LEE, 2015). Alguns nomes como Francis Bacon, Robert Boyle e Benjamin Franklin contribuíram com alguns estudos iniciais. No entanto, foi Raphael Dubois (1849-1929) que em 1885 descreveu pela primeira vez a reação luciferina/luciferase à partir de um dos mais clássicos experimentos da história da bioluminescência (HARVEY, 1957; SHIMOMURA, 2012).

Dubois realizou duas extrações das lanternas do vagalume *Pyrophorus noctilucus* em água. Um dos extratos foi imerso em gelo, resultando em uma solução luminescente com queda gradativa na emissão de luz até sua extinção total. O segundo extrato foi intencionalmente aquecido próximo ao ponto de ebulição impedindo-se assim a emissão de luz. No entanto, quando os dois extratos eram misturados, a emissão de luz retornava. Dubois então pressupôs que no extrato frio havia uma enzima específica necessária para a emissão de luz e que no extrato aquecido essa enzima era destruída restando na solução apenas o substrato estável. A esses dois componentes ele deu os nomes de *luciferase* e *luciferina* respectivamente, termos que permanecem em uso até os dias atuais (DUBOIS, 1885; 1887).

Após Dubois, outros grandes nomes surgiram no campo da bioluminescência. Em 1888 Eilhard Wiedemann (1852-1929) introduziu pela primeira vez o termo “luminescência” para se referir a emissão de luz fria, e em 1916 E. Newton Harvey (1887–1959) usou pela primeira vez o termo “bioluminescência” pra designar a luminescência de organismos vivos. Em 1952 foi publicada a primeira edição do livro *Bioluminescence* de autoria de Harvey, que até hoje é considerado como a bíblia do assunto (WIEDEMANN, 1888; HARVEY, 1957; SHIMOMURA, 2012; LEE, 2015).

Maiores detalhes sobre os aspectos químicos das reações bioluminescentes foram esclarecidos apenas a partir da segunda metade do século XX. Em 1947, McElroy demonstrou o requerimento de ATP na reação

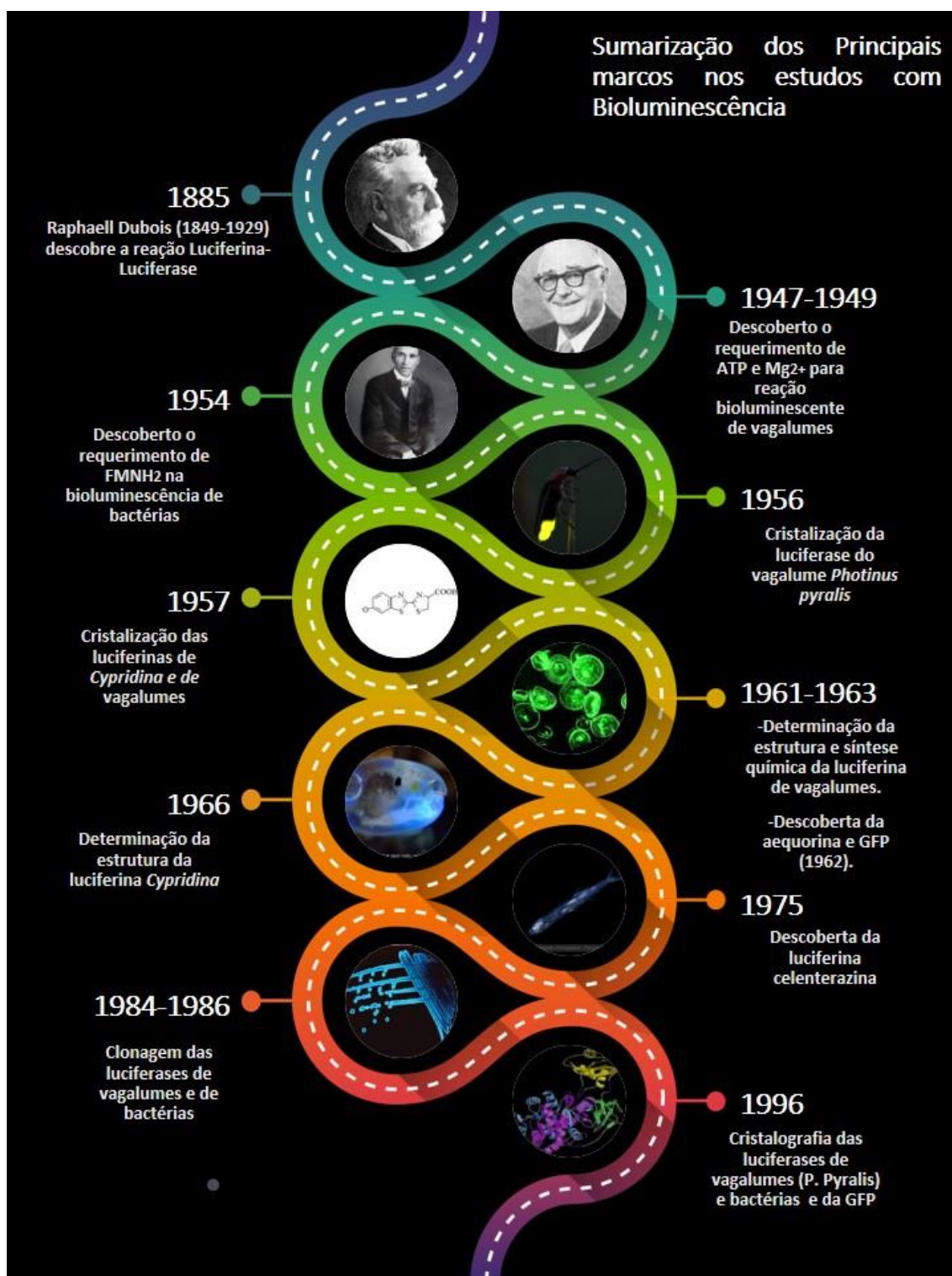
luciferina-luciferase de vagalumes e em 1949, também demonstrou o requerimento de  $Mg^{2+}$ . Entre 1953 e 1954 o requerimento de FMNH<sub>2</sub> na reação bioluminescente de bactérias foi demonstrado (STREHLER *et al.*, 1954; McELROY *et al.*, 1953) e, em 1955, a primeira luciferase de vagalume foi parcialmente purificada a partir do vagalume norte-americano *Photinus pyralis* e posteriormente, cristalizada (GREEN & McELROY, 1956). Em 1957, Bitler & McElroy cristalizaram a molécula da luciferina de vagalumes, permitindo a determinação de sua estrutura e sua síntese química (WHITE *et al.*, 1961; 1963).

Em 1962 foram descobertas a primeira fotoproteína (aequorina) e a proteína Fluorescente Verde ou *Green Fluorescent protein* (GFP) (SHIMOMURA *et al.*, 1962). Esse trabalho renderia em 2008 o prêmio Nobel de química a Osamu Shimomura juntamente com Martin Chalfie, que clonou o gene da GFP e o inseriu em células da bactéria *Escherichia coli* e em outros organismos, iniciando sua ampla aplicação como gene repórter (CHALFIE *et al.*, 1994). O prêmio também foi dividido com Roger Tsien que desenvolveu formas de GFP em uma ampla variedade de cores, que podem ser usadas como marcadores para os mais diversos processos biológicos (TSIEN, 2009)

Em 1966 foi elucidada a estrutura da luciferina *Cypridina* (KISHI *et al.*, 1966) encontrada em alguns organismos marinhos como ostracodes e certos peixes. Atualmente, a *Cypridina* recebe o nome de *Vargulina* em referência ao gênero *Vargula*. Em 1975 viria a ser descoberta a celenterazina, um segundo tipo de luciferina encontrada em diversos organismos marinhos, sendo a mais abundante nesse ambiente (SHIMOMURA, 2012).

O cDNA para a luciferase de vagalume *P. pyralis* foi clonado em 1985 (DeWET *et al.*, 1985), período em que também foi feita a clonagem da luciferase de bactérias (COHN *et al.*, 1985; JOHNSTON *et al.*, 1986). A estrutura tridimensional de ambas foi determinada em 1996 através de estudos de cristalografia (CONTI *et al.*, 1996; FISHER *et al.*, 1996).

Desde então, vários sistemas bioluminescentes e suas respectivas luciferases foram amplamente investigados visando estudos bioquímicos, evolutivos e aplicações biotecnológicas dos mesmos. Uma sumarização dos principais estudos dentro da bioluminescência pode ser vista na **Figura 1**.



**Figura 1.** Linha do tempo contendo alguns dos principais estudos dentro da bioluminescência.

Autoria: Mariele C. de Carvalho.

### 1.1.2. Aspectos bioquímicos gerais

A quimioluminescência é um processo no qual energia luminosa é emitida por reações químicas altamente exotérmicas. Quando reações desse tipo ocorrem por intermédio de catálise enzimática, em sistemas biológicos, culminando na emissão de luz fria visível, tem-se um dos mais fascinantes fenômenos da natureza, a bioluminescência (WILSON, 1995; WILSON & HASTINGS, 1998).

Como a principal característica da bioluminescência é a emissão de luz visível a outros organismos, atualmente sabe-se que ela pode ter várias finalidades como comunicação biológica, defesa, camuflagem e atração de presas (HASTINGS, 2001).

Os mecanismos químicos da bioluminescência são, em geral, semelhantes. Envolvem oxidações (por oxigênio ou uma de suas espécies reativas) de substratos genericamente chamados de *luciferinas*, produzindo intermediários peroxídicos altamente energéticos que, ao se clivarem termoliticamente, produzem moléculas-produto carbonílicas (oxiluciferinas) eletronicamente excitadas no estado *singlete*. Ao decair para o estado fundamental, essas moléculas emitem energia sob a forma de luz. Esse processo é catalisado por enzimas denominadas de *luciferases* (WILSON & HASTINGS, 1998).

Os termos *luciferina* e *luciferase* são usados de modo genérico. Segundo Shimomura (2012), caracteriza-se como luciferina qualquer composto orgânico existente em um organismo bioluminescente que, ao ser oxidado, emite luz. As luciferases também têm estruturas moleculares diversas dependendo do táxon onde são encontradas (HASTINGS, 1983; HASTINGS, 1995; VIVIANI, 2002).

### 1.1.3. Diversidade Biológica

Atualmente, sabe-se que a bioluminescência não é uma característica filogeneticamente conservada. Com base nas estruturas químicas diversificadas das luciferinas e moleculares das luciferases, bem como o requerimento de diferentes cofatores, estima-se que a bioluminescência tenha surgido e evoluído de modo independente em torno de 30-40 vezes (HASTINGS, 1983; 2001). Espécies bioluminescentes são encontradas dentro dos mais diversos grupos

sem seguir um padrão de distribuição. Harvey (1957) expressou essa situação da seguinte forma:

*[...] é como se vários grupos tivessem sido escritos em um quadro e um punhado de areia úmida lançada sobre esses nomes. Onde cada grão de areia gruda, aparece uma espécie luminescente. É um fato extraordinário que uma espécie em um gênero possa ser luminescente enquanto outras espécies estreitamente próximas não contenham um traço sequer de luminosidade.*

Com exceção do molusco dulcícola *Latia neritoides*, endêmico na Nova Zelândia (OHMIYA *et al.*, 2005) e algumas larvas de vagalumes que são encontrados em riachos, a maioria dos organismos bioluminescentes podem ser classificados como marinhos ou terrestres.

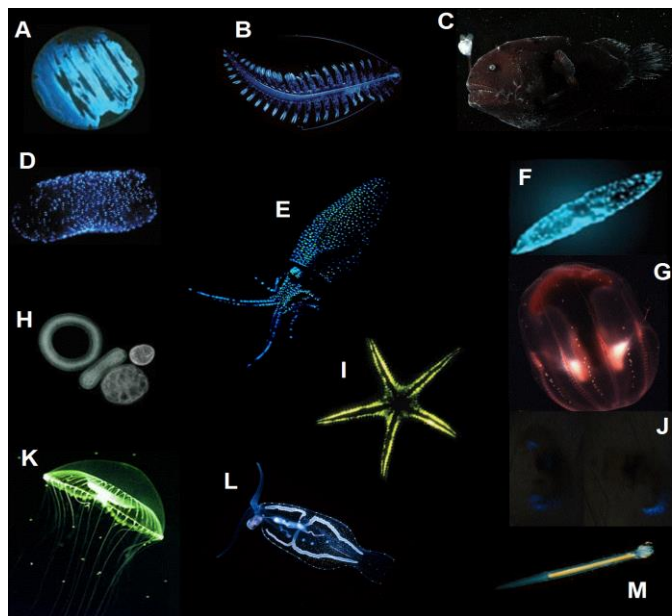
#### **1.1.3.1. Organismos marinhos**

No total, aproximadamente 700 gêneros animais contém algum representante bioluminescente. Destes, cerca de 80% são marinhos (WIDDER, 2010; SHIMOMURA, 2012). A predominância de espécies bioluminescentes nos ambientes marinho ainda não é bem compreendida mas algumas características dos oceanos são especialmente favoráveis para a evolução de espécies luminescentes, entre as quais pode-se destacar: (I) condições ambientais relativamente estáveis, (II) grandes porções de habitat em escuridão contínua ou recebendo luz fraca, e (III) interações entre uma alta diversidade de taxa (predação, parasitismo e afins) (HADDOCK *et. al*, 2010).

Em um ambiente como o oceano, a bioluminescência pode exercer as mais variadas funções tais como: Localização e atração de presas (como farol ou iscas brilhantes), comunicação e atração de parceiros através de padrões de emissão específicos e defesa contra predadores (pode se dar por invisibilidade conferida pela emissão de luz de mesma cromaticidade do ambiente fótico, pela emissão de nuvens de material luminoso que diminuem a visibilidade e favorecem a fuga, marcação de predadores para torná-los alvos de predadores secundários ou mesmo aposematismo, que é uma característica adaptativa onde as cores fortes e vibrantes da presa indicam para os predadores que ela é impalatável) (GROBER, M.S.; 1988; HADDOCK *et. al*, 2010; WIDDER, 2010).



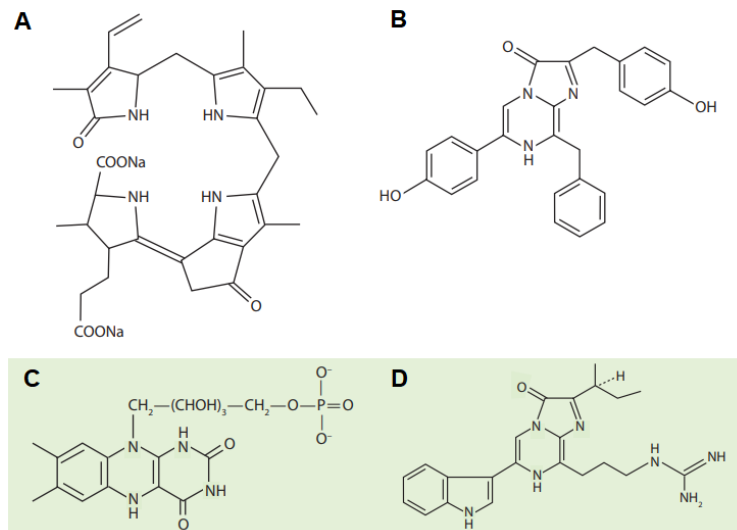
A cor da bioluminescência mais comum em espécies luminescentes marinhas é o azul seguida pelo verde e amarelo. Outras cores como o violeta, laranja e vermelho são raras e pouquíssimo estudadas (**Figura 2**).



**Figura 2.** Alguns representantes de organismos bioluminescentes marinhos: (A) Bactéria- *Photobacterium phosphoreum*; (B) Anelídeo- *Tomopteris*; (C) Cordado- *Linophryne coronata*; (D) Tunicado – *Pyrosoma atlanticum*; (E) Molusco- *Watasenia scintillans*; (F) Dinoflagelado- *Pyrocystis fusiformis*; (G) Ctenóforo- *Bathyctena*; (H) Radiolários; (I) Equinodermo- *Plutonaster bifrons*; (J) Anelídeo- *Chaetopterus*; (K) Cnidário- *Aequorea victoria*; (L) Nudibrânquio- *Phylliroe* e (M) Quetognatas – *Caecosagitta macrocephala*. Autoria: A, D, F, I : Edith Widder; B, C, G, H, L, M: Steve Haddock; E: BBC natural history; K: Duane W. Sears; J: Vadim Viviani.

A grande variedade de organismos bioluminescentes reflete diretamente na variedade bioquímica dos sistemas de emissão de luz. Atualmente são conhecidos quatro tipos principais de luciferina: (I) FMNH<sub>2</sub>, que é encontrada em bactérias simbiotes ou de vida livre (Tu, 2004); (II) tetrapirróis encontrados no sistema bioluminescente de dinoflagelados e alguns crustáceos (Haddock *et al.*, 2010; Schultz *et al.*, 2005); (III) Vargulina (Cypridina), encontrada em crustáceos ostracodes *Cypridina* e em alguns peixes (Haddock *et al.*, 2010); (IV) Celenterazina a luciferina mais comum de organismos marinhos, sendo encontrada em celenterados, peixes, moluscos e protozoários entre outros.

Ambas vargulina e celenterazina são imidazolopirazinonas (WILSON & HASTINGS, 1998; HADDOCK *et. al*, 2010) (**Figura 3**).



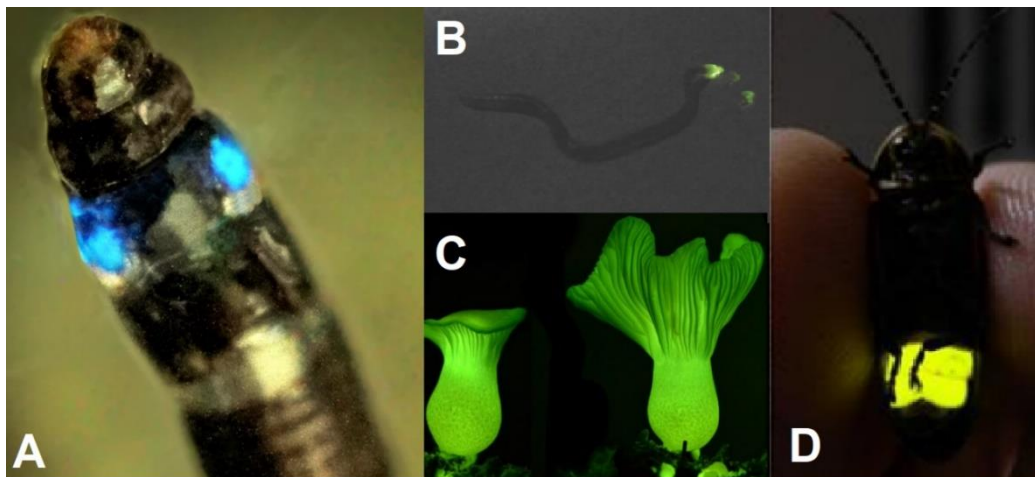
**Figura 3.** Estrutura química das principais luciferinas encontradas em organismos marinhos. (A) Luciferina tetrapirrólica; (B) Celenterazina; (C) FMNH<sub>2</sub>; (D) *Cypridina*. Fonte: Haddock *et al.*, 2010 (adaptado).

### 1.1.3.2. Organismos Terrestres

No ambiente terrestre, a bioluminescência é encontrada em fungos, bactérias, anelídeos, quilópodes e insetos (HERRING, 1987) (**Figura 4**). De todos os grupos terrestres com representantes bioluminescentes, a classe Insecta é a que abriga o maior número de espécies luminescentes, as quais ocorrem nas ordens Collembola, Diptera e principalmente em Coleóptera (VIVIANI, 2002). Com exceção dos coleópteros, que constituem o grupo mais estudado, e dípteros e fungos que vêm sendo melhor compreendidos nos últimos anos, os mecanismos da bioluminescência em outros grupos ainda são pouco investigados.

Em fungos, o sistema bioluminescente envolve uma pequena luciferase de aproximadamente ~25 kDa que é uma proteína de membrana, e a luciferina é uma hispidina derivada do ácido cafeico (KASKOVA *et al.*, 2017; KOTLOBAY *et al.*, 2018).

Em Díptera, existem espécies luminescentes dentro da família Keroplatidae, nos gêneros *Arachnocampa*, *Orfelia*, *Keroplatus* e *Neoceroplatus*. (VIVIANI *et al.*, 2002; FALASCHI *et al.*, 2019). Notavelmente, existem dois sistemas bioluminescentes distintos.



**Figura 4.** Exemplos de organismos bioluminescentes terrestres: (A) Díptero *Neoceroplatus betaryiensis*; (B) Anelídeo *Microscolex phosphoreus*; (C) Fungo *Neonothopanus gardneri*; (D) Vagalume *Macrolampis* sp2. Fonte: (A) Adaptado de Falaschi *et al.*, 2019; (B) Adaptado de Oba *et al.*, 2017 – fotografia de Yuichi Oba; (C) Fotografia de Cassius Stevani; (D) Fotografia de Vadim Vivivani.

Em *Arachnocampa* spp, a emissão de luz ocorre na região do azul-esverdeado por meio de uma lanterna caudal derivada da porção terminal dos túbulos de Malpighi (GATEMBY, 1960; VIVIANI *et al.*, 2002<sup>A</sup>). A bioluminescência também é ativada por ATP, como ocorre em vagalumes (Coleóptera), embora claramente os sistemas sejam bioquimicamente e evolutivamente distintos (VIVIANI *et al.*, 2002). No que diz respeito a luciferase desse gênero, um estudo recente conseguiu clonar o cDNA que codifica uma enzima de aproximadamente 60 kDa a partir de lanternas da espécie *Arachnocampa richardase* (TROWELL *et al.*, 2016). Segundo esse trabalho, essa enzima foi capaz de emitir luz azul ( $\lambda_{\max} \sim 490$ ) na presença de D-luciferina de vagalumes e ATP, sugerindo que o substrato para a reação bioluminescente de coleópteros e *Arachnocampa* seja o mesmo. No entanto, estudos anteriores

(LEE, 1976; VIVIANI *et al.*, 2002<sup>A</sup>) não confirmam esta hipótese. Além disso, em 2018 foi demonstrado que a luciferina é um composto derivado ácido xanturênico e tirosina (WATKINS, *et al.*, 2018).

Em *Orfelia fultoni*, a luciferase e luciferina foram parcialmente purificadas e caracterizadas (VIVIANI *et al.*, 2002<sup>A</sup>; 2020). A luciferase é uma enzima oligomérica estável que se mostra ativa em um trímero de ~220 kDa (VIVIANI *et al.*, 2020). Recentemente descoberta no Brasil, a espécie bioluminescente *Neoceroplatus betaryiensis* aparenta ter a mesma luciferina da *Orfelia* como substrato da reação luminescente (FALASCHI *et al.*, 2019). Além disto, larvas da espécie *Neoditomyia* sp, apesar de não serem luminescentes, também possuem a luciferina de *O. fultoni*, razão pela qual a luciferina foi chamada de *keroplatina* (VIVIANI *et al.*, 2020). Isso indica que a essa luciferina pode ter algum outro papel bioquímico importante nas larvas desta subfamília (VIVIANI *et al.*, 2018<sup>A</sup>).

## 1.2. Bioluminescência em Coleópteros.

Em coleópteros, espécies bioluminescentes são encontradas na superfamília Elateroidea, dentro das famílias Lampyridae (vagalumes), Elateridae (besouros tec-tec) e Phengodidae (larvas trenzinho) (LAWRENCE & NEWTON, 1995; VIVIANI, 2002) (**Figura 5**).

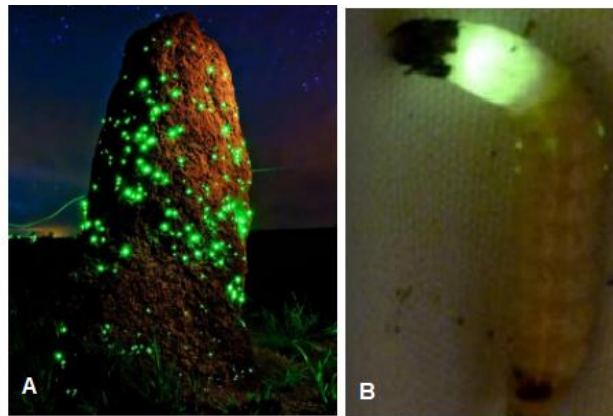


**Figura 5.** Representantes bioluminescentes das diferentes famílias de coleópteros: (A) Lampirídeo *Cratomorphus concolor*, (B) Fengodideo *Phrixotrix hirtus*, (C) Elaterídeo *Pyrophorus divergens*. A autoria: Vadim Viviani.

Os lampirídeos possuem uma lanterna ventral e emitem luz na região do verde-amarelo em geral sob a forma de lampejos com a função principal de

atração sexual. Os padrões de emissão (duração, intervalo e frequência) são variáveis de acordo com a espécie (LLOYD, 1983; VIVIANI, 2002). Todas as espécies de Lampyridae possuem bioluminescência em seu estágio larval, em duas lanternas ovaladas na face ventral do 8 segmento abdominal, mas nessa fase a emissão de luz está mais relacionada à defesa, provavelmente como sinal aposemático (SIVINSKI, 1981) (**Figura 5A**).

Elaterídeos emitem luz contínua na região do verde ao alaranjado e possuem duas lanternas dorsais protorácicas e uma lanterna ventral. Essa última, é ativada apenas durante o voo (BECHARA, 1988) (**Figura 5C**). A bioluminescência nas larvas desse grupo está em geral relacionada com defesa contra predadores, mas pode estar relacionada também com predação como acontece com as larvas de *Pyrearinus termitilluminans*. Essas larvas habitam em galerias de cupinzeiros e, durante a noite, se posicionam na superfície para atrair as presas, sendo responsáveis pela manifestação dos cupinzeiros bioluminescentes no cerrado central do Brasil (**Figura 6**) (COSTA, 1982; REDFORD, 1982).



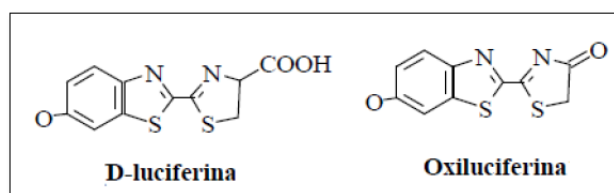
**Figura 6.** (A) Cupinzeiro boluminescente; (B) Larva de *P. termitilluminans* responsável pela bioluminescência em cupinzeiros. Autoria: (A) Fotografia de Ary bassous (adaptado); (B) Fotografia de Pedro Busana (adaptado de Amaral *et al.*, 2016).

Em fengodídeos, as fêmeas são neotênicas, ou seja, se mantêm sob forma larval mesmo depois de atingirem maturidade sexual. A bioluminescência nesse grupo é bastante particular, as larvas e fêmeas neotênicas possuem lanternas laterais no corpo que emitem luz verde-amarela e estão geralmente

associadas à defesa, e podem possuir também uma ou duas lanternas cefálicas que emitem luz na região verde ao vermelho de acordo com a espécie (COLEPICOLO *et al.*, 1986; VIVIANI & BECHARA, 1993; VIVIANI & BECHARA, 1997; VIVIANI, 2002) (**Figura 5B**). Em espécies *Phrixothrix* spp, a lanterna cefálica emite luz vermelha, uma cor única entre os organismos terrestres. Acredita-se que luz vermelha não é percebida pela maioria dos organismos. Portanto, a função nesse caso pode estar relacionada com a iluminação do ambiente enquanto o indivíduo preambula à noite sem que ele seja notado por presas e possíveis predadores, facilitando a caça (SAVINSKI, 1981; VIVIANI & BECHARA, 1997).

### 1.2.1. Mecanismos da reação bioluminescente em besouros

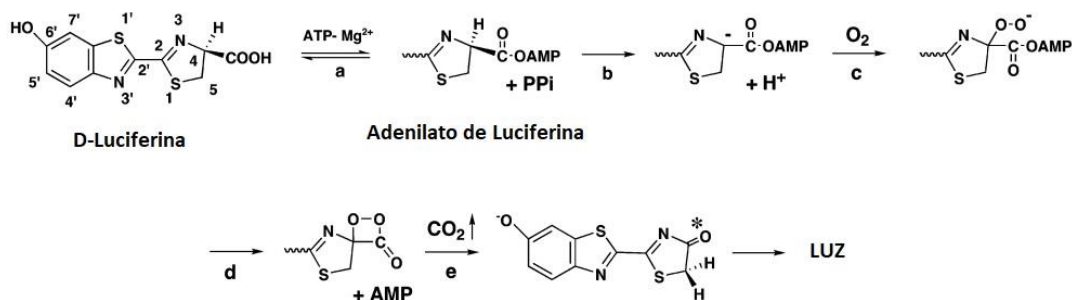
O mecanismo bioquímico responsável pela bioluminescência em besouros tem sido extensivamente estudado. As luciferases desse grupo são altamente conservadas e diferenças sutis a nível de estrutura primária explicam particularidades como a diversidade de cores da bioluminescência (VIVIANI, 2002). Já a luciferina de vagalumes (**Figura 7**), é um composto benzotiazólico que pode ser biossintetizado à partir de cisteína e quinonas e é idêntico para todas as espécies de besouros bioluminescentes da superfamília Elateroidea (COPEPICOLO *et al.*, 1986; VIVIANI & BECHARA, 1993).



**Figura 7.** Luciferina de besouros e seu produto de oxidação oxiluciferina. Fonte: Viviani, 2002 (adaptado).

O mecanismo de reação enzimática também é idêntico em todas as espécies, envolvendo a oxidação da luciferina por oxigênio na presença de ATP. A reação ocorre em duas etapas: (I) Adenilação dependente de ATP e magnésio de uma molécula de D-luciferina, produzindo adenilato de luciferina, pirofosfato

e água, e (II) Oxidação do adenilato de luciferina liberando AMP, CO<sub>2</sub> e uma molécula de oxiluciferina eletronicamente excitada no estado *singlete*. A primeira etapa de reação é mais lenta do que a segunda, sendo portanto, a etapa limitante (McELROY & DeLUCA 1978) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Mecanismo da reação catalisada por luciferases de besouros. Fonte: Branchini *et al.*, 2003 (adaptado).

Na segunda etapa da reação, o adenilato de luciferina é rapidamente oxigenado através da abstração de um próton do C4 pela luciferase. Esse processo é facilitado justamente pela adição do AMP à carboxila da molécula de luciferina que facilita a formação de um carbânion que sofre ataque eletrofílico pelo oxigênio molecular. Após a oxigenação, forma-se um hidroxiperóxido que rapidamente se cicliza formando dioxetanona e liberando o AMP (WHITE *et al.*, 1971; DeLUCA & McELROY, 1974). Em seguida, a dioxetanona se cliva liberando CO<sub>2</sub> e oxiluciferina em estado excitado *singlete* que, ao decair para seu estado fundamental, emite um fóton de luz. A clivagem da dioxetanona ocorre por uma via de troca de elétrons entre a mesma e o anel tiazol-benzotiazólico conjugado, em um processo conhecido como CIEEL (*Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence*) ou CILT como é chamado nos dias atuais (WILSON, 1995; SCHUSTER, 1979).

O produto da reação, oxiluciferina é inibidor da atividade luciferásica. Além disso, cerca de 20% da D-luciferina da reação sofre auto-oxidação, formando dehidroluciferil-adenilato, um produto secundário que é um forte inibidor competitivo da enzima (RHODES & McELROY, 1958; FRAGA *et al.*, 2006). O

rápido aumento da concentração dos inibidores, após o início da reação, faz com que a emissão de luz alcance rapidamente o pico de intensidade, seguido por um rápido decaimento para um nível basal (BITLER & McELROY, 1978; WHITE *et al.*, 1961; 1963; RIBEIRO & SILVA; 2008).

Alguns fatores adicionais também podem interferir na cinética da reação bioluminescente. A adição de Coenzima-A após o início da reação, por exemplo, leva a um aumento na intensidade e tempo de duração da luminescência. Acredita-se que isso aconteça porque na presença desse cofator, o forte inibidor dehidroluciferil-adenilato é convertido em dehidroluciferil-CoA, um inibidor bem mais fraco que sai facilmente do sítio ativo (AIRTH *et al.*, 1958; FONTES *et al.*, 1998; FRAGA *et al.*, 2005; RIBEIRO & SILVA, 2008).

### **1.2.2. Luciferasas de besouros**

A luciferase de vagalumes é um monômero com cerca de 550 aminoácidos e aproximadamente 60 kDa. Na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica possui uma sequência peptídica sinalizadora SKL (SerLysLeu), responsável por endereçar a proteína para o peroxissomo (DeWET *et al.*, 1985; VIVIANI, 2002). Possui algumas propriedades de proteínas de membrana como a associação à fosfolipídeos e, em altas concentrações, pode formar oligômeros (UGAROVA, 1989; VIVIANI, 2002).

Como anteriormente mencionado, a luciferase é uma enzima bifuncional e possui dois sítios de ligação distintos para ligação de luciferina e ATP (VIVIANI, 2002). Além da reação bioluminescente, as luciferasas também são capazes de catalisar a tioesterificação com coenzima-A de alguns compostos carboxílicos como ácido *p*-cumárico e cetoprofeno, de modo análogo às acil-CoA sintetases (FORD *et al.*, 1995; OBA *et al.*, 2003; KATO *et al.*, 2011).

A primeira luciferase de besouros a ser clonada foi a do vagalume norte-americano *P. pyralis* (DeWET *et al.*, 1985). Por esse motivo, essa enzima foi extensamente usada como modelo no desenvolvimento de muitos estudos baseados sobre os mecanismos da reação bioluminescente em coleópteros.

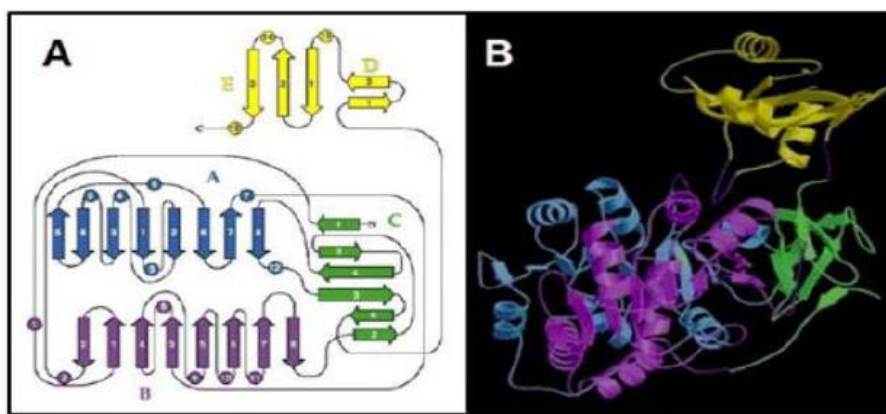
#### **1.2.2.1. Estrutura tridimensional**

A estrutura tridimensional da luciferase de *Photinus pyralis* foi resolvida pela primeira vez por Conti *et al.* (1996) na ausência de substratos.



