

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

**GABRIELLE RODRIGUES BENITES**

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS  
LUCIFERASES DE *Cratomorphus distinctus*  
(LAMPYRIDAE) E *Euryopa clarindae* (PHENGODIDAE) E  
SONDAGEM DE SUAS APLICABILIDADES**

**Sorocaba**

**2024**

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

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS LUCIFERASES DE  
*Cratomorphus distinctus* (LAMPYRIDAE) E *Euryopa clarindae* (PHENGODIDAE)  
E SONDAÇÃO DE SUAS APLICABILIDADES**

GABRIELLE RODRIGUES BENITES

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como parte do requisito para obtenção do Título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientação: Prof. Dr. Vadim R. Viviani-  
UFSCar *campus* Sorocaba

SOROCABA

2024



**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

---

---

Prof. Dr. Vadim Viviani

---

Prof. Dr. Alexandre Donizeti Cavagis

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iseli Lourenço Nantes

## Agradecimentos

Agradeço a minha família por todo o suporte, em especial a minha mãe, Maria Inês Rodrigues, que sempre me apoiou e acreditou em mim;

Ao meu orientador, prof. Dr. Vadim Viviani, pela oportunidade de estudo e trabalho, além de toda a estrutura necessária, financiamento e ensinamentos que se sucederam;

Aos meus colegas/amigos de laboratório, em especial a Gabriel Felder Pelentir, que colaborou diretamente na execução do projeto e que não mede esforços para ensinar e ajudar a todos; à Dra. Jaqueline R. da Silva e Dra. Vanessa R. Bevilaqua que sanaram muitas dúvidas e questionamentos relacionados à área de estudo; aos alunos de Iniciação Científica Murilo D. de Medeiros, Gabriel Fracacio e Daniel Siqueira;

A todo o grupo técnico-administrativo, da limpeza e manutenção da Universidade Federal de São Carlos *campus* Sorocaba que mantém essa universidade em funcionamento com muito zelo;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) por ter possibilitado a realização do meu mestrado;

Agradeço também a CNPq (130866/2022-9; 405060/2021-1) e FAPESP (2022/04800-0) por todo o suporte financeiro que possibilitou minha pesquisa.

“Quanto mais aprendo, mais percebo o quanto preciso aprender”  
(Michelangelo)

## Resumo

Luciferases são as enzimas que catalisam a reação de bioluminescência em organismos como besouros. A bioluminescência tem sido utilizada com propósitos bioanalíticos há décadas, incluindo ensaios de detecção de ATP, ensaios enzimáticos, contaminação microbiológica de produtos na indústria alimentícia, como gene repórter para biossensores de poluentes, indicadores de pH intracelular e metais pesados, e bioimagem. Nosso grupo de pesquisa clonou o maior número e variedade de luciferases de besouros no mundo, algumas já tendo aplicações bioanalíticas, entretanto ainda existem várias luciferases e formas mutantes com propriedades interessantes que produzimos, mas que ainda não foram bem caracterizadas e aplicadas. Com o objetivo de ampliar a gama de aplicações, especialmente em biossensores de pH e metais potencialmente tóxicos, realizamos a caracterização das luciferases pH-sensitiva do lampirídeo *C. distinctus* e da emissora de luz laranja do fengodídeo *E. clarindae*. Para isso, fizemos a subclonagem do cDNA da luciferase de *C. distinctus* e *E. clarindae* em vetor pCold, transformamos bactérias *E. coli* BL21DE3 e expressamos e purificamos as duas luciferases por cromatografia de afinidade em resina de níquel-agarose. Os ensaios mostraram que a luciferase de *C. distinctus* possui uma eficiência catalítica alta para ATP e menor para LH<sub>2</sub>, quando comparada a outras luciferases de lampirídeos, além de ter uma excelente sensibilidade a pH e a metais, principalmente a mercúrio. A luciferase de *E. clarindae* apresentou K<sub>M</sub> alto para LH<sub>2</sub> e baixo para ATP, quando comparada às luciferases de outros fengodídeos. Dessa forma, a luciferase de *C. distinctus* apresenta potencial aplicabilidade como proteína sensora de mercúrio e pH; enquanto que a luciferase insensitiva de *E. clarindae* tem potencial como gene repórter. Além disto, a luciferase emissora de luz laranja de *E. clarindae* constitui mais um modelo importante para compreender a relação estrutura x espectros de bioluminescência em luciferases de coleópteros e a origem das diferentes cores de bioluminescência.

**Palavras-chave:** Luciferases; biossensor; *C. distinctus*; *E. clarindae*.

## Abstract

Luciferases are the enzymes that catalyze the bioluminescence reaction in organisms such as beetles. Bioluminescence has been used for bioanalytical purposes for decades, including ATP detection assays, enzymatic assays, microbiological contamination of products in the food industry, as a reporter gene for pollutant biosensors, intracellular pH and heavy metal indicators, and bioimaging. Our research group has cloned the largest number and variety of beetle luciferases in the world, some already having bioanalytical applications, however there are still several luciferases and mutant forms with interesting properties that we have produced, but which have not yet been well characterized and applied. With the aim of expanding the range of applications, especially in biosensors for pH and potentially toxic metals, we carried out the characterization of the pH-sensitive luciferases from the lampyrid *C. distinctus* and the orange light-emitting luciferase from the phengodid *E. clarindae*. To achieve this, we subcloned the luciferase cDNA from *C. distinctus* and *E. clarindae* into a pCold vector, transformed *E. coli* BL21DE3 bacteria and expressed and purified the two luciferases by affinity chromatography on nickel-agarose resin. The tests showed that the *C. distinctus* luciferase has a high catalytic efficiency for ATP and lower for LH<sub>2</sub>, when compared to other lampyrid luciferases, in addition to having excellent sensitivity to pH and metals, especially mercury. The *E. clarindae* luciferase showed a high K<sub>M</sub> for LH<sub>2</sub> and low for ATP, when compared to luciferases from other phengodids. Thus, *C. distinctus* luciferase has potential applicability as a mercury and pH sensor protein; while the insensitive luciferase from *E. clarindae* has potential as a reporter gene. Furthermore, the orange light-emitting luciferase from *E. clarindae* constitutes another important model to understand the structure x bioluminescence spectra relationship in coleopteran luciferases and the origin of the different bioluminescence colors.