Posteriormente, foi feita a resolução da estrutura da luciferase de *Luciola cruciata* por Nakatsu *et al.* (2006) na presença do análogo de adenilato de luciferina DLSA (5'-O-[N-(desidroluciferil)-sulfamoil]adenosina). Mais recentemente, também foi feita a cristalização das luciferases dos vagalumes *Lampyrus turkestanicus* (KHEIRABADI *et al.*, 2013), *Amydetes vivianii* e da luciferase vermelha da larva-trenzinho *Phrixothrix hirtus* (CARRASCO-LÓPEZ *et al.*, 2018).

A resolução da estrutura cristalográfica da luciferase de *Photinus pyralis*, feita na ausência do substrato (CONTI *et al.*, 1996), mostrou a presença de um pequeno domínio C-terminal ligado por um *loop* flexível a um grande domínio N-terminal (**Figura 9**). O domínio N-terminal possui três subdomínios: um barril- $\beta$  antiparalelo (subdomínio C) e duas folhas  $\beta$  flanqueadas por  $\alpha$ -hélices formando uma estrutura  $\alpha\beta\alpha\beta$  (subdomínios A e B). O domínio C-terminal é composto de uma estrutura  $\alpha+\beta$  (CONTI *et al.*, 1996).



**Figura 9.** (A) Diagrama topológico da enzima. (B) Estrutura tridimensional da luciferase de *P. pyralis*. Domínio C-terminal em amarelo e domínio N-terminal com seus subdomínios: Subdomínio A em azul, Subdomínio B em lilás, Subdomínio c em verde. Fonte: Conti et al., 1996 (adaptado).

Existem algumas regiões que são altamente conservadas em luciferases, especialmente no que se refere ao sítio de ligação dos substratos ATP e D-Luciferina. Sendo assim, são consideradas críticas para a atividade luminescente. Três regiões principais estão envolvidas com adenilação: (I) Motivo  $^{197}\text{SSGSTGLPKG}^{209}$ , (II) Motivo  $^{340}\text{YGLTE}^{344}$  e (III) motivo 419-457 (VIVIANI, 2007<sup>A</sup>).

O motivo  $^{340}\text{YGLTETTS}^{347}$  se encontra estrategicamente localizado entre os sítios de ligação para luciferina e AMP, interagindo com ambos os substratos.

A sequência desse motivo varia consideravelmente em outras CoA-ligases, (SANDALOVA & UGAROVA, 1999; NAKATSU *et al.*, 2009; VIVIANI *et al.*, 2013).

Segundo os estudos cristalográficos com a luciferase de *Luciola cruciata* na presença do análogo de luciferina DLSA, o sitio de ligação de luciferina envolve motivos  $\alpha 8$  (248-260),  $\beta 12$  (286-289),  $\beta 13$  (313-316),  $\beta 14$  (339-342),  $\beta 15$  (351-353) e o *loop* 343-350 (NAKATSU *et al.*, 2006). O segmento <sup>244</sup>HHGF<sup>247</sup> mostrou-se envolvido na ligação da luciferina durante estudos de fotoinativação com análogos de luciferina (BRANCHINI *et al.*, 1998; 1999). O resíduo H245 é invariável e exclusivo entre as luciferases de besouros sendo considerado importante cataliticamente (BRANCHINI *et al.*, 1998). Ele é responsável por fazer ligações de hidrogênio com a oxiluciferina e AMP, e também pode determinar um impedimento estérico para a ligação do isômero L-Luciferina (favorecendo o encaixe de D-Luciferina) tendo assim sido associado à função oxigenásica (PRADO *et al.*, 2016).

Outros segmentos importantes são A313-G320, G337-I351 (BRANCHINI *et al.*, 1999). Os resíduos I351, F247 e A348 e A313 são responsáveis por formar o entorno hidrofóbico do sitio ativo para acomodação da luciferina (BRANCHINI *et al.*, 2001). Já a hidroxila do resíduo T343 está envolvida na estabilização do carboxilato da luciferina (BRANCHINI *et al.*, 2000; 2003). Além disso, F249, I288, T353 e A350 interagem com a porção benzotiazólica da luciferina através de forças de van der Waals (NAKATSU *et al.*, 2006).

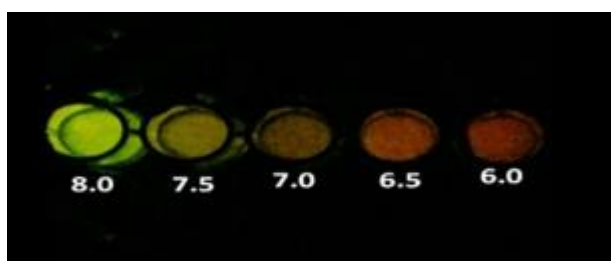
O resíduo R218 também possui papel essencial, o íon guanidínio presente em sua cadeia lateral foi sugerido ser responsável por estabilizar o grupo fenolato da luciferina (BRANCHINI *et al.* 2001), estudos de mutagênese sítio dirigida nessa posição mostraram que as substituições possuem efeitos drásticos sobre os espectros de bioluminescência de luciferases de *Phrixotrix* e vagalumes (VIVIANI & OHMIYA, 2000; BRANCHINI *et al.*, 2001; VIVIANI *et al.*, 2002<sup>B</sup>).

#### **1.2.2.2. Diversidade molecular e funcional**

As luciferases de besouros compartilham de 45% a 99% de identidade a nível de estrutura primária, e apresentando graus de identidade que variam de 60% a 99% dentro da mesma família (WOOD, 1995; VIVIANI, 2002). Ou seja, as luciferases possuem diversidade molecular em diferentes espécies, e também

na mesma espécie, apresentando isozimas em diferentes lanternas e estágios de vida, o que ajuda a explicar particularidades como diferentes espectros de emissão, cinéticas, sensibilidade ao pH e termoestabilidade.

Funcionalmente, luciferases podem ser divididas em pH-sensitivas (lampirídeos) e pH-insensitivas (elaterídeos e fengodídeos). Nas pH-sensitivas, o espectro de emissão muda para o vermelho em pH ácido, altas temperaturas ou na presença de metais pesados (SELIGER & McELROY, 1964) com uma diminuição no rendimento quântico (ANDO *et al.*, 2008) (**Figura 10**).



**Figura 10.** Cor da bioluminescência da luciferase do lampirídeo *Macrolampis sp2* em diferentes valores de pH. Fonte: VIVIANI *et al.*, 2018<sup>B</sup> (Adaptado).

Atualmente, mais de 30 luciferases foram clonadas e caracterizadas com o intuito de melhor entender sua origem e propriedades (**Tabela 1**). As sequências polipeptídicas das luciferases de elaterídeos são, em geral, mais curtas (542-543 resíduos) quando comparadas com as luciferases de lampirídeos (545-550 resíduos) (VIVIANI, 2002). Embora os resíduos catalíticos sejam altamente conservados em todas as famílias, dados experimentais sugerem que em luciferases de elaterídeos o sítio ativo possui uma conformação mais rígida e estável, o que está diretamente relacionado com a insensibilidade ao pH nesse grupo (VIVIANI *et al.*, 2008<sup>A</sup>). Lampirídeos por sua vez, possuem um sítio ativo mais flexível, o que permite a modulação do espectro de emissão em pH ácidos e na presença de metais (VIVIANI & BECHARA, 1995; VIVIANI *et al.*, 2008<sup>A</sup>).

**Tabela 1.** Algumas luciferases de coleópteros cujos cDNAs já foram clonados e suas principais propriedades moleculares e físico-químicas.

Família	Nº de resíduos	PI	$\lambda_{\max}$ (nm)	$K_M$ LH <sub>2</sub> ( $\mu$ M)	$K_M$ ATP ( $\mu$ M)	Referência
<b>LAMPYRIDAE</b>						
<i>Photinus pyralis</i>	550	6,4	567	5	250	DeWet <i>et al.</i> , 1985
<i>Luciola cruciata</i>	548	7,1	562	14	106	Masuda <i>et al.</i> , 1989
<i>Luciola lateralis</i>	548	6,5	552	78,9	220	Tatsumi <i>et al.</i> , 1992
<i>Luciola mingrélica</i>	548	6,2	570	20	150	Devine <i>et al.</i> , 1993
<i>Hotaria parvula</i>	548	6,3	568	-	-	Ohmiya <i>et al.</i> , 1995
<i>Pyrocoelia miyako</i>	548	6,1	550	-	-	Ohmiya <i>et al.</i> , 1995
<i>Lampyris noctiluca</i>	547	6,1	555	4	62,4	Sala–Newby <i>et al.</i> , 1996
<i>Photuris pennsylvanica</i>	545	8,4	538	-	-	Ye <i>et al.</i> , 1997
<i>Cratomorphus distinctus</i>	547	5,9	548	15		Viviani <i>et al.</i> , 2004a.
<i>Macrolampis sp2</i>	550	6,03	575	20	83	Viviani <i>et al.</i> , 2005
<i>Luciola italica</i>	548	-	566	90	180	Branchini <i>et al.</i> , 2006
<i>Amydetes vivianii</i>	548	-	547	9	9	Viviani <i>et al.</i> , 2011
<i>Luciola parvula</i>	548	6,4	559	18	428	Bessho-Uehara <i>et al.</i> , 2017 <sup>a</sup>
<i>Pyrocoelia atripennis</i>	548	-	547	-	-	Bessho-Uehara <i>et al.</i> , 2017 <sup>b</sup>
<b>ELATERIDAE</b>						
<i>Pyrearinus termitilluminans</i>	543	6,75	546	80	370	Viviani <i>et al.</i> , 1999 <sup>A</sup>
<i>Fulgeochlizus bruchi</i>	542	6,81	543	12	140	Amaral <i>et al.</i> , 2012
<i>Photophorus jansonii</i>	543	-	559	173	270	Mitani <i>et al.</i> , 2013
<i>Pyrophorus angustus</i>	543	8,38	594	17	160	Amaral <i>et al.</i> , 2016
<b>PHENGODIDAE</b>						
<i>Phrixothrix hirtus</i>	546	7	626	7	230	Viviani <i>et al.</i> , 1999 <sup>B</sup>
<i>Phrixothrix vivianii</i>	545	6,3	548	-	-	Viviani <i>et al.</i> , 1999 <sup>B</sup>

### 1.2.2.3. Origem e evolução das luciferases de besouros

Atualmente, sabe-se que a bioluminescência não é um processo evolutivamente conservado (HASTINGS, 2001). No entanto, como se originou e evoluiu a bioluminescência nos mais diversos grupos ainda é alvo de muitos

questionamentos. A princípio, foi proposto que a bioluminescência surgiu em formas de vida anaeróbias como forma de lidar com o efeito tóxico de concentrações crescentes do oxigênio na atmosfera primitiva, quando este começou a aparecer (SELIGER & McELROY, 1965).

Todas as luciferases compartilham a característica funcional de serem oxigenases (PRESWOOD & HASTINGS, 1978). Assim sendo, uma teoria alternativa sugeriu que luciferases evoluíram à partir de oxigenases preexistentes, como forma de usar oxigênio como acceptor final de elétrons (SELIGER, 1975). No entanto, as luciferases não apresentam homologia com oxigenases clássicas (REES *et al.*, 1998).

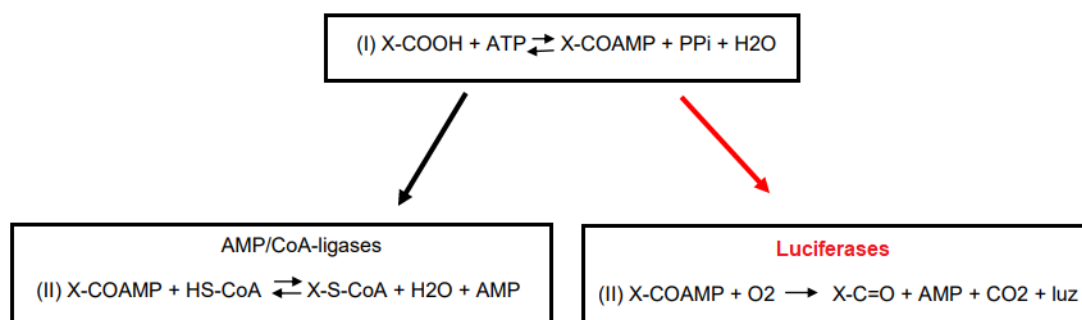
Com o advento da biologia molecular, análises das sequências de várias luciferases mostraram que, na verdade, as luciferases de diferentes grupos são oriundas de diferentes famílias de estruturais de proteínas. As luciferases de besouros, por exemplo, são homólogas às CoA-ligases (SCHROEDER, 1989). Isso leva a acreditar que as essas enzimas se originaram à partir de AMP-CoA ligases, sendo esta a hipótese evolutiva mais aceita atualmente (VIVIANI, 2002).

**A superfamília das AMP-CoA ligases.** A superfamília das AMP-CoA-ligases é bastante vasta e seus representantes podem ser encontrados em todos os grupos de organismos vivos, desempenhando as mais variadas funções. Dentre as muitas famílias de AMP-ligases pode-se citar as cumarato-CoA ligases que estão envolvidas com o metabolismo de fenilpropanóide durante processos de biossíntese de pigmentos em vegetais, as Acil-CoA sintetases responsáveis pela adenilação de ácidos graxos no metabolismo de lipídeos, as xenobiótico ligases que estão envolvidas em processos de detoxificação de xenobióticos e as clorobenzoato-dehalogenases que desempenham um importante papel em bactérias capazes de biodegradar poluentes aromáticos. (BABBIT & KENYON, 1992; KNIGHTS & DROGEMULLER, 2000; SCHMELTER *et al.*, 2004; GUI *et al.*, 2011).

As diferentes famílias de ligases apresentam grau de identidade bastante variável a nível de estrutura primária, o que reflete sua grande diversidade funcional. No entanto, a estrutura tridimensional dessas enzimas é conservada e compreende um grande domínio N-terminal, um pequeno domínio C-terminal, possuindo motivos altamente conservados para ligação de ATP (SUZUKI *et al.*,

1990; SCHOLTEN *et al.*, 1991; INGRAM-SMITH *et al.*, 2006; REGER *et al.*, 2008). Esse perfil conformacional é muito similar ao que encontramos nas luciferases de besouros.

O mecanismo básico de reação das CoA-ligases também envolve duas etapas distintas: (I) Ativação de substratos carboxílicos variados por adenilação ATP dependente e (II) Tioesterificação do ácido carboxílico com a CoA. A primeira etapa é essencialmente a mesma para as CoA-ligases e luciferases de coleópteros, havendo diferenciação apenas na segunda reação, que nas luciferases é substituída pela atividade oxidásica (**Figura 11**) (VIVIANI, 2002).



**Figura 11.** Comparativo entre os mecanismos de reação de AMP-ligases e luciferases. (I) Etapa de Adenilação; (II) Etapa de tioesterificação com CoA das ligases em preto e etapa oxidativa das luciferases de besouros destacado em vermelho. Fonte: Viviani, 2002 (adaptado).

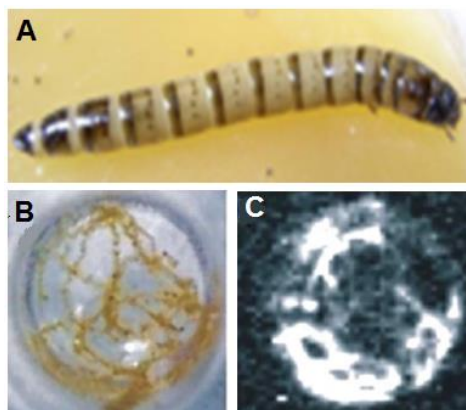
A homologia estrutural e os mecanismos de reação corroboram com a hipótese de que as luciferases surgiram através neofuncionalização de alguma CoA-ligase ancestral, após um evento de duplicação gênica (WOOD, 1995; VIVIANI, 2002).

**Enzimas tipo-luciferase.** Em 1996, VIVIANI & BECHARA encontraram pela primeira vez enzimas capazes de emitir fraca quimioluminescência na presença de luciferina de vagalumes e ATP em larvas de *Tenebrio molitor* (um besouro não bioluminescente) da família Tenebrionidae. Desde então, genes homólogos às luciferases de besouros foram encontrados em outros insetos não luminescentes (VIVIANI, 2002) e alguns foram clonados em diferentes

organismos como *Agrypnus binodolus* (Elateridae) e *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) e *Drosophila melanogaster* (Díptera). Apesar da identidade das sequências de aminoácidos com luciferases ser relativamente alta para algumas destas enzimas homólogas (~55% no caso da enzima tipo-luciferase de *A. binodolus*), nenhuma dessas enzimas apresentou atividade luminescente (OBA *et al.*, 2004; 2006; 2008).

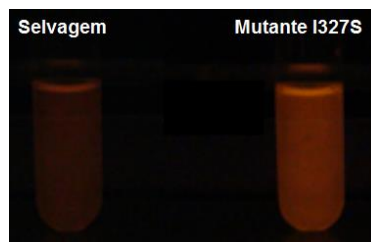
A enzima tipo-luciferase de *A. binodolus* (uma acil-CoAsintetase) foi convertida em uma luciferase através de técnicas de mutagênese sítio-dirigida substituindo-se os resíduos L345S, C344S e G345T. Mas a atividade luminescente obtida tinha atividade luminescente ordens de grandeza abaixo das luciferases típicas (OBA *et al.*, 2009).

A primeira enzima tipo-luciferase fracamente luminescente foi clonada em 2009 (VIVIANI *et al.*) a partir dos Túbulos de Malpighi de *Zophobas morio* (Coleóptera: Tenebrionidae) (**Figura 12**). Essa enzima possui um grau de identidade ainda menor com as luciferases típicas (~30%) do que a enzima tipo-luciferase de *A. binodolus* modificada por Oba *et al.* (2009) (~ 55%). No entanto, ela se mostrou capaz de emitir fraca luminescência na região do vermelho na presença de D-luciferina de besouros e ATP em sua forma selvagem (VIVIANI *et al.*, 2009; 2010).



**Figura 12.** (A) Larva intacta do tenebrionideo *Z. morio*, (B) Túbulos de Malpighi de *Z. morio* isolados, (C) Imagem da bioluminescência dos mesmos após 20 minutos de exposição em câmara CCD ATTO com injeção de D-luciferina 10 mM. Fonte: Viviani *et al.*, 2009 (Adaptado).

Desde então, a enzima tipo-luciferase de *Zophobas morio* vem sendo usada como modelo para estudos sobre a origem e evolução da bioluminescência em coleópteros. Estudos de mutagênese sítio-dirigida, mostraram que a substituição I327T ocasiona um aumento na atividade luminescente dessa enzima (PRADO *et al.*, 2011). O papel crucial desse resíduo na atividade luminescente da proteína foi confirmado com a obtenção do mutante I327S. Esse mutante apresentou emissão laranja muito semelhante às luciferases de vagalumes e um aumento de 100% na emissão de luz (VIVIANI *et al.*, 2013) (**Figura 13**).

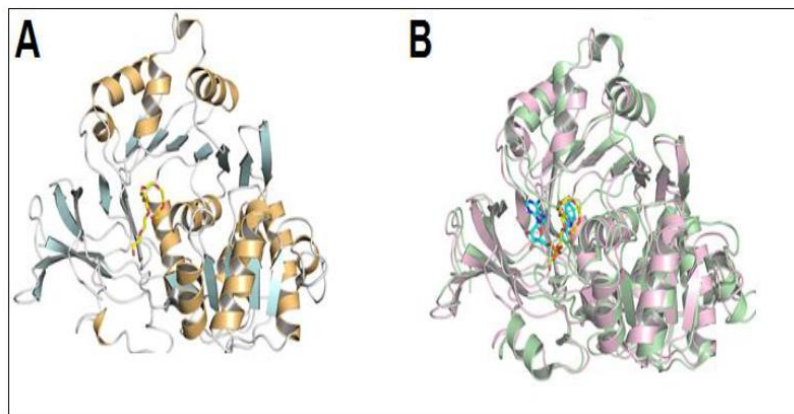


**Figura 13.** Ensaios *in vitro* mostrando a enzima tipo-luciferase selvagem (esquerda) e o mutante I237S (direita), ambas expressas em vetor pColdII. Fonte: Viviani *et al.*, 2013 (Adaptado).

Recentemente, a estrutura tridimensional do domínio N-terminal dessa enzima tipo-luciferase de *Z. morio* foi resolvida na ausência de substratos (**Figura 14**). Foi possível observar que, apesar da baixa similaridade com as sequências de luciferases, seu dobramento tridimensional é similar tanto às luciferases quanto a CoA-ligases estruturalmente caracterizadas.

Até o momento, a real função biológica dessa enzima ainda permanece desconhecida. No entanto, sabe-se que ela é generalista, sendo capaz de tioesterificar uma ampla gama de substratos carboxílicos (PRADO *et al.*, 2016). Somado a isso, a sua ocorrência em um órgão excretor, e a ativação e oxidação de D-luciferina (um substrato exógeno para esse organismo), leva a acreditar que talvez essa enzima esteja envolvida em alguma rota de detoxificação/excreção de xenobióticos carboxílicos (VIVIANI *et al.*, 2013).





**Figura 14.** Estrutura tridimensional do domínio catalítico da protoluciferase *Z. morio*: **(A)** dobra global; **(B)** Sobreposição estrutural da luciferase *Luciola cruciata* complexada com AMP e oxiluciferina (em ciano) sobre a enzima do tipo luciferase (em lilás). Fonte: PRADO *et al.*, 2016 (adaptado).

#### 1.2.2.4. Relação entre estrutura e espectros de emissão

Vários mecanismos foram propostos ao longo do tempo para explicar a emissão de diferentes cores da bioluminescência pelas luciferases de coleópteros. Sabe-se que diferenças a nível de estrutura primária são responsáveis por estas variações. Atualmente, existem três hipóteses mais amplamente aceitas: (I) Interação específica de resíduos do sítio ativo com a oxiluciferina e (II) Polaridade do sítio ativo (DeLUCA, 1969; UGAROVA & BROKVO, 2002); (III) conformação do sítio-ativo (VIVIANI *et al.*, 2008<sup>A,B</sup>). Essas hipóteses não são excludentes.

A hipótese da polaridade do sítio ativo se baseia no princípio de que a oxiluciferina em estado excitado é mais polarizada do que a molécula do substrato no estado fundamental. Assim sendo, o microambiente hidrofóbico do sítio ativo favoreceria a emissão de luz em comprimentos de onda menores. A entrada de água no sítio ativo levaria à estabilização parcial da oxiluciferina excitada e, conseqüentemente, a emissão de luz em um comprimento de onda menos energético (DeLUCA; 1969; UGAROVA & BROKVO, 2002).

Já os efeitos específicos se dão por meio de interações eletrostáticas e ácido-base entre resíduos do sítio ativo e, especialmente o grupo fenolato da molécula de luciferina. Essas interações podem interferir no grau de ressonância

da molécula de substrato, modulando assim a cor da bioluminescência (BRANCHINI *et al.*, 2004; HIRANO *et al.*, 2009).

Ao longo dos anos, vários estudos de mutagênese foram feitos com o objetivo de entender a relação entre a estrutura das luciferases de besouros e as cores de emissão (BRANCHINI *et al.*, 2004; VIVIANI *et al.*, 2008<sup>A</sup>).

Em luciferases de lampirídeos, diversas substituições foram feitas nos resíduos conservados do sítio ativo como o R218, H245 e T343 e todas elas ocasionaram um deslocamento no espectro para a região do vermelho (BRANCHINI *et al.*, 2001; 2003; 2005). Essas mesmas mutações não têm o mesmo efeito drástico sobre o espectro de emissão de luciferases pH-insensíveis de elaterídeos e fengodídeos (WHITE *et al.*, 1996; TAURIANEN *et al.*, 2000, VIVIANI *et al.*, 2002<sup>B</sup>; 2004<sup>B</sup>; 2007; VIVIANI & OHMIYA, 2000). Assim sendo, embora esses resíduos sejam importantes na interação com a oxiluciferina e modulação de cor, esses resultados indicam que existem outros fatores além da identidade dos resíduos do sítio-ativo envolvidos na determinação da cor da bioluminescência.

Substituições nos Y/F224 e G228 e T226, causam efeitos drásticos nos espectros de emissão em luciferases pH-sensíveis e insensíveis desviando consideravelmente o pico de emissão para a região do vermelho (VIVIANI *et al.*, 2001; 2007). Esses resíduos encontram-se no *loop* 223-235, e não interagem diretamente com a luciferina durante a catálise. No entanto, esse *loop* se localiza próximo ao assoalho do sítio de ligação para luciferina e faz várias interações polares que, aparentemente, ajudam na estabilização do fundo do sítio ativo (VIVIANI *et al.*, 2001; 2004<sup>B</sup>; 2007; 2008<sup>B</sup>). Essas informações indicam que a conformação da proteína também é importante.

Recentemente foi demonstrado que dois resíduos, E311 e R337, são cruciais para determinar a cor da bioluminescência nas luciferases emissoras de luz verde-amarela de vagalumes e sua sensibilidade ao pH (VIVIANI *et al.*, 2016). Eles possuem cargas opostas nas cadeias laterais que interagem entre si formando uma ponte salina responsável por estabilizar o sítio ativo mantendo-o em uma conformação mais rígida e fechada (VIVIANI *et al.*, 2016). Essa conformação mantém um microambiente apolar ao redor da oxiluciferina excitada, o que favorece a emissão de luz em um estado de energia mais elevado, resultando na bioluminescência de cor verde (VIVIANI *et al.*, 2016).

A importância de arginina na posição 337 fica realmente evidente quando observamos a estrutura primária da luciferase de *P. hirtus*. Essa luciferase não possui arginina na respectiva posição R334, resultando em um sítio ativo mais flexível e polarizado, o que ajuda a explicar porque essa enzima emite luz naturalmente vermelha (VIVIANI *et al.*, 1999<sup>B</sup>; VIVIANI *et al.*, 2016).

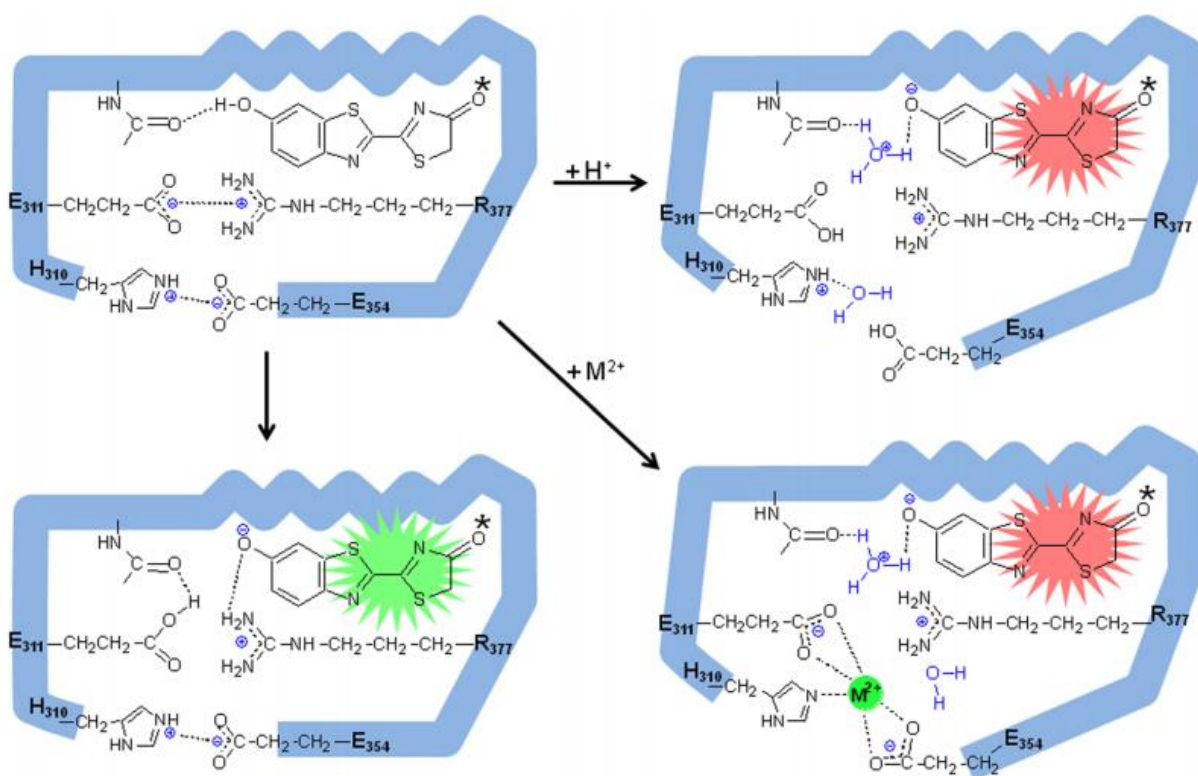
#### 1.2.2.5. Origem estrutural da sensibilidade ao pH e metais

Para melhor entender a origem estrutural da sensibilidade ao pH, diversas luciferases de vagalumes brasileiros tiveram seus cDNAs clonados e foram sequenciadas e caracterizadas (**Tabela 1, vide pág. 35**). A comparação entre as estruturas de luciferases pH-sensitivas e pH-insensitivas mostraram alguns resíduos que variam entre estes dois grupos de luciferases, e que poderiam estar relacionados à sensibilidade espectral (VIVIANI *et al.*, 2008<sup>A</sup>).

Os resultados publicados sugerem que as luciferases pH-insensitivas são, em geral, mais rígidas e estáveis enquanto as pH-sensitivas possuem um sítio ativo mais flexível (VIVIANI *et al.*, 2008<sup>A</sup>). Essa flexibilidade é necessária para que ocorra a emissão de luz vermelha mediante mudanças de pH ou aumento da temperatura (VIVIANI *et al.*, 2008<sup>B</sup>; 2014). Alguns *loops* possuem papel importante nesta sensibilidade. O *loop* 223-235 conecta os subdomínios A e B e é fundamental na estabilização do assoalho do sítio ativo e, conseqüentemente na modulação de cor (VIVIANI *et al.*, 2007; 2008<sup>B</sup>), bem como o *loop* 352-361, que também ajuda na estabilização do sítio ativo. (WOOD, 1995; VIVIANI *et al.*, 2005; MORADI *et al.*, 2009). Mutações nessa região afetam drasticamente os espectros de bioluminescência das luciferases (VIVIANI *et al.*, 2005; MORADI *et al.*, 2009).

Recentemente, o sítio de ligação de prótons e metais nas luciferases pH sensitivas foi elucidado (VIVIANI *et al.*, 2018<sup>B</sup>). Ele inclui principalmente as cadeias laterais dos resíduos E311 e H310 e E354 que ficam localizados próximos ao sítio de ligação do grupo fenolato da luciferina (VIVIANI *et al.*, 2018<sup>B</sup>). Em condições fisiológicas, os resíduos H310 e E354 formam uma ponte salina que, juntamente com a ponte salina entre os resíduos E311 e R337 mantém o sítio ativo fechado eletrostaticamente, o que resulta na emissão de luz verde (VIVIANI *et al.*, 2016; 2018<sup>B</sup>).

Em pH baixos e na presença de metais como zinco, o resíduo E311 não consegue interagir com o R337 e a formação da ponte salina fica prejudicada. Essa flexibilização estrutural faz com que o sítio ativo fique polarizado, o que resulta na emissão de luz vermelha (VIVIANI *et al.*, 2018<sup>B</sup>) (**Figura 15**). Além disto, foi proposto que o E311 possa funcionar como base no processo de quimioexcitação e o R337 funcione como contracatión durante a estabilização do grupo fenolato na etapa emissiva.



**Figura 15.** Mecanismo proposto para modulação de cor da bioluminescência por pH e presença de metais divalentes nas luciferases de lampirídeos. Fonte: VIVIANI *et al.*, 2018<sup>B</sup> (adaptado).

**Ocorrência de isoformas de luciferases em lampirídeos.** Em 1981, Strause & DeLuca mostraram a existência de isoformas distintas de luciferases em lampirídeos. Foram preparados extratos dos órgãos fotogênicos dos estágios adulto e larval do vagalume *Photuris*. Esses extratos foram submetidos a focalização isoeletrica e as luciferases parcialmente purificadas caracterizadas

quanto à cinética, perfil de pH e peso molecular. Os resultados mostraram a presença de uma enzima na larva de *P. pennsylvanica* com perfil distinto das demais luciferases de adultos, indicando tratar-se de uma isoforma diferente da enzima (STRAUSE & DeLUCA, 1981).

Em 1997, Leach *et al.* clonaram luciferases do adulto (Ppe1) e da larva (Ppe2) de *P. pennsylvanica*. As análises das sequências mostraram que essas luciferases compartilhavam 57% de identidade entre si, com perfis diferentes sendo que a isoforma larval mostrou-se insensível ao pH. Esses resultados corroboraram a presença de isoformas distintas de luciferases descritas por Strause e DeLuca. Posteriormente, isoformas pH-insensíveis também foram descritas nos ovos e pupas de *Luciola* spp (OBA *et al.*, 2010; 2013; BESSHO-UEHARA *et al.*, 2017<sup>A</sup>) e de *Pyrocoelia atripennis* (BESSHO-UEHARA *et al.*, 2017<sup>B</sup>).

Também foi relatada uma emissão de luz fraca e contínua originada no corpo gorduroso de larvas do vagalume brasileiro *Aspisoma lineatum* (VIVIANI *et al.*, 2008<sup>C</sup>) (**Figura 16**). Essa bioluminescência contínua e difusa, é bastante diferente da emissão rápida tipo lampejo observada nas lanternas dos adultos (VIVIANI *et al.*, 2008<sup>C</sup>). Estudos posteriores mostraram que os trofócitos do corpo gorduroso são as células que contém esta isozima, indicando que os fotócitos das lanternas atuais possam ter se originado de trofócitos (VIVIANI *et al.*, 2008<sup>C</sup>; TONOLLI *et al.*, 2011). Ensaio com os extratos de tecidos mostraram que além da cinética, as cores da bioluminescência também eram distintas, sendo verde no corpo gorduroso e amarela nas lanternas, o que também indica tratar-se de isoformas diferentes (TONOLLI *et al.*, 2011).