**Keywords:** Luciferases; biosensor; *C. distinctus*; *E. clarindae*.

## Lista de abreviaturas e siglas

**Al1:** Luciferase de *A. lineatum* isoforma 1

**AmyLuc:** Luciferase de *A. vivianii*

**ATP:** Trifosfato de Adenosina

**BicLuc:** Luciferase de *B. lividipennis*

**CCD:** Dispositivo de carga acoplada (*Charge-Coupled Device*)

**cps:** *Counts* por segundo

**CrtLuc:** Luciferase de *C. distinctus*

**DTT:** Ditioneitol

**EDTA:** Ácido etilondiamina tetracético

**GFP:** *Green Fluorescent Protein* ou proteína verde fluorescente

**IPTG:** Isopropil 2-D-tiogalactopiranosídeo

**LB:** Meio Luria Bertani

**LH<sub>2</sub>:** D-luciferina

**MacLuc:** Luciferase de *Macrolampis sp2*

**Ni-NTA:** Ácido níquel-nitrilotriacético

**SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio

**TAE:** Tris-Acetato-EDTA

**TEMED:** Tetrametiletilenodiamina

**TRIS:** Tris- hidroximetilaminometano



## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Exemplos de besouros bioluminescentes: (a) <i>Amydetes vivianii</i> (lampirídeo); (b) <i>Pyrophorus angustus</i> (elaterídeo) e (c) <i>Phrixotrix hirtus</i> (fengodídeo). Fonte: adaptado de Pelentir <i>et al.</i> , 2019; Amaral <i>et al.</i> , 2016; 2017.....	13
<b>Figura 2.</b> Mecanismo da reação bioluminescente catalisada pela luciferase de besouros. Fonte: DAY; TISI; BAILEY, 2004.....	14
<b>Figura 3.</b> Mecanismo da reação de oxidação da luciferina de coleópteros luminescentes catalisada pela luciferase, com consumo de ATP e O <sub>2</sub> . O esquema mostra somente um dos mecanismos possíveis de determinação das cores de bioluminescência, o processo de tautomerização ceto-enol. Fonte: BECHARA; VIVIANI, 2015. ....	16
<b>Figura 4.</b> Mecanismo proposto de modulação de cor da bioluminescência pelo pH e metais pesados divalentes em luciferases de vagalume. Fonte: VIVIANI <i>et al.</i> 2018. ....	19
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de modulação de cores nas luciferases insensitvas emissoras de luz verde e vermelha. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA <i>et al.</i> , 2019.....	21
<b>Figura 6.</b> Vagalume <i>C. distinctus</i> em (a) fase adulta e (b) fase larval. Fonte: VIVIANI <i>et al.</i> , 2004. ....	26
<b>Figura 7.</b> Esquema simplificado da metodologia empregada para subclonagem, expressão, purificação e caracterização das luciferases. Fonte: autoria própria. ....	33
<b>Figura 8.</b> SDS-PAGE de diferentes etapas da extração e purificação da luciferase de <i>C. distinctus</i> . (A) Homogenato bacteriano; (B) extrato bruto; (C) precipitado; (D) escoamento; (PM) padrões de peso molecular; (E) fração da 1 <sup>o</sup> lavagem com 20 mM de imidazol; (F) fração da 2 <sup>o</sup> lavagem; (G) fração da 1 <sup>o</sup> eluição com 250 mM de imidazol; (H) fração da 2 <sup>o</sup> eluição; (I) fração da 3 <sup>o</sup> eluição. Fonte: autoria própria. ....	34
<b>Figura 9.</b> Efeito do pH na atividade bioluminescente da luciferase de <i>C. distinctus</i> . Fonte: autoria própria.....	36
<b>Figura 10.</b> Estabilidade da luciferase de <i>C. distinctus</i> a 37°C. Fonte: autoria própria.....	37
<b>Figura 11.</b> Padrão cinética da reação bioluminescente da luciferase de <i>C. distinctus</i> . Fonte: autoria própria.....	38
<b>Figura 12.</b> Efeito do pH no espectro de bioluminescência da luciferase de <i>C. distinctus</i> . Fonte: autoria própria.....	40
<b>Figura 13.</b> Efeito de pH na razão de intensidade de luz verde e vermelha. Fonte: autoria própria. ....	41

<b>Figura 14.</b> Efeito comparativo da adição de sais $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , $\text{NiSO}_4$ , $\text{ZnSO}_4$ , $\text{CdSO}_4$ , $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ (concentração final = 1 mM) no espectro de emissão da luciferase de <i>C. distinctus</i> . Fonte: autoria própria.....	42
<b>Figura 15.</b> Efeito de metais no espectro de bioluminescência da luciferase de <i>C. distinctus</i> : a) $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ; b) $\text{CdSO}_4$ ; c) $\text{ZnSO}_4$ ; d) $\text{NiSO}_4$ ; e) $\text{Li}_2\text{SO}_4$ . Fonte: autoria própria.....	43
<b>Figura 16.</b> Efeito da adição de 1mM dos sais $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , $\text{NiSO}_4$ , $\text{ZnSO}_4$ , $\text{CdSO}_4$ , $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ na atividade bioluminescente da luciferase de <i>C. distinctus</i> . Fonte: autoria própria. ....	44
<b>Figura 17.</b> Fotografia da bioluminescência das luciferases pH-sensitivas na presença de diferentes metais: Al1 ( <i>A. lineatum 1</i> ), Amy ( <i>A. viviani</i> ), Bic ( <i>B. lividipenis</i> ), Crt ( <i>C. distinctus</i> ) e Mac ( <i>Macrolampis sp2</i> ). Concentração final de 1 mM de $\text{LiSO}_4$ , $\text{NiSO}_4$ , $\text{ZnSO}_4$ , $\text{CdSO}_4$ e $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ Obtida com Motorola Edge 20 Pro. Fonte: autoria própria. ....	45
<b>Figura 18.</b> Fengodídeo emissor de luz laranja: (A) Macho adulto de <i>Euryopa clarindae</i> ; (B) Indivíduo adulto de <i>E. clarindae</i> exibindo bioluminescência no corpo; (C) Indivíduo adulto de <i>E. clarindae</i> exibindo bioluminescência na cabeça (VIVIANI <i>et al.</i> , 2024). ....	47
<b>Figura 19.</b> Efeito do pH na atividade bioluminescente da luciferase de <i>E. clarindae</i> . Fonte: autoria própria.....	48
<b>Figura 20.</b> Espectro de bioluminescência in vitro da luciferase de <i>Euryopa clarindae</i> e imagem da bioluminescência in vitro na presença de D-luciferina, magnésio e ATP (VIVIANI <i>et al</i> , 2023).....	50

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Primers utilizados na subclonagem da luciferase de <i>C. distinctus</i> .....	29
<b>Tabela 2.</b> Comparação das propriedades cinéticas e espectrais de luciferases de lampírideos. ....	39
<b>Tabela 3.</b> Propriedades dos espectros de bioluminescência da luciferase de <i>C. distinctus</i> na presença de diferentes metais (concentração final de 1 e 2 mM).....	42
<b>Tabela 4.</b> Efeito da adição de 2 mM de diferentes metais no espectro de bioluminescência de luciferases de lampírideos. ....	46
<b>Tabela 5.</b> Comparação de propriedades estruturais e cinéticas de diferentes luciferases de coleópteros. ....	49
<b>Tabela 6.</b> Propriedades cinéticas da luciferase no extrato bruto e purificada.....	51

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Bioluminescência .....	12
1.2. Luciferases de besouros .....	14
1.3. Mecanismos propostos de modulação de espectros .....	15
1.4. Relação entre estrutura e espectros de bioluminescência.....	17
1.4.1. Luciferases pH-sensitivas .....	18
1.4.2. Luciferases pH-insensitivas (elaterídeos e fengodídeos) .....	20
1.5. Aplicabilidade da bioluminescência .....	21
1.5.1. Ensaio de quantificação de ATP .....	21
1.5.2. Genes repórteres.....	22
1.5.3. Biossensores .....	23
1.5.4. Uso de luciferases de vagalumes como indicadores de pH .....	23
1.5.5. Uso de luciferases como sensores de metais pesados.....	24
1.6. Novas luciferases e sua potencialidade bioanalíticas .....	25
1.6.1. A luciferase do vagalume <i>Cratomorphus distinctus</i> .....	25
1.6.2. Luciferases de fengodídeos.....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVOS .....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
5.1. Luciferase de <i>Cratomorphus distinctus</i> .....	34
5.1.1. Expressão e purificação.....	34
5.1.2. Efeito do pH na atividade bioluminescente .....	35
5.1.3. Termoestabilidade .....	36
5.1.4. Padrão cinético da reação luminescente .....	37
5.1.5. Afinidade pelos substratos.....	38
5.1.6. Constante catalítica e eficiências catalíticas .....	38
5.1.7. Efeito do pH no espectro de bioluminescência .....	39
5.1.8. Aplicabilidade como indicador de pH .....	40
5.1.9. Efeito de metais pesados no espectro de bioluminescência .....	41
5.1.10. Efeito dos metais na atividade bioluminescente.....	43
5.1.11. Aplicabilidade como sensor de metais: Comparação com outras luciferases	44
5.2. A Luciferase emissora de luz laranja do fengodídeo <i>Euryopa clarindae</i> .....	47
5.2.1. Efeito do pH na atividade bioluminescente .....	47

5.2.2.	Propriedades cinéticas.....	48
5.2.3.	Espectro de bioluminescência .....	50
5.3.	Subclonagem, expressão e propriedades da luciferase purificada de <i>E. clarindae</i> .....	50
5.3.1.	Aplicabilidade bioanalítica potencial da luciferase de <i>Euryopa clarindae</i> .....	51
6.	CONCLUSÕES.....	52
7.	PERSPECTIVAS .....	53
8.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

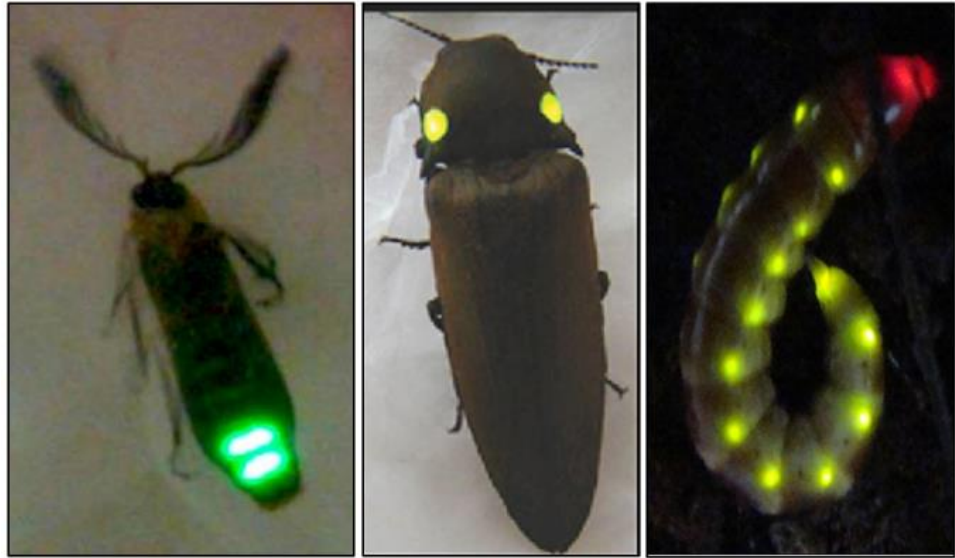
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Bioluminescência

A bioluminescência é a emissão de luz fria e visível por organismos vivos. Ela decorre de reações químicas exotérmicas nas quais substratos genericamente denominados de luciferinas são oxidados por enzimas conhecidas por luciferases (HASTINGS, 1983). Ela é encontrada em bactérias, dinoflagelados, moluscos, cnidários, artrópodes e cordados (HERRING, 1987; ELLIS; OAKLEY, 2016; HASTINGS, 1983; HADDOCK *et al.*, 2010).

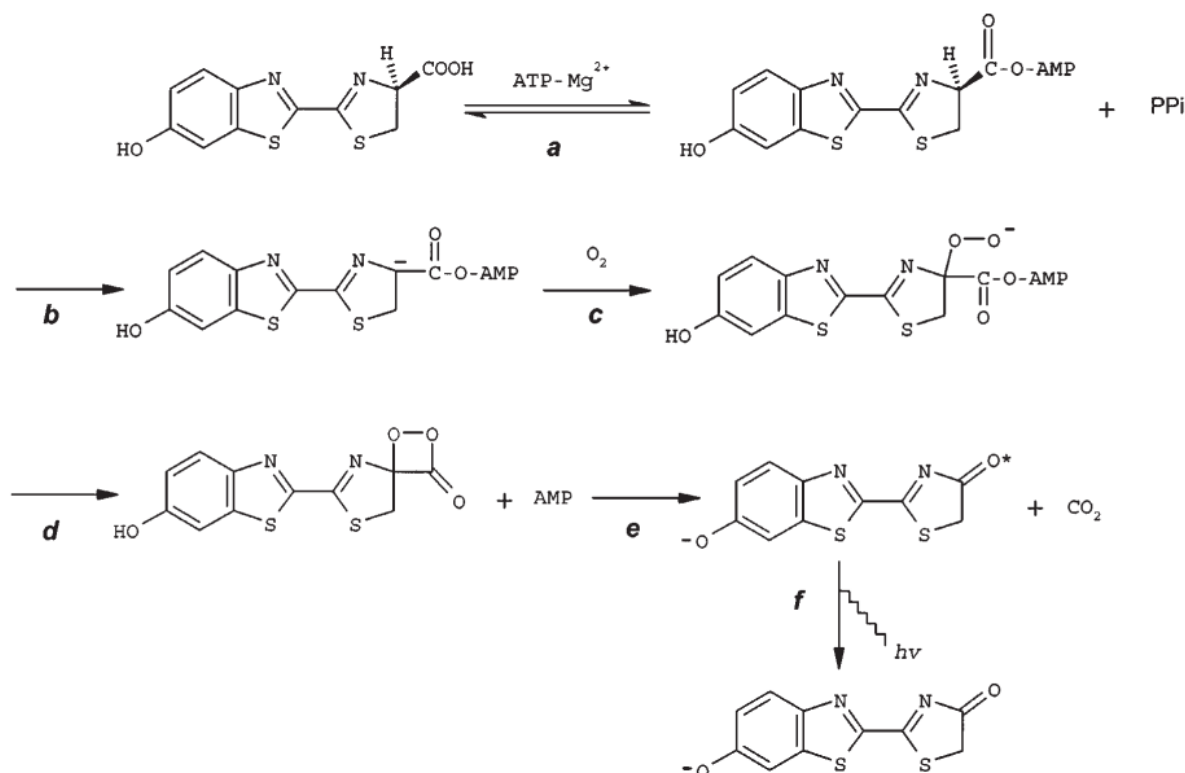
De acordo com a estrutura química das luciferinas e molecular das luciferases, estima-se que bioluminescência surgiu pelo menos trinta vezes independentemente ao longo da história evolutiva em diferentes organismos. Tem funções comunicativas interespecíficas ou intraespecíficas como defesa, corte sexual, repulsão de predadores, atração de presas, territorialidade, entre outros (HASTINGS, 1983; HADDOCK *et al.*, 2010).

A bioluminescência em insetos ocorre principalmente nas ordens Coleoptera e Diptera (VIVIANI, 2002). Entre os coleópteros, ela ocorre principalmente na superfamília Elateroidea que inclui as famílias *Lampyridae*, *Elateridae* e *Phengodidae* (**Fig. 1**), com representantes conhecidos popularmente como vagalumes, pirilampos e trenzinhos, respectivamente (LAWRENCE; NEWTON, 1995; CROWSON, 1972; BECHARA; VIVIANI, 2015).



**Figura 1.** Exemplos de besouros bioluminescentes: (a) *Amydetes vivianii* (lampirídeo); (b) *Pyrophorus angustus* (elaterídeo) e (c) *Phrixotrix hirtus* (fengodídeo). Fonte: adaptado de Pelentir *et al.*, 2019; Amaral *et al.*, 2016; 2017.

O sistema bioluminescente de coleópteros é um dos mais estudados. A reação bioluminescente dos vagalumes depende de uma luciferina benzotiazólica, ATP, magnésio ( $Mg^{2+}$ ) e uma luciferase, ocorrendo em 2 etapas. Primeiramente, ocorre a adenilação da luciferina benzotiazólica na presença do íon magnésio e ATP, com a liberação de um pirofosfato e formação de adenilato de luciferina. Na segunda etapa, ocorre a oxidação do adenilato de luciferina por oxigênio molecular liberando AMP e formando um intermediário dioxetanona, rico em energia e instável, que se cliva em  $CO_2$  e oxiluciferina eletronicamente excitada que decai para o estado fundamental e emitindo um fóton de luz visível na região entre o verde e o vermelho (**Fig.2**) (McELROY; DELUCA, 1978; WILSON; HASTINGS, 1998).



**Figura 2.** Mecanismo da reação bioluminescente catalisada pela luciferase de besouros. Fonte: DAY; TISI; BAILEY, 2004.

## 1.2. Luciferases de besouros

As luciferases de besouros emitem luz na faixa espectral que varia do verde (534 nm) ao vermelho (626 nm) usando a mesma luciferina (VIVIANI; BECHARA, 1993; VIVIANI, 2002).

As luciferases de coleópteros podem ser pH-sensitivas ou insensitivas (VIVIANI; BECHARA, 1995). As primeiras, encontradas em vagalumes lampírideos, têm mudança do espectro do verde para a vermelho em pH ácido, presença de metais pesados como zinco e chumbo e aumento de temperatura (SELIGER; McELROY, 1964). Por outro lado, luciferases de fengodídeos e elaterídeos, são insensitivas às mesmas condições citadas acima (VIVIANI; BECHARA, 1995). Atualmente, sabe-se que o mecanismo estrutural de modulação da cor não é o mesmo em luciferases pH-sensitivas e insensitivas (VIVIANI; BECHARA, 1995; VIVIANI *et al.*, 2001; SELIGER; Mc ELROY, 1964; VIVIANI *et al.*, 2008).