**Figura 16.** Lampirídeo *Aspisoma lineatum*: (A) Larva; (B) Vista dorsal do adulto e (C) Vista ventral do adulto evidenciando a lanterna. Autoria: Raone Reis Mariano

A análise do transcriptoma dos tecidos fotogênicos e não-fotogênicos da larva e adulto do vagalume *A. lineatum* (AMARAL *et al.*, 2017) confirmaram a existência dessas duas isoformas distintas de luciferase encontradas nas lanternas e no corpo gorduroso de adulto e larva, homólogas a aquelas encontradas em *Photuris pennsylvanica*, *Luciola* spp, *P. atripennis* e (LEACH *et al.*, 1997). No entanto até o trabalho desta tese, essas isoformas de *A. lineatum* ainda não tinham sido clonadas e caracterizadas.

Evolutivamente, acredita-se que as luciferases pH-sensíveis tenham evoluído a partir de um ancestral pH-insensível (OBA *et al.*, 2010; AMARAL *et al.*, 2017; 2019). Entretanto, ainda não se sabe exatamente o que determina diferentes graus de sensibilidade ao pH e como essa sensibilidade se originou durante o curso evolutivo.

### **1.2.3. Aplicações biotecnológicas de luciferases de besouros**

A bioluminescência tem sido muito utilizada como ferramenta analítica devido à sua rápida resposta, alta sensibilidade e baixo custo. O ATP, um dos substratos da reação Luciferina/Luciferase está presente em todas as células vivas. Por esse motivo, luciferases tem sido amplamente utilizadas como reagentes na análise de viabilidade celular, detecção de contaminação biológica, análises de proliferação celular entre outros (CAMPBELL, 1988; CROUCH *et al.*, 1993; PELENTIR *et al.*, 2019).

A clonagem do cDNA de luciferases de besouros passou a permitir uma infinidade de aplicações como gene repórter, sendo usado para monitorar progressão tumoral, taxa de transcrição em promotores de interesse, bioimagem de tecidos animais e vegetais e análises de ritmo circadiano (LI *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2020; MURANAKA & OYAMA, 2020).

Além disso, luciferases tem um forte apelo no desenvolvimento de biossensores. Células de *E. coli* transformadas com o cDNA de luciferases emitem sinal luminoso quando adicionamos luciferina. Em biossensores *light off* na presença de metais pesados ou outros agentes tóxicos, as células são afetadas e o sinal luminoso decresce, indicando a presença de toxicidade na amostra. (GABRIEL *et al.*, 2013). Em biossensores *light on*, o cDNA da luciferase é inserido junto a um promotor induzível que responde à presença de algum

composto específico, desse modo a enzima e a bioluminescência serão expressas apenas quando o promotor for ativado (SELIFONOVA *et al.*, 1993).

Recentemente, foi demonstrado o uso de luciferases pH-sensíveis como *Macrolampis* sp2 e *Amydetes vivianii* como indicadores ratiométricos de pH e metais pesados (GABRIEL & VIVIANI, 2014; 2016; PELENTIR *et al.*, 2019). Nesse tipo de biossensor, ao invés de analisar-se a diferença da intensidade da luz em diferentes amostras, as mudanças espectrais na presença do analito são quantificadas através da razão entre as intensidades da luz em diferentes comprimentos de onda.

No entanto, a baixa estabilidade de muitas luciferases na sua forma selvagem, a intolerância a variações de pH e a perda rápida da atividade luminescente em temperatura ambiente ou elevadas são grandes limitantes para expandir o leque de aplicações (IMANI *et al.*, 2010).

A termoestabilidade é um dos principais fatores limitantes na aplicação de biotecnológica de luciferases de um modo geral. As luciferases mais amplamente utilizadas biotecnologicamente, são as dos lampirídeos *Luciola cruciata* e *Photinus pyralis*, mas sua gama de aplicações envolveu processos de otimização por engenharia, já que ambas são bastante sensíveis à temperatura em sua forma selvagem (BRANCHINI *et al.*, 2007; KOKSHAROV & UGAROVA, 2011<sup>A</sup>; 2011<sup>B</sup>; IMANI *et al.*, 2010; JARCHI *et al.*, 2018).

Dentre as luciferases mais estáveis em sua forma selvagem, destacam-se a do elaterídeo *P. termitilluminans* e a do lampirídeo *A. vivianii*, com uma meia vida à 37°C de aproximadamente 11 horas e 12 horas, respectivamente (OLIVEIRA & VIVIANI, 2017; PELENTIR *et al.*, 2019). Sob esse aspecto, a prospecção de novas luciferases mais termoestáveis, e com propriedades catalíticas diferentes ainda é necessária.

## 2. JUSTIFICATIVA

O sistema bioluminescente de besouros tem sido extensivamente investigado nas últimas décadas e várias luciferases de diversas espécies com diferentes propriedades de bioluminescência como espectro de emissão, cinética, estabilidade térmica e sensibilidade ao pH e metais já foram estudadas. Assim sendo, muitos detalhes sobre mecanismos de reação são bem esclarecidos. Entretanto, ainda existem muitas questões em aberto, especialmente no que diz respeito à origem e evolução da bioluminescência nesse grupo. A sensibilidade do espectro de bioluminescência ao pH é uma característica exclusiva das luciferases de espécies da família lampyridae e, recentemente, a identidade dos resíduos que compõem o sensor de pH e sítio de ligação de metais foi elucidada nessas enzimas e o mecanismo desta sensibilidade foi esclarecido (VIVIANI, *et al.*, 2018<sup>B</sup>). Apesar disso, ainda não está claro como as eficientes luciferases pH-sensitivas das lanternas dos vagalumes se originaram durante a evolução. O vagalume brasileiro *Aspisma lineatum* tem sido utilizado como modelo de estudo para essa finalidade. Estudos anatômicos, bioquímicos e transcriptômicos, realizados anteriormente por nosso grupo, demonstraram a presença de isoformas distintas de luciferase na lanterna e corpo gorduroso. A clonagem dos cDNAs e caracterização estrutural e físico-química destas isoformas oriundas de um tecido ancestral e um derivado, poderão ajudar a identificar elementos estruturais importantes na origem da sensibilidade ao pH e outras propriedades cinéticas em luciferases de lampirídeos.

Além disto, considerando a grande utilidade das luciferases de vagalumes para finalidades biotecnológicas como genes repórteres, biossensores de pH/metais e sondas para bioimagem, existe um grande interesse na prospecção de novas enzimas com diferentes propriedades físico-químicas.



### 3. OBJETIVOS

O objetivo principal desta tese é ajudar a compreender como as eficientes luciferases pH-sensitivas das lanternas dos vagalumes lampirídeos se originaram e evoluíram. Para alcançar este objetivo principal, os objetivos específicos foram:

- 1- Clonagem do cDNA das diferentes isoformas de luciferases oriundas do corpo gorduroso e da lanterna da espécie brasileira de vagalume *Aspisoma lineatum* (Lampyridae: Cratomorphini);
- 2- Expressar, purificar e caracterizar cineticamente e a bioluminescência de ambas as luciferases.
- 3- Comparar as estruturas primárias destas luciferases com outras luciferases pH-sensitivas e pH-insensitivas, para identificar diferenças estruturais que possam estar envolvidas com a origem estrutural da sensibilidade ao pH, e outras propriedades cinéticas incluindo a eficiência catalítica nas luciferases de lampirídeos.
- 4- Prospecção de novas luciferases de besouros da fauna brasileira com propriedades cinéticas e de luminescência de interesse biotecnológico.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Coleta de insetos

Ambos larvas e adultos de *Aspisma lineatum* foram coletados no *campus* de Sorocaba da Universidade Federal de São Carlos, localizado na Rodovia João Leme dos Santos, Km 110 na cidade de Sorocaba – SP, Brasil (47°31'28"W, 23°34'53"S). O período de coleta foi de novembro a janeiro de 2017 e 2018.

### 4.2. Extração do RNA total

O RNA total da lanterna do indivíduo adulto foi isolado usando Trizol. A amostra de tecido foi homogeneizada em Trizol (1mL para 50-100 mg de tecido) e em seguida centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Após o descarte do precipitado foi feita a adição de clorofórmio (200  $\mu$ L/ 1mL trizol) e a amostra seguiu novamente para centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa contendo o RNA foi isolada e foi feita a precipitação com isopropanol (500  $\mu$ L/1 mL Trizol) seguida por lavagem com solução de etanol 75%. Por fim foi feita a ressuspensão do RNA total em água livre de RNase.

O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro *Nanoview* (GE *Healthcare*) que forneceu os valores de concentração do RNA total e da razão das absorbâncias A260 / A280, que indica a pureza do RNA. Preparações puras de RNA têm uma relação A260/A280 de entre 1,8 e 2,0.

### 4.3. Síntese do cDNA

Para obtenção do *pool* gênico contendo as moléculas de cDNA do tecido, foi feita a transcrição reversa com o Kit *GoScript Reverse Transcriptase* (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. Foi preparado um mix contendo 1  $\mu$ L de água livre de nucleases, 1  $\mu$ L de oligo-dT e 3  $\mu$ L do RNA total. Esse mix foi incubado a 70°C por 5 minutos para pareamento do oligo DT ao RNA mensageiro. Após isso esse mix contendo o RNA foi adicionado na reação de conversão em cDNA contendo tampão, Mg<sup>2+</sup>, dNTP e transcriptase reversa. A reação foi submetida ao termociclador sob as seguintes condições: 5 minutos a 25°C seguidos por 60 minutos a 42°C e finalmente 75 minutos a 70°C.

#### 4.4. Amplificação dos cDNAs para as luciferases e subclonagem em vetor de expressão

As sequências de cDNA das luciferases foram obtidas previamente por análise dos transcritos da lanterna do vagalume *A. lineatum* (AMARAL *et al.*, 2017). Desse modo, foram construídos *primers* específicos para amplificação dos genes de interesse (**Tabela 2**). Os insertos foram amplificados por PCR utilizando-se o cDNA (4.3) como molde e os *primers* contendo o sítio de restrição *KpnI* e *Hind III* para inserção em vetor de expressão. Uma vez amplificados, foi feita a digestão dos insertos de ~2 kb e do vetor pCold II (Takara) com as enzimas de restrição (Promega) e as amostras foram purificadas com o kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. Por fim, a reação de ligação foi feita utilizando a enzima T4 ligase (Promega).

A reação de ligação consiste em um mix com volume total de 10 µL contendo o inserto e o vetor previamente digeridos e purificados (30 ng do inserto e 10 ng de vetor), 1 µL do tampão de reação comercial 10X (Tris-HCl 300 mM, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,8) e 0,5 µL da Ligase comercial (1-3 U/µL). A reação foi incubada à 4°C por 12 horas.

O mapa e o sítio de clonagem do vetor pColdII utilizado para clonagem e expressão dos cDNAs podem ser vistos no ANEXO 2.

**Tabela 2.** Sequência dos *primers* utilizados para clonagem das luciferases AL 1 e AL 2 de *A. lineatum*.

<i>Primer</i>	Sequência
AL 1 <i>foward</i>	GGT CCA TGA GGA TCC ATG GAA TCG GAA GAT AAA AAT ATT GTT TGC GGT CC
AL 1 <i>reverse</i>	GTA TGG CTA TCG AAG CTT ACA ATT TGG ATT TCT TTG CCT TAA TTA AA
AL 2 <i>foward</i>	TCA CAG GAT GGA TCC ATG GAC GAT ACA AAT ATT TTA TAT GGG CCT AAA CC
AL 2 <i>reverse</i>	GTA TCG TCG AAG CTT CTA AAG TTT AGA CTT AGG TTT TGA AAG TAT TT

#### 4.5. Transformação de *Escherichia coli*

Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de células *E. coli* competentes tipo XL1-Blue ou BL-21 (Agilent, LaJolla, CA) foi misturada com 1  $\mu\text{L}$  (~10-50 ng) de DNA plasmidial em um tubo. Em seguida, essa alíquota foi incubada no gelo por 30 minutos e então submetida a um choque térmico de 42° C em banho-maria por 45 segundos seguidos de mais 2 minutos de incubação no gelo. Após o choque térmico, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de meio líquido LB (Luria Bertani) e esta solução foi incubada a 37° C sob agitação de 225 rpm por 1 hora sendo, posteriormente, plaqueada em meio seletivo LB ágar/ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### 4.6. Screening funcional

Após a transformação (4.5) de células competentes do tipo XL1-Blue com a reação de ligação entre o inserto e o vetor (4.4), as colônias foram transferidas para uma placa com meio LB com ampicilina contendo 1 mM de IPTG com o auxílio de uma membrana de nitrocelulose. Em seguida, essa placa foi mantida à 18° C durante 16 horas para indução. Após esse período, foi adicionada D-luciferina 1 mM (diluída em tampão citrato 50 mM, pH 5,0) e foi feita a fotodeteção por 1 minuto em Câmera CCD (ATTO, Tóquio, Japão). As colônias que apresentaram emissão de luz foram isoladas, cultivadas e usadas para extração de DNA plasmidial (4.7).

#### 4.7. Extração de DNA plasmidial

Para preparação de estoque do DNA plasmidial de interesse, células competentes do tipo XL1-Blue foram transformadas de acordo com o item 4.4. Uma colônia isolada foi cultivada em 5 mL de meio líquido LB /Ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e mantida *overnight* a 37° C sob agitação de 225 rpm. Em seguida essa minicultura foi centrifugada a 12.000 g a 4° C durante 15 minutos. O DNA plasmidial foi extraído a partir do *pellet* obtido pela centrifugação utilizando-se o “Kit Miniprep” (GE-Healthcare), segundo o protocolo do fornecedor. Uma vez obtidos os estoques de plasmídeos, as amostras seguiram para sequenciamento.

#### 4.8. Sequenciamento do DNA

A confirmação da clonagem foi feita por meio do sequenciamento do DNA utilizando-se reações terminadas com dideoxi nucleotídeos (Sanger). Esse sequenciamento foi realizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal (FCAV) - Departamento de Tecnologia (UNESP - Jaboticabal) em sequenciador ABI PRISM® 3100 *GeneticAnalyzer* (Hitachi). As sequências dos nucleotídeos utilizados para sequenciamento estão discriminadas na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Sequência dos *primers* utilizados para sequenciamento das luciferases AL1 e AL2.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
pCold <i>foward</i>	CGC CAT ATC GCC GAA AGG CAC
pCold <i>reverse</i>	GGC AGG GAT CTT AGA TTC TG
AL1 150 <i>foward</i>	GTG GTG ATT GAT AGC AAA GT
AL1 310 <i>foward</i>	CTG CAG GAA ATT GCG AGC GGC G
AL1 400 <i>foward</i>	CGA TAT TGC GTA TCA TGA TA
AL2 205 <i>foward</i>	CTA AAG GCG TAA TGG TTA CTC A
AL2 356 <i>forward</i>	GAA ATT GGC ATT AAA CCG GGC A

#### 4.9. Expressão heteróloga de proteínas

Uma colônia isolada de *E. coli* BL21 previamente transformada com o plasmídeo contendo o cDNA de interesse (4.4) foi cultivada em 5 mL de meio líquido LB/Ampicilina (100 µg/mL) a 37° C e 225 rpm por aproximadamente 6 horas (ou até a turbidez do meio). Em seguida, 2 mL dessa pré-cultura foram inoculados em 100 mL de meio líquido LB. A cultura foi então mantida a 37° C e agitação de 225 rpm até atingir absorbância ( $Abs_{600\text{ nm}}$ ) de 0,4. Uma vez atingida a absorbância, a cultura foi mantida a 4° C por 30 minutos para parar o crescimento bacteriano, e acrescida de 0,5 mM de IPTG. A indução foi feita incubando a cultura a 16° C com agitação de 180 rpm durante 16 horas. Após a indução, as culturas foram centrifugadas a 2.500 g por 15 minutos a 4° C, e os

*pellets* contendo o material celular seguiram para extração e purificação da proteína recombinante.

#### **4.10. Extração e purificação de proteínas recombinantes**

O *pellet* contendo as células foi ressuspensão em 5 mL de tampão de extração gelado (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl 10% glicerol, 1% Triton X-100, pH 8,0) acrescido de 100 µL de coquetel antiprotease livre de EDTA (Roche). Em seguida foi feita a lise celular por ultrassonicação (Misonix, Nova York, USA) com cinco repetições de 10 segundos. A amostra lisada foi então centrifugada a 12.000 g por 15 minutos a 4° C e o sobrenadante contendo a fração solúvel da enzima foi usado para purificação das luciferases.

A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em resina de níquel. Esse método é baseado na afinidade entre uma cauda de histidina fundida no N-terminal da enzima recombinante e os íons de níquel (Ni-NTA) imobilizados em resina de agarose. A resina Ni-NTA-agarose (Qiagen) foi equilibrada com tampão de extração, misturada ao extrato bruto e mantida sob agitação moderada por 45 minutos à 4° C. A mistura foi então transferida para uma coluna, o que permite a eluição de proteínas não ligadas. Subsequentemente, adicionou-se 10 mL de tampão de lavagem (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM e glicerol 10%). A proteína recombinante foi eluída da resina com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM, Glicerol 10% em alíquotas de 1 mL. A alíquota que apresentou melhor atividade luminescente foi dialisada *overnight* em tampão (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 10 mM, EDTA, 0,1 mM, Glicerol 15%, DTT 2 mM).

#### **4.11. Análise SDS-PAGE**

A eletroforese em gel de poliacrilamida 10% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com o protocolo Bio-RAD. As amostras foram preparadas diluindo-se de 30 µL da proteína em 30 µL de tampão desnaturante de amostra foram desnaturadas a 95 °C por 5 minutos. Em seguida foi feita a corrida do gel por cerca de 2 horas a 100 volts em tampão de corrida (16,3% TRIS, 78% de glicina e 5,4% de SDS e pH 8,3). Para coloração, o gel foi imerso em solução do corante *Comassie Blue* (*comassie* R250 0,2%, metanol 50%, ácido acético glacial 10%) sob leve agitação por 30 minutos. Para

visualização das bandas o gel foi imerso em solução descorante (10% ácido acético, 25% etanol).

#### 4.12. Quantificação de proteínas totais

O método utilizado foi o estabelecido por Bradford (1976). Essa técnica se baseia na ligação da proteína com o corante azul de Comassie que tem uma absorvância máxima em 590 nm. Inicialmente foi montada uma curva-padrão de concentração de proteína utilizando-se Soroalbumina bovina (BSA). A concentração de proteínas totais foi então determinada pela expressão:  $[Proteína] = F \times Abs$ , onde F é o fator igual a  $\Delta x / \Delta y$ , obtido a partir da curva-padrão.

#### 4.13. Medida da atividade luminescente *in vitro*

A atividade da luciferase foi baseada na luminescência produzida. O ensaio foi realizado em luminômetro AB2200 (ATTO, Tóquio, Japão). A unidade de luminescência foi dada em *counts por segundo* (cps). A reação foi realizada adicionando-se em um tubo de luminometro, 85  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,10 M, pH 8,0; 5  $\mu$ L do extrato bruto ou da enzima purificada, 5  $\mu$ L de D-luciferina 10 mM e 5  $\mu$ L de solução  $MgSO_4$  80 mM e ATP 40 mM.

#### 4.14. Determinação da atividade específica

A atividade específica da enzima (cps/mg) foi calculada dividindo-se a atividade luminescente da enzima purificada no ensaio padrão em cps/mL pela concentração de proteína total em mg/mL.

#### 4.15. Constantes e eficiências catalíticas

A constante catalítica é definida como o número de moléculas de substrato convertidas por uma molécula de enzima por unidade de tempo. As constantes catalíticas ( $k_{cat}$ ) e oxidativas ( $k_{ox}$ ) foram calculadas com base na equação abaixo:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]}$$

Onde,  $V_{\max}$  = Atividade bioluminescente (em cps) com luciferina e ATP ( $k_{\text{cat}}$ ), ou adenilato de luciferina ( $k_{\text{ox}}$ ) e  $[E]$  = número de moléculas de luciferase.

Como o valor absoluto de luminescência em fótons/s, e os valores de rendimentos quânticos das luciferases não puderam ser determinados, os valores absolutos de  $k_{\text{cat}}$  e  $k_{\text{ox}}$  em  $\text{s}^{-1}$  não puderam ser determinados. Portanto, os valores foram relatados em cps (*counts* por segundo). Embora esses valores não sejam absolutos, eles podem ser usados com segurança como valores relativos de constantes catalíticas.

#### 4.16. Determinação do $K_M$ para luciferina e ATP

Os ensaios para determinar o  $K_M$  para luciferina foram realizados misturando-se 5  $\mu\text{L}$  da solução de Mg/ATP (80 mM/40 mM), 85  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,10 M pH 8,0, 5  $\mu\text{L}$  de luciferase purificada ( $\sim 1 \mu\text{g}$ ) e luciferina em concentrações finais entre 0,01 e 1 mM. Os ensaios de  $K_M$  para ATP foram realizados misturando 5  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{MgSO}_4$  80 mM, 80  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,10 M, pH 8,0, 5  $\mu\text{L}$  de luciferase purificada ( $\sim 1 \mu\text{g}$ ), 5  $\mu\text{L}$  de luciferina 10 mM e ATP em concentrações finais no intervalo entre 0,02 e 2 mM. Os valores de  $K_M$  foram calculados por meio da equação da reta obtida através do gráfico de Lineaweaver-Burk.

#### 4.17. Determinação do pH-ótimo

O pH ótimo para ambas enzimas foi determinado a partir da atividade luminescente utilizando-se diferentes tampões para cada faixa de pH: tampão citrato 0,10 M (pH 5,0 a 6,0), tampão fosfato 0,10 M (6,0 a 8,0), tampão Tris-HCl 0,10 M (pH 7,5 a 9,0) e tampão 0,10 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.

#### 4.18. Espectros de bioluminescência

O espectro de bioluminescência foi medido na presença de ATP e luciferina em espectroluminômetro AB – 1850 Lumi FI Spectro Capture (ATTO, Tóquio). No ensaio foram misturados 85  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,10 M, pH 8,0; 5  $\mu\text{L}$  da enzima purificada, 5  $\mu\text{L}$  de D-luciferina 10 mM e 5  $\mu\text{L}$  de Mg/ATP



(80/40 mM). Para avaliar o efeito do pH no espectro de bioluminescência, a reação também foi feita com diferentes tampões com diferentes valores de pH: Citrato 0,10 M pH 5,5; fosfato 0,10 M pH 6,0. 6,5; 7,0 e 7,5 Tris-HCl 0,10 M pH 8,0.

#### **4.19. Efeito de metais pesados sobre as atividades e espectros de bioluminescência.**

Os efeitos de metais tóxicos tanto sobre a atividade luminescente (4.13) quanto sobre o espectro de emissão (4.18) de ambas as luciferases de *A. lineatum* também foram analisados. Foram testados Cádmio ( $\text{CdSO}_4$ ), Mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), Cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), Chumbo ( $\text{PbCl}_2$ ), Lítio ( $\text{LiSO}_4$ ) Níquel ( $\text{NiSO}_4$ ) e Zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ). A reação foi realizada adicionando-se 80  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,10 M, pH 8,0; 5  $\mu\text{L}$  da enzima purificada, 5  $\mu\text{L}$  da solução estoque 20 mM do sal do metal (concentração final 1mM), 5  $\mu\text{L}$  de D-luciferina 10 mM e 5  $\mu\text{L}$  de solução  $\text{MgSO}_4$  80 mM/ATP 40 mM. As soluções estoque de todos os metais foram diluídas em água.

#### **4.20. Fotografia de bioluminescência**

Todas as fotografias de bioluminescência foram obtidas usando-se uma câmera fotográfica *Canon Eos T7*. No caso das fotografias feitas para observar e comparar a cor da bioluminescência de ambas as luciferases e a cor de emissão da AL1 (lanterna do adulto) em diferentes valores de pH, foi preparado 1 mL da reação *in vitro* contendo 700  $\mu\text{L}$  de tampão (Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 ou Fosfato 0,1 M pH 6,0), 50  $\mu\text{L}$  de solução  $\text{MgSO}_4$  80 mM/ATP 40 mM, 50  $\mu\text{L}$  de D-luciferina 10 mM, 100  $\mu\text{L}$  da enzima purificada e 5% de glicerol.

No caso das fotografias do efeito da temperatura sobre a atividade da luciferase AL2 (do corpo gorduroso), alíquotas da enzima submetidas ao teste de estabilidade térmica foram estocadas a 4° C para cada temperatura e intervalo de tempo medido até a finalização do ensaio (4.21). Em seguida, as reações foram preparadas em uma placa tipo ELISA da seguinte forma: 5  $\mu\text{L}$  da alíquota da enzima submetida ao ensaio de termoestabilidade estocada a 4° C, 5  $\mu\text{L}$  de D-luciferina 10 mM e 5  $\mu\text{L}$  de solução  $\text{MgSO}_4$  80 mM/ATP 40 mM. Cada um desses reagentes foi pipetado na parede do poço da placa sem entrarem em contato entre si.

Uma vez que todas as alíquotas da curva de termoestabilidade foram pipetados na placa, todas as reações foram disparadas simultaneamente pela adição 85  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,10 M, pH 8 com o auxílio de uma pipeta multicanal. A fotografia foi feita em seguida.

#### **4.21. Estabilidade térmica**

Após purificação e diálise (4.10), amostras contendo luciferases de *A. lineatum* na concentração padrão de  $\sim$ 0,2 mg/mL (AL1 e AL2) foram incubadas a 4° C, 22° C e 37° C e a atividade luminescente residual foi medida nos tempos de 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120 horas. A termoestabilidade da luciferase do corpo gorduroso AL2 também foi analisada á 50° C (0, 1, 2, 3, 4, 5, e 6 horas) e 60° C (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 15 minutos).

#### **4.22. Espectros de dicroísmo circular (CD)**

Os espectros de dicroísmo circular (CD) foram utilizados para analisar a proporção de estrutura secundária da luciferase AL2 de *A. lineatum* e das luciferases de *Amydetes vivivanii* e *Macrolampis* sp2 com finalidade comparativa. Estes testes foram realizados em parceria com o Dr. Atilio Tomazini do Centro Brasileiro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM).

As proteínas recombinantes foram preparadas na concentração de 3,5  $\mu$ M em Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 120 mM, pH 7,5 e analisadas a 20° C. Os espectros de CD foram registrados em um espectropolarímetro Jasco J-815 (*Japan Spectroscopic*, Tóquio, Japão) equipado com uma unidade Peltier para controle de temperatura. Os espectros de CD de UV-distante foram medidos usando cubetas de 1 mm de comprimento de caminho. Os espectros foram apresentados como uma média de dez varreduras registradas na faixa de comprimento de onda de 190–260 nm com passo de incremento de 100 nm.min<sup>-1</sup>, tempo médio de 10 s, largura de banda de 1 nm e tempo de resposta de 0,5 s. A elipticidade molar residual foi expressa em grau  $\times$  cm<sup>2</sup> por decimole. Os dados foram submetidos ao programa de análise do CD Dichroweb (WHITMORE & WALLACE, 2004) para obter as estimativas da composição da estrutura secundária da proteína. Além disso, também analisamos a transição térmica por CD no comprimento de onda de 222 nm na faixa de 20-100° C. As proteínas

foram dialisadas contra HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol a 10% e analisadas a 3,5  $\mu$ M.

#### 4.23. Análises de Bioinformática

O multialinhamento das estruturas primárias das luciferases foi realizado no programa Clustal (LARKIN *et al.*, 2007). A análise de propriedades físico-químicas baseadas na sequência de aminoácidos (PI e MW) foi realizada usando ProtParam (GASTEIGER *et al.*, 2005). A análise filogenética da estruturas primárias das luciferases foi realizada com o auxílio do Dr. Danilo T. Amaral, usando o software MrBayes 3.2 (RONQUIST *et al.*, 2012) e IQTree 1.5.6 (NGUYEN *et al.*, 2015). As seqüências de aminoácidos foram alinhadas no software MEGA 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013). As árvores obtidas usando os dois softwares foram visualizadas no software FigTree v.1.4.1 (SUCHARD *et al.*, 2018). O número de acesso das luciferases usadas na análise está disponível na **Tabela 4**.

#### 4.24. Modelagem

A modelagem foi feita pelo Dr. Afílio Tomazini do Centro Brasileiro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Modelos ab iniciais das luciferase de *Aspisma lineatum* (AL1 e AL2) foram gerados usando o I-TASSER (ROY *et al.*, 2010). Os efeitos das mutações na luciferase AL2 foram previstos pelo servidor da web DynaMut (RODRIGUES *et al.*, 2018) e Arpeggio (JUBB *et al.*, 2017) implementado para analisar e visualizar o impacto das mutações. Além disso, a visualização gráfica molecular e as análises foram preparadas usando o Sistema Gráfico Molecular PyMOL, Versão 2.0 Schrödinger, LLC. Também foi feita a modelagem das luciferases de *A. vivianii* e *Macrolampis* sp2 com finalidades comparativas.

**Tabela 4.** Espécies e número de acesso GenBank das sequências primárias de luciferases utilizadas nas análises filogenéticas (NA – número de acesso não disponível).

<b>Espécies</b>	<b>Número de acesso</b>
<i>Fulgeochlizus bruchi</i>	NA
<i>Pyrearinus termitilluminans</i>	AF116843.1
<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i>	AAQ11735.1
<i>Photophorus jansonii</i>	AB767301.1
<i>Agrypnus binodulus</i> luciferase-like enzyme	BAF96580.1
<i>Photinus pyralis</i>	AB644228.1
<i>Macrolampis</i> sp.2	NA
<i>Lucidina biplagiata</i>	AB535101
<i>Cratomorphus distinctus</i>	AY633557
<i>Lampyrus turkestanikus</i>	AY742225
<i>Pyrocoelia atripennis</i> Luc1	LC215693.1
<i>Pyrocoelia rufa</i>	AF328553.1
<i>Pyrocoelia pectoralis</i>	EF155570.1
<i>Pyrocoelia pygidialis</i>	EU826678
<i>Amydetes vivianii</i>	NA
<i>Luciola mingrelica</i>	S61961.1
<i>Luciola parvula</i> Luc1	L39929.1
<i>Luciola unmusana</i>	AF420006.1
<i>Luciola itálica</i>	DQ138966.1
<i>Lampyroidea maculata</i>	DQ137139.1
<i>Luciola terminalis</i>	EU302126.1
<i>Luciola cruciata</i> Luc1	M26194.1
<i>Luciola lateralis</i> Luc1	X66919.1
<i>Photuris pennsylvanica</i> Luc1	D254416.1
<i>Drilaster axillaris</i>	AB604790.1
<i>Stenocladus azumai</i>	AB644225.1
<i>Ciphonocerus ruficollis</i>	AB5604789.1
<i>Pyrocoelia atripennis</i> Luc2	LC215694.1
<i>Luciola cruciata</i> Luc2	AB490793.1
<i>Luciola lateralis</i> Luc2	AB693934.1
<i>Luciola parvula</i> Luc2	AB812879.1
<i>Photuris pennsylvanica</i> Luc2	U31240.1
<i>Phrixothrix vivianii</i>	AF139644.1
<i>Taxinomastinocerus</i> sp.	NA
<i>Zophobas morio</i>	NA

## 5. RESULTADOS

Com o objetivo de clonar os cDNAs das isoformas de luciferase encontradas nas análises transcriptômicas de *Aspisoma lineatum*, foi feita a extração do RNA total da lanterna parcialmente isolada do vagalume em fase adulta. O órgão não foi completamente isolado. Desse modo, juntamente com a lanterna a extração também continha amostra de tecido do corpo gorduroso. Após a conversão das moléculas de mRNA em cDNA, os genes foram amplificados separadamente e os clones positivos para bioluminescência foram isolados através de *screening* funcional.

Uma vez confirmados os clones por sequenciamento, as isoformas foram caracterizadas e as propriedades físico-químicas e cinéticas, como constantes catalíticas, termoestabilidade, sensibilidade ao pH e a metais foram determinadas. As sequências de aminoácidos foram comparadas entre si e com outras luciferases típicas. Também com base na sequência de aminoácidos foi feita a análise da filogenia, alinhamento com luciferases pH-sensitivas e pH-insensitivas e modelagem das isoformas, o que nos permitiu identificar os resíduos e regiões potencialmente envolvidos na origem da sensibilidade ao pH em luciferases de lampirídeos.

### 5.1. Análise das sequências de cDNA e dedução das sequências de aminoácidos

As identidades dos cDNAs clonados das luciferases da lanterna (AL1) e do corpo gorduroso (AL2) foram confirmadas por sequenciamento. A comparação entre as sequências parciais obtidas pela clonagem e a sequência previamente obtida por transcriptoma (AMARAL *et al.*, 2017) mostrou algumas diferenças a nível de cDNA. Entretanto, todas as mutações observadas são silenciosas.

A sequência da janela de leitura (ORF) da luciferase de lanternas de *A. lineatum* AL1 possui 1647 nucleotídeos, codificando 548 aminoácidos dos quais 12 são cisteínas (**Figura 17, Tabela 5**). O ponto isoelétrico (PI) teórico calculado deste polipeptídeo é 6,06 e o peso molecular é 60,45 kDa. Por outro lado, a sequência da luciferase do corpo gorduroso AL2 possui 1638 nucleotídeos e

codifica um polipeptídeo com 545 aminoácidos contendo 9 cisteínas e peso de 60,49 kDa. Para esta isoenzima, o PI calculado foi 6,89 (**Figura 18, Tabela 5**).

Ambas as sequências de aminoácidos possuem o sinal peptídico de direcionamento peroxissômico SKL na extremidade C'-terminal (LODISH *et al.*, 2000). As respectivas estruturas primárias compartilham 57% de identidade e 66% de semelhança entre si (**Tabela 6**).

**Tabela 5.** Composição de aminoácidos das luciferases AL1 e AL2.

Aminoácidos (AA)	Luciferase AL1		Luciferase AL2	
	N° de AA	%	N° de AA	%
Alanina (A)	33	6	28	5,1
Arginina (R)	19	3,5	11	2
Asparagina (N)	18	3,3	19	3,5
Aspartato (D)	32	5,8	31	5,7
Fenilalanina (F)	29	5,3	27	5
Cisteína (C)	12	2,2	9	1,7
Glutamina (Q)	17	3,1	14	2,6
Glutamato (E)	33	6	31	5,7
Glicina (G)	48	8,8	40	7,3
Histidina (H)	11	2	13	2,4
Isoleucina (I)	41	7,5	46	8,4
Leucina (L)	51	9,3	49	9
Lisina (K)	40	7,3	50	9,2
Metionina (M)	12	2,2	9	1,7
Prolina (P)	27	4,9	28	5,1
Serina (S)	30	5,5	41	7,5
Treonina (T)	29	5,3	33	6,1
Tirosina (Y)	20	3,6	22	4
Triptofano (W)	1	0,2	4	0,7
Valina (V)	45	8,2	40	7,3
<b>Total de AA carga positiva</b>	59	10,8	61	11,2
<b>Total de AA carga negativa</b>	65	11,8	62	11,4
<b>NUMERO TOTAL DE AA</b>	<b>548</b>		<b>545</b>	

A comparação entre as estruturas primárias das luciferases AL1 e AL2 com outras luciferases já clonadas e caracterizadas na literatura mostrou que a AL1 possui valores de identidade e similaridades maiores com luciferases provenientes das lanternas de outras espécies lampírideos como as isoladas dos adultos de *A. vivianii*, *Macrolampis* sp2, *P. pyralis*, *Luciola* spp e da larva de *C.*

*distinctus* (valores de identidade entre 68 e 84 % ) do que com sua isoforma AL2 isolada do corpo gorduroso (57 % de identidade).

Quando comparada com outras luciferases, a AL2 tem um grau de similaridade maior com a luciferase da lanterna larval de *Cratomorphus distinctus* (74%). Notavelmente, a isoforma AL2 apresenta similaridade ligeiramente maior com as luciferases de fengodídeos (entre 68% a 72%) do que com a isoforma AL1 da mesma espécie (66% de similaridade) (**Tabela 6**).

O comprimento da sequencia polipeptídica da isoforma AL2 também se aproxima ao das luciferases de fengodídeos, sendo ligeiramente mais curta do que as luciferases de lampirídeos que possuem em média 548-550 resíduos. AL2 tem 545 resíduos assim como a luciferase de *Phrixothrix vivianii* (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Valores de identidade e similaridade das luciferases AL1 e AL2 com outras luciferases já clonadas de lampirídeos, elaterídeos e fengodídeos.

Luciferases	Identidade (%)		Similaridade (%)		N° de Resíduos
	<i>Aspisoma lineatum</i>	<i>Aspisoma lineatum</i>	<i>Aspisoma lineatum</i>	<i>Aspisoma lineatum</i>	
	AL1	AL2	AL1	AL2	
<b>Lampirídeos</b>					
<i>A. lineatum</i> AL1	-	57	-	66	548
<i>A. lineatum</i> AL2	-	-	-	-	545
<i>A. vivianii</i>	80	56	89	70	548
<i>Macrolampis sp2</i>	83	55	91	72	550
<i>P. pyralis</i>	84	56	91	73	550
<i>C. distinctus</i>	84	59	92	74	547
<i>L. cruciata</i> Luc 1	68	54	81	72	548
<i>L. lateralis</i> Luc 1	68	56	81	71	548
<i>L. cruciata</i> Luc 2	61	61	78	79	544
<b>Elaterídeos</b>					
<i>P. termitilluminans</i>	46	44	66	65	543
<i>F. bruchii</i>	46	44	66	65	542
<i>P. angustus</i>	48	44	67	67	543
<b>Fengodídeos</b>					
<i>Rhagophthalmus ohbai</i>	52	49	73	72	543
<i>P. hirtus</i> vermelha	49	45	70	68	546
<i>P. vivianii</i>	48	53	72	71	545

<b>Isoforma AL1</b>																	
atg gaa tcg gaa gat aaa aat att gtt tgc ggt cca ccg gca ttt tat cct ttg gaa gat																	<b>60</b>
M E S E D K N I V C G P P A F Y P L E D																	
gga act gct gga gaa caa ttg cat aaa gcg atg aag aga tac gcc caa gat cca gga aca																	<b>120</b>
G T A G E Q L H K A M K R Y A Q D P G T																	
att gct ttt aca gat gca cat att gag gtt aac gtc aca tat gcc gaa tac ttt gaa ata																	<b>180</b>
I A F T D A H I E V N V T Y A E Y F E I																	
gct tgc cga tta gct gaa agt atg aaa cga ttc gga ctc act ttg aag gat aga att tgc																	<b>240</b>
A C R L A E S M K R F G L T L K D R I C																	
gtg tgc agt gaa aat tct ctt cag ttc ttt atg cca gta ttg ggt gct cta ttt atc ggg																	<b>300</b>
V C S E N S L Q F F M P V L G A L F I G																	
gtt gga gta gct cca gca aat gac atc tac aat gaa cgt gaa tta ctg aac agt ttg agt																	<b>360</b>
V G V A P A N D I Y N E R E L L N S L S																	
ata tca caa cct act ata ata ttt gtt tct aaa aag ggg ctg caa aag att ctg aac gtc																	<b>420</b>
I S Q P T I I F V S K K G L Q K I L N V																	
caa aag agt ttg tcc gta att aaa aaa att gtt gtt att gat tcc aag gtg gac tac caa																	<b>480</b>
Q K S L S V I K K I V V I D S K V D Y Q																	
ggg cac caa tgt atg acc acc ttc att tca act tac cta cct ccg ggt ttc aac gaa tat																	<b>540</b>
G H Q C M T T F I S T Y L P P G F N E Y																	
gac tac gta ccg gaa tca ttt gat cgc gaa acc aca act gcc ctt ata atg aat tca tcg																	<b>600</b>
D Y V P E S F D R E T T T A L I M N S S																	
gga tct acc ggt tta cct aag ggt gta aat atc tgt cac atc aat gtt tgc gtt aga ttc																	<b>660</b>
G S T G L P K G V N I C H I N V C V R F																	
tcc cat tgc cgc gat ccc gtc ttt ggt aat aat att att ccc gat act gca att tta tcg																	<b>720</b>
S H C R D P V F G N N I I P D T A I L S																	
gtc gta ccg ttc cac cat ggt tat gga atg ttt aca acg ttg ggt tac ttg att tgc gga																	<b>780</b>
V V P F H H G Y G M F T T L G Y L I C G																	
ttc cgc att vtg cta atg tat aga ttt gaa gag gaa cta ttt ttg cgg tcg cta caa gat																	<b>840</b>
F R I V L M Y R F E E L F L R S L Q D																	
tac aaa tgt caa agt gtt tta ctc gta cct aca tta ttt tca ttc ttc gcc aaa agt act																	<b>900</b>
Y K C Q S V L L V P T L F S F F A K S T																	
ctt atc gat aaa tac gat cta tcc aac tta caa gaa att gcg tct ggt gga gcg cca ctt																	<b>960</b>
L I D K Y D L S N L Q E I A S G G A P L																	
tcg aaa gaa gtg gga gaa gct gta gca aaa aga ttt aac cta ccg gga ata cga caa gga																	<b>1020</b>
S K E V G E A V A K R F N L P G I R Q G																	
tac gga ctg aca gaa acg act tcg gct att ctg att aca ccc gag ggc gat gat aaa ccc																	<b>1080</b>
Y G L T E T T S A I L I T P E G D D K P																	
gga gca gtt gga aaa gtt gtg cca ttc ttt tgc gcc aag gtt gtc gat cta gat act gga																	<b>1140</b>
G A V G K V V P F F C A K V V D L D T G																	
aaa aca ttg ggt ata aat caa aga gga gaa tta tgt gtg aag ggt cct atg atc atg aag																	<b>1200</b>
K T L G A I N Q R G E L C V K G P M I M K																	
ggt tat vtg aac aac caa gaa gca aca gat gct ttg atc gac aag gac gga ttg ctg cac																	<b>1260</b>
G Y V N N Q E A T D A L I D K D G W L H																	
tct ggc gac ata gct tac cac gac aaa gat ggt cat ttc ttc ata gtt gac cgt ttg aaa																	<b>1320</b>
S G D I A Y H D K D G H F F I V D R L K																	
tcc ttg att aag tac aag ggt tac cag gta cca ccc gcc gaa tta gag tcg ata tta ttg																	<b>1380</b>
S L I K Y K G Y Q V P P A E L E S I L L																	
cag cat cct ttt atc ttc gat gca ggt gta gcg ggt ctt cca gat gac gaa gct ggt gaa																	<b>1440</b>
Q H P F I F D A G V A G L P D D E A G E																	
ctt ccc gga gcc gtt gtt gtg ttg gag aaa gga aaa aca atg aca gaa aaa gaa gta atg																	<b>1500</b>
L P G A V V V L E K G K T M T E K E V M																	
gat tat gtc gcg gga caa gta act gtt gct aag cgt cta cgc gga gga gtc ata ttt gtg																	<b>1560</b>
D Y V A G Q V T V A K R L R G G V I F V																	
gat gaa gta cct aaa ggt ctt act ggc aaa att gat gga aga aaa ata cga gaa att tta																	<b>1620</b>
D E V P K G L T G K I D G R K I R E I L																	
att aag gca aag aaa tcc aaa ttg taa																	<b>1647</b>
I K A K K <b>S K L</b> -																	

**Figura 17.** Sequência de cDNA e de aminoácidos da isoforma de luciferase AL1 da lanterna de *A. lineatum* (AMARAL *et al.*, 2017). Em destaque a sequência sinalizadora SKL.

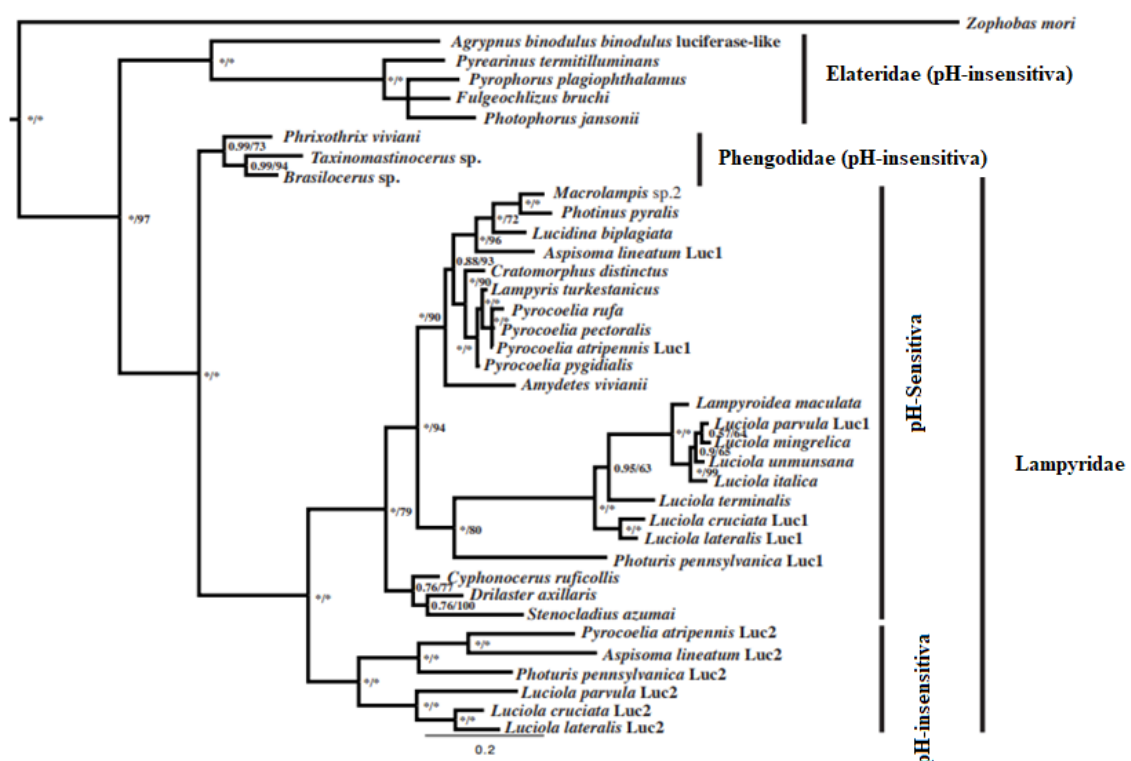


<b>Isoforma AL2</b>																			
atg gac gat aca aat att tta tat ggg cct aaa ccg ctt tat cca ata gaa gat gag aca	<b>60</b>																		
M D D T N I L Y G P K P L Y P I E D E T																			
gcg ggt gag cac atg ttt aaa gct cta aaa aaa tat gca caa att cca gat tgc ata gct	<b>120</b>																		
A G E H M F K A L K K Y A Q I P D C I A																			
cta acc gac gtc cat aca aaa gaa aat gta ctc tat aag gag ctc tta gaa tcg act tgc	<b>180</b>																		
L T D V H T K E N V L Y K E L L E S T C																			
caa tta gct cac gct ttt aaa aat tac gga ctt ggc att gac agc act att gcc gtt tgt	<b>240</b>																		
Q L A H A F K N Y G L G I D S T I A V C																			
agc gaa aac aac ttg cag ttt ttt gtg cct gta att gct tct cta tac att gcc aca acg	<b>300</b>																		
S E N N L Q F F V P V I A S L Y I G T T																			
gta gca tct gtt aat gga agt tat gct gaa cgt gaa cta ctg cac aac tta gat ata aca	<b>360</b>																		
V A S V N G S Y A E R E L L H N L D I T																			
aaa ccc act gta atc ttt tgt tcg aag gaa gcc ttt aaa aat att tca aaa gta agg cct	<b>420</b>																		
K P T V I F C S K E A F K N I S K V R P																			
aaa ata agt tac gta aaa gat gta gtt ata ata gat cac aat gat gat tgg gaa ggt tgt	<b>480</b>																		
K I S Y V K D V V I I D H N D D W E G C																			
cag tgc ctc aaa agt ttt att tca aaa tat agc gac cca aat ttt aag tca gaa agt ttt	<b>540</b>																		
Q C L K S F I S K Y S D P N F K S E S F																			
aag cca agc tct ttt gac tgc gat aag caa atc gca ttg gtg atg tat tca tca gcc aca	<b>600</b>																		
K P S S F D C D K Q I A L V M Y S S G T																			
acc ggt ttt tct aaa ggc gta atg gtt act cat aaa aac att gta gtg cga ttt tcc att	<b>660</b>																		
T G F S K G V M V T H K N I V V R F S I																			
tgc aag gac ccc act tat ggc aac caa atc aac cca aca aca gca att cta aca gtc ata	<b>720</b>																		
C K D P T Y G N Q I N P T T A I L T V I																			
cca ttt cag cat ggc ttt ggc atg ttt aca act tta gga tac ctg acg tgc gga ttt cgc	<b>780</b>																		
P F Q H G F G M F T T L G Y L T C G F R																			
gta gta ctc atg cgc tac ttt gac gaa gaa att ttt ttg agg tca ctt caa gac tat aaa	<b>840</b>																		
V V L M R Y F D E E I F L R S L Q D Y K																			
att tcc agc acg gtg ttg gtg ccc agc ctg atg tca ctg ttt gca aaa agc gct ctt gta	<b>900</b>																		
I S S T V L V P S L M S L F A K S A L V																			
gga aat tac gat cta tcc cac tta gaa gaa att gca tcc ggg gga gcg cct cta tca aag	<b>960</b>																		
G N Y D L S H L E E I A S G G A P L S K																			
gag att agc gaa att atc aaa aaa cga ttt aag ctg aac ttt gta agg caa ggg tac gga	<b>1020</b>																		
E I S E I I K K R F K L N F V R Q G Y G																			
tta acc gaa act aca tct gcc att tta att act ccc gag att ggc atc aag cct gga tcg	<b>1080</b>																		
L T E T T S A I L I T P E I G I K P G S																			
act ggt aaa att gtg cct ctg cac gct gta aaa gtg att gac cca aag act aaa gaa gtg	<b>1140</b>																		
T G K I V P L H A V K V I D P K T K E V																			
ttg ggt ccg cat caa gtt ggt gaa ctg tat ttt aaa ggc gac atg ata atg aaa ggt tat	<b>1200</b>																		
L G P H Q V G E L Y F K G D M I M K G Y																			
ttc gac aat cct aaa gaa act gat ggc att att gat tca gat gga tgg ttg cgg tcg ggc	<b>1260</b>																		
F D N P K E T D G I I D S D G W L R S G																			
gat ctt gct tat tat gat gaa gaa ggg cac ttt ttc att gta gac agg cta aaa tcg ctg	<b>1320</b>																		
D L A Y Y D E E G H F F I V D R L K S L																			
att aag tac aag gga cat caa att gca cct gct gaa att gaa gca gtg tta tta cag cac	<b>1380</b>																		
I K Y K G H Q I A P A E I E A V L L Q H																			
ccc tgg att att gac gcc ggt gta aca gga att caa gac agt aat gcc aat gaa gtt cca	<b>1440</b>																		
P W I I D A G V T G I Q D S N A N E V P																			
gcg gcc ggt gtt gtt tta aaa aag gga aaa tac ttg agt gaa gaa act gta aaa aac ttc	<b>1500</b>																		
A A G V V L K K G K Y L S E E T V K N F																			
gtt gca agt caa ctg tcc cca cca aaa tgg ttg cga gga ggt gtg acc ttt ttg gat gta	<b>1560</b>																		
V A S Q L S P P K W L R G G V T F L D V																			
att cca aaa ggt cct act gga aaa atc gat aca aaa gtt tta aaa gaa ata ctt tca aaa	<b>1620</b>																		
I P K G P T G K I D T K V L K E I L S K																			
cct aag tct aaa ctt tag	<b>1638</b>																		
P K <b>S K L</b> -																			

**Figura 18.** Sequência de cDNA e de aminoácidos da isoforma de luciferase AL2 do corpo gorduroso de *A. lineatum* (AMARAL *et al.*, 2017). Em destaque a sequência sinalizadora SKL.

## 5.2. Filogenia

A análise filogenética das sequências de aminoácidos das luciferases clonadas mostra a família Lampyridae como um grupo monofilético (**Figura 19**). A isoenzima *Aspisma lineatum* (AL1), que foi isolada das lanternas de um indivíduo adulto, foi agrupada como um grupo irmão da tribo Photinini (*Macrolampis* + *Photinus*) (AMARAL *et al.*, 2014) dentro da subfamília Lampyrinae. Surpreendentemente, embora o gênero *Aspisma* tenha sido originalmente classificado na tribo Cratomorphini junto com o gênero *Cratomorphus* (McDERMOTT, 1964), a relação esperada não foi encontrada na topologia das árvores. Nesta topologia, observamos quatro clados: I. luciferases de Lampyrinae (*Aspisma*, *Amydetes*, *Cratomorphus*, *Lucidina*, *Macrolampis*, *Photinus* e *Pyrocoelia*); II Luciolinae + Photurinae luciferases (*Lampyroidea*, *Luciola* e *Photuris*); III Cyphonocerinae + Otoretinae (*Cyphonocerus*, *Drilaster* e *Stenocladus*) luciferases e IV. Luciferases ancestrais do corpo gorduroso larval clonadas de espécies distintas de Lampyridae.

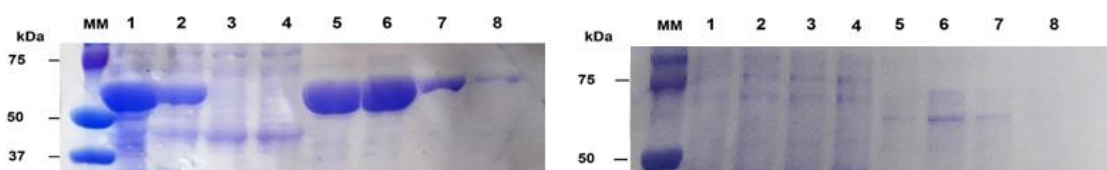


**Figura 19.** Filogenia molecular de luciferases de vagalumes usando abordagens bayesianas e de máxima verossimilhança. Os clados bem suportados com probabilidade maior que 1 e *bootstrap* de 100 foram marcados com asterisco \*.

Portanto, com base nas análises moleculares e bioquímicas realizadas aqui, e em estudos anteriores (OBA *et al.*, 2010; TONOLLI *et al.*, 2011; VIVIANI *et al.*, 2008<sup>C</sup>; BESSHO-UEHARA & OBA, 2017), distinguimos dois grupos principais na topologia das árvores das luciferases de vagalumes, um clado formado pelas luciferases clonadas das lanternas (adulto e larval) , que são sensíveis ao pH, e um segundo clado formado pelas isozimas clonadas do corpo gorduroso, que são insensíveis ao pH (AMARAL *et al.*, 2017).

### 5.3. Expressão em *E. coli* e purificação das luciferases

As luciferases recombinantes foram expressas em *E. coli* linhagem BL21 e purificadas por cromatografia em níquel-agarose. Ambas as luciferases têm um MW próximo a 60 kDa. No entanto, a enzima AL2 apresentou rendimentos de expressão e purificação muito mais altos. A concentração da luciferase AL2 do corpo gorduroso purificada foi de ~0,7 mg/mL, enquanto a concentração da AL1 da lanterna do adulto foi de apenas ~0,03 mg/mL (**Figura 20**).



**Figura 20.** Análise SDS-PAGE do processo de purificação da luciferase do corpo gorduroso da larva AL2 (à esquerda) e da lanterna do adulto AL1 (à direita). (**MM**) marcador de peso molecular, (1) extrato bruto, (2) lisado celular, (3) primeiro eluato, (4) lavagem e (4-8) amostras eluídas.

### 5.4. Caracterização cinética

A comparação das propriedades cinéticas da luciferase AL1 da lanterna do adulto e isoforma AL2 do corpo gorduroso mostrou que essas enzimas apresentam características bastante distintas.

#### 5.4.1. Atividade e atividades específicas

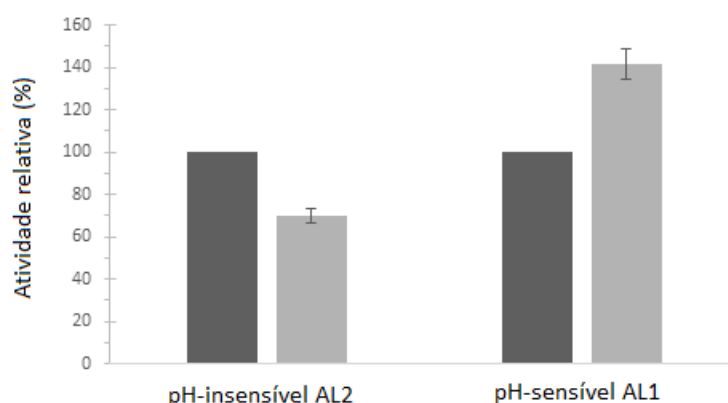
A atividade luminescente total, que reflete as duas etapas catalíticas da luciferase (adenilação e oxidação), foi medida iniciando-se a reação com

luciferina e ATP. A luciferase da lanterna (AL1) exibiu uma atividade específica de  $6,93 \times 10^{11}$  cps/mg, esse valor está um pouco abaixo do que observamos em outras luciferases de lampirídeos como *A. vivianii* e *P. pyralis*. No entanto, a atividade específica da AL1 ainda é cerca de 17 vezes maior do que a luciferase AL2 do corpo gorduroso ( $4 \times 10^{10}$  cps/mg) (**Tabela 8**).

#### 5.4.2. Atividade oxidativa

Também foi medida a atividade luminescente iniciando-se a reação com adenilato de luciferina (LH<sub>2</sub>-AMP), que reflete apenas a segunda etapa de oxidação da reação da reação bioluminescente de besouros, uma vez que o substrato LH<sub>2</sub>-AMP é o produto da primeira reação de adenilação.

A atividade luminescente de ambas enzimas na presença do adenilato de luciferina (LH<sub>2</sub>-AMP) foi consideravelmente diferente. A luciferase AL1 teve um aumento de aproximadamente 40% na atividade luminescente com LH<sub>2</sub>-AMP quando comparada atividade luminescente total iniciada com luciferina e ATP (Adenilação + Oxidação). Já a luciferase AL2 apresentou comportamento oposto, com uma queda de cerca de 30% na atividade luminescente com LH<sub>2</sub>-AMP em relação à reação iniciada com luciferina e ATP (**Figura 21, Tabela 8**).

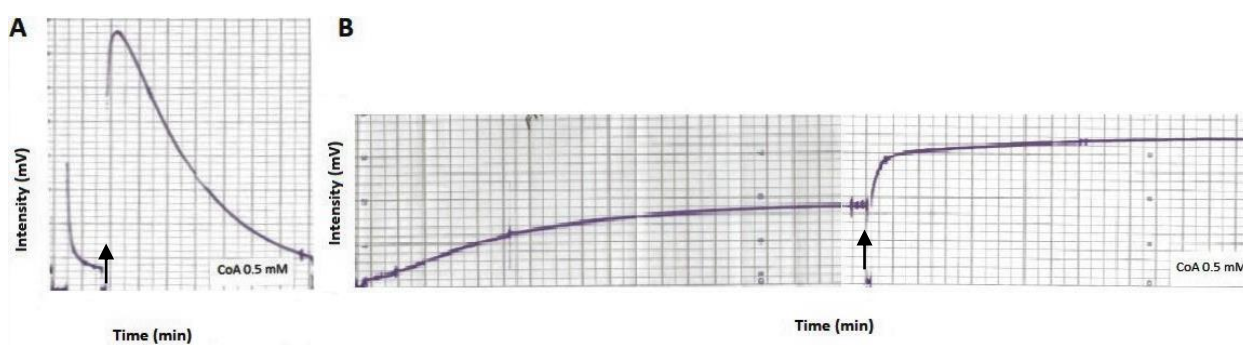


**Figura 21.** Atividade relativa de ambas luciferases de *A. lineatum* com adenilato de luciferina (cinza claro) e luciferina + ATP (cinza escuro).

### 5.4.3. Padrão cinético da reação bioluminescente

No ensaio padrão de atividade de luminescência com luciferina e ATP, a luciferase da lanterna AL1 exibiu uma cinética de luminescência extremamente rápida tipo *flash*, semelhante à de outras luciferases de vagalumes adultos publicadas na literatura, como *Photinus pyralis* (DeLUCA & McELROY, 1974), *Macrolampis sp2* (VIVIANI *et al.*, 2005) e *Amydetes vivianii* (PELENTIR *et al.*, 2019). Por outro lado, a luciferase do corpo gorduroso apresentou uma cinética muito mais lenta, levando aproximadamente 10 minutos para atingir o pico de intensidade e com um tempo de decaimento de várias horas à temperatura de 22°C (**Figura 22**).

A adição de coenzima-A durante à reação bioluminescente *in vitro* levou a um aumento na intensidade da bioluminescência para a isoforma AL1 e também diminuiu a taxa de decaimento da bioluminescência que, na ausência de CoA, decai mais rapidamente. No entanto, apesar de um ligeiro aumento da atividade, pouca diferença foi observada na cinética da luminescência da isoforma AL2 (**Figura 22**). Estes resultados seugerem que a influência do C-terminal e na ligação de CoA possam ser diferentes entre estas duas isoformas.



**Figura 22.** Comportamento cinético da reação bioluminescente das luciferases de *A. lineatum* em condições padrão (0,5 mM de luciferina; 4 mM de ATP; 85  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,1M pH8; ~ 1  $\mu$ g de enzima), sem Coenzima-A, e após adição de Coenzima-A na concentração final de 0,05 mM. As setas indicam o momento em que a Co-A foi adicionada à mistura reacional: (**A**) Luciferase AL 1 da lanterna do adulto; (**B**) Luciferase AL 2 do corpo gorduroso.

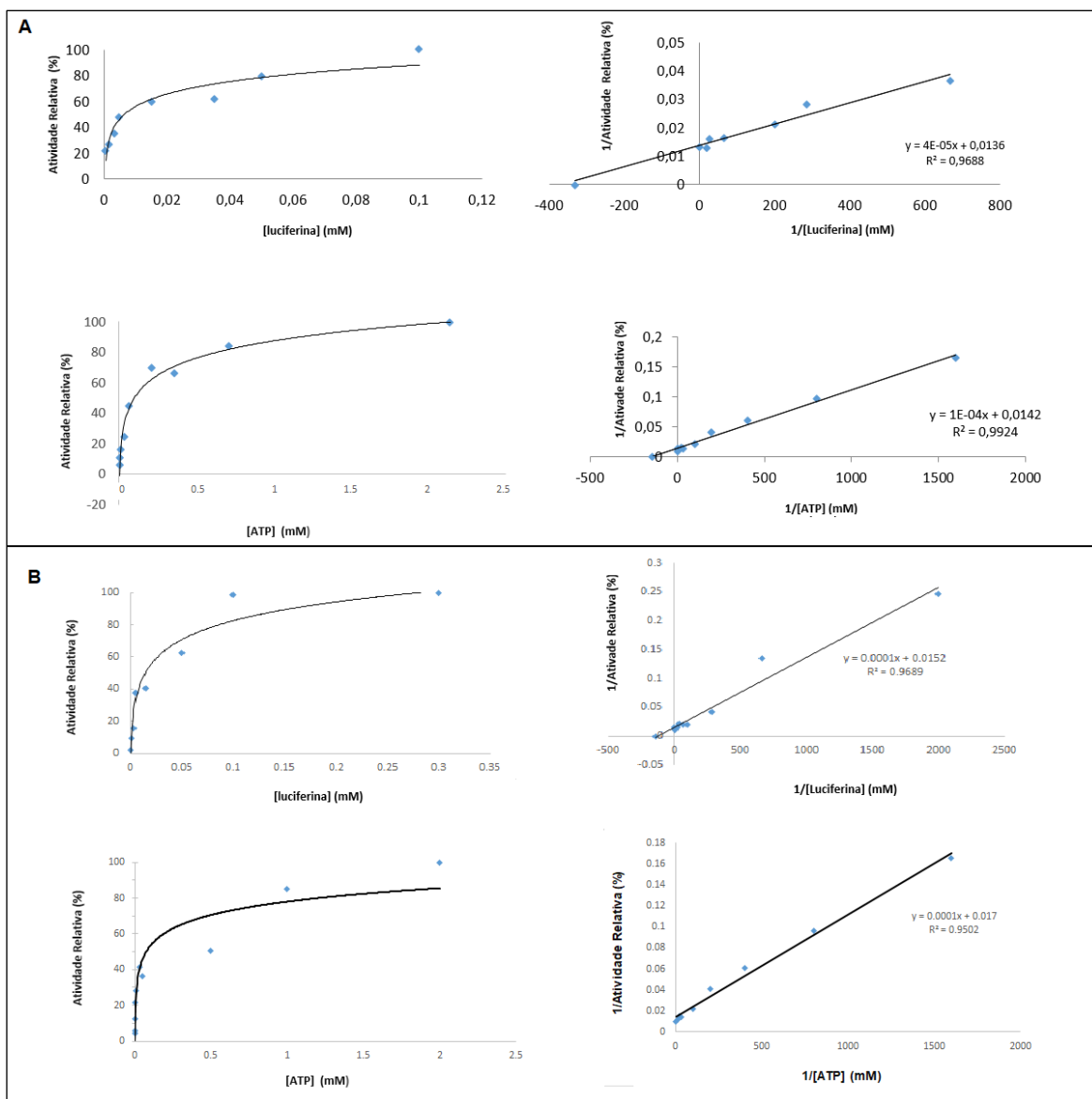
#### 5.4.4. Valores de $K_M$ para ATP e luciferina

Os valores de  $K_M$  para luciferina e ATP foram semelhantes para ambas enzimas (**Figura 23**). Para a luciferase pH-sensível AL1, os valores foram de 4  $\mu\text{M}$  e 7  $\mu\text{M}$  para ATP e luciferina, respectivamente. Para a isoforma AL2, os valores foram 7  $\mu\text{M}$  para ATP e 3  $\mu\text{M}$  para luciferina (**Tabela 8**). Esses valores de  $K_M$  são bastante baixos e são comparáveis com outras luciferases de lampírideos como *A. vivianii* por exemplo, que possui  $K_M$  de 9  $\mu\text{M}$  tanto para luciferina quanto para ATP (**Tabela 8**).

Os valores são um pouco inusitados no que se refere à AL2, já que ela apresenta baixa atividade e cinética bastante lenta. Entretanto, esses valores são comparáveis com os obtidos em estudos anteriores para isoformas de luciferases luc 2 clonadas de outras espécies de lampírideos (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Comparação entre propriedades físico-químicas das luciferases de *A. lineatum* e isoformas Luc 1 (lanterna) e Luc 2 (corpo gorduroso) de outras espécies de lampírideos já estudadas.

Luciferase	Nº de AA	MW	PI	$\lambda_{\text{max}}$ (nm) pH 8	$\lambda_{\text{max}}$ (nm) pH 6	$K_M$ LH <sub>2</sub> ( $\mu\text{M}$ )	$K_M$ ATP ( $\mu\text{M}$ )	Ref.
<i>A. lineatum</i> 1	548	60,45	6,06	573	605	7	4	-
<i>L. cruciata</i> 1	548	59,9	6,74	554	589	14,3	106	Oba, et al., 2010.
<i>L. parvula</i> 1	548	60,35	6,4	559	600	18	428	Bessho-Uehara & Oba, 2017.
<i>L. lateralis</i> 1	548	60,09	6,5	550	597	78,9	220	Oba, et al., 2013.
<i>A. lineatum</i> 2	545	60,49	6,89	561	561	3	7	-
<i>L. cruciata</i> 2	544	59,94	8,39	543	543	0,81	21,5	Oba, et al., 2010
<i>L. parvula</i> 2	544	60,07	7,97	538	538	2,44	123	Bessho-Uehara & Oba, 2017.
<i>L. lateralis</i> 2	544	60,2	8,74	539	540	32,2	32,3	Oba, et al., 2013.



**Figura 23.** Curvas de saturação e gráficos duplo-recíproco para obtenção dos valores de  $K_M$  para ATP e Luciferina. (A) Luciferase AL2; (B) Luciferase AL1.

#### 5.4.5. Constantes catalíticas

Por definição, a constante catalítica é ao número de moléculas de substrato que uma enzima consegue converter em produto por unidade de tempo. Os valores de  $k_{cat}$  aqui apresentados são considerados relativos, uma vez que se referem à atividade luminescente em *cps*, e não ao número absoluto da intensidade de luz em fótons por segundo (que corresponderia a um número de moléculas de luciferina oxidadas por segundo dividido pelo valor do rendimento quântico). Como esperado pela comparação das atividades

específicas, a constante catalítica ( $k_{cat}$ ) da AL1 também foi ~10 vezes maior quando comparada com a isoenzima do corpo gorduroso AL2. A constante catalítica utilizando-se o substrato adenilato de luciferina, que reflete a constante oxidativa ( $k_{ox}$ ), teve uma diferença ainda mais expressiva entre as isoenzimas, sendo cerca de 37 vezes maior para a AL1 quando comparada com AL2 (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Comparação das propriedades cinéticas das isoenzimas de *A. lineatum* e outras luciferases de besouros.