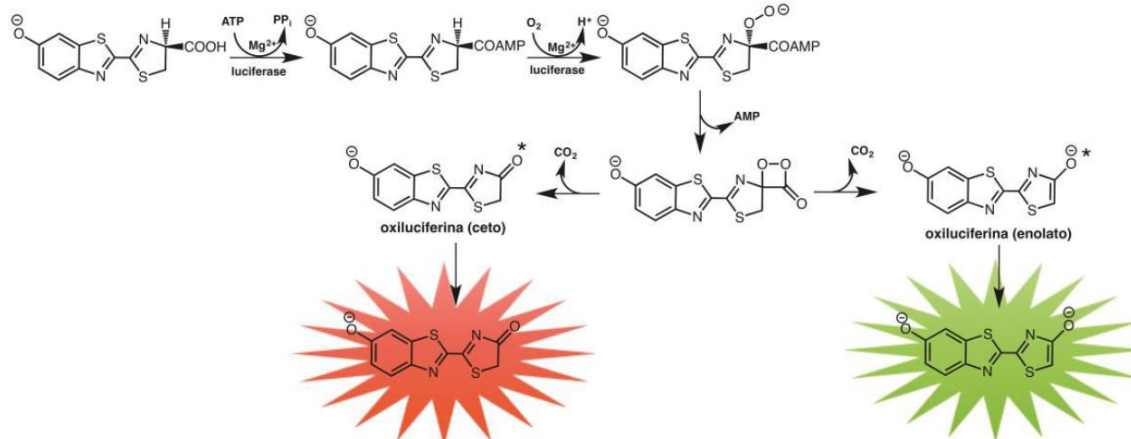


### 1.3. Mecanismos propostos de modulação de espectros

Alguns mecanismos físico-químicos fundamentais foram propostos para explicar a modulação da cor em luciferases de besouros: a polaridade do sítio ativo (efeitos não-específicos), interações ácido-básicas que afetam a estrutura da oxiluciferina (efeitos específicos) e a geometria do sítio ativo.

**Efeitos não-específicos.** Os efeitos não-específicos se referem à polaridade do sítio ativo e sua interação com a oxiluciferina, que é uma molécula mais polar no estado excitado. Quando o microambiente é polar, há uma maior interação entre solvente e oxiluciferina excitada, o que estabiliza e diminui sua energia, gerando uma emissão deslocada para o vermelho. Por outro lado, quando o solvente é apolar, a emissão se desloca em sentido contrário, para o azul (DE LUCA, 1969). Ugarova e Brovko (2002) propuseram que quando o solvente, devido a uma maior mobilidade, consegue se reorganizar ao redor da oxiluciferina, a energia do estado excitado diminui e o espectro de emissão é avermelhado. Em contrapartida, se o solvente tiver dificuldade em se rearranjar ao redor da molécula excitada, em uma estrutura mais rígida, a luz emitida será mais azulada.

**Interações ácido-base.** De acordo com White *et al.* (1971), um dos fatores que afetariam o espectro da luz emitida pela reação de bioluminescência seria um processo de tautomerização da oxiluciferina excitada, na presença de bases, na qual a forma enólica resultaria na emissão de luz verde e a forma ceto na vermelha. Dessa forma, o balanço da forma ceto-enólica determinaria o espectro de emissão. De acordo com esta hipótese, no sítio ativo da luciferase, uma base próxima do carbono C5' estaria envolvida com a abstração de próton e tautomerização (**Fig.3**).



**Figura 3.** Mecanismo da reação de oxidação da luciferina de coleópteros luminescentes catalisada pela luciferase, com consumo de ATP e O<sub>2</sub>. O esquema mostra somente um dos mecanismos possíveis de determinação das cores de bioluminescência, o processo de tautomerização ceto-enol. Fonte: BECHARA; VIVIANI, 2015.

**Geometria do sítio ativo.** McCapra *et al.* (1994) propuseram que o grau de rotação dos anéis tiazínicos da oxiluciferina excitada determinaria os espectros de emissão. De acordo com esta hipótese, no estado excitado, a restrição da rotação dos anéis na forma planar emitiria luz azul enquanto que o relaxamento dos anéis para forma rotacionada 90° gerariam luz vermelha. Entretanto, esta hipótese atualmente carece de sustentação teórica e experimental.

**Conjugação da oxiluciferina.** Posteriormente, Branchini *et al.* (2004) propuseram que o espectro seria determinado pelo estado de conjugação da oxiluciferina no estado excitado, sob influência de interações com o sítio-ativo, de modo que a cor verde seria resultado da configuração -N=C-C=N- da oxiluciferina, enquanto que a vermelha seria resultado da configuração =N-C=C-N=.

**Presença de cargas.** Branchini (1998) e Viviani *et al.* (2000) mostraram que um resíduo positivamente carregado (R218) poderia ser responsável por estabilizar o grupo fenolato da oxiluciferina durante a etapa de emissão de luz, produzindo luz verde, já que substituições neste resíduo geravam mutantes emissores de luz vermelha. Entretanto, essa mutação não teve efeito significativo na luciferase vermelha de *P. hirtus*. Por outro lado, a presença de sulfato de guanidina leva a um deslocamento espectral para o azul nesta luciferase, indicando que a emissão de luz

vermelha se deve à ausência de uma cadeia lateral positiva próxima ao grupo fenolato (VIVIANI *et al.*, 2000). Posteriormente, Viviani *et al.*, (2016), mostraram que a substituição L337R leva a um deslocamento para o azul e o cancelamento completo do efeito do sulfato de guanidina, o que corrobora a hipótese de que a presença de cargas positivas próximas ao grupo fenolato da oxiluciferina seria responsável pela emissão de luz verde nas luciferases de besouros. Embora essa teoria explique em parte a modulação de cores, ela não pôde explicar completamente a ampla faixa espectral emitida pelas luciferases de coleópteros.

Por fim, baseado nos mecanismos propostos estudos, realizados apontam que tanto efeitos não-específicos como polaridade, como interações específicas como interações ácido-base e presença de cargas em torno da oxiluciferina excitada, especialmente seu grupo fenolato, podem determinar os espectros de emissão, sendo que estes mecanismos não são mutuamente exclusivos

#### **1.4. Relação entre estrutura e espectros de bioluminescência**

A primeira luciferase foi clonada do vagalume lampirídeo norte-americano *Photinus pyralis* (de WET *et al.*, 1985) e, desde então, dezenas de outras luciferases das três famílias de besouros luminescentes, principalmente lampirídeos, também foram clonadas e sua estrutura primária foi elucidada (TATSUMI *et al.*, 1989, 1992; WOOD *et al.*, 1989; DEVINE *et al.*, 1993; SALA-NEWBY *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997; VIVIANI *et al.*, 1999<sup>a</sup>; VIVIANI *et al.*, 1999<sup>b</sup>; VIVIANI *et al.*, 2004; VIVIANI *et al.*, 2005; VIVIANI *et al.*, 2011; ALIPOUR *et al.*, 2004; EMAMZADEH *et al.*, 2006; BRANCHINI *et al.*, 2006; AMARAL *et al.*, 2012; AMARAL *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2020; MOREIRA *et al.*, 2022).

Essas enzimas possuem entre 542 e 550 resíduos de aminoácidos, um peso molecular de aproximadamente 60 kDa e uma identidade compartilhada que varia de 66 a 99%, dependendo da espécie e lanterna dos vagalumes (WOOD, 1995; VIVIANI, 2002).

Conti *et al.* (1996) foram pioneiros na cristalização e determinação da primeira estrutura tridimensional da luciferase de *Photinus pyralis*, na ausência de substratos, o que mostrou que as luciferases possuem dois grandes domínios ligados por um loop

flexível, sendo que o domínio N' é composto pelos resíduos 1 ao 436 e o domínio C' pelos resíduos 443 ao 548.

Posteriormente, Nakatsu *et al.* (2006) determinaram a estrutura cristalográfica da luciferase de *Luciola cruciata* complexada com DLSA (análogo de adenilato de luciferina) identificando os resíduos que compõem o sítio ativo do domínio N-terminal:  $\alpha 8$  248-260,  $\beta 12$  (286-289),  $\beta 13$  (313-316),  $\beta 14$  (339-342),  $\beta 15$  (351-353) e o loop (343-350).

Além disso, dezenas de estudos de modificação na estrutura primária das luciferases foram realizados a fim de entender o mecanismo estrutural da modulação de cor nas luciferases de besouros. Diversos estudos apontaram que mutações sítio-dirigidas em luciferases de lampirídeos pH-sensitivas resultam em mutantes que emitem luz vermelha (KAJIYAMA; NAKANO, 1991; DEVINE *et al.*, 1993; TAFRESHI *et al.*, 2007, 2008; VIVIANI *et al.*, 2005), enquanto que em luciferases pH-insensitivas de elaterídeos e fengodídeos, menos mutações afetam os espectros e em geral resultam em deslocamentos menores (VIVIANI *et al.*, 2001, 2007, 2008), o que indica que o mecanismo estrutural de modulação de cor é diferente nas luciferases pH-sensitivas e pH-insensitivas.