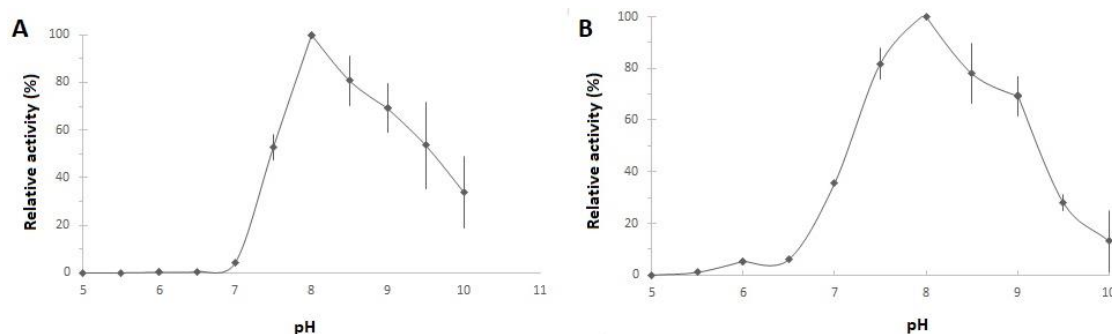
	* $\lambda_{max}$ (nm) <sup>a</sup> [Meia-Banda]	$K_M$ ( $\mu M$ )		Atividade específica*	Atividade oxidativa**	$k_{cat}$ ( $10^{-6} s^{-1}$ )	$k_{ox}$ ( $10^{-6} s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $\mu M^{-1} S^{-1}$ )		$k_{ox}/K_M$ ( $\mu M^{-1} S^{-1}$ )	
		ATP	LH <sub>2</sub>	(10 <sup>9</sup> cps/mg) [Atividade relativa]				ATP	LH <sub>2</sub>	ATP	LH <sub>2</sub>
<b>Lampyridae</b>											
<i>Amydetes vivianii</i>	547[81]	9	9	890	730	109	81	12.1	12,1	9	9
<i>Macrolampis sp2</i>	575[86]	83	20	1198	1008	125	106	1.5	6,25	1.3	5,3
<i>Photinus pyralis</i>	567[81]	250	5	1037	910	116	102	0.46	23	0.4	20,5
<i>Aspisoma lineatum</i> AL1	573[88]	4	7	693	1766	69	177	11	9,8	44	25
<i>Aspisoma lineatum</i> AL2	561[88]	7	3	40	39	6	4.7	0.85	2	0,67	1,5
<b>Elateridae</b>											
<i>Pyrearinus termitilluminans</i>	546[87]	370	80	290	55	29	56	0.78	3,625	0,15	0,7
<b>Phengodidae</b>											
<i>Phrixotrix hirtus</i>	626[82]	230	7	70	65	8.3	7.8	0.04	1,2	0.034	1,11
<i>Phrixotrix vivianii</i>	558[89]	330	64	37.9	33	3.79	3.12	0.011	0.059	0.009	0,048



As eficiências catalíticas (razão entre os valores de  $k_{cat}$  e  $K_M$ ), foram cerca de 10 vezes maiores para a luciferase da lanterna AL1 do que para a luciferase do corpo gorduroso AL2, tanto para o substrato luciferina quanto para o ATP. Esses resultados indicam claramente que a isoforma da lanterna AL1 é uma oxigenase mais eficiente do que a sua isoforma AL2, e portanto uma luciferase mais brilhante.

#### 5.4.6. pH-ótimo

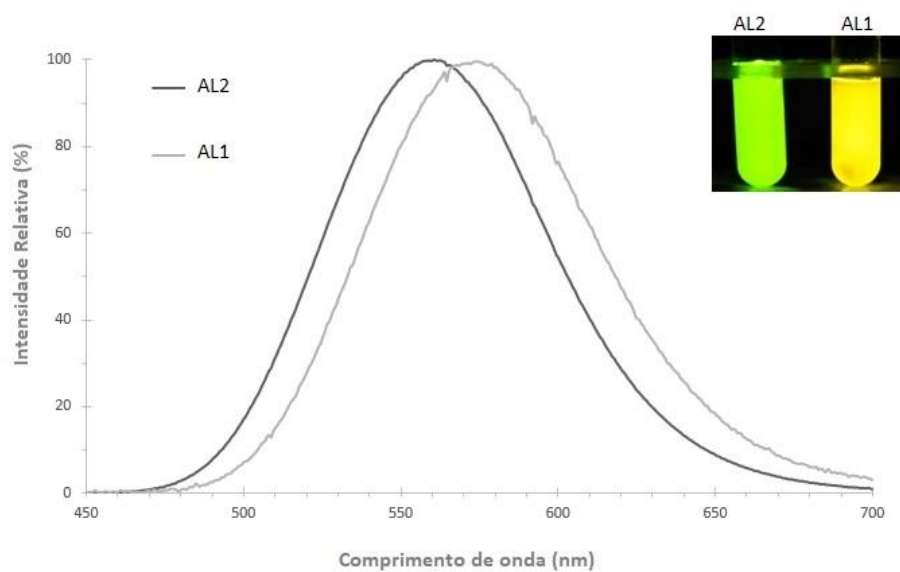
Com relação ao pH ótimo, ambas as enzimas tiveram o pico de atividade em com o valor de pH próximo de 8. Entretanto, a luciferase do corpo gorduroso AL2 apresenta atividade um pouco maior em pHs acima de 8 quando comparada com a isoforma AL1 (**Figura 24**).



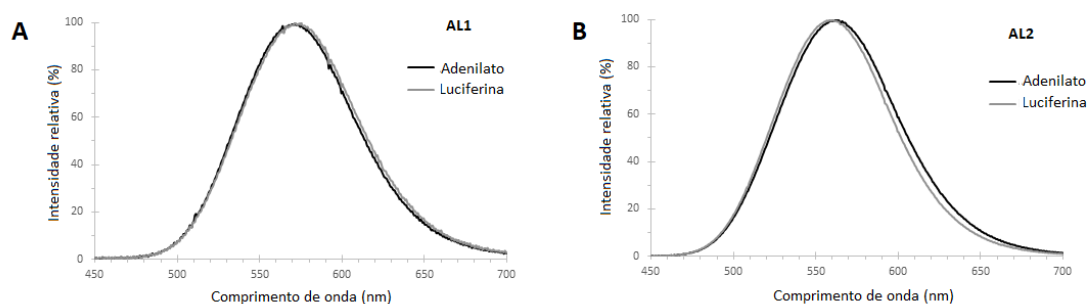
**Figura 24.** Curvas de pH ótimo das luciferases de *A. lineatum*: (A) luciferase do corpo gorduroso da larva AL2 e (B) Luciferase da lanterna do adulto AL1.

#### 5.5. Espectros de bioluminescência

A luciferase AL1 da lanterna adulta emite luz na região do amarelo com um pico de emissão a 573 nm em pH 8,0 enquanto a isoforma AL2 do corpo gorduroso produz luz verde-amarela com pico em 561 nm (**Figura 25**). Os espectros de bioluminescência usando adenilato de luciferina (LH<sub>2</sub>-AMP) foram idênticos aos respectivos espectros obtido com luciferina e ATP (**Figura 26**).



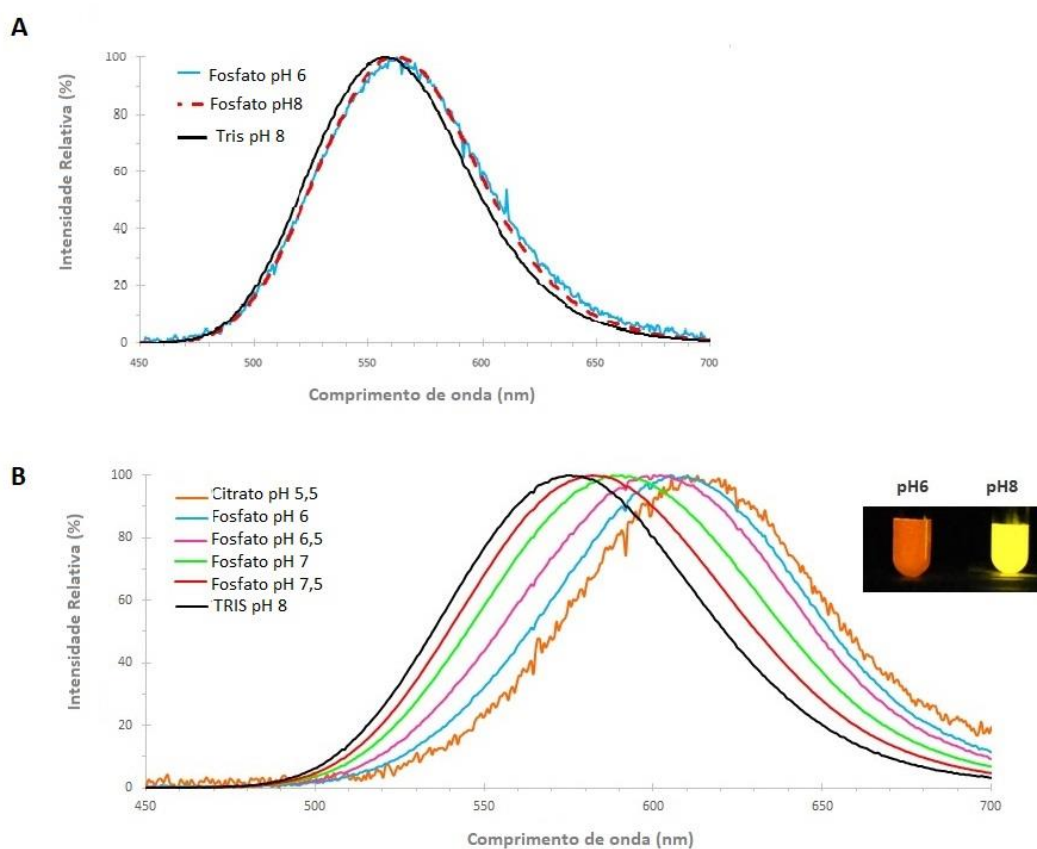
**Figura 25.** Comparação entre os espectros de emissão das luciferases de lanterna (AL1) e do corpo gorduroso (AL2) de *A. lineatum*: (Cinza claro) AL1, (Cinza escuro) AL2.



**Figura 26.** Comparação entre os espectros de bioluminescência das reações iniciadas com luciferina e ATP (cinza) ou com LH<sub>2</sub>-AMP (preto): (A) Isoforma AL1 e (B) Isoforma AL2.

### 5.5.1. Sensibilidade espectral ao pH

O espectro de bioluminescência da isoenzima do corpo gorduroso AL2 se mostrou insensível ao pH (**Figura 27A**). A luciferase da lanterna AL1 apresentou sensibilidade ao pH, deslocando o espectro para a região do vermelho com pico em 605 nm em pH 6,0 (**Figura 27B**). Os valores exatos dos picos de emissão e meia banda dessa enzima em diferentes valores de pH são apresentados na **Tabela 9**.



**Figura 27.** Espectros de bioluminescência em diferentes pHs das isoformas de luciferase do vagalume *A. lineatum*. (A) AL2, (B) AL1.

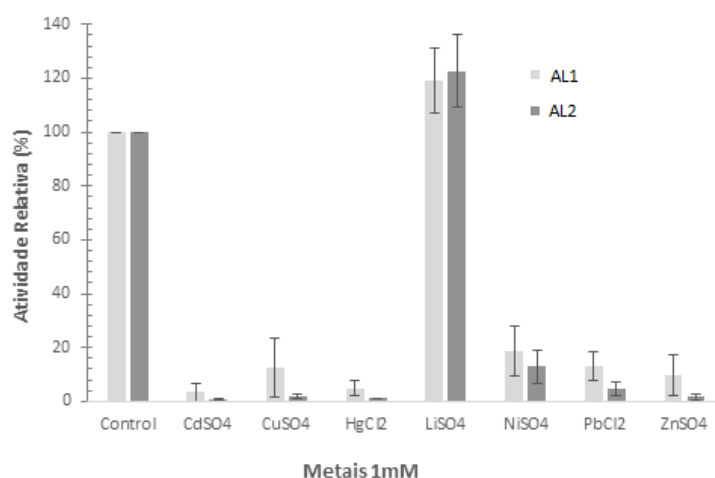
**Tabela 9.** Valores dos picos de emissão e meia-banda dos espectros de bioluminescência da luciferases de *A. lineatum* em diferentes valores de pH.

Tampão	AL1 * $\lambda_{\max}$ [meia-banda] (nm)	AL2 * $\lambda_{\max}$ [meia-banda] (nm)
Citrato pH 5,5	610 [88]	-
Fosfato pH 6	605 [94]	564[88]
Fosfato pH 6,5	600 [94]	-
Fosfato pH 7	591 [96]	-
Fosfato pH 7,5	582 [92]	-
Tris-HCl pH 8	575 [88]	561[88]

\*Erro estimado de pico  $\pm 2,5$  nm

### 5.6. Sensibilidade à metais

Metais pesados como zinco, cádmio e mercúrio, sabidamente tem efeitos inibitórios na atividade luminescente e na sensibilidade espectral da bioluminescência em luciferases de vagalumes. Como esperado, os metais cobre, zinco, cádmio, mercúrio, chumbo, zinco e níquel tiveram um efeito inibitório considerável na atividade luminescente *in vitro* de ambas as isozimas. No entanto, esse efeito inibitório é um pouco mais pronunciado na luciferase pH-insensível AL2. Apenas o lítio não inibiu a atividade da bioluminescente das luciferases (**Figura 28**).



**Figura 28.** Efeito de metais na concentração de 1 mM na a atividade luminescente das luciferases de *A. lineatum*: (Cinza claro) AL1 pH sensível; (Cinza escuro) AL2 pH insensível.

### 5.6.1. Efeito dos metais nos espectros de bioluminescência

Como esperado, os espectros de emissão da enzima pH-sensível da lanterna AL1 também sofreram efeitos consideráveis na presença dos metais mais tóxicos. Houve uma mudança no pico de emissão de 573 nm para 593 nm na presença de cádmio e para 597 nm na presença de mercúrio. Ambos o zinco e o chumbo desviaram o pico de emissão para 583 nm. Cobre, lítio e níquel não tiveram efeitos consideráveis (**Figura 29**).

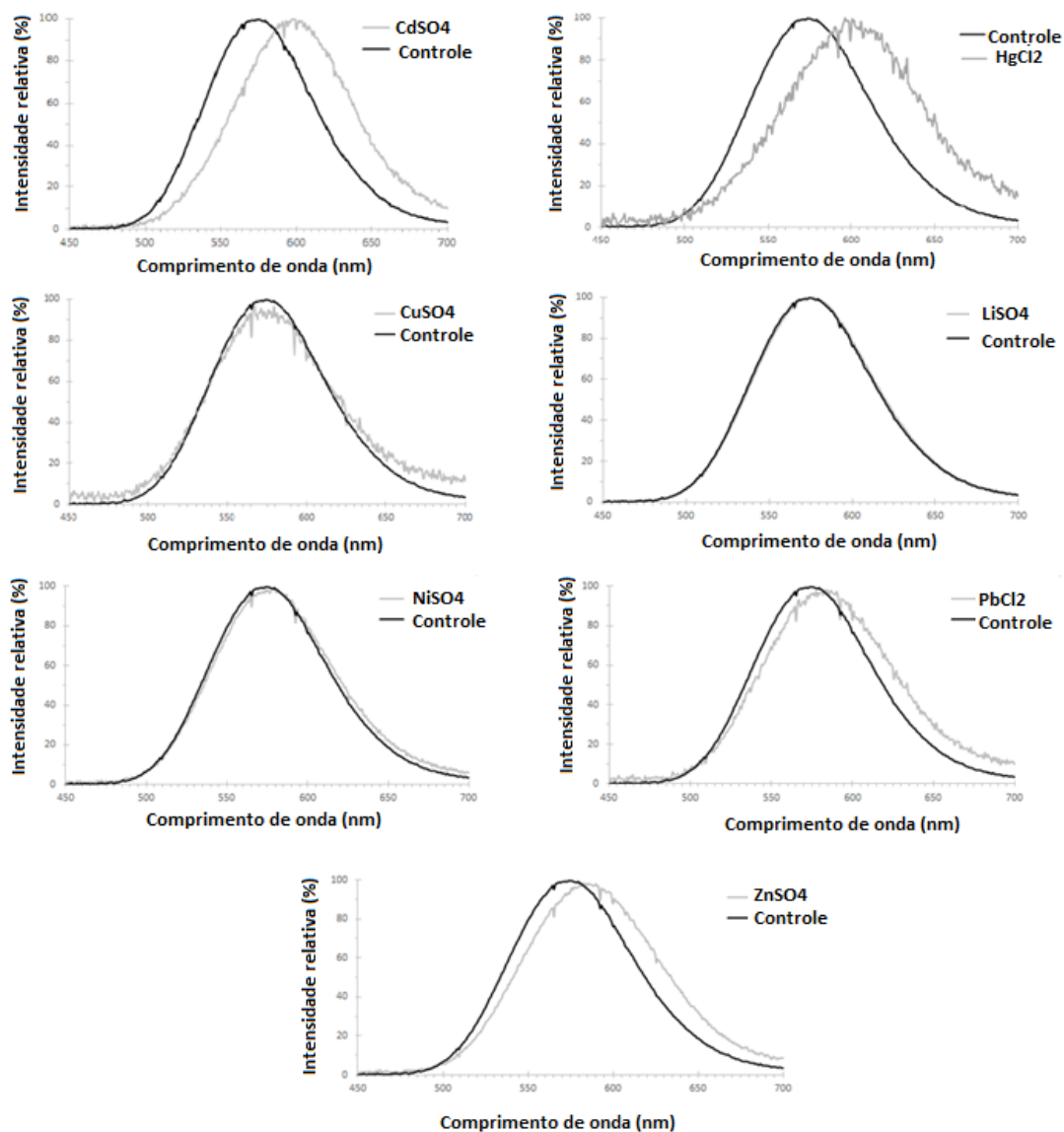
Notavelmente, a luciferase do corpo gorduroso AL2 também apresentou um pouco de sensibilidade espectral na presença de metais apesar de ser insensível ao pH. Na presença de cádmio e mercúrio, o pico de emissão teve um desvio batocrômico de 10 nm. O chumbo causou um desvio de apenas 6 nm no pico, no entanto é possível observar um efeito considerável na largura da meia-banda. O zinco também teve um modesto efeito de 6 nm sem afetar a meia-banda da mesma maneira que o chumbo.

Assim como a AL1, a AL2 também se mostrou insensível na presença de cobre, lítio e níquel (**Figura 30**). Todos os valores de picos de emissão e meia-banda de ambas as enzimas na presença de metais são apresentados na **Tabela 10**.

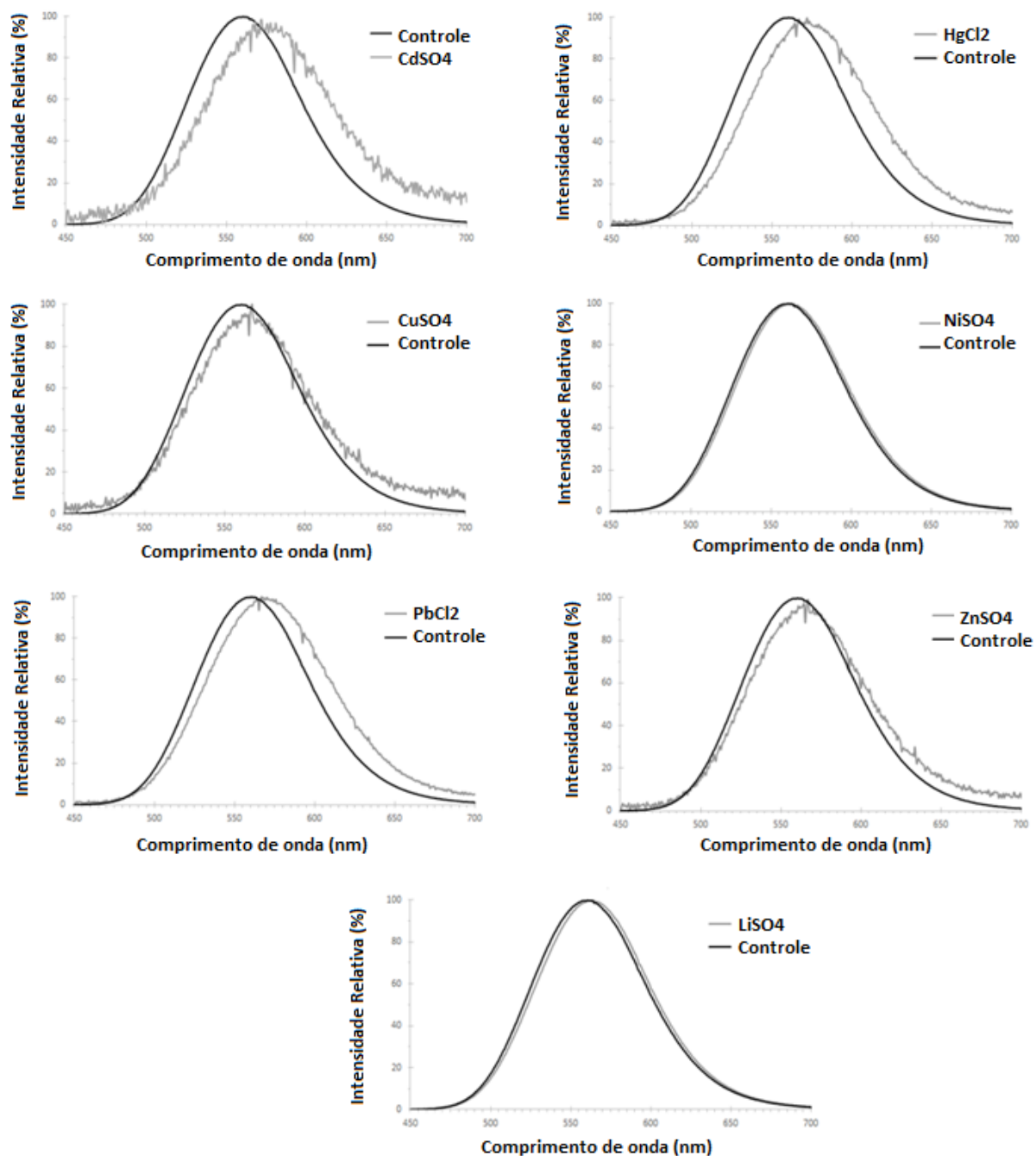
**Tabela 10.** Valores dos picos de emissão em meia-banda das luciferases pH-sensível e pH-insensível de *A. lineatum* na presença de metais na concentração final de 1 mM.

Metais	AL1 * $\lambda_{\max}$	AL2 * $\lambda_{\max}$
	[meia-banda] (nm)	[meia-banda] (nm)
Controle	573[88]	561[88]
CdSO <sub>4</sub>	593[94]	571[96]
CuSO <sub>4</sub>	568[90]	566[88]
HgCl <sub>2</sub>	597[106]	571[96]
LiSO <sub>4</sub>	574[88]	562[90]
NiSO <sub>4</sub>	577[90]	561[86]
PbCl <sub>2</sub>	583[98]	566[100]
ZnSO <sub>4</sub>	583[96]	566[90]

\*Erro estimado de pico  $\pm$  2,5 nm



**Figura 29.** Efeito da presença de metais na concentração de 1 mM nos espectros de bioluminescência da luciferase pH-sensível AL1 da lanterna de *A. lineatum*.

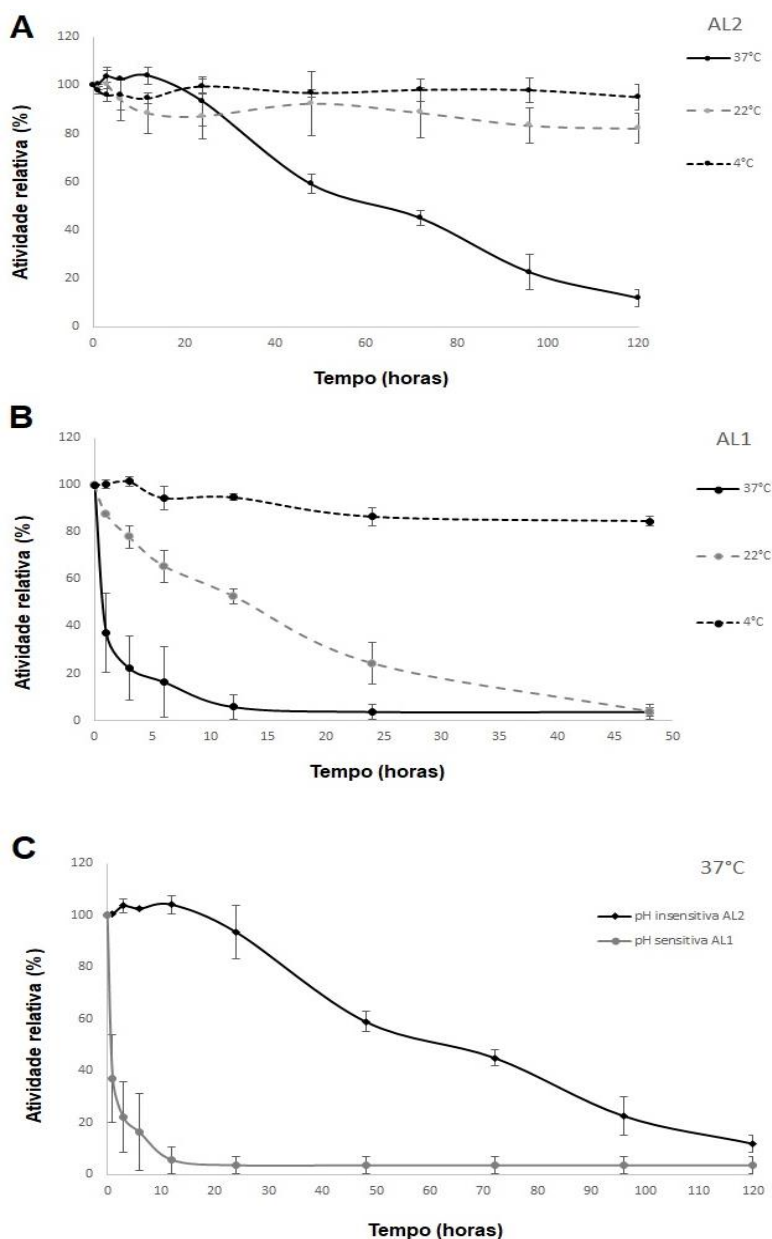


**Figura 30.** Efeito da presença de metais na concentração de 1 mM no o espectro de bioluminescência da luciferase pH-insensível AL2 do corpo gorduroso de *A. lineatum*.

### 5.7. Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica de ambas as enzimas foi comparada à 4° C, 22° C e 37° C. A luciferase pH-sensível AL1 apresentou meia-vida de 12 horas à 22°

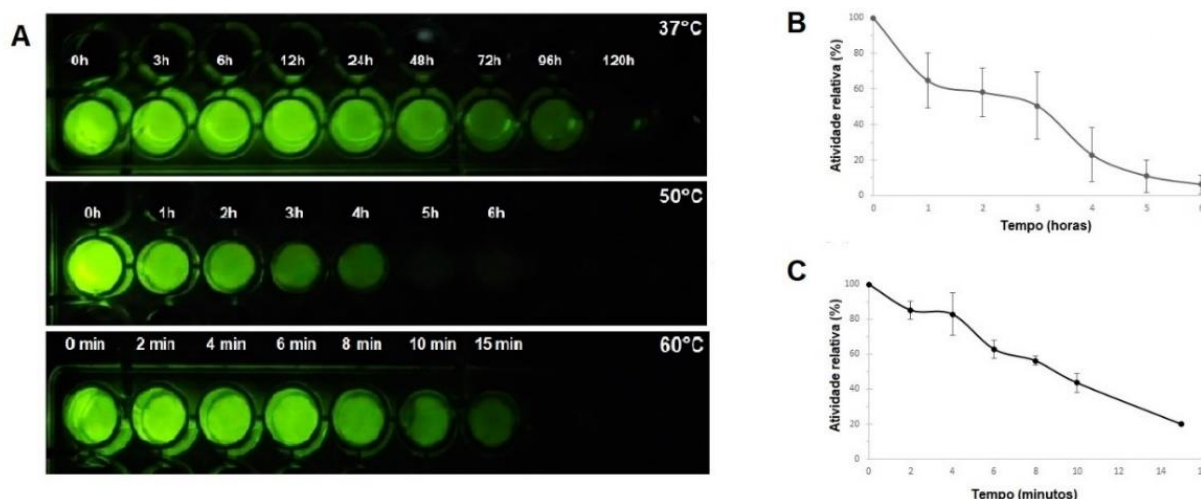
C e inferior a 1 hora quando incubada a 37°C (**Figura 31B**). Em contrapartida, a luciferase pH-insensível AL2 se mostrou muito mais estável, com uma meia vida de 48 horas à 37°C. Ao final das 120 horas do experimento, a amostra incubada à 37°C mostrou uma atividade remanescente de 10% (**Figura 31A**). Uma comparação entre a estabilidade térmica de ambas as luciferases à 37°C pode ser vista na **Figura 31C**.



**Figura 31.** Estabilidade térmica das isoformas AL1 e AL2 a 4° C, 22° C e 37° C. **(A)** Luciferase AL2. O tempo de ensaio para essa enzima foi de 0-120 horas; **(B)** Luciferase AL1. O tempo de ensaio para essa enzima foi de 0-48 horas; **(C)** Comparação da estabilidade térmica de ambas as luciferases a 37° C.



Devido à sua maior termoestabilidade à 37° C, também analisamos a estabilidade da luciferase pH-insensível AL2 em temperaturas mais elevadas. As meias-vidas à 50° C e 60° C foram de aproximadamente 3 horas e 10 minutos, respectivamente (**Figura 32 A-C**).



**Figura 32.** Termoestabilidade da luciferase pH-insensível AL2 de *A. lineatum*: **(A)** Imagem da bioluminescência *in vitro* da AL2 incubada à 37°C (0-120 horas), 50°C (0-6 horas) e 60°C (0-15 minutos); **(B)** Medida luminométrica da estabilidade térmica à 50°C; **(C)** Medida luminométrica da estabilidade térmica à 60°C.

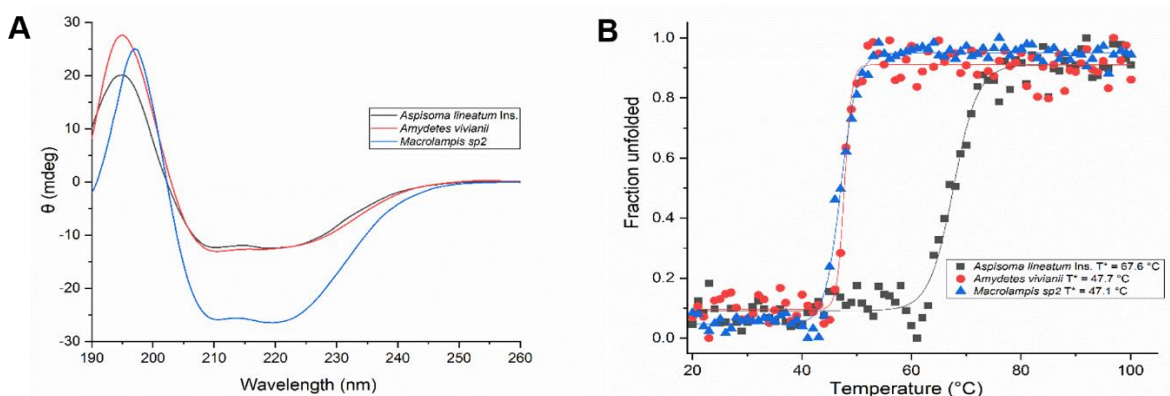
### 5.7.1. Espectros de dicroísmo circular (CD)

Com o intuito de entendermos melhor a estabilidade térmica e sensibilidade espectral, analisamos mudanças estruturais e dinâmicas da luciferase em diferentes pHs, através da medida de espectros de dicroísmo circular (CD), que refletem o dobramento da proteína e seu conteúdo relativo de estruturas secundárias. Comparamos os espectros destas isozimas com as luciferases dos lampírideos *A. vivianii* e *Macrolampis* sp2.

A composição da estrutura secundária (**Tabela 11**), calculada a partir dos espectros de CD das luciferases (**Figura 33A**), mostrou que ambas as luciferases pH-insensível de *A. lineatum* AL2 e pH-sensível de *Amydetes vivianii*,

que exibe menor grau de sensibilidade ao pH, exibem um menor conteúdo de  $\alpha$ -hélices (16% e 28%, respectivamente) quando comparadas à luciferase pH-sensível do vagalume *Macrolampis sp2* (35%). Por outro lado, o conteúdo de folhas  $\beta$  é maior na luciferase pH-insensível de *A. lineatum* AL2 (30%).

O espectro de CD e o conteúdo de estruturas secundárias podem ser correlacionados com a Temperatura média de fusão ( $T_m$ ), que reflete o efeito da temperatura na fração desnaturada da proteína (**Figura 33B**). Os resultados mostram que a enzima pH-insensível AL2 de *A. lineatum* apresenta uma  $T_m$  20° C maior do que todas as outras luciferases testadas.



**Figura 33.** Espectro de dicroísmo circular e efeito da temperatura no desdobraimento proteico. **(A)** Espectros de CD. O espectro UV-distante foi obtido em 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 120 mM NaCl, pH 7.5 usando um caminho óptico de 1 mm. **(B)** Desenovelamento térmico de 3.5  $\mu\text{M}$  de luciferases. Foi monitorado pela mudança no sinal do CD à 222 nm em resposta ao aquecimento. A temperatura foi elevada de 20 a 100°C na escala de 1°C/min. A fração desenovelada da proteína e os valores de  $T_m$  ( $T^*$ ) foram calculados usando OriginLab, função Boltzmann, curva sigmoidal.

**Tabela 11.** Análise da dinâmica estrutural das luciferases com base nos dados de CD da figura 33.

Luciferase	Fração de cada estrutura secundária				NRMSD	método	Conjunto elementos
	$\alpha$ -Hélice (%)	Folhas $\beta$ (%)	Volta s (%)	Desordenada (%)			
<i>Aspisoma lineatum</i> AL2.	16	30	26	28	0.033	CDSSTR	4
<i>Amydetes vivianii</i>	28	26	22	24	0.023	CDSSTR	4
<i>Macrolampis sp2</i>	35	25	19	22	0.007	CDSSTR	4

### 5.8. Evolução molecular da sensibilidade ao pH

Com a intenção de identificar os resíduos que possivelmente estão envolvidos com as diferentes propriedades cinéticas e sensibilidade ao pH, foi feito o multialinhamento de sequências das duas novas enzimas AL1 e AL2 de *A. lineatum*, das luciferases 1 e 2 de *L. cruciata* já reportadas anteriormente (OBA *et al.*, 2010), e outras luciferases pH-sensitivas e pH-insensitivas.

Entre todas as substituições encontradas, destacamos o resíduo 310. Recentemente, o sítio responsável pela ligação de metais e sensibilidade ao pH foi identificado (VIVIANI *et al.*, 2018<sup>B</sup>). Foi demonstrado que ele envolve essencialmente as cadeias laterais dos resíduos H310, E311 e E354 (VIVIANI *et al.* 2018<sup>B</sup>). Na maioria das luciferases de vagalumes pH-sensitivas, a histidina 310 é conservada. No entanto, o alinhamento (**Figura 34**) mostra que em *Luciola* spp essa posição pode ter valina ou treonina. Na luciferase AL1 este resíduo é substituído por glutamina (Q310) e na AL2 por glutamato (E310), que possuem características básicas e eletrostáticas bastante distintas.

```

PTE  KSPLVDKYDLSTLAEELCCGAAPLAKAEVAEIAVKRNLNPGIRCGYGLTESTSANIHTLHN- 352
ROL  KSPLVDQYDLSLIREVATGGAPVGTAVAVAVAKRLLKIGGILQGYGLTETCCAVLITPHD- 352
PVGR  KSPLVDQYDLSLREVATGGAPLGDVAEAVAKRLLKPGIIRQGYGLTETCCAVMITPHN- 352
PHRE  KSPLVDEYNLSSLTEIACGGSPLRDIADKVAKRLLKVHGIIRQGYGLTETCSALILSPNDR 353

ALI2  KSALVGNKYDLSHLLEIASGGAPLSKEIIEIKKRFKLNFRVQGYGLTETTSAILITPEI- 354
LCR2  KSSLVDKYVHLPNLQEIASGGAPLSKEIIEAVARRFKLKSIRQGYGLTETTSAILITPEG- 353

HPA  KSELIDKFDLSNLTEIASGGAPLAKEVGEAVARRFNLPGVRQGYGLTETTSAFIITPEG- 357
LCR1  KSELLNKYDLSNLVEIASGGAPLSKEVGEAVARRFNLPGVRQGYGLTETTSAIITPEG- 357
LLA  RSELLDKYDLSNLVEIASGGAPLSKEIIEAVARRFNLPGVRQGYGLTETTSAIITPEG- 357
PPE  KNPLVDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEIIEIAAKRFKLPGIRQGYGLTETTCIVITAEI- 354
MAC  KSTLIDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAILITPNG- 355
PPY  KSTLIDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAILITPEG- 355
ALI1  KSTLIDKYDLSNLQEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFNLPGIRQGYGLTETTSAILITPEG- 356
AMY  KSTLVDKYDLSNLHEIASGGAPLAKEVGEAVAKRFNLVGIIRQGYGLTETTSACIITPEG- 355
CRT  KSTLVDKYDLSNLHEIASGGAPLAKEVGEAVAKRFKLPGIRQGYGLTETTSAIITPEG- 355
LNO  KSTLVDKYDLSNLHEIASGGAPLAKEVGEAVAKRFKLPGIRQGYGLTETTSAIITPEG- 355
PMY  KSTLVDKYDLSNLHEIASGGAPLAKEVGEAVAKRFKLPGIRQGYGLTETTSAIITPEG- 356

```

**Figura 34.** Multialinhamento das sequências das luciferases de *A. lineatum* (ALI1 e ALI2) com outras luciferases. **(pH-sensitivas):** *L. cruciata* (LCR1 e LCR2), *Macrolampis* sp2 (MAC), *C. distinctus* (CRT), *A. vivianii* (AMY), *P. pyralis* (PPY), *P. pennsylvanica* (PPE), *L. lateralis* (LLA), *H. parvula* (HPA), *L. noctiluca* (LNO). **(pH-insensitivas):** *P. termitilluminans* (PTE), *P. vivianii* (PVGR) e *P. hirtus* (PHRE). Em destaque os resíduos do sensor de pH.

Além disso, existem diferenças interessantes na região do *loop* 352-361 que é crucial na sensibilidade ao pH (WOOD, 1995; VIVIANI *et al.*, 2005; 2018b; GABRIEL & VIVIANI, 2016) (**Figura 35**).

```

Macrolampis sp2
Cratomorphus distinctus
Aspisma lineatum Luc 1
Luciola cruciata Luc 1
Luciola lateralis Luc 1
Luciola parvula Luc 1
Pyrocoelia atripennis Luc 1
Pyrearinus termitilluminans
Aspisma lineatum Luc 2
Luciola cruciata Luc 2
Luciola parvula Luc 2
Pyrocoelia atripennis Luc 2
Luciola lateralis Luc 2

```

```

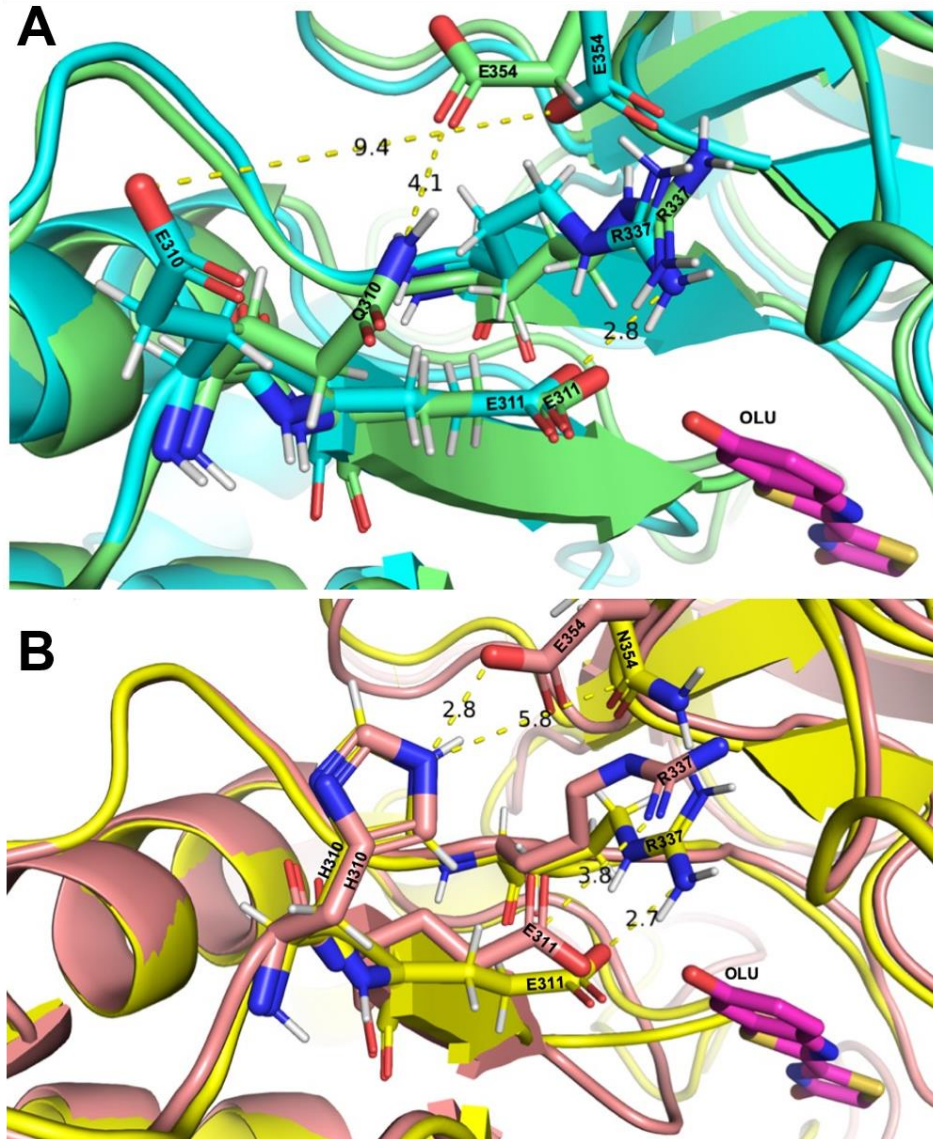
          340      350      360      370
AKRFHLPGIRQGYGLTETTSAILITPNG-DDKPGA'VGK'
AKRFKLPGIRQGYGLTETTSAIITPEG-DDKPGA'CGK'
AKRFNLPGIRQGYGLTETTSAILITPEG-DDKPGA'VGK'
ARRFNLPGVRQGYGLTETTSAIITPEG-DDKPGA'SGK'
ARRFNLPGVRQGYGLTETTSAIITPEG-DDKPGA'SGK'
ARRFNLPGVRQGYGLTETTSAFIITPEG-DDKPGA'SGK'
AKRFKLPGIRQGYGLTETTSAIITPEG-DDKPGA'CGK'
VKRNLNLPGIRCGYGLTESTSANIHTLHN-EFKSG'SLGK'
KKRFKLNFRVQGYGLTETTSAILITPEI-GIKPG'STGK'
ARRFKLKSIRQGYGLTETTSAILITPEI-EIVPG'STGK'
SQRFKLKKARQGYGLTETTSAILITPEG-EEVSG'STGK'
RKRFTLDFVRQGYGLTETTSAILITPDT-DVRAG'STGK'
ALRFKLSIRQGYGLTETTSAILITPEG-EIVPG'STGK'

```

**Figura 35.** Alinhamento entre sequências de luciferases pH-sensitivas, luciferase pH-insensitiva de *P. termitilluminans* e luciferases pH-insensitivas basais de outros lampirídeos. Em destaque as posições que apresentam substituições de resíduos do *loop* 352-361 entre enzimas sensíveis e insensíveis.

A modelagem do sítio ativo das luciferases de *A. lineatum* (**Figura 36**), mostrou que a substituição de resíduos que compõem o sensor de pH alteram significativamente a distância e interação entre eles. Na AL2 (pH-insensível) a substituição H310E faz com que o resíduo E310 fique à uma distância de aproximadamente 9,4 Å do E354 (**Figura 36A**). Em luciferases pH-sensíveis, esses dois resíduos (H310 e E354) formam potencialmente uma ponte salina no sensor de pH. Já na luciferase pH sensível de *A. vivianii*, a distância entre H310 e E354 é de apenas 2,8 Å, compatível com a formação de uma ponte salina. (**Figura 36B**).

Na isoforma AL1, o resíduo Q310 fica a uma distância aproximada de 4,1 Å do E354. (**Figura 36A**). Embora esse valor também seja um pouco maior do que o observado em *A. vivianii*, ele é próximo ao que observamos no modelo da luciferase de *Macrolampis* sp2 (~5,1 Å) que possui a substituição natural E354N (**Figura 36B**). Vale ressaltar que os modelos simulam os efeitos das substituições dos resíduos do sensor e os valores de distância entre os aminoácidos são uma apenas uma estimativa já que o comportamento real das enzimas em solução pode variar



**Figura 36.** Modelagem do sítio ativo das luciferases de *A. lineatum* evidenciando os resíduos do sensor de pH das luciferases de lampírideos: **(A)** Sobreposição dos modelos da AL1 (em verde) que tem a substituição H310Q e da AL2 (em azul) que tem a substituição H310E. **(B)** Modelos das luciferases de *A. viviani* (em rosé) e *Macrolampis* sp2 (em amarelo) para comparação.

## 6. DISCUSSÃO

Como se deu a origem da bioluminescência e das luciferases em besouros é um assunto que ainda permanece um grande mistério. Atualmente, acredita-se que as luciferases se originaram à partir de protoluciferases, CoA-ligases com a capacidade de emitir fraca luminescência na presença de luciferina e ATP, provavelmente semelhantes à aquelas encontradas hoje em dia em larvas de tenebrionideos (VIVIANI & BECHARA, 1995; VIVIANI *et al.*, 2009; 2013) (**Figura 12, vide pág. 38**).

É provável que a evolução da bioluminescência se deu em etapas. Em um primeiro momento do curso evolutivo, é possível que uma CoA-ligase generalista ancestral tenha sofrido um evento de duplicação gerando genes parálogos. As luciferases mais basais provavelmente surgiram à partir da neofuncionalização de uma cópia do gene duplicado mediante o aparecimento da D-luciferina, um substrato potencialmente oxidável que não poderia ser tioesterificado com CoA no sítio-ativo da enzima por impedimento estérico (VIVIANI *et al.*, 2013; OBA *et al.*, 2017).

Nesse momento do curso evolutivo, as protoluciferases deveriam emitir luz vermelha, que é fracamente visível para grande parte dos organismos. É possível que, sob tais circunstâncias, a protobioluminescência ainda não tivesse um papel adaptativo claramente definido. Estudos com as enzimas tipo-luciferase de *Z. morio* sugerem que mutações com efeitos pleiotrópicos, que simultaneamente aumentaram a  $k_{cat}$  e deslocaram o espectro para o amarelo, tenham tido um papel crucial no desenvolvimento da bioluminescência funcional (VIVIANI *et al.*, 2013) (**Figura 13, vide pág. 39**).

Considerando-se que uma das principais funções da bioluminescência é a comunicação, o fenótipo fracamente luminescente deve ter sofrido forte pressão seletiva para aumentar sua intensidade e, conseqüentemente sua visibilidade. A intensidade luminescente ( $I_{LM}$ ) depende diretamente da concentração dos substratos e da enzima, do rendimento quântico (QY) e da constante catalítica ( $k_{cat}$ ), por esse motivo, a otimização de propriedades cinéticas como  $k_{cat}$  e  $K_M$  deve ter sido crucial ao longo do curso evolutivo (VIVIANI *et al.*, 2013; NIWA *et al.*, 2010).

$$I_{LM} = QY \times k_{cat} \times [E]$$

Acredita-se após o surgimento das primeiras luciferases funcionais e da bioluminescência, outros eventos de duplicação gênica podem ter ocorrido. Análises de RNA-seq corroboram com essa hipótese, indicando que a família Elateridae, cujas luciferases são pH-insensíveis é mais antiga, tendo surgido há cerca de 120-197 milhões de anos. Na sequência teriam surgido as famílias Phengodidae (que também tem luciferases pH-insensíveis), e Lampyridae, a única família que tem luciferases pH-sensíveis, com tempo de divergência estimado em 73,4 e 71,9 milhões de anos respectivamente (AMARAL *et al.*, 2019). Assim, um terceiro evento de duplicação deve ter ocorrido, originando luciferases pH-sensíveis à partir das pH-insensíveis (AMARAL *et al.*, 2017).

Estudos anteriores, demonstraram que larvas do lampirídeo *A. lineatum* emitem bioluminescência fraca e contínua por todo o corpo. Essa bioluminescência é oriunda dos trofócitos presentes no corpo gorduroso e é bem diferente da observada nas lanternas, que emitem luz com maior intensidade sob controle nervoso na forma de lampejos ou pulsos (VIVIANI *et al.*, 2008<sup>C</sup>; TONOLLI *et al.*, 2011) (**Figura 37**).



**Figura 37.** Larva de *A. lineatum* (esquerda) e bioimagem em câmara CCD mostrando a luminescência difusa do corpo gorduroso. Autoria: Vadim Viviani.



Além das diferenças na cinética de emissão, que é rápida nas lanternas e contínua no corpo gorduroso, medidas *in vitro* com extratos destes tecidos mostraram também que havia diferença nos espectros de bioluminescência emitido por estas luciferases. Enquanto o extrato do corpo gorduroso da larva emite cor verde, o extrato da lanterna gera luz amarela, o que indica que as luciferases responsáveis pela luminescência em cada um desses tecidos são isoformas distintas (VIVIANI *et al.*, 2008<sup>C</sup>; TONOLLI *et al.*, 2011).

A análise do transcriptoma dos tecidos fotogênicos e não fotogênicos da larva e do adulto do vagalume *A. lineatum* (AMARAL *et al.*, 2017), de fato mostrou a presença de duas sequências distintas com identidade maior do que 45% com outras luciferases de vagalumes. A isoforma denominada AL1 apresentou cerca de ~86% de identidade com luciferases de vagalumes, que foi encontrada tanto na lanterna do adulto quanto da larva. Já a isoforma AL2 tem uma identidade menor com luciferases de lanternas de vagalumes (~60%) e é encontrada no corpo gorduroso e lanterna da larva mas não na lanterna do adulto (AMARAL *et al.*, 2017). Esses resultados são similares aos observados para a isozima isolada dos ovos de *Luciola cruciata* (OBA *et al.*, 2010), na pupa e ovos de *Luciola lateralis* (OBA *et al.*, 2013) e na pupa e ovos de *Pyrocoelia atripennis* (BESSHO-UEHARA *et al.*, 2017).

Nesse trabalho, finalmente foi feita a clonagem e caracterização das isoformas AL1 e AL2 com base nas sequências oriundas do transcriptoma (AMARAL *et al.*, 2017) e os resultados mostraram que as luciferases exibem propriedades moleculares, cinéticas e espectrais claramente distintas.

A isoforma AL2 apresentou um rendimento de expressão na forma ativa muito maior do que a AL1. Um fator que pode ajudar a explicar isso é a presença de diferentes códons nas sequências de cDNA, que podem afetar o nível de expressão dentro da célula bacteriana.

As diferenças mais notáveis entre as propriedades físico-química das isoformas AL1 e AL2 foram: (I) Espectros de bioluminescência, (II) Sensibilidade ao pH e, (III) Cinéticas da reação bioluminescente.

Essas luciferases apresentam cores de bioluminescência diferentes. Sob condições fisiológicas, a isoforma AL1 emite luz amarela enquanto a AL2 emite luz verde, esses resultados são similares aos obtidos previamente com os extratos *in vitro* (TONOLLI *et al.*, 2011, **Figura 25**). Além disto, as luciferases de

lampirídeos são em geral sensíveis à mudanças de pH e presença de metais pesados, desviando seu espectro de emissão para a região do vermelho na presença desses fatores (SELIGER & McELROY, 1964). A isoforma AL1 da lanterna possui espectro de emissão sensível à mudanças de pH e presença de metais conforme era esperado (**Figura 27**).

Por outro lado, a isoforma AL2 do corpo gorduroso, além de emitir espectro mais deslocado para o azul, é pH-insensível (**Figura 27**). Esses resultados são similares aos encontrados em estudos realizados anteriormente com isoformas luc 2 encontradas nas espécies de *Photuris* e *Luciola* spp que também se mostraram pH-insensíveis (**Tabela 7**) (OBA *et al.*, 2010; 2013; BESSHO-UEHARA & OBA, 2017).

Outra diferença marcante é com relação à cinética da reação luminescente. As luciferases de lanternas de vagalumes emitem luz sob forma de lampejo ou *flash*. Em ensaios *in vitro*, a bioluminescência atinge o pico de intensidade rapidamente, entre 0,3-0,5 segundos após a adição do ATP, e também decai rapidamente (McELROY & SELIGER, 1961).

Como esperado, a luciferase AL1 apresentou esse comportamento tipo *flash*, enquanto que isoforma AL2 do corpo gorduroso mostrou um comportamento cinético extremamente lento, levando aproximadamente 10 minutos apenas para atingir o pico de emissão e mostrando um tempo de decaimento de horas (**Figura 22**).

Uma possível explicação aventada na literatura para o rápido decaimento da intensidade de luz na cinética tipo *flash* é a formação de um subproduto alternativo da reação catalisada pela luciferase, o dehidroluciferil-adenilato, que é um forte inibidor da reação bioluminescente, e por isso o pico de intensidade decai rapidamente.

Foi relatado na literatura que ao adicionar-se coenzima-A à reação, esse intermediário é convertido em dehidroluciferil-CoA, que é um inibidor muito mais fraco que é facilmente removido do sítio-ativo. Por isso a adição de CoA resulta numa maior duração e intensidade da luminescência (FONTES *et al.*, 1997; 1998; FORD *et al.*, 1995; SHIMOMURA, 2012).

A adição de coenzima-A aumentou significativamente duração e intensidade da luminescência na reação com AL1. Entretanto, na reação com AL2, este aumento foi bem inferior ao observado com AL1, indicando que a CoA

tem menor efeito nesta isozima de cinética naturalmente mais lenta. O menor efeito da CoA na isozima AL2 pode indicar que o sítio-ativo desta isoforma já é naturalmente mais aberto, ou que o C-terminal sofre menor mudança conformacional em relação ao N-terminal, permitindo que os produtos da reação bioluminescente saiam mais facilmente do que nas luciferases de cinética rápida que são inibidas rapidamente.

A caracterização cinética também mostrou outras discrepâncias entre as duas isoformas. As constantes e eficiências catalíticas da reação bioluminescente total ( $\text{LH}_2 + \text{ATP}$ ) e da reação oxigenásica ( $\text{LH}_2\text{-AMP}$ ) foram consideravelmente maiores para a isoforma AL1 da lanterna em relação a isoforma AL2 do corpo gorduroso, indicando que a isoforma AL1 é uma luciferase mais eficiente e uma oxigenase melhor do que a isoforma AL2.

Os valores de  $K_M$  obtidos para luciferina e ATP para ambas AL1 e AL2 são, em geral, comparáveis com os valores reportados para outras luciferases de vagalumes na literatura. Entretanto, esses valores são surpreendentes quando analisamos a isoforma AL2 isoladamente, já que é uma enzima com menor atividade específica e constante catalítica. (**Tabela 8**). No entanto, ao comparar esses valores com os já descritos na literatura para luciferases pH-insensitivas tipo luc 2 de outras espécies de lampirídeos, é possível observar uma tendência de baixos valores para essas isoformas (**Tabela 7**). A luc 2 de *L. cruciata* por exemplo, tem um  $K_M$  de 0,8  $\mu\text{M}$  para luciferina e 21,5  $\mu\text{M}$  para ATP (OBA *et al.*, 2010).

### **Semelhanças funcionais e moleculares entre AL2 e luciferases de lanternas de fengodídeos e elaterídeos atestam parentesco mais próximo**

É notável que o comportamento cinético mais lento da reação *in vitro* e as baixas eficiências catalíticas para a isozima AL2 se assemelham às respectivas propriedades de luciferases pH-insensíveis emissoras de luz verde, como as encontradas nas lanternas laterais de larvas trenzinho (fengodídeos) e em elaterídeos. Essas semelhanças cinéticas sugerem que as luciferases pH-insensitivas do corpo gorduroso de larvas de lampirídeos e de lanternas de larvas de outros besouros tenham um parentesco mais próximo.

De fato, a análise filogenética mostra que a segunda isoforma AL2 é mais basal em relação ao clado das luciferases de lanternas, indicando que esta

isozima é mais primitiva. Assim sendo, os resultados indicam que os genes que codificam AL1 nas lanternas diferentes espécies de lampirídeos são ortólogos, ou seja possuem a mesma função e tendo uma origem em comum.

Além disso, a ocorrência predominante da luciferase AL2 mais primitiva no corpo gorduroso, reforça a hipótese anterior de que o corpo gorduroso foi o tecido fotogênico primitivo que, ao se especializar, deu origem às lanternas dos vagalumes (VIVIANI *et al.*, 2008<sup>C</sup>). A bioluminescência contínua e difusa do corpo gorduroso, ocasionada pela isozima AL2, pode representar um vestígio de um estágio ancestral da bioluminescência sem lanterna em larvas de vagalumes (TONOLLI *et al.*, 2011).

### **Origem estrutural de luciferases pH-sensitivas mais eficientes à partir de luciferases pH-insensitivas**

A análise comparativa das sequências de aminoácidos das isoformas AL1 e AL2 mostrou diferenças importantes, especialmente no que diz respeito a região sensor ade pH e metais. O resíduo H310 é extremamente importante na sensibilidade ao pH e estudos de mutagênese, demonstraram anteriormente que a sua substituição tem efeitos drásticos tanto na sensibilidade ao pH quanto na ligação de metais (GABRIEL & VIVIANI, 2016; VIVIANI *et al.*, 2018<sup>B</sup>). Isso porque, em condições fisiológicas, esse resíduo forma uma ponte salina com outro aminoácido (E354) que ajuda a manter o sítio ativo fechado e resulta na emissão de luz verde (VIVIANI *et al.*, 2016; 2018<sup>B</sup>). A perturbação dessa ponte salina por cargas externas (prótons e metais) causa abertura do sítio ativo, permitindo a entrada de água e polarizando o mesmo, o que resulta na emissão de luz vermelha (VIVIANI *et al.*, 2018<sup>B</sup>).

Embora nas luciferases pH-sensíveis de *A. lineatum* AL1 e de *Luciola* spp a histidina 310 esteja substituída por treonina e glutamina, as cadeias laterais desses resíduos ainda podem potencialmente coordenar metais como o zinco. Além disso, apesar de não ser um resíduo básico, a glutamina ainda pode participar de redes de ligação de hidrogênio com outros resíduos do sensor de pH, especialmente o E354, através do seu grupo amida, o que explicaria porque a AL1, que tem a substituição Q310, ainda é sensível ao pH.

A substituição de resíduos da ponte salina H310-E354 sem que a sensibilidade ao pH seja perdida tem precedentes. Na luciferase do lampírideo *Macrolampis* sp2, a substituição de E354 por asparagina (N354) é responsável pelo ombro no vermelho encontrado naturalmente no espectro de emissão dessa enzima. Isso acontece porque nesse caso não há carga negativa na posição 354 (em geral E354) para interagir com a histidina H310, e a ausência dessa interação causa um deslocamento no *loop* flexível <sup>352</sup>TPEGDDKP<sup>358</sup>. Esse deslocamento, por sua vez, causa a abertura maior do sítio ativo permitindo favorecendo a emissão de luz vermelha (VIVIANI *et al.*, 2005).

Por outro lado, o glutamato (E310) encontrado na isoforma pH-insensível AL2 de *A. lineatum*, é uma substituição muito mais drástica devido à inserção de uma carga elétrica oposta nessa posição. O glutamato ainda pode interagir com metais devido a presença da carga, o que é demonstrado pela sensibilidade remanescente dessa enzima a alguns metais (**Figura 30 e Tabela 10**). Entretanto, a presença dessa carga negativa poderia gerar também a repulsão com o resíduo E354, o que interferiria diretamente na sensibilidade ao pH. De fato, de acordo com a modelagem das estruturas (**Figura 36**), a distância estimada entre esses glutamatos é de 9 Å na AL2, enquanto na luciferase pH-insensível de *A. vivianii* (que possui H310 e E354) a distância estimada é de apenas 2,8 Å. Para a AL1 que possui a substituição H310Q essa distância é de 4,1 Å. Embora esse valor também seja maior ao observado para *A. vivianii*, é próximo ao que encontramos na luciferase pH-insensível de *Macrolampis* sp2 que possui a substituição E354N.

Portanto, embora ainda não seja possível afirmar que a substituição da Histidina 310 seja o ponto chave na origem da sensibilidade ao pH em luciferases pH-insensíveis, claramente o resíduo 310, juntamente com algumas outras substituições, deve ter tido um papel crítico na transição de uma luciferase pH-insensível para uma pH-insensível mais eficiente e especializada.

### **Estabilidade térmica e rigidez estrutural de luciferases pH-insensíveis**

Por fim, um dos resultados mais significativos se refere a estabilidade térmica da luciferase AL2. Em geral, luciferases que emitem bioluminescência na região do verde-azul são mais estáveis e rígidas em relação as luciferases que emitem luz na região do vermelho (SHERF *et al.*, 1996, OLIVEIRA &

VIVIANI, 2017). Portanto, já era esperado que a isoforma AL2 fosse mais estável do que a AL1, como foi de fato observado.

Entretanto, sua estabilidade em altas temperaturas foi muito maior para esta isozima do que para outras luciferases estudadas. À 37° C, a luciferase AL2 de *A. linetaum* apresenta 48 horas de meia vida. Entre as luciferases recombinantes anteriormente estudadas, a enzima pH-insensível da larva de elaterídeo *Pyrearinus termitilluminas* e a pH-sensível do vagalume *Amydetes vivianii* foram as mais termostáveis já reportadas, com meia-vida a 37° C de ~11 horas (OLIVEIRA & VIVIANI, 2017) e 12 horas (PELENTIR *et al.*, 2019), respectivamente. Essa enzima também foi estável por 3 horas à 50° C e 10 minutos à 60° C (tempos de meia vida). Assim sendo, os resultados indicam que a isozima AL2 é provavelmente a luciferase, em sua forma selvagem, mais termoestável já relatada na literatura (**Figuras 32 e 33**).

A análise de espectros de CD mostra que essa luciferase possui um perfil de estruturas secundárias bastante distinto quando comparada a outras luciferases de lampirídeos. A isoforma AL2 de *A. linetaum* possui apenas 16% de  $\alpha$ -hélice contra 28% e 35% nas luciferases de *A. vivianii* e *Macrolampis* sp2 respectivamente, e também possui um maior percentual de folhas- $\beta$  (**Tabela 11**). Estas diferenças tornam a enzima mais rígida, o que explica a alta estabilidade térmica, e corrobora a hipótese anteriormente aventada de que as luciferases pH-insensíveis seriam mais rígidas do que as luciferases pH-sensíveis (VIVIANI *et al.*, 2008<sup>A</sup>).

Assim, não somente as substituições na posição 310, mas outras substituições que afrouxaram o arcabouço das enzimas ancestrais tipo AL2 (pH-insensíveis), podem ajudar a explicar a origem das luciferases pH-sensíveis e mais eficientes das lanternas.

### **Aplicabilidade biotecnológica da luciferase AL2**

Luciferases de vagalumes possuem um grande apelo bioanalítico. Elas podem ser utilizadas na detecção e quantificação de ATP (PELENTIR *et al.*, 2019,) como biossensores na detecção de metais pesados e outros agentes tóxicos (GABRIEL *et al.*, 2014), como genes repórteres e bioimagem na análise de proliferação celular e progressão tumoral. No entanto, um dos fatores mais limitantes no uso destas luciferases diz respeito à sua instabilidade térmica.

Luciferases são, em geral, bastante termoinstáveis, perdendo rapidamente sua atividade em temperatura ambiente. A situação se torna ainda mais complicada quando nas aplicações que envolvem células de mamíferos que funcionam a ~ 37° C. A grande maioria das luciferases não tolera essa faixa de temperatura. Estudos de CD com a luciferase de *P. pyralis* e seus mutantes, mostram que a substituição tripla V241I/G246A/F250S produz uma luciferase termoestável com Tm de 66°C, no entanto a meia vida à 37° C é de aproximadamente 11 horas (BRANCHINI *et al.*, 2005; 2007).

A nova enzima AL2 do corpo gorduroso de *A. lineatum* por sua maior estabilidade à temperaturas acima de 37° C é extremamente apelativa para aplicações biotecnológicas. Além disto, sua cinética extremamente lenta, a torna interessante para aplicações em bioimagem que requeiram longo tempo de exposição.

## 7. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi feita a clonagem e caracterização de duas isoformas distintas de luciferases do vagalume *Aspisoma lineatum* (Lampyrinae: Cratomorphini) que serviram de modelo de estudo para entender a origem estrutural das luciferases pH-sensíveis das lanternas dos vagalumes. A luciferase da lanterna AL1 emite luz amarela, é sensível ao pH e apresenta uma cinética do tipo *flash*. Em contraste, a isozima AL2 do corpo gorduroso emite luz na região verde, é insensível ao pH, e possui uma cinética extremamente lenta. A isoforma AL2 é muito menos eficiente cataliticamente que a luciferase da lanterna AL1, indicando que as luciferases das lanternas de vagalumes se originaram a partir de um ancestral menos eficiente e pH-insensível presente no corpo gorduroso. A substituição E310Q parece ter tido um papel importante na origem do fenótipo sensível ao pH, típico das luciferases das lanternas de lampirídeos. Além disso, os estudos estruturais confirmam que as luciferases pH-insensíveis emissoras de luz verde tem um arcabouço mais rígido do que as luciferases pH-sensíveis, o que as tornam menos suscetíveis a mudanças de conformação do sítio ativo mediante fatores como alterações de pH, temperatura ou presença de metais. Apesar de ser menos eficiente cataliticamente, a insensibilidade ao pH atrelada à cinética lenta e, principalmente, à alta estabilidade em temperaturas elevadas, tornam a isoforma AL2 potencialmente aplicável como gene repórter para fins de bioimagem.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRTH, R.L.; RHODES, W.C.; McEIROY, W.D. "The function of coenzyme A in luminescence." **Biochimica. Biophysica. Acta.**, v. 27, p. 519-532, 1958.

ALIPOUR, B.S.; HOSSEINKHANI S.; NOKKHAH, M.; NADERI-MANESH, H.; CHAICHI, M.J.; OSALOO, S.K. "Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm *Lampyrus turkestanicus*." **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 325, n. 1, p. 215-222, 2004.

AMARAL, D.T.; PRADO, R.A.; VIVIANI, V.R. "Luciferase from *Fulgeochlizus bruchi* (Coleoptera: Elateridae), a Brazilian click-beetle with a single abdominal lantern: molecular evolution, biological function and comparison with other click-beetle luciferases." **Photochem Photobiol Sci**, v. 11, n. 7, p. 1259-1267, 2012.

AMARAL, D.T.; OLIVEIRA, G.; SILVA, J.R.; VIVIANI, V.R. "A new orange emitting luciferase from the Southern-Amazon *Pyrophorus angustus* (Coleoptera: Elateridae) click-beetle: structure and bioluminescence color relationship, evolutionary and ecological considerations." **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 15, n. 9, p. 1148-1154, 2016.

AMARAL, D.T.; MITANI, Y.; OHMIYA, Y.; VIVIANI, V.R. "Organization and comparative analysis of the mitochondrial genomes of bioluminescent Elateroidea (Coleoptera: Polyphaga)." **Gene**, v. 586, n. 2, p. 254-262, 2016<sup>B</sup>.

AMARAL, D.T.; RODRIGUES, J.S.; VIVIANI, V.R. "Transcriptomes from the photogenic and non-photogenetic tissues and life stages of the *Aspisoma lineatum* firefly (Coleoptera: Lampyridae): Implications for the evolutionary origins of bioluminescence and its associated light organs." **Gene reports**, v. 8, p. 150-159, 2017.