#### **1.4.1. Luciferases pH-sensitivas**

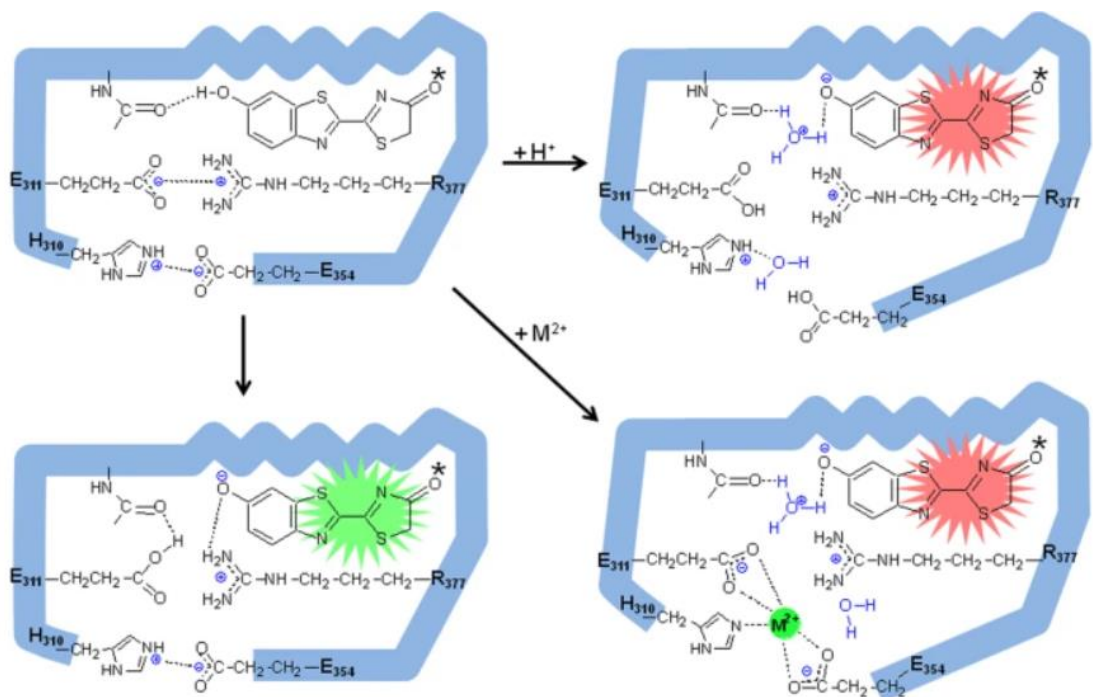
Nas luciferases de vagalumes lampirídeos, várias mutações pontuais resultaram em luciferases mutantes emissoras de luz vermelha (KAJIYAMA; NAKANO, 1991; DEVINE *et al.*, 1993; TAFRESHI *et al.*, 2007, 2008; VIVIANI *et al.*, 2005). Estes estudos mostraram que várias mutações importantes que afetavam o espectro de bioluminescência em luciferases pH-sensitivas e insensitivas se concentravam nos loops 223–235 e 351–360 (VIVIANI *et al.* 2007; 2008, VIVIANI *et al.*, 2005, MORADI *et al.*, 2009). Posteriormente, foi mostrado que estes loops mantêm interações com os resíduos S284/E311/R337, por fazer o suposto sensor de pH que auxilia na manutenção de um ambiente hidrofóbico que propicia a emissão de luz verde (BRANCHINI *et al.*, 2004; MORADI *et al.*, 2009; VIVIANI *et al.*, 2008).

Posteriormente, os estudos também mostraram que mutações dos resíduos E311 e R337, que fazem uma ponte salina próxima do sítio-ativo nas luciferases emissoras de luz verde geravam mutantes que emitiam luz vermelha. Assim,

concluíram que a ponte salina nessa posição é essencial para uma conformação mais fechada e hidrofóbica da enzima, que resulta na emissão de luz verde (VIVIANI *et al.*, 2016).

Estes resultados levaram Viviani *et al.* (2018) a propor que o sensor de pH e metais nas luciferases de lampírideos é composto por duas pontes salinas entre os resíduos E311/R337 (interna, próxima ao sítio ativo) e H310/E354 (mais externa).

O estudo de Viviani *et al.* (2018) propõe que a ponte salina externa entre H310/E354 é afetada pela diminuição do pH e presença de metais, rompendo-se e aumentando a entrada de água e polarizando o sítio ativo, resultando em emissão vermelha. Por outro lado, a ponte salina interna entre E311/R337 estabiliza e retém o próton liberado pela oxiluciferina excitada próximo ao grupo fenolato, que gera a emissão verde-amarela. Dessa forma, a carga negativa do E311 é essencial para a sensibilidade ao pH e metais (**Fig. 4**), demonstrando também um papel catalítico na bioluminescência ao receber o próton do grupo fenol da oxiluciferina excitada e assim, gerando bioluminescência verde (VIVIANI *et al.* 2018).



**Figura 4.** Mecanismo proposto de modulação de cor da bioluminescência pelo pH e metais pesados divalentes em luciferases de vagalume. Fonte: VIVIANI *et al.* 2018.

### 1.4.2. Luciferases pH-insensitivas (elaterídeos e fengodídeos)

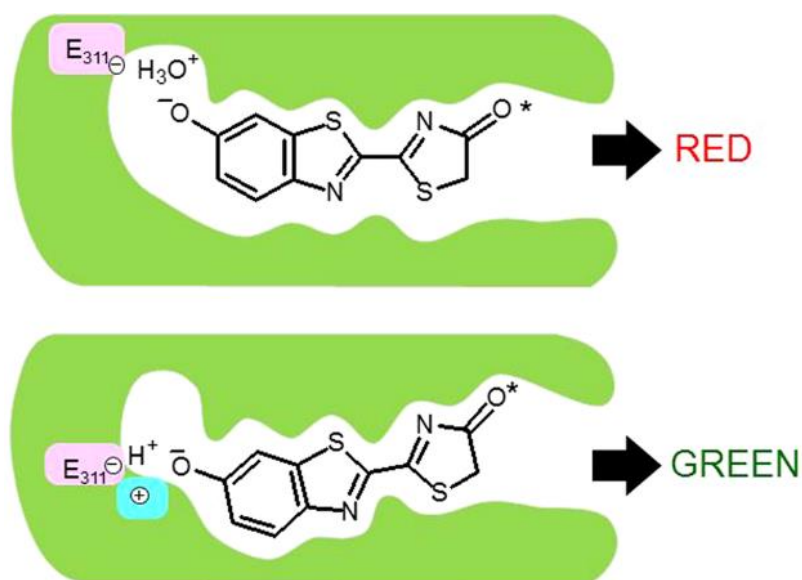
Algumas luciferases pH-insensitivas emissoras de luz verde a vermelha das famílias de elaterídeos e fengodídeos foram clonadas para entender o mecanismo estrutural da modulação de cores nestas enzimas (WOOD *et al.*, 1989; VIVIANI *et al.*, 1999<sup>a</sup>, 1999<sup>b</sup>). No entanto, somente a comparação das sequências das estruturas primárias não foi suficiente para elucidar seus mecanismos. Estudos posteriores comprovaram que, diferentemente das luciferases encontradas em vagalumes lampirídeos, que são pH-sensitivas, poucas mutações são capazes de afetar o espectro de emissão das luciferases de elaterídeos e fengodídeos (VIVIANI *et al.*, 2002, 2007). Alguns dos resíduos capazes de causar alteração no espectro de emissão das luciferases presentes nas três famílias estão localizados no *loop* 223-235, especialmente em F/Y224, G228 e T/N226 (VIVIANI *et al.*, 2007<sup>a</sup>, 2007<sup>b</sup>, 2008, MORADI *et al.*, 2009) e 351-360 (MORADI *et al.*, 2009), que estabilizam a ponte salina que ocorre entre os resíduos E311 e R337.