AMARAL, D.T.; BONATELLI, I.A.S.; CERRI, R.; VIVIANI, V.R. "Phylogenomic analyses and divergence time estimation of Elateroidea (Coleoptera) based on RNA-Seq data." **Comparative Biochemistry and Physiology D-Genomics & Proteomics**, v.30, p. 283-289, 2019.

ANDO, Y.; NIWA, K.; YAMADA, N.; ENOMOTO, T.; IRIE, T.; KUBOTA, H.; OHMIYA, Y.; AKIYAMA, H. "Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pHsensitive Green emission." **Nature**, v. 2. P. 44-47, 2008.

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.

BECHARA, E.J.H. "Luminescent elaterid beetles: biochemical, biological and ecological aspects." **Adv. Oxygen. Process**, v. 1, p.123-178, 1988.

BESSHO-UEHARA, M.; KONISHI, K.; OBA, Y. "Biochemical characteristics and gene expression profiles of two paralogous luciferases from the Japanese firefly *Pyrocoelia atripennis* (Coleoptera, Lampyridae, Lampyrinae): insight into the evolution of firefly luciferase genes." **Potochem. Photobiol. Sci**, v. 16, p. 1301-1310, 2017<sup>A</sup>.

BESSHO-UEHARA, M.; OBA, Y. " Identification and characterization of the Luc2-type luciferase in the Japanese firefly *Luciola parvula* involved in a dim luminescence in immobile stages." **Luminescence**, v. 32, p. 924-931, 2017<sup>B</sup>.

BITLER, B.; McELROY, W.D. "The preparation and properties of crystalline firefly luciferin." **Arch. Biochem. Biophys**, v. 72, p. 358–368, 1957.

BRADFORD, M.M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." **Anal Biochem**, v. 7, p. 248-254, 1976.

BRANCHINI B.R.; SOUTHWORTH, T.L.; DeANGELIS, J.P.; RODA, A.; MICHELINI, E. "Luciferase from the Italian firefly *Luciola italica*: molecular cloning and expression." **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**. v. 145, n. 2, p. 159-167, 2006.

BRANCHINI, B. R., MAGYAR, R. A., MURTIASHAW, M. H., ANDERSON, S. M., ZIMMER, M. Site-directed mutagenesis of histidine 245 in firefly luciferase: A proposed model of the active site. **Biochemistry**, v. 37, n. 44, p. 15311–15319, 1998.

BRANCHINI, B. R.; MAGYAR, R. A.; MURTIASHAW, M. H.; ANDERSON, S. M.; HELGERSON, L. C.; ZIMMER, M. Site-directed mutagenesis of firefly luciferase active site amino acids: a proposed model for bioluminescence color. **Biochemistry**, v. 38, n. 40. P. 13223-13230, 1999.

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., SOUTHWORTH, T. L., MURTIASHAW, M. H., BOIJE, H., FLEET, S. E. A mutagenesis study of the luciferin binding site residues of firefly luciferase. **Biochemistry**, v. 42, n. 35, p. 10429–10436, 2003.

BRANCHINI, B. R.; SOUTHWORTH, T. L.; MURTIASHAW, M. H.; WILKINSON, S. R.; KHATTAK, N. F.; ROSENBERG, J. C.; ZIMMER, M. "Mutagenesis evidence that the partial reactions of firefly bioluminescence are catalyzed by different conformations of the luciferase C-terminal domain." **Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 1385-1393, 2005.

BRANCHINI, B.R.; ABLAMSKY, D.M.; MURTIASHAW, M.H.; UZASCI, L.; FRAGA, H.; SOUTHWORTH, T.L. "Thermostable red and green light-producing firefly luciferase mutants for bioluminescent reporter applications." **Analytical Biochemistry**, v. 361, p.253-262, 2007.

BRANCHINI, B.R.; SOUTHWORTH, T.L.; SALITURO, L.J.; FONTAINE, D.M.; OBA, Y. "Cloning of the Blue Ghost (*Phausis Reticulata*) Luciferase Reveals a Glowing Source Of Green Light." **Photochem. Photobiol.**, v. 93, p. 473-478, 2017.

CAMPBELL, A.K. "**Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine.**" Ellis Horwood Series, New York. 1988.

CARRASCO- LÓPEZ, C.; FERREIRA, J. C; LUI, N. M.; SCHRAMM, S.; BERRAUDPACHE, R.; NAVIZET, I; PANJIKAR, S.; NAUMOV, P; RABEH, W. M. Beetle luciferases with naturally red- and blue-shifted emission. **Life Science Alliance**. v.1, p.4, 2018.

CHALFIE, M. et al. "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." *Science*. v. 263, p. 802-805, 1994.

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.

COHN, D.H.; MILEHAM, A.J.; SIMON, M.I.; NEALSON, K.H.; RAUSCH, S.K.; BONAM, D.; BALDWIN, T.O. "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. 260, n. 10, p. 6139-6146, 1985.

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. "Pyrearinus termitilluminans, sp.n., with description of the immature stages (Coleoptera, Elateridae, Pyrophorini)." **Revta bras. Zool.**, v. 1, n. 1, p. 23-30, 1982.

DeLANO. W.L. "**The PyMOL Molecular Viewer.**" DeLano Scientific LLC, San Carlos, California, USA. Disponível em <<http://www.pymol.org>>, 2002.

DeLUCA, M. "Hydrophobic nature of the active site of firefly luciferase." **Biochemistry**, v. 8, p: 160-166, 1969.

DeLUCA, M.; McELROY, W.D. "Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions" **Biochemistry**, v. 13, n. 5, p. 921-925, 1974.

DEVINE, J.H.; KUTUZOVA, G.D.; GREEN V.A.; UGAROVA, N.N.; BALDWIN, T.O. "Luciferase from the East European firefly *Luciola mingrelica*: Cloning and nucleotide sequence of the cDNA, overexpression in *Escherichia coli* and purification of the enzyme." **BBA - Gene Structure and Expression**, v. 1173, n. 2, p. 121-132, 1993.

DeWET, J.R.; WOOD, K.V.; HELINSKI, D.R.; DeLUCA, M. "Cloning of Firefly Luciferase cDNA and the Expression of Active Luciferase in *Escherichia Coli*." **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 82, p. 7870-7873, 1985.

DUBOIS, R. "Fonction photogenique des Pyrophores." **C.R. Soc. Bioi**, v. 37, p. 559-562. 1885.

DUBOIS, R. "Note sur la fonction photogenique chez les Pholades." **C.R. Soc. Bioi**, v. 39, p. 564-566, 1887.

FALASCHI, R.L.; AMARAL, D.T.; SANTOS, I.; DOMINGOS, A.H.R.; JOHNSON, G.A.; MARTINS, A.G.S.; VIROOMAL, I.B.; POMPÉIA, S.L.; MIRZA, J.D.; OLIVEIRA, A.G.; BECHARA, E.J.H.; VIVIANI, V.R.; STEVANI, C. "Neoceroplatus betaryiensis nov. sp. (Diptera: Keroplatidae) is the first record of a bioluminescent fungus-gnat in South America." **Scientific reports**, v. 9, p. 11291, 2019.

FISHER, A.J.; THOMPSON, T.B.; THODEN, J.B.; BALDWIN, T.O.; RAYMENT, I. "The 1.5-Å Resolution Crystal Structure of Bacterial Luciferase in Low Salt conditions." **JBC**, v. 271, p. 21956-21968, 1996.

FONTES, R.; ORTIZ, B.; DIEGO, A.; SILLERO, A.; SILLERO, M.A.G. "Dehydroluciferyl-AMP is the main intermediate in the luciferin dependent synthesis of Ap4A catalyzed by firefly luciferase." **FEBS Letters**, v. 438, p. 190-194, 1998.

FORD, S.R.; BUCK, L.M.; LEACH, F.R. "Does the sulfhydryl or the adenine moiety of CoA enhance firefly luciferase activity?" **BBA – Prot. Struc. and Mol. Enzymol**, v. 1252, n. 2, p. 180-184, 1995.

FRAGA, H.; FERNANDES, D.; FONTES, R.; SILVA, J.C.G.E. "Coenzyme A affects firefly luciferase luminescence because it acts as a substrate and not as an allosteric effector." **FEBS J**, v. 272, p. 5206-5216, 2005.

FRAGA, H.; FERNANDES, D.; NOVOTNY, J.; FONTES, R.; SILVA, J.C.G.E. "Firefly luciferase produces hydrogen peroxide as a coproduct in dehydroluciferyl adenylate formation." **Chem. Bio. Chem**, v. 7, p. 929-935, 2006.

GABRIEL, G.V.M.; LOPES, P.S.; VIVIANI, V.R. "Suitability of *Macrolampis* firefly and *Pyrearinus* click beetle luciferases for bacterial light off toxicity biosensor." **Anal. Biochem**, v. 445, p. 72–78, 2013.

GABRIEL, G.V.M.; VIVIANI, V.R. "Novel application of pH sensitive firefly luciferases as dual reporter genes for simultaneous ratiometric analysis of intracellular pH and gene expression/location." **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 13, p. 1661-1670, 2014.

GABRIEL, G.V.M.; VIVIANI, V.R. "Engineering the metal sensitive sites in *Macrolampis sp2* firefly luciferase and use as a novel bioluminescent ratiometric biosensor for heavy metals." **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 40, p. 8881–8893, 2016.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINGS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server." In: **The proteomics protocols handbook**, Humana Press. p. 571-607, 2005.

GATEMBY, J. B. The Australian Mycetophilid Glowworms. **Trans. Roy. Soc. New Zeland**, v. 88, p. 577-593, 1960.

GREEN, A. A.; McELROY, W. D. "Crystalline firefly luciferase." **Biochem. Biophys. Acta**, v. 20, p. 170-176, 1956.

GROBER, M.S. "Brittle-star bioluminescence functions as an aposematic signal to deter crustacean predators." **Animal Behaviour**, v. 36, n. 2, p. 493-501, 1988.

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.; MOLINE, M. A.; CASE, J. F. "Bioluminescence in the sea." **Ann. Ver. Mar. Sci.**, v. 2, p. 443-93, 2010.

HASTINGS, J.W. "Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems." **J. Mol. Evol.**, v. 19, p. 309-321, 1983.

HASTINGS, 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.

HARVEY, E.N. "**A history of luminescence. From the earliest times until 1900.**" Philadelphia: The American Philosophical Society, J.H. Furst Company, Baltimore, Maryland (USA), 1957.

HERRING, P.J. "Bioluminescence of invertebrates other than insects." In: **Bioluminescence in Action**, London: Academic Press, 1978.

HERRING, P.J. "Systematic distribution of bioluminescence in living organisms." **J. Biolumin. Chemi. lumin.**, v. 1, p. 147-163, 1987.

HIRANO, T., HASUMI, Y., OHTSUKA, K., MAKI, S., NIWA, H., YAMAJI, M., HASHIZUME, D. Spectroscopic studies of the light color modulation mechanism of firefly (beetle) bioluminescence. **American Chemical Society**, v. 131, p. 2385-2396, 2009.

IMANI, M. et al. "Design and introduction of a disulfide bridge in firefly luciferase: increase of thermostability and decrease of pH sensitivity." **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 9, p. 1167–1177, 2010.

INGRAM-SMITH, C.; WOODS, B.L.; SMITH, K.S. "Characterization of the acyl substrate binding pocket of acetyl-CoA synthetase." **Biochemistry**. 2006.

JARCHI, S.; ATAEI F.; HOSSEINKHANI, S. "Mutation of conserved residues K329 and R330 on the surface of firefly luciferase: effect on proteolytic degradation." **Biological Macromolecules**, v. 115, p. 324-330, 2018.

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. 261, n. 11, p. 4805-4811, 1986.

JUBB, H.C.; HIGUERUELO, A.P.; OCHOA-MONTAÑO, B.; PITT, W.R.; ASCHER, D.B.; BLUNDELL, T.L. "Arpeggio: A Web Server for Calculating and Visualising Interatomic Interactions in Protein Structures." **Journal of molecular biology**, v. 429, 2017.

KASKOVA, Z.M.; DORR, F.A.; PETUSHKOV, V.N.; PURTOV, K.V.; TSARKOVA, A.S.; RODIONOVA, N.S.; MINEEV, K.S.; GUGLYA, E.B.; KOTLOBAY, A.; BALEEVA, N.S.; BARANOV, M.S.; ARSENIIEV, A.S.; GITELSON, J.I.; Lukyanov, S.; SUZUKI, Y.; KANIE, S.; PINTO, E.; Di MASCIO, P.; WALDENMAIER, H.E.; PEREIRA, T.A.; CARVALHO, R.P.; OLIVEIRA, A.G.; OBA, Y.; BASTOS, E.L.; STEVANI, C.V.; YAMPOLSKY, I.V. "Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence." **Sci. Adv.**, v. 3, p. 1602847, 2017.

KATO, D.; YOKOHAMA, K.; HIRAISHI, Y.; TAKEO, M.; NEGORO, S. "Comparison of Acyl-CoA Synthetic Activities and Enantioselectivity toward 2-Arylpropanoic Acids in Firefly Luciferases. Biosci." **Biotechnol. Biochem**, v. 75, n. 9, p. 1758-1762, 2011.

KNIGHTS, M.; DROGEMULLER, C.J. "Xenobiotic-CoA ligases: Kinetic and molecular characterization." **Curr. Drug. Metab.**, v. 1, p. 49–66, 2000.

KISHI, Y.; GOTO, T.; HIRATA, Y.; SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F.H. "The structure of Cypridina luciferin." In: F.H. JOHNSON & Y. HANEDA, eds. **Bioluminescence in Progress**. Princeton University Press, New Jersey, 1966.

KOKSHAROV, M.I.; UGAROVA, N.N. "Triple substitution G216N/A217L/S398M leads to the active and thermostable *Luciola mingrelica* firefly luciferase." **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 10, p. 931-938, 2011A.

KOKSHAROV, M.I.; UGAROVA, N.N. "Thermostabilization of firefly luciferase by in vivo directed evolution." **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 24, n. 11, p. 835-844, 2011B.

KOTLOBAY, A.A.; SARKISYAN, K.S.; MOKRUSHINAA, Y.A.; MARCET-HOUBENE, M. *et al.* "Genetically encodable bioluminescent system from fungi." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 115, p. 12728-12732, 2018.

LARKING, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; McGETTINGAN, P.A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GINSON, T.J.; HIGGINS, D.G. "Clustal W and Clustal X Version 2.0." **Bioinformatics** (Oxford, England). v. 23, 2007.

LAWRENCE, J.F.; NEWTON, A.F. "Families and subfamilies of Coleoptera." In: PAKALUK, J.; SLIPINSKI, S.A. **Biology, phylogeny and classification of Coleoptera**. Poland: Warsaw, 1995.

LEACH, F.R.; YE, L.; SCHAEFFER, H.J.; BUCK, L.M. "Cloning and sequencing of a firefly luciferase from *Photuris pennsylvanica*." In: HASTINGS, J.W.; KRICKA, L.J.; STANLEY, P.E. **Bioluminescence and Chemiluminescence**. (John Wiley & Sons), p.240–243, 1997.

LEE, J. "Bioluminescence of the Australian glow-worm *Arachnocampa richardsae* Harrison". **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.24, p. 279-285, 1976.

LEE, J. "**Bioluminescence, the nature of the light.**" University of Geórgia, in press, 2015.

LI, H.; LI, J.Z.; HELM, G.A.; PAN, D. "Non-invasive imaging of firefly luciferase reporter gene expression using bioluminescence imaging in human prostate cancer models." **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 46, n. 4, p.179-184, 2007.

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

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. "Synthesis and Targeting of Peroxisomal Proteins." In: **Molecular Cell Biology**. Freeman, W.H. New York, 2000.

MASUDA, T.; TATSUMI, H.; NAKANO, H. "Cloning and sequence analysis of cDNA for luciferase of a Japanese firefly, *Luciola cruciata*." V. 77, n. 2, p. 265-270, 1989.

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.; STREHLER, B.L. "Factors influencing the response of the bioluminescent reaction to adenosine triphosphate." **Archs. Biochem.**, v. 22, p. 420-433, 1949.

McELROY, W.D.; DeLUCA, M. "Chemistry of firefly bioluminescence." In: HERRING, P.J. **Bioluminescence in Action**. New York: Academic Press, 1978.

McELROY, W.D.; HASTINGS, J.W.; SONNEFIELD, V.; COULOMBRE J. "The requirement of riboflavin phosphate for bacterial luminescence." **Science**, v. 118, p. 385-386, 1953.

MITANI, Y.; FUTAHASHI, R.; NIWA, K.; OHBA, N.; OHMYIA, Y. "Cloning and characterization of luciferase from a Fijian luminous click beetle." **Photochem Photobiol.**, v. 89, n. 5, p. 1163-1169, 2013.

MORADI, A.; HOSSEINKHANI, S.; NADERI-MANESH, H.; SADEGHIZADEH, M.; ALIPOUR, B.S. "Effect of Charge Distribution in a Flexible Loop on the Bioluminescence Color of Firefly Luciferases." **Biochemistry**, v. 48, p. 575-582, 2009.

MURANAKA T.; OYAMA, T. "Application of Single-Cell Bioluminescent Imaging to Monitor Circadian Rhythms of Individual Plant Cells." In: RIPP S. **Bioluminescent Imaging. Methods in Molecular Biology**, v. 2081, p. 231-242, 2020.

NAKATSU, T.; ICHIYAMA, S.; HIRATAKE, J.; SALDANHA, A.; KOBASHI, N; SAKATA, K.; KATO, H. "Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence." **Nature**, v. 44, p. 372-376, 2006.

NIWA, K.; ICHINO, Y.; KUMATA, S.; NAKAJIMA, Y.; HIRAISHI, H.; KATO, D.; VIVIANI, V. R.; OHMIYA, Y. "Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases." **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 1046-1049, 2010.



NGUYEN, L.T.; SCHIMIDT, H.; VON HAESELER, A.A.; MINH, B.Q. "IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies." **Molecular biology and evolution**, v. 32, 2015.

OBA, Y.; OJIKI, M.; INOUE, S. "Firefly luciferase is a bifunctional enzyme: ATP-dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl-CoA synthetase." **FEBS Letters**, v. 540, p. 251-254, 2003.

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, 2004.

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.; LIDA, 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.

OBA, Y.; MORI, N.; YOSHIDA, M.; INOUE, S. "Identification and Characterization of a Luciferase Isozyme in the Japanese Firefly *Luciola cruciata* Involving in the Dim Glow of Firefly Eggs." **Biochemistry**, v. 49, p. 10788-10795, 2010.

OBA, Y.; FURUHASHI, M.; BESSHO-UEHARA, M.; SAGAWA, S.; IKEYA, H.; INOUE, S. "Bioluminescence of a firefly pupa: involvement of a luciferase isozyme in the dim glow of pupae and eggs in the Japanese firefly *Luciola lateralis*" **Photochemical and photobiological sciences**, v. 12, p. 854-863, 2013.

OHMIYA, Y.; OHBA, N.; TOH, H.; TSUJI, F.I. "Cloning, expression, and sequence analysis of cDNA for the Luciferase from the Japanese fireflies, *Pyrocoelia miyako* and *Hotaria parvula*." **Photchem. Photobiol**, v. 62, p. 309-313, 1995.

OHMIYA, Y.; KOJIMA, S.; NAKAMURA, M.; NIWA, H. "Bioluminescence in the Limpet-Like Snail, *Latia neritoides*." **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v. 78, p. 1197-1205, 2005.

OLIVEIRA, G.; VIVIANI, V.R. "Comparison of the thermostability of recombinant luciferases from Brazilian bioluminescent beetles: relationship with kinetics and bioluminescence colors." **Luminescence**, 2017.

PELENTIR, G.F.; BEVILAQUA, V.R.; VIVIANI, V.R. "A Highly Efficient, Thermostable and Cadmium Selective Firefly Luciferase Suitable for Ratiometric Metal and pH Biosensing and for Sensitive ATP Assays." **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 18, p. 2061-2070, 2019.

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.

PRADO, R.A.; SANTOS, C.R.; KATO, D.; MURAKAMI, M.T.; VIVIANI, V.R. "The dark and bright sides of an enzyme: threedimensional structure of the N-terminal domain of Zophobas morio luciferase-like enzyme, inferences on the biological function and origin of oxygenase/luciferase activity." **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 17, p. 08-31, 2016.

PRESWOOD, R.; HASTINGS, J.W. "Oxygen dependent and independent steps in luciferase-FMNH<sub>2</sub> oxidation." **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 82, n. 3, p. 990-996, 1978.

REDFORD, K.H. "Prey attraction as a possible function of bioluminescence in the larvae of *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridae)." **Rev. Bras. Zool.**, v. 1, n. 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.

REGER, A.S.; WU, R.; DUNAWAY-MARIANO, D.; GULICK, A.M. "Structural characterization of a 140 domain movement in the two-step reaction catalyzed by 4-chlorobenzoate:CoA ligase." **Biochemistry**, v. 47, p. 8016-8025, 2008.

RHODES, W.C.; McELROY, W.D. "The synthesis and function of luciferyl-adenylate and oxyluciferyl-adenylate." *J. Biol. Chem.*, v. 233, p. 1528-1537, 1958.

RIBEIRO, C.; SILVA, J.C.G.E. "Kinetics of inhibition of firefly luciferase by oxyluciferin and dehydroluciferyl-adenylate." **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 7, p. 1085-1090, 2008.

RODRIGUES, C.H.; PIRES, D.E.; ASCHER, D.B. "DynaMut: Predicting the Impact of Mutations on Protein Conformation, Flexibility and Stability." **Nucleic acids research.**, v. 46, p. 350-355, 2018.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HOHNA, B.L.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. "MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space." **Systematic biology**, v. 61, 2012.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. "I-TASSER: A Unified Platform for Automated Protein Structure and Function Prediction." **Nature protocols**, v. 5, 2010.

SALA-NEWBY, G.B.; THOMSON, C.M.; CAMPBELL, A.K. "Sequence and biochemical similarities between the luciferases of the glow-worm *Lampyrus noctiluca* and the firefly *Photinus pyralis*." **Biochem.**, v. 313, p. 761-767, 1996.

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

SÁNCHEZ-LINARES, I; PÉREZ-SÁNCHEZ, H.; CECILIA, J.M.; GARCÍA, J.M. "High-Throughput Parallel Blind Virtual Screening Using BINDSURF." **BMC bioinformatics**. 13 Suppl 14, 2012.

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.

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.

SCHULTZ, L.W.; LIU L.; CEGIELSKI, M.; HASTINGS J.W. "Crystal structure of a pH-regulated luciferase catalyzing the bioluminescent oxidation of an open tetrapyrrole." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 1378–1383, 2005.

SCHUSTER, G.B. "Chemiluminescence of organic peroxides. Conversion of ground-state reactants to excited-state products by the chemically initiated electron-exchange luminescence mechanism." **Acc. Chem. Res.**, v. 12, p. 366–73, 1979.

SELIFONOVA, O.; BURLAGE, R.; BARKAY, T. "Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment." **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 3083–3090, 1993.

SELIGER, H.H. "The origin of bioluminescence." **Photochem. Photobiol.**, v. 21, p. 355-361, 1975.

SELIGER, H.H.; McElroy, W.D. "**Bioluminescence enzyme catalyzed chemiluminescence.**" In *Light: Physical and biological action*, New York: Academic Press. 1965.

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. "**Bioluminescence. Chemical Principles and Methods.**" Massachusetts: Mainland Press Pte Ltd, 2012.

SIVINSKY, J. "The nature and possible functions of luminescence in Coleoptera larvae." **Coleopterists bulletin.**, v. 35, p. 167-179, 1981.

STRAUSE, L.G.; DeLUCA, M. "Characteristics of luciferases from a variety of firefly species: Evidence for the presence of luciferase isozymes." **Insect Biochemistry**, v. 11, n. 4, p. 417-422, 1981.

STREHLER, B.L.; HARVEY, E.N.; CHANG, J.J.; CORMIER, M.L. "The luminescent oxidation of reduced riboflavin phosphate in the bacterial luciferin-luciferase system." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 40, p. 10-12, 1954.

SUCHARD, M.A.; LEMEY, P.; BAELE, G.; AYRES, D.L.; RAMBAUT, A. "Bayesian Phylogenetic and Phylodynamic Data Integration Using BEAST 1.10," **Virus evolution**, v. 4, 2018.

SUZUKI, H., et al. "Structure and regulation of rat long chain fatty acyl-CoA sintetase." **J. Biol.Chem.**, v. 25, p. 8681-8685, 1990.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0," **Molecular biology and evolution**, v, 30, 2013.

TATSUMI, H.; KAJIYAMA, N.; NAKANO, E. "Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cDNA clone encoding luciferase of a firefly, *Luciola lateralis*." **BBA - Gene Structure and Expression**, v. 1131, n. 2, p. 161-165, 1992.

TONOLLI, P.N.; OKAWACHI, F.M.; ABDALLA, F.C.; VIVIANI, V.R. "Bioluminescent fat body of larval *Aspisoma lineatum* (Coleoptera:Lampyridae) firefly: ontogenic precursor of lantern's photogenic tissue." **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, p. 761-767, 2011.

TROWELL, S.C.; DACRES, H.; DUANCIC, M.M.; LEITCH, V.; RICKARDS, W.R. "Molecular basis for the blue bioluminescence of the Australian glow-worm *Arachnocampa richardsae* (Diptera: Keroplatidae)." **BBRC**, v. 78, p. 533-539, 2016.

TSIEN, R. "Constructing and Exploiting the Fluorescent Protein Paintbox (Nobel Lecture)." **Nobel lectures**, v. 48, p. 5612-5626, 2009.

TU, S.C. "**Bacterial bioluminescence: biochemistry**". In: HORSPOLL, W.M.; LENCI, F. Handbook of organic photochemistry and photobiology. Washington, DC: CRC Press LLC, 2004.

UGAROVA, N.N. "Luciferase of *Luciola mingrelica* fireflies: kinetics and regulation mechanism." **J. Biolum. Chemilum.**, v. 4, p 406–418, 1989.

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, E.J.H. "Larval *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) fat body extracts catalyze D-luciferin and ATP-dependent 40 chemiluminescence. A luciferase-like enzyme." **Photochem. Photobiol.**, v. 63, p. 713-718, 1996.

VIVIANI, V.R.; BECHARA, E.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.; SILVA, A.C.R.; PEREZ, G.L.O.; SANTELLI, R.V.; BECHARA, E.J.H.; REINACH, F.C. Cloning and molecular characterization of cDNA for Brazilian larval click-beetle *Pyrearinus termitiluminans* luciferase. **Photochemistry and Photobiology**, v. 70, p. 254-260, 1999B.

VIVIANI, V. R.; OHMIYA, Y. Bioluminescence color determinants of Phrixotrix railroadworm luciferases: chimeric luciferases, site-directed mutagenesis of Arg 215 and guanidine effect. **Photochemistry and Photobiology**, v. 72, n.2, p. 267–271, 2000.

VIVIANI, V.R.; UCHIDA, A.; SUENAGA, N.; RYUFUKU, M.; OHMIYA, Y. "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. "The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases." **CMLS**, v. 59, p. 1833–1850, 2002.

VIVIANI, V.R.; HASTINGS, J. W.; WILSON, T. "Two Bioluminescent Diptera: The North American *Orfelia fultoni* and the Australian *Arachnocampa flava*. Similar Niche, Different Bioluminescence Systems." **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, p. 22-27, 2002A.

VIVIANI, V.R.; UCHIDA, A.; VIVIANI, A.; OHMIYA, Y. "The influence of Ala243(Gly247), Arg 215 and Thr226(Asn230) on the bioluminescence spectra and pH-sensitivity of railroad worm, click beetle and firefly luciferases. **Photochem. Photobiol.** v. 76, p. 538–544, 2002B.

VIVIANI, V. R.; ARNOLDI, F. G. C.; BROCHETTO-BRAGA, M. R.; OHMIYA, Y. Cloning and characterization of the cDNA for the Brazilian *Cratomorphus distinctus* larval firefly luciferase: similarities with European *Lampyris noctiluca* and Asiatic *Pyrocoelia* luciferases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v: 139, p.151-156, 2004A.

VIVIANI, V. R.; SILVA NETO, A. J.; OHMIYA, Y. The influence of the region between residues 220 and 344 and beyond in *Phrixotrix* railroad-worm luciferases green and red bioluminescence. **Protein Engineering, Design and Selection**, v.17, p: 113-117, 2004B.

VIVIANI, V.R.; OEHLMEYER, T.L.; ARNOLDI, F.G.C.; BROCHETTO-BRAGA, M.R. "A new firefly luciferase with bimodal spectrum: identification of determinants in spectral pH-sensitivity firefly luciferases." **Photochem. Photobiol.**, v. 81, p. 843-848, 2005.

VIVIANI, V. R. **Beetle luciferases: origin, structure and function relationships, and engineering for biotechnological applications.** In: VIVIANI, V. R.; Y. OHMIYA. *Luciferases and Fluorescent Proteins: principles and advances in biotechnology and bioimaging.* Kerala: Transworld Research Network, p.79–105, 2007a

VIVIANI, V. R.; ARNOLDI, F. G. C.; OGAWA, F. T.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Few substitutions affect the bioluminescence spectra of *Phrixotrix* railroad-worm luciferases: a site-directed mutagenesis survey. **Journal of Luminescence**, v. 22, p. 362-369, 2007b.

VIVIANI, V.R.; ARNOLDI, F.G.C.; NETO, A.J.S.; OEHLMEYER, T.L.; BECHARA, E.J.H.; Ohmiya, Y. "The structural origin and biological function of pH-sensitivity in firefly luciferases." **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 7, p. 159–169, 2008A.

VIVIANI, V.R. *et al.* "The influence of the loop between residues 223-235 in beetle luciferase bioluminescence spectra: a solvent gate for the active site of pH-sensitive luciferases." **Photochem. Photobiol.**, v. 84, p. 138-144, 2008B.

VIVIANI, V.R.; Okawachi, F.M.; Scorsato, V.; Abdalla, F.C. "CCD Imaging of Basal Bioluminescence in Larval Fireflies: Clues on the Anatomic Origin and Evolution of Bioluminescence." **Photochem & photobiol sci.**, 2008C.

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

VIVIANI, V.R.; SCORSATO, V.; PRADO, R.A.; PEREIRA, J.G.C.P.; NIWA, K.; OHMIYA, Y.; BARBOSA, J.A.R.G. "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.

VIVIANI, V.R.; PRADO, R.A.; NEVES, D.R.; KATO, D.; BARBOSA, J.A.A. "A route from darkness to light: Emergence and evolution of luciferase activity in AMP-CoAligases inferred from a mealworm luciferase-like enzyme." **Biochemistry**, v. 52, p. 3963- 3973, 2013.

VIVIANI, V.R.; SIMÕES, A.F.; BEVILAQUA, V.R.; GABRIEL, G.V.; ARNOLDI, F.G.C.; HIRANO, T. "Glu311 and Arg337 stabilize a closed conformation and provide a critical catalytic base and counteraction for green bioluminescence in beetle luciferases." **Biochemistry**. 55: 4764-4776, 2016.

VIVIANI, V.R.; AMARAL D.T.; BEVILAQUA, V.R.; FALASCHI, R.L. "Orfelia-type luciferin and its associated storage protein in the nonluminescent cave worm *Neoditomyia* sp. (Diptera: Keroplatidae) from the Atlantic rainforest: biological and evolutionary implications." **J. Photochem. Photobiol.**, v. 17: 1282, 2018A.

VIVIANI, V.R.; GABRIEL, G.V.M.; BEVILAQUA, V.R.; SIMÕES, A.F.; HIRANO, T.; LOPES-DE-OLIVEIRA, P.S. "The proton and metal binding sites responsible for the pH-dependent green-red bioluminescence color tuning in firefly luciferases." **Scientific Reports**, v. 8: 17594, 2018B.

VIVIANI, V.R.; RODRIGUES, J.S.; AMARAL, D.T.; BEVILAQUA, V.R.; ABDALLA, F.C.; BRANCHINI, B.R.; JOHNSON, C.H. "A new brilliantly blue-emitting luciferin-luciferase system from *Orfelia fultoni* and Keroplatinae (Diptera)" **Scientific reports**, v. 10: 9608, 2020.

WATIKINS, O.C.; SHARPIE, M.L.; PERRY, N.B.; KRAUSE, K.L. "New Zealand glowworm (*Arachnocampa luminosa*) bioluminescence is produced by a firefly like luciferase but an entirely new luciferin." **Scientific reports**, v. 8: 3278, 2018.

WHITE, E.H., McCAPRA, F.; FIELD, G.F.; McELROY, W.D. "The structure and synthesis of firefly luciferin." **J. Am. Chem. Soc.**, v. 83, p. 2402–2403, 1961.

WHITE, E.H., McCAPRA, F.; FIELD G.F. "The structure and synthesis of firefly luciferin." **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, p. 337–343, 1963.

WHITE, E.H.; RAPAPORT, E.; SELIGEER, H.; HOPKINS, T.A. "The chemi and bioluminescence of firefly luciferin: An efficient chemical production of electronically excited states" **Bioorganic Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 92-122, 1971.

WHITMORE, I.; WALLACE, B.A. "DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data." **Nucleic Acids Research**, v. 32, 2004.

WILSON, T. "Comments on the mechanisms of chemi and bioluminescence." **Photochem. Photobiol.**, v. 62, p. 601-606, 1995.

WILSON, T.; HASTINGS, J.W. "Bioluminescence." **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 14, p. 197–230, 1998.

WOOD, K.V. "The chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence." **Photochem. Photobiol.**, v. 62, p. 662–673, 1995.

YE, L.; BUCK, L.M.; SCHAEFFER, H.J.; LEACH, F.R. "Cloning and sequencing of a cDNA for firefly luciferase from *Photuris pennsylvanica*." **Biochim Biophys Acta.**, v.1339, n. 1, p. 39-52, 1997.

ZHOU, B.; TAKAHASHI, S.; TAKEMURA, T.; TANAKA, K.; IMAMURA, S. "Establishment of a firefly luciferase reporter assay system in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*." **J. Gen. Appl. Microbiol.** 2020.



# ANEXOS

## **ANEXO 1- Efeito do fármaco diclofenaco sobre a atividade da enzima tipo-luciferase de *Zophobas morio***

Paralelamente ao projeto de doutorado, foram feitos estudos utilizando-se a enzima tipo-luciferase de *Z. morio* com a finalidade de avaliar seu potencial biotecnológico. Embora a real função biológica dessa enzima ainda permaneça desconhecida, sabe-se atualmente que ela é generalista, sendo capaz de tioesterificar uma ampla gama de substratos carboxílicos (PRADO *et al.*, 2016). Somado a isso, temos sua ocorrência em um órgão excretor e a ativação e oxidação de D-luciferina (um substrato exógeno para esse organismo), o que nos leva a acreditar que talvez essa enzima esteja envolvida em alguma rota de detoxificação/excreção de xenobióticos (VIVIANI, *et al.*, 2013).