Estes resultados levaram Viviani *et al.* (2016) a propor que nas luciferases insensitivas de elaterídeos emissoras de luz verde-amarelada, a ponte salina formada pelos resíduos E311 e R337 é estabilizada adicionalmente por um ambiente hidrofóbico, não sendo afetada por pH ou metais. Dessa forma, durante a etapa de emissão de luz, o E311 atua como base, enquanto a carga positiva do R337 estabiliza a carga negativa do grupo fenolato, o que faz com que o próton ejetado da oxiluciferina se mantenha próximo do grupo fenolato em um estado de alta energia, favorecendo a emissão de luz verde. Por outro lado, a falta de uma arginina na respectiva posição 334 na luciferase emissora de luz vermelha de *P. hirtus* (VIVIANI *et al.*, 2018) seria parcialmente responsável pela emissão de luz vermelha.

Estudos de cristalografia da luciferase emissora de luz vermelha de *P. hirtus* mostraram que ela mesma possui uma abertura maior entre os domínios N' terminal e C' terminal, quando comparada com luciferases emissoras de luz verde (CARRASCO-LÓPES *et al.*, 2018). Isso sugere que a emissão de luz vermelha é proveniente do empacotamento específico do sítio ativo desta luciferase (CARRASCO-LÓPES *et al.*, 2018; Viviani *et al.*, 2007; 2016)

Estudos com 6' amino-análogos volumosos por Bevilaqua *et al.* (2019) mostraram que o volume da cavidade do sítio de ligação da luciferina, especialmente

no lado do grupo fenolato da luciferina, é um dos fatores responsáveis pela modulação da cor. Cavidades maiores permitem a presença de moléculas de água com maior mobilidade, diminuindo as interações específicas entre os resíduos do sítio de ligação da com o grupo fenolato da oxiluciferina excitada, resultando na emissão de luz vermelha. Por outro lado, cavidades menores, encontradas nas luciferases que emitem luz verde e amarela, permitem uma interação mais próxima entre os grupos dos resíduos do sítio ativo e o grupo fenolato da oxiluciferina excitada (**fig. 5**).



**Figura 5.** Mecanismo de modulação de cores nas luciferases insensíveis emissoras de luz verde e vermelha. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA *et al.*, 2019.

## 1.5. Aplicabilidade da bioluminescência

A bioluminescência é uma ferramenta muito útil, pois tem diversas aplicações nas áreas de monitoramento de contaminação microbiológica, indústria farmacêutica, alimentícia e biomédica, em testes de toxicidade *in vivo* e *in vitro*, quantificação indireta de ATP, em biossensores *light on* e *light off* de substâncias, de poluentes como metais potencialmente tóxicos, de pH e em *screening* de drogas (SYED; ANDERSON, 2021).

### 1.5.1. Ensaio de quantificação de ATP

De interesse sanitário, os ensaios de quantificação de ATP utilizando bioluminescência partem do princípio que todas as células vivas, incluindo a de fungos e bactérias, produzem e usam ATP. Como a bioluminescência do sistema luciferina-

luciferase de vagalumes é dependente de ATP, existe uma relação direta entre a intensidade da bioluminescência e a concentração de ATP disponível, e, portanto, indireta com o número de células vivas. Logo, é possível correlacionar quantidade de luz emitida com unidades formadoras de colônia e quantificar os microrganismos presentes na amostra (DOSTÁLEK; BRÁNYIK, 2003; WU *et al.*, 2011). Além disso, existem vários kits comerciais que usam este princípio e os reagentes luciferina e luciferase para detecção de contaminação microbiológica, de alimentos, bebidas e superfícies.

### 1.5.2. Genes repórteres

Muitos produtos da expressão gênica são difíceis de monitorar e quantificar. Considerando esse problema, foram desenvolvidas, com auxílio da engenharia genética, diferentes genes repórteres. Como é sugerido pelo próprio nome, os genes repórteres notificam, demonstram, sinalizam e quantificam a expressão de um gene alvo. Isto é possível a partir da fusão entre o gene que se deseja monitorar a um outro de fácil detecção, dando assim, uma medida indireta da expressão do gene ao qual está fusionado (FRANKLIN *et al.*, 2002; POLLOK; HEIM, 1999).

Nas últimas décadas, o gene repórter mais utilizado tem sido o cDNA de *Green Fluorescent Protein* (GFP). Apesar de simples e prático, o uso de proteínas fluorescentes apresenta uma série de desvantagens, como a necessidade de luz externa, sua acumulação nos tecidos, a autoabsorção, autofluorescência, branqueamento etc (ZIMMER, 2002). Por outro lado, a utilização do cDNA de luciferases como gene repórter não apresenta as desvantagens citadas acima, sendo assim uma alternativa muito utilizada, uma vez que geram seu próprio sinal luminescente e não apresentam as desvantagens dos sistemas fluorescentes (VIVIANI *et al.*, 2022).

Por não necessitar de irradiação de luz externa, as luciferases são ótimas para bioimagem em tecidos profundos, pois sua luz penetra mais facilmente os tecidos do que a utilizada para excitar a fluorescência da GFP, por exemplo. Além disto, luciferases vêm ganhando ainda mais vantagem devido ao desenvolvimento de sistemas emissores de luz vermelho-distante compostos por luciferases mutantes e análogos de luciferina (IWANO, *et al.*, 2018; VIVIANI, *et al.* 2020).



Além disso, a instabilidade das luciferases de besouros faz com que estas se desnaturem rapidamente e, por consequência, não se acumulem. Dessa forma, podem ser utilizadas para monitorar a expressão gênica de uma cultura de células ou animais modelos em tempo real, uma vez que o sinal bioluminescente é resultado da concentração momentânea de luciferase na amostra (VELTEN; POGSON; CAZZONELLI, 2008; CRIVAT; TARASKA, 2012; VIVIANI *et al.*, 2020; VIVIANI; PELENTIR; BEVILAQUA, 2022).

### **1.5.3. Biossensores**

De acordo com a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), um biossensor é um "dispositivo que usa reações bioquímicas específicas, mediadas por enzimas isoladas, anticorpos, tecidos, organelas ou células, de forma a detectar compostos químicos, por meio de sinais elétricos, térmicos ou ópticos" (IUPAC, 1997; PATACAS, 2007).

Os biossensores ópticos luminescentes podem ser fluorescentes, quimioluminescentes ou bioluminescentes. Esta classe de biossensores é muito útil para indicar o pH de células vivas ou mesmo detectar e quantificar a presença de metais (GABRIEL *et al.*, 2014; 2016; 2019)

### **1.5.4. Uso de luciferases de vagalumes como indicadores de pH**

O pH intracelular é um indicador da condição metabólica da célula. Em casos de estresse oxidativo, morte celular programa (apoptose), inflamação ou crescimento de câncer, o microambiente celular torna-se mais ácido. Por isso, o uso de indicadores de pH é útil para monitorar a homeostase celular (KRULWICH *et al.*, 2011; AMARANTE-MENDES, 2003).

Os biossensores fluorescentes são os mais utilizados para estimar o pH intracelular. Neste contexto, algumas proteínas fluorescentes dependentes de pH foram desenvolvidas e utilizadas em análises ratiométrica baseadas nos comprimentos de onda emitidos ou utilizados para excitar estas proteínas. Entretanto, como já mencionado, técnicas fluorescentes apresentam uma série de desvantagens práticas.

Nosso grupo demonstrou pela primeira vez que luciferases pH-sensitivas de lampirídeos podem ser utilizadas como biossensores bioluminescentes para estimar ratiometricamente o pH intracelular em tempo real em bactérias e células de mamíferos (GABRIEL *et al.*, 2014; GABRIEL *et al.*, 2019, VIVIANI *et al.*, 2022). Luciferases pH-sensitivas sofrem alterações na sua emissão de luz do verde para o vermelho em condições ácidas, por esse motivo, pode-se analisar a razão entre a luz verde e vermelha emitidas, para indicar o pH de uma célula onde a luciferase é expressa (GABRIEL; VIVIANI, 2014; GABRIEL *et al.*, 2019; VIVIANI; PELENTIR; BEVILAQUA, 2022).