Assim sendo, cogitamos a possibilidade de usar esta enzima para estabelecer um ensaio luminescente para seleção de xenobióticos carboxílicos tóxicos. Testamos o efeito de diferentes compostos carboxílicos de origem natural e farmacêutica sobre a atividade luminescente *in vivo* e *in vitro* da enzima.

### **A1.1 Materiais e métodos**

#### **A1.1.1. Efeito de compostos carboxílicos sobre a atividade *in vitro***

A atividade luminescente da enzima tipo-luciferase purificada de *Zophobas morio* foi medida na presença dos ácidos benzóico, 4-hidroxibenzóico, 4-clorobenzóico, cafeico, nicotínico, tiazol-2-carboxílico e *p*-cumarico; e dos fármacos cetoprofeno e diclofenaco. O ensaio foi feito em luminômetro AB 2200 (ATTO, Japão). No ensaio, foram misturados 10 µL da solução estoque do composto (10 mM), 10 µL de D-luciferina de vagalumes (10 mM), 10 µL da enzima purificada (~ 0,002 mg), 5 µL de solução MgATP 80 mM /40 mM e 65 µL de tampão (Tris-HCl 0,10 M, pH 8,0). A concentração final de todos os compostos carboxílicos no ensaio foi de 1 mM.

#### **A1.1.2. Curva de inibição enzimática *in vitro***

Foram realizados testes inibitórios com diferentes concentrações de diclofenaco (0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 e 1 mM). O método de medição foi basicamente o mesmo do item **A1.1.1** com uma pequena modificação: Foram misturados 65 µL de tampão (Tris-HCl 0,10 M pH 8,0), 10 µL da enzima purificada, 10 µL de solução estoque de diclofenaco, 10 µL de

luciferina (10 mM) 5  $\mu$ L de solução Mg/ATP (80mM/40mM). Esse teste foi também realizado com o mutante I327S da enzima tipo-luciferase e com as luciferases de *Macrolampis sp2*, *Phrixothrix hirtus* e *Pyrearinus termitilluminans* com finalidade comparativa.

#### **A1.1.3. Cinética de Inibição**

Para determinar o tipo de inibição do diclofenaco, foi feita uma análise do efeito da concentração de diclofenaco em diferentes concentrações de luciferina (0,03; 0,1; 0,3; 0,7; 1; 5 e 10 mM) ou de ATP (0,03; 0,1; 0,3; 0,7; 1; 3; 4 mM) na velocidade inicial e  $K_M$  da reação. Essas medidas cinéticas para ambos os substratos (D-Luciferina e ATP) foram feitas na presença de três concentrações diferentes do inibidor diclofenaco (0 mM, 0,4 mM e 0,7 mM). A análise foi feita pela construção dos gráficos de saturação e duplo-recíproco (Lineweaver-Burk).

#### **A1.1.4. Modelagem e estudos de docagem com diclofenaco**

A modelagem e docagem foram feitas pelo Dr. Atílio Tomazin do Centro Brasileiro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Modelos ab iniciais da enzima tipo-luciferase foram gerados no I-TASSER (ROY *et al.*, 2010). Através da comparação entre o modelo obtido e os modelos de outras CoA-ligases já cristalizadas (*Aquincola tertiaricarbonis* PDB file ID: 6HE0, *Cryptococcus neoformans* PDB file file: 5K85, *Salmonella typhimurium* PDB file file: 5JRH), o sítio de ligação foi predito. Para os testes de docagem do composto com a enzima do tipo-luciferase, foi utilizado o servidor web CB-Dock (LIU *et al.*, 2020). Além disso, o diagrama de interação proteína-ligante foi gerado usando o Ligplot (WALLACE *et al.*, 1995) e os gráficos moleculares foram modelados usando o programa PyMOL (DeLANO, 2002).

#### **A1.1.5. Bioimagem da atividade *in vivo***

Para analisar o efeito do compostos sobre células vivas, foram misturados em poços de placa tipo Elisa 200  $\mu$ L de cultura de *E. coli* BL-21 expressando o mutante I327S da enzima tipo-luciferase, 20  $\mu$ L das soluções estoque de diclofenaco em diferentes concentrações (concentração final: 0; 1; 10 e 50  $\mu$ M) e 20  $\mu$ L de luciferina de vagalumes 10 mM. Em seguida, foi feita a fotodeteccção por 5-10 minutos usando Câmera CCD *Nightowl II* (Berthold).

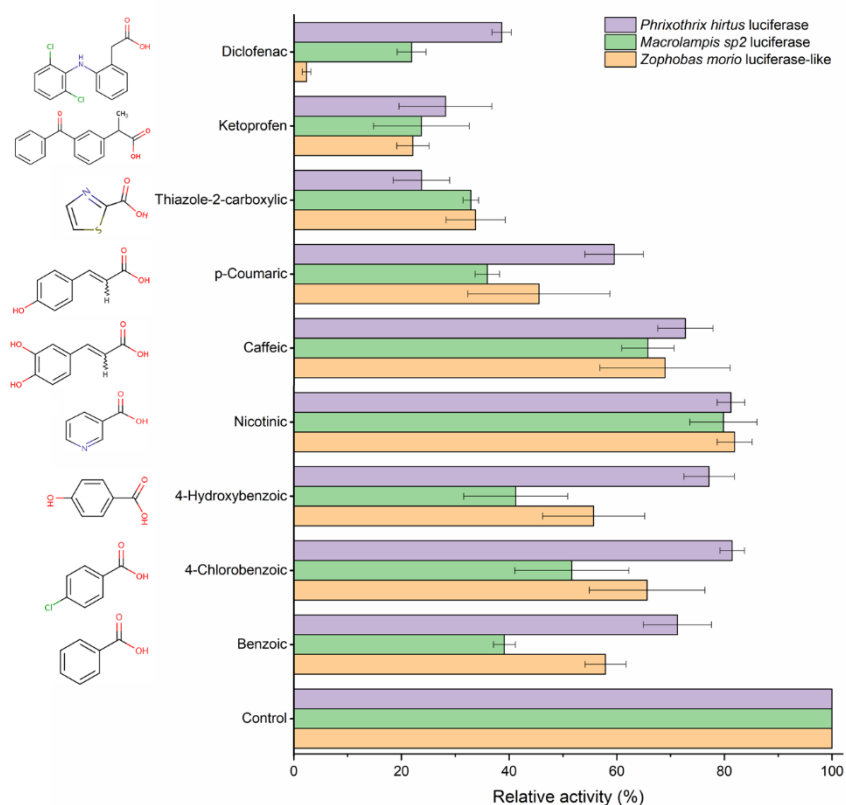
#### A1.1.6. Teste colorimétrico de viabilidade celular

Visando analisar os efeitos de toxicidade do diclofenaco sobre as células foi realizado o teste com CTT (cloridrato de trifeniltetrazólio). O CTT é um reagente incolor que adquire coloração avermelhada na forma reduzida. Desse modo, a presença de coloração nas amostras indica a capacidade redutora e, conseqüentemente, de atividade biológica. O ensaio é similar ao de fotodeteção em câmara CCD. No entanto, no lugar da luciferina, adiciona-se 20 µL de cloridrato de trifeniltetrazólio – CTT (1 mg/mL). Em seguida a placa Elisa é incubada por 2 horas à 37°C e analisada visualmente.

#### A1.2. Resultados e Discussão

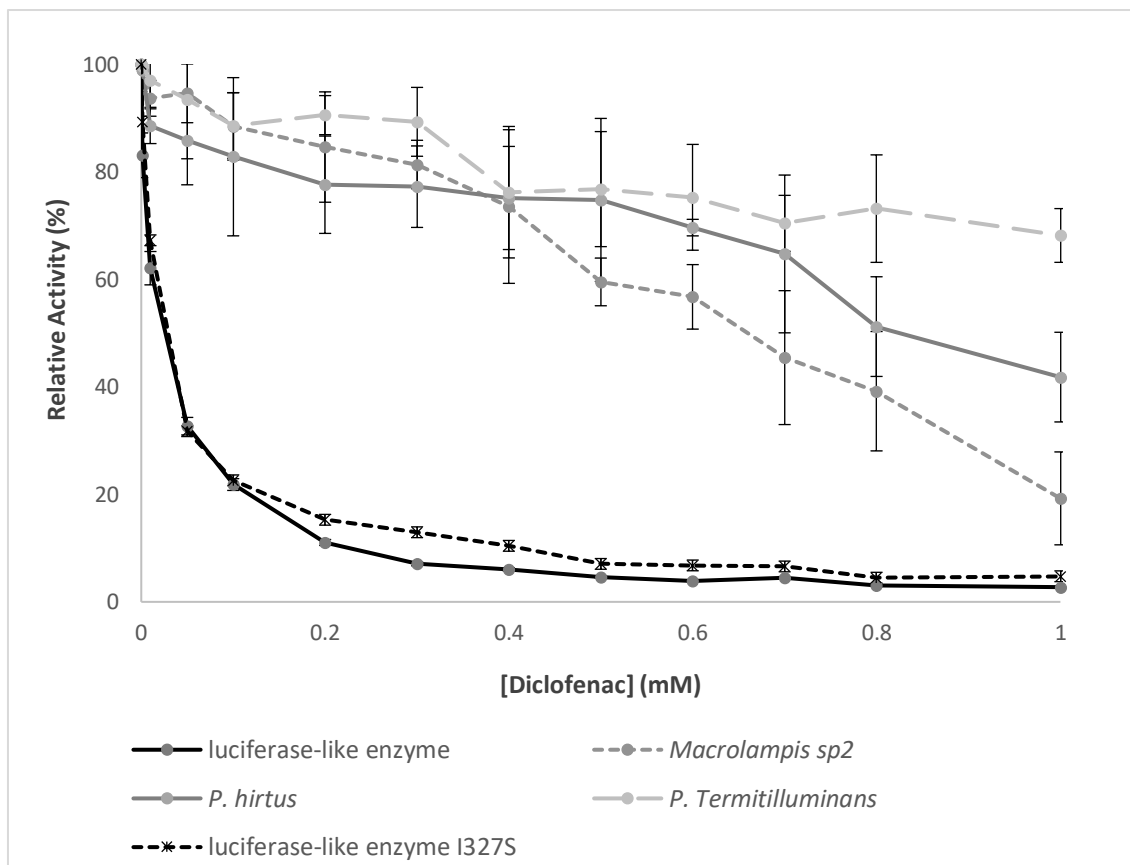
Inicialmente, todos os compostos foram testados na concentração final padrão de 1 mM. A atividade luminescente *in vitro* com a enzima tipo-luciferase purificada foi inibida na presença de alguns compostos como ácido p-cumárico (~50% de inibição) e cetoprofeno (~75% de inibição). No entanto, um composto se destacou dos demais pelo severo efeito sobre a atividade luminescente; Sob as mesmas condições, o fármaco diclofenaco gerou uma inibição superior a 95% da atividade da enzima (**Figura 1**).

Devido ao forte efeito do diclofenaco sobre a atividade luminescente da enzima, foi contruída uma curva de inibição utilizando-se várias concentrações do composto. As luciferases de *Macrolampis* sp2, *Pyrearinus termitilluminans* e *Phrixothrix hirtus*, bem como o mutante I327S da enzima tipo-luciferase de *Z. morio*, também foram analisados com finalidade comparativa (**Figura 2**).



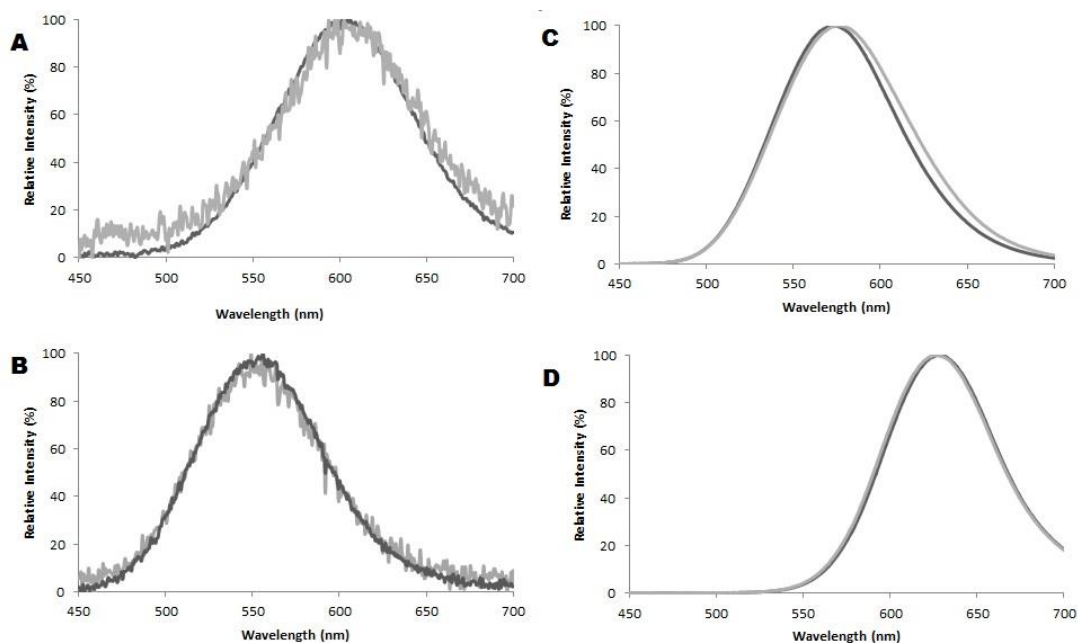
**Figura 1.** Comparativo do efeito de diferentes compostos carboxílicos na concentração final de 1mM sobre a atividade luminescente *in vitro* das enzimas purificadas. **(Roxo)** Luciferase vermelha de *P. hirtus*; **(Verde)** Luciferase do lampírideo *Macrolampis sp2* e **(Laranja)** Enzima tipo-luciferase de *Z. morio*. Fonte: CARVALHO *et al.*, 2020.

Os resultados mostraram que a enzima tipo-luciferase de *Z. morio* é consideravelmente mais sensível ao diclofenaco do que qualquer outra das luciferases testadas. Enquanto a enzima tipo-luciferase possui um  $IC_{50}$  (medida usada em ensaios de inibição que mostra a taxa de inibição de 50% da atividade por um determinado composto) de 20  $\mu M$ , a luciferase de *Macrolampis sp2* (que foi a segunda enzima mais sensível ao diclofenaco) apresentou um  $IC_{50}$  de 700  $\mu M$  (**Figura 2**). Assim, a enzima tipo-luciferase é cerca de 40 vezes mais sensível ao diclofenaco do que as luciferases. O mesmo resultado foi observado com o mutante I327S da enzima tipo-luciferase que tem atividade luminescente mais intensa.



**Figura 2.** Curva de inibição da atividade luminescente *in vitro* na presença de diferentes concentrações de diclofenaco (0.001; 0.01; 0.05; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.8 e 1mM). Fonte: CARVALHO *et al.*, 2020.

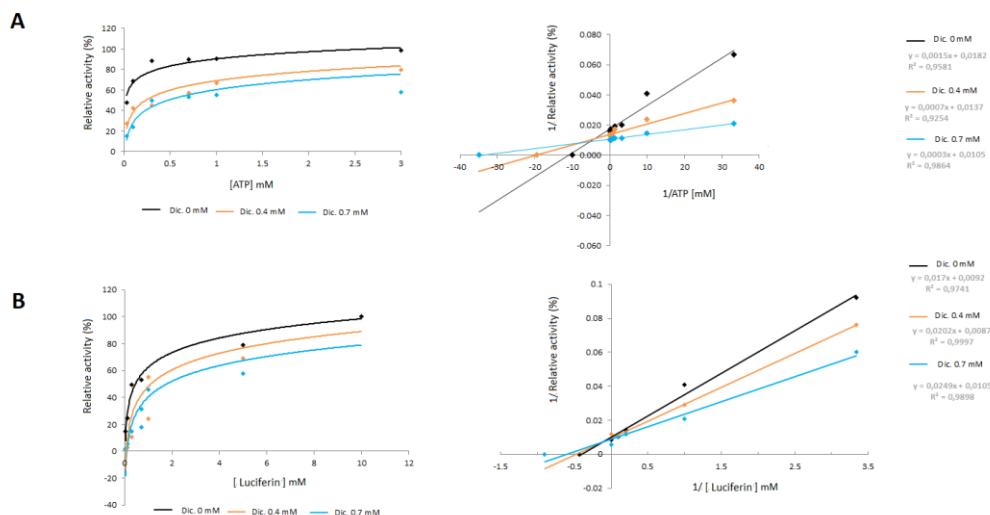
Os efeitos do inibidor diclofenaco aparentam ser restritos à atividade luminescente e nenhuma mudança espectral foi observada na presença desse composto para nenhuma das enzimas testadas (**Figura 3**).



**Figura 3.** Espectro de emissão das luciferases sem o inibidor (cinza escuro) e na presença de 0,5 mM de diclofenaco. **(A)** *Z. morio* enzima tipo-luciferase; **(B)** *Pyrearinus termitilluminaans*; **(C)** *Macrolampis* sp2; **(D)** Luciferase vermelha da cabeça de *Phrixotrix hirtus*. Fonte: CARVALHO *et al.*, 2020.

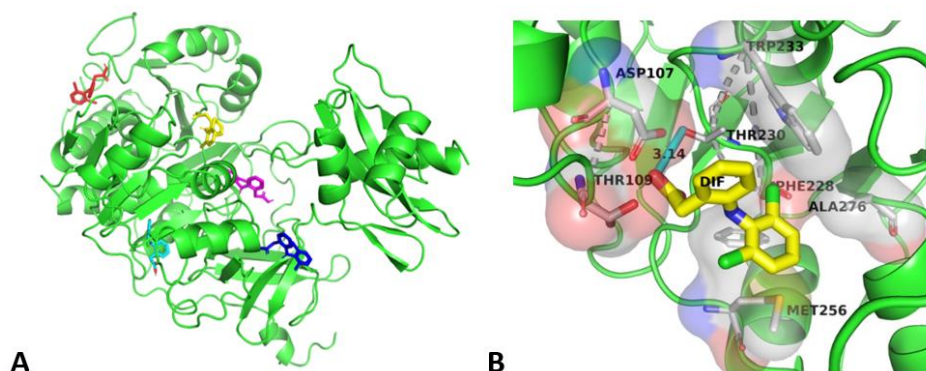
Visando melhor entender o mecanismo de inibição, foi feito o estudo da cinética de inibição do diclofenaco sobre os sítios de ligação para luciferina e ATP da enzima tipo-luciferase na forma selvagem. A análise gráfica mostrou que ocorre inibição do tipo mista tanto para a luciferina quanto para o ATP (**Figura 4**).

Objetivando encontrar o potencial local de ligação do diclofenaco, o Dr. Atílio Tomazini realizou a análise de docagem do composto na estrutura tridimensional da enzima. Foram encontrados cinco candidatos potenciais para locais de ligação do e a sobreposição estrutural simples, entre a enzima tipo-luciferase de *Z. morio* e outras CoA-ligases complexadas com ligante CoA (*Aquincola tertiaricarbonis* PDB files ID: 6HE0, *Cryptococcus neoformans* PDB files ID: 5K85, *Salmonella typhimurium* PDB files ID: 5JRH) indicou que, entre os 5 locais de ligação, o de CoA foi um dos com maior constante de ligação para o fármaco diclofenaco (**Figura 5A**).



**Figura 4:** Cinética de inibição do diclofenaco. **(A)** Sítio para ATP e **(B)** sítio para luciferina. Fonte: CARVALHO *et al.*, 2020.

Além disso, na **Figura 5B** é possível verificar a interação entre os aminoácidos aromáticos (Phe 228, Thr230 e Trp 233), que geralmente são presentes nos sítios ativos de enzimas, sendo o Trp o aminoácido mais conservado na superfície da proteína (DOUGHERTY, 2007) e isso é confirmado com a posição prevista para o diclofenaco na proteína.

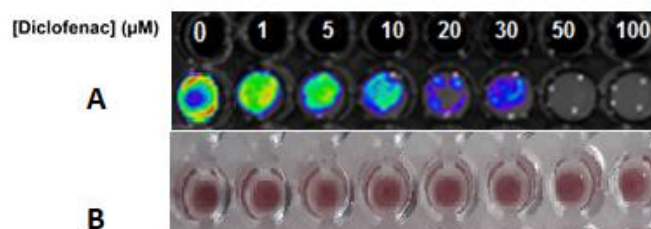


**Figura 5:** Docagem do diclofenaco com a enzima tipo-luciferase. **(A)** Em verde, the I-Tasser *ab initio* model of *Zophobas morio* luciferase-like enzyme. Possíveis posições de docagem do composto em vermelho, magenta, azul claro, amarelo e azul escuro possuem afinidade de ligação de -7,5; -7,4; -6,8; -5,9 e -5,9 kcal/mol respectivamente; **(B)** Docagem do diclofenaco (DIF) no sítio para CoA (molécula em amarelo). Aminoácidos próximos ao ligante na superfície da proteína: Met256, Phe228, Ala276, Thr230, Trp233, Thr109 and Asp107, ligação de hidrogênio (barra azul claro) entre Thr230 e diclofenaco. Fonte: CARVALHO *et al.*, 2020 (adaptado).



A interação entre o inibidor e sítio de ligação para CoA pode ajudar a explicar por que a enzima do tipo-luciferase é consideravelmente mais sensível ao diclofenaco quando comparada às demais luciferases testadas. Atualmente, é aceito que as luciferases de besouros evoluíram a partir de CoA-ligases (VIVIANI, 2002). Considerando que as luciferases de besouros são altamente especializadas para a etapa oxidativa da reação luminescente ao invés da reação de tioesterificação com CoA de outras ligases, o sítio de ligação para coenzima A das luciferases de besouros pode ser vestigial e não tão conservado como no caso de outras CoA-ligases incluindo a enzima tipo-luciferase de *Z. morio*.

Notavelmente, os testes de inibição *in vivo* usando células transformadas com a enzima tipo-luciferase também mostraram alta sensibilidade ao fármaco. Entretanto, o composto não afetou a viabilidade celular mesmo nas maiores concentrações, conforme pode ser averiguado pelo teste colorimétrico de viabilidade celular com tetrazólio - CTT (**Figura 6**), indicando claramente que a inibição da luminescência foi causada pela inibição da enzima e não por morte celular



**Figura 6.** Efeito *In vivo* de diferentes concentrações de diclofenaco em cultura líquida expressando a enzima tipo-luciferase de *Z. morio* na forma selvagem. (A) Bioimagem da bioluminescência detectada em câmara CCD Night Owl; (B) Teste colorimétrico de viabilidade celular (CTT) após 2 horas de incubação. Fonte: CARVALHO *et al.*, 2020.

Todos esses resultados são muito interessantes do ponto de vista biotecnológico. O diclofenaco é um composto não esteroide sintético amplamente utilizado como anti-inflamatório. A persistência desse fármaco no meio ambiente tem sido associada a graves impactos ambientais como ovos quebradiços em aves e alterações citológicas no fígado e rim em peixes e aves (SCHIMITT-JENSEN *et al.*, 2007; HOEGGER *et al.*, 2005).

Na Índia, algumas espécies de abutres quase foram levadas à extinção devido a um declínio abrupto no número populacional causando desequilíbrios ambientais que foram associados com a proliferação de doenças causadas pela decomposição retardada de carcaças. Vários estudos demonstraram claramente que a mortalidade dos indivíduos estava diretamente ligada com a presença dessa droga no ambiente (OAKS *et al.*, 2004; SHULTZ *et al.*, 2004; CUTHBERT *et al.*, 2009).

Métodos analíticos convencionais, como HPLC, podem detectar a presença de diclofenaco em amostras complexas com alta sensibilidade e precisão (SCHIMIT *et al.*, 2018). No entanto, essas técnicas são caras, trabalhosas, demoradas e exigem equipamentos sofisticados, o que as torna inconvenientes para o uso em larga escala no campo. Assim sendo, é desejável o desenvolvimento de métodos simples e rápidos de detecção, como biossensores.

Nesse sentido, um método de análise rápida usando anticorpo monoclonal foi proposto por Huebner *et al.* (2015). Embora eficientes, os custos de produção e manipulação de anticorpos ainda são altos quando comparados ao uso de células microbianas. Também foi proposto um biossensor fluorescente “*light on*” usando células encapsuladas de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas geneticamente com GFP (SCHULLER *et al.*, 2017; SCHIRMER *et al.*, 2018). Utilizando esta técnica, a presença de diclofenaco pode ser detectada por fluorescência na faixa de 10 a 100  $\mu\text{M}$  (SCHIRMER *et al.*, 2018). No entanto, esse método requer microscopia de fluorescência e citometria de fluxo durante a análise, requisitos bastante inconvenientes e dispendiosos para uma análise rápida.

Recentemente, essas mesmas cepas de levedura geneticamente modificadas foram usadas para o desenvolvimento de um dispositivo de fluxo celular microfluídico à base de papel alumínio de uso único. Esse sistema pode detectar diclofenaco na faixa de 10 a 75  $\mu\text{M}$ , mas, novamente, requer microscopia de fluorescência ou espectrofluorimetria para medições de fluorescência (SCHIRMER *et al.*, 2019)

O forte efeito inibitório do diclofenaco especificamente na enzima do tipo-luciferase levanta a possibilidade de usar essa enzima, ou células que a expressam, em biossensores tipo “*light off*”. A faixa de sensibilidade da enzima

do tipo-luciferase ao diclofenaco é praticamente a mesma das cepas de leveduras à base de GFP propostas por Schirmer *et al.* (2019) com um limite de detecção de ~ 10 µM (**Figura 6**). A vantagem do potencial de células bacterianas expressando a enzima do tipo-luciferase é que a manipulação das células de *E. coli* é consideravelmente mais simples do que a de microrganismos eucarióticos, como leveduras. Além disso, as imagens em CCD e medidas de luminometria são mais rápidas e acessíveis.

### A1.3. Referências bibliográficas

CUTHBERT, R.; PRAKASH, V.; BOWDEN, C.; DAS, D.; GEEN, R.E.; JHALA, Y.; PAIN, D.J.; SENACHA, K.R.; SHAH, N. "Taggart MA. Role of veterinary diclofenac in decline of vulture populations in South Asia." **Indian J of Vet Med.**, v. 29, p. 80-85, 2009.

DeLANO. W.L. "**The PyMOL Molecular Viewer.**" DeLano Scientific LLC, San Carlos, California, USA. Disponível em <<http://www.pymol.org>>, 2002.

HOEGER, B.; KOLLNER, B.; DIETRICH, D.R.; HITZFIEL, B. "Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta*)." **Aqua. Toxicol.**, v. 75, p. 53-64, 2005.

HUEBNER, M.; WEBER, E.; NIESSNER, R.; BOUJDAY, S.; KNOOP, D. "Rapid analysis of diclofenac in freshwater and wastewater by a monoclonal antibody-based highly sensitive ELISA." **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 407, n. 29, p.8873–8882, 2015.

LIU, Y.; WANG, L.; PAN, B.; WANG, C.; BAO, S.; NIE, X. "Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna*." **Aqua Toxicol.**, v. 183, p. 104-113, 2017.

OAKS, J.L.; GILBERT, M.; VIRANI, M.Z.; WATSON, R.T.; METEYER, CU.; RIDEOUT, B.A.; SHIVAPRASAD, H.L.; AHMED, S.; CHAUDHRY M.J.; ARSHAD, M.; MAHMOOD, S.; ALI, A.; KHAN, A.A. "Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan." **Nature**, v. 427, p. 630-633, 2004.

PRADO, R.A.; SANTOS, C.R.; KATO, D.; MURAKAMI, M.T.; VIVIANI, V.R. "The dark and bright sides of an enzyme: threedimensional structure of the N-terminal domain of *Zophobas morio* luciferase-like enzyme, inferences on the biological function and origin of oxygenase/luciferase activity." **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 17, p. 08-31, 2016.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. "I-TASSER: A Unified Platform for Automated Protein Structure and Function Prediction." **Nature protocols**, v. 5, 2010.

SCHIMIT, S.; HOFFMANN, H.; GARBE, L.; SCHNEIDER, R.J. "Liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection of diclofenac and related compounds in water samples." **J of chrom A.**, v. 1538, p. 112-116, 2018.

SCHIRMER, C.; POSSECKARDTA, J.; KICKA, K.; REBATSCHKEA, K.; FICHTNERA, W.; OSTERMANN, K.; SCHULLER, A.; RODEL, G.; MERTIGA, M. Encapsulating genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* cells in a flowthrough device towards the detection of diclofenac in wastewater. **Journal of Biotechnology**, v. 284, p. 75-83, 2018.

SCHIRMER, C.; POSSECKARDTA, J.; SCHRODER, M.; GLASER, M.; HOWITZ, S.; SCHARFF, W.; MERTIG, M. Portable and low-cost biosensor towards on-site detection of diclofenac in wastewater. **Talanta**, v. 203, p. 242-247, 2019.

SCHULLER, A.; RODEL, G.; OSTERMANN, K. "Tuning the sensitivity of the PDR5 promoter based detection of diclofenac in yeast biosensors." **Sensors**, v. 17, p. 1506–1522, 2017.

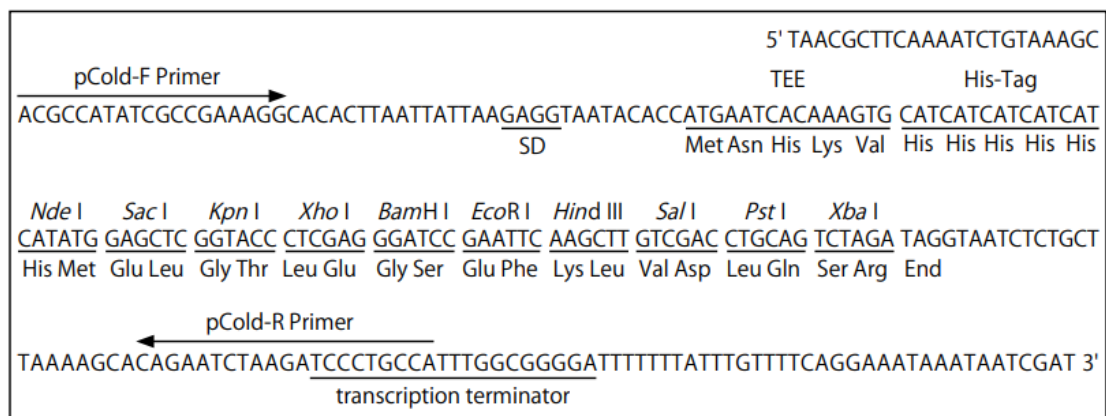
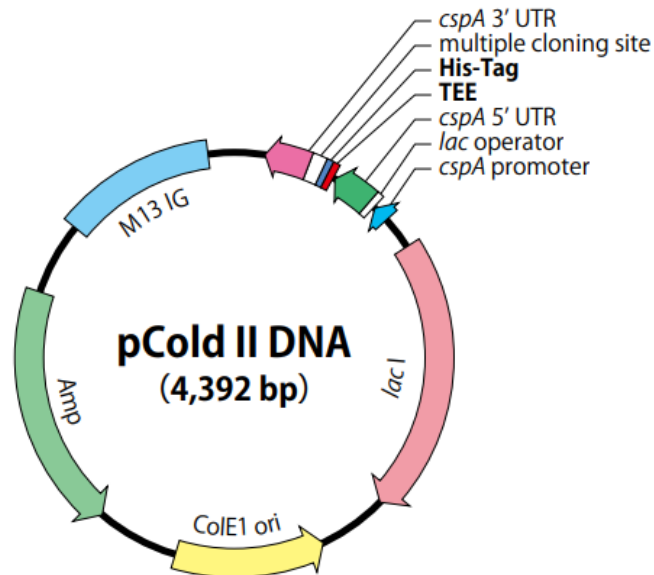
SHULTZ, S.; BARAL, H.S.; CHARMAN, S.; CUNNINGHAM, A.A.; DAS, D.; GHALSASI, D.R., GOUDAR, M.S.; GREEN, R.E.; JONES, A.; NIGHOT, P.; PAIN, D.J.; PRAKASH, V. "Diclofenac poisoning is widespread in declining vulture populations across the Indian subcontinent." **Biological Sciences**, v. 271, p. 458-460, 2004

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

VIVIANI, V.R.; PRADO, R.A.; NEVES, D.R.; KATO, D.; BARBOSA, J.A.A. "A route from darkness to light: Emergence and evolution of luciferase activity in AMP-CoAligases inferred from a mealworm luciferase-like enzyme." **Biochemistry**, v. 52, p. 3963- 3973, 2013.

WALLACE, A.C.; LASKOWSKI, R.A.; THORNTON, J.M. "LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions." **Prot Eng, Design and Select**, v. 8, n. 2, p. 127-134, 1995.

## ANEXO 2- Mapa e sítio múltiplo de clonagem do vetor pCold II (Takara Cat.#3362)



Disponível em:

<[https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/3360/3360-3364\\_e.v1807Da.pdf](https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/3360/3360-3364_e.v1807Da.pdf)>

### **ANEXO 3 - Produção científica**

#### **Artigos publicados:**

CARVALHO, M.C.; TOMAZINI, A.; PRADO, R.A.; VIVIANI, V.R. Selective Inhibition of *Zophobas morio* luciferase-like enzyme luminescence by diclofenac and potential suitability for light off biosensing. **Luminescence** (2020). doi.org/10.1002/bio.3952

CARVALHO, M.C.; TOMAZINI, A.; AMARAL, D.T.; MURAKAMI, M.T.; VIVIANI, V.R. Luciferase isozymes from the Brazilian *Aspisoma lineatum* (Lampyridae) firefly: Origin of efficient pH-sensitive lantern luciferases from fat body pH-insensitive ancestors. **Photochemical and Photobiological Sciences** (2020). doi.org/10.1039/D0PP00272K

#### **Artigo em fase de publicação:**

BEVILAQUA V.R.; CARVALHO, M.C.; PELENTIR, G.F.; TOMAZINI, A.; MURAKAMI, M.T.; VIVIANI, V.R. Effect of C-terminal deletion on bioluminescence properties of green and red emitting luciferases and luciferase-like enzymes.