### **1.5.5. Uso de luciferases como sensores de metais pesados**

Há uma preocupação global com o monitoramento e quantificação de metais tóxicos presentes na água. Os chamados metais potencialmente tóxicos como mercúrio, chumbo e cádmio, podem estar presentes na forma de contaminação em diversas amostras. Devido à existência de garimpos ilegais no Brasil, muitos corpos de água são contaminados com o despejo incorreto de mercúrio, que causa bioacumulação e biomagnificação em toda rede trófica. Este metal, que é líquido, mas frequentemente encontrado na forma iônica, é conhecido por gerar problemas no metabolismo celular e afetar principalmente o sistema nervoso de animais. O cádmio, outro contaminante extremamente tóxico, resultante de baterias elétricas por exemplo, é frequentemente relacionado ao surgimento de tumores, principalmente o de pulmão (LACERDA, 1997; ASCHNER; ASCHNER, 1990; NAWROT *et al.*, 2015; DSOUZA; MENEZES; VENKATESH, 2002, LANDRIGAN; TODD, 1994).

Como já mencionado, luciferases de lampirídeos são pH sensitivas e também sensíveis a metais pesados. Com isso em mente, nosso grupo de pesquisa também propôs utilizar estas enzimas para detectar e quantificar metais pesados como cádmio e mercúrio por meio de análise ratiométrica de luz verde e vermelha emitidas (VIVIANI *et al.*, 2022).

Gabriel e Viviani (2016) demonstraram que a luciferase de *Macrolampis sp2* pode ser utilizada em ensaios ratiométricos para detectar e quantificar mercúrio em solução (GABRIEL; VIVIANI, 2016). Posteriormente, Pelentir *et al.* (2019) mostraram que a luciferase de *A. vivianii* apresenta uma seletividade a cádmio, seguido pelo

mercúrio, detectando concentrações maiores que 100  $\mu\text{M}$  de cádmio e 62  $\mu\text{M}$  para mercúrio (VIVIANI; PELENTIR; BEVILAQUA, 2022). Deste modo, luciferases de vagalumes mostram-se muito promissoras para detectar e quantificar metais pesados em solução ou em células (VIVIANI *et al.*, 2022)

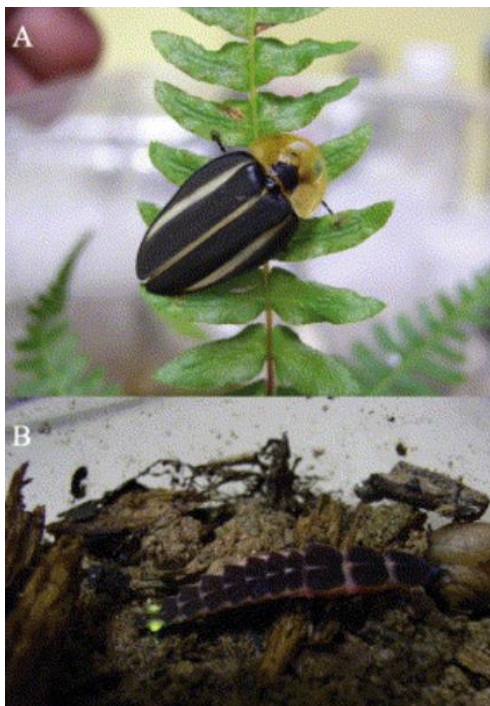
## **1.6. Novas luciferases e sua potencialidade bioanalíticas**

Várias luciferases das três famílias de coleópteros bioluminescentes já foram clonadas em nosso laboratório e um amplo banco de mutantes foi gerado. Porém, nem todas foram caracterizadas detalhadamente e seu potencial bioanalítico ainda não foi totalmente explorado. Como observado em diversos estudos, as luciferases de besouros possuem diversas aplicações bioanalíticas dependendo das suas propriedades, como sensor de pH (*Macrolampis sp2*) (GABRIEL *et al.*, 2016), sensor de metais pesados (*A. vivianii*) (PELENTIR *et al.*, 2019), bioimagem em células de mamíferos (*P. hirtus*) (BEVILAQUA *et al.*, 2019; VIVIANI *et al.*, 2020; NAKAJIMA *et al.*, 2004, 2010), entre outras. Dessa forma, é de extrema importância prospectar novas luciferases, estudar suas propriedades e sondar suas potencialidades para fins bioanalíticos.

### **1.6.1. A luciferase do vagalume *Cratomorphus distinctus***

Entre as luciferase que já foram clonadas, mas que carecem de uma investigação mais aprofundada, está a luciferase da larva de *Cratomorphus distinctus*.

O vagalume lampirídeo *C. distinctus* e sua larva são encontrados durante as noites de primavera e verão na mata Atlântica do sudeste brasileiro (**Fig. 6**).



**Figura 6.** Vagalume *C. distinctus* em (a) fase adulta e (b) fase larval. Fonte: VIVIANI *et al.*, 2004.

A luciferase da larva de *C. distinctus* foi clonada em 2004 pelo nosso grupo de pesquisa (VIVIANI *et al.*, 2004), no entanto, o cDNA estava no plasmídeo pBluescript e a luciferase era fracamente expressa em bactérias não sendo facilmente purificável, de modo que apenas uma caracterização preliminar foi feita com extratos brutos. Esta luciferase possui 547 resíduos de aminoácidos, sendo 53% hidrofóbicos, 29% hidrofílicos e 17,9% neutros. A luciferase tem 93% de identidade com a luciferase de *Lampyris noctiluca*, 91% com a luciferase de *Pyrocoelia miyako* e 83% com a luciferase de *Photinus pyralis* (VIVIANI *et al.*, 2004; VIVIANI *et al.*, 2005). O  $pI$  era 5,9. O valor de  $K_M$  obtido para luciferase em extratos brutos para D-luciferina ( $LH_2$ ) foi 15  $\mu M$ . O pico de emissão do espectro de bioluminescência estava em 550 nm.

### 1.6.2. Luciferases de fengodídeos

Como já mencionando, as luciferases de fengodídeos são as que únicas emitem luz que varia do verde ao vermelho. Considerando que estas possuem alta identidade entre si, são ótimos modelos para estudar o mecanismo de modulação da cor de bioluminescência de besouros.

Além disso, fengodídeos são a família com o menor número de luciferases clonadas, se compararmos com lampirídeos e elaterídeos. Apesar disso, os fengodídeos são em geral mais raros, sendo encontrados especialmente no cerrado brasileiro, o bioma mais ameaçado pelo desmatamento e o uso indiscriminado de agrotóxicos que estão levando ao desaparecimento dessas espécies (VIVIANI, *et al.*, 2023; VIVIANI; BECHARA, 1997). Por isso, é extremamente importante estudar e compreender essa família, bem como clonar e investigar suas luciferases e sondar suas potenciais aplicabilidades bioanalíticas, de modo a ajudar a combater o declínio de suas populações

## **2. JUSTIFICATIVA**

As luciferases de besouros têm inúmeras aplicações bioanalíticas, que dependem de suas propriedades cinéticas, espectrais e físico-químicas. Nosso grupo de pesquisa já clonou o maior número de luciferases de besouros das 3 famílias de vagalumes, dispondo de um banco de mais de 15 luciferases selvagens e cerca de 100 mutantes. Algumas destas já tem aplicações, enquanto que outras ainda não foram purificadas, e devidamente caracterizadas ou sondadas quanto às suas potencialidades bioanalíticas. Dessa forma, torna-se necessária a caracterização dessas luciferases disponíveis em nosso banco gênico, bem como a clonagem, expressão, purificação e caracterização de novas luciferases e a sondagem de sua aplicabilidade bioanalítica.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi expressar em bactérias, purificar e caracterizar duas novas luciferases de besouros, e sondar suas propriedades físico-químicas para finalidades bioanalíticas específicas. Os objetivos específicos foram:

1. Expressar, purificar e determinar as propriedades cinéticas e espectros de bioluminescência da luciferase do vagalume *Cratomorphus distinctus* (Lampyridae) em diferentes pHs.
2. Sondar as propriedades de interesse bioanalítico desta luciferase, como eficiência catalítica, termoestabilidade, sensibilidade ao pH e aos metais.
3. Contribuir para a clonagem, purificação e caracterização de novas luciferases de fengodídeos, especialmente a luciferase emissora de luz laranja de *Euryopa clarindae* (Phengodidae)

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

**cDNAs.** O cDNA do *Cratomorphus distinctus* foi sintetizado códon-humanizado (Genone) a partir da sequência já conhecida e disponível no laboratório no vetor pBluescript vector (Agilent) (VIVIANI *et al.*, 2004), enquanto que o da *Euryopa clarindae* foi clonado no pSport vector (Invitrogen) com o kit Gateway cloning kit (Invitrogen).

**Subclonagem de cDNA em vetor plasmidial.** O cDNA da luciferase do *Cratomorphus distinctus* humanizada foi subclonado do vetor pCMV para o pCold II (Takara, Japão). Para isso, o fragmento foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers com sítios de restrição Nde I e Xho I. Para esta reação foram utilizados 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega, EUA), 0,5 µL do DNA plasmidial 10 ng, 0,5 µL de cada primer na concentração 10 mM, 11 µL de água ultrapura autoclavada (volume total de 25 µL). Após a amplificação, o DNA foi purificado de acordo com o kit de purificação de PCR Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA). Em seguida, o DNA e plasmídeo pCold II foram paralelamente digeridos com as enzimas Nde I e Xho I (tabela 1). 50 ng de fragmento digerido foram ligados a 50 ng de plasmídeo com kit de T4 ligase da empresa Takara (Japão). A mistura de ligação foi então utilizada para transformar células XL1-Blue.

**Tabela 1.** Primers utilizados na subclonagem da luciferase de *C. distinctus*.

Primers	Sequência
Forward:	GCCGCATATGGAGGAGGACAAAAA
Reverse:	AATGCCTCGAGTTACTTCCCGCC

Fonte: autoria própria.

**Eletroforese em gel de agarose.** A análise de DNA foi feita por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1x (Tris-acetato 20 mM e EDTA 0,5 mM pH 8,0) e 0,6 µL do corante Nancy-520 (Sigma). Para a corrida, foram utilizados 5 µL da amostra de DNA, 1 µL de tampão de marcação colorido, além de padrões de peso molecular. A corrida foi realizada em 100 volts por 40 minutos e as bandas reveladas por fluorescência em transluminador UV (ATTO, Tóquio, Japão).

**Preparação de DNA Plasmidial (Minipreps).** A mini-preparação de DNA plasmidial foi realizada com o —Kit Wizard Plus SV Mineprep DNA Purification Systemll (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante. As colônias transformadas com o plasmídeo contendo luciferase mutante foram selecionadas e cultivadas *overnight* em 5 mL de meio de cultura LB/ampicilina (100 µg/mL). A cultura foi centrifugada a 2200 rcf por 15 minutos para a remoção do meio de cultura. O *pellet* foi ressuspendido com 250 µL de tampão de ressuspensão, as células foram lisadas com 250 µL de tampão de lise e, então, adicionados 10 µL de protease alcalina para remoção das nucleases, mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. O pH ideal da mistura foi atingido utilizando 350 µL de tampão de neutralização. A amostra foi centrifugada a 14.000 rcf por 10 minutos e então o sobrenadante foi adicionado às colunas de purificação, onde foram feitas duas lavagens para remoção do DNA indesejado. O DNA alvo foi eluído com água ultrapura estéril e armazenado a -20°C.

**Transformação bacteriana.** Amostras de 50 µL de células competentes *E. coli* (XL1Blue ou BL21/DE3) e 5 µL de plasmídeo foram misturados em tubo de microcentrífuga, então incubados por 40 minutos no gelo e submetidas a um choque térmico de 45 segundos a 42° C. Novamente, postas no gelo por mais 2 minutos e subsequentemente 200 µL de meio LB líquido foram adicionados. Esta solução foi então mantida a 37°C em agitação a 225 rpm por 1 hora, sendo posteriormente plaqueada em meio LB Ágar/Ampicilina (100 µg/mL) e colocada na estufa *overnight* a 37°C para crescimento.

**Expressão heteróloga de proteína em bactérias.** Células competentes BL21/DE3 foram transformadas com DNA recombinante e cultivadas em 200 mL de meio LB líquido/Ampicilina 100 µg/mL a 37 °C até a absorbância de 0,4 (O.D. 600), e induzidas com IPTG 0,4 mM a 18°C sob agitação de 225 rpm, durante o período de 12 a 18 horas.

**Extração de proteína.** Volumes de 100 mL de culturas induzidas foram transferidos para tubos tipo Falcon e centrifugados a 2.200 g por 15 minutos a 4 °C. As células coletadas foram ressuspendidas em 5 mL de tampão de extração gelado (Fosfato 50 mM pH 7,0, 10 mM Imidazol), 150 µL de coquetel antiprotease. A lise celular foi



realizada por ultrassonicação (Misonix, Nova York, USA) com 5 repetições e centrifugada a 12.000 rcf a 4° C por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e usado posteriormente no processo de purificação.

**Purificação por cromatografia de afinidade com matriz de Níquel.** Este método se baseia na afinidade da cauda de histidina fundida a proteínas recombinantes por íons de níquel (Ni-NTA) imobilizados em uma resina de agarose. A resina de Ni-NTA-Agarose (Qiagen) foi equilibrada com tampão de extração (Fosfato 50 mM pH 7; 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol), misturada ao extrato bruto e submetida a agitação moderada por 45 min a 4 °C para permitir a ligação da cauda de histidina da proteína ao níquel da resina. A mistura foi então aplicada em uma mini-coluna e lavada com 10 mL de tampão de lavagem (Fosfato 50 mM pH 7; 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol). A proteína recombinante foi eluída da resina com tampão de Eluição (Fosfato 50 mM pH 7,0; 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) em alíquotas de 1 mL/cada. Cada alíquota foi analisada quanto à concentração total de proteínas pelo método do Bradford, em ensaio luminométrico de luciferase SDS-PAGE. As frações com maior atividade foram dialisadas em tampão de diálise (TRIS-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 10 mM, EDTA 1mM, DTT 2 mM, e glicerol 10%) durante um período de 12 a 20 horas a 4°C.

**Quantificação de proteínas totais.** Para medir a concentração de proteínas totais foi utilizado o método de Bradford (1976). Inicialmente, foi montada uma curva-padrão (para cálculo do Fator) de concentração de proteína utilizando-se soroalbumina bovina (BSA). A concentração de proteínas totais foi determinada pela equação: [Proteína] = F x Abs, onde F é igual a  $\Delta x / \Delta y$ , obtido por pontos da curva-padrão. As medições foram feitas em triplicata, a 595 nm, em um espectrofotômetro (Thermo Electron Corporation- GENESYS 10UV).

**Eletroforese em gel de SDS (SDS-PAGE).** Preparo do gel de poliacrilamida. Em sanduíche de placas de vidro, foram pipetados os géis de resolução (compõe a base) e empilhamento (sobre o gel de resolução), respectivamente. Gel de resolução. 10% Acrilamida-bisacrilamida, 0,375M TRIS-HCl, pH 8,8 SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,05 % e TEMED 0,05 %. Gel de empilhamento. Acrilamida-bisacrilamida 4%, TRIS-HCl 0,125M pH 6,8, SDS, 0,1% de persulfato de amônio 0,05 % e TEMED 0,1%.

Alíquotas de amostras contendo as proteínas de interesse foram misturadas na proporção 1:1 ao tampão de amostra (TRIS-HCl 0,5 M pH 6,8, de glicerol 20%, SDS 40%, 10% 2-mercapetanol e 2% de bromofenol-blue) e aquecidas a 95°C por 5 minutos em bloco termostático para desnaturarem.

Os géis previamente preparados foram colocados em uma cuba de eletroforese e imersos em tampão de corrida (TRIS 16,3%, glicina 78% e de SDS 5,4% pH 8,3). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese por um período de 60 minutos, sob a tensão de 120 V. Posteriormente, os géis foram retirados e imersos em solução corante contendo *Comassie Blue* sob leve agitação por aproximadamente 60 minutos. Logo após, ainda sob leve agitação, foi imerso em água para a descoloração, a cada 20 minutos até a visualização das bandas de proteína nos géis. Por fim, os géis foram retirados da solução e envolvidos em papel celofane para preservação.

**Medidas de atividade luminescente da luciferase *in vitro*.** Após a expressão, extração e purificação, a atividade luminescente da amostra de luciferase foi obtida por meio de um ensaio contendo 85  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 0,10 M pH 8,0; 5  $\mu\text{L}$  da amostra da luciferase, 5  $\mu\text{L}$  de luciferina 10 mM e 5  $\mu\text{L}$  de 40 mM ATP e 80 mM  $\text{MgSO}_4$ . Para o ensaio com metais, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  das soluções a 20 mM dos sais  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ . A atividade luminescente foi obtida em luminômetro AB2200 (ATTO, Tokyo, Japão) em counts por segundo (*cps*).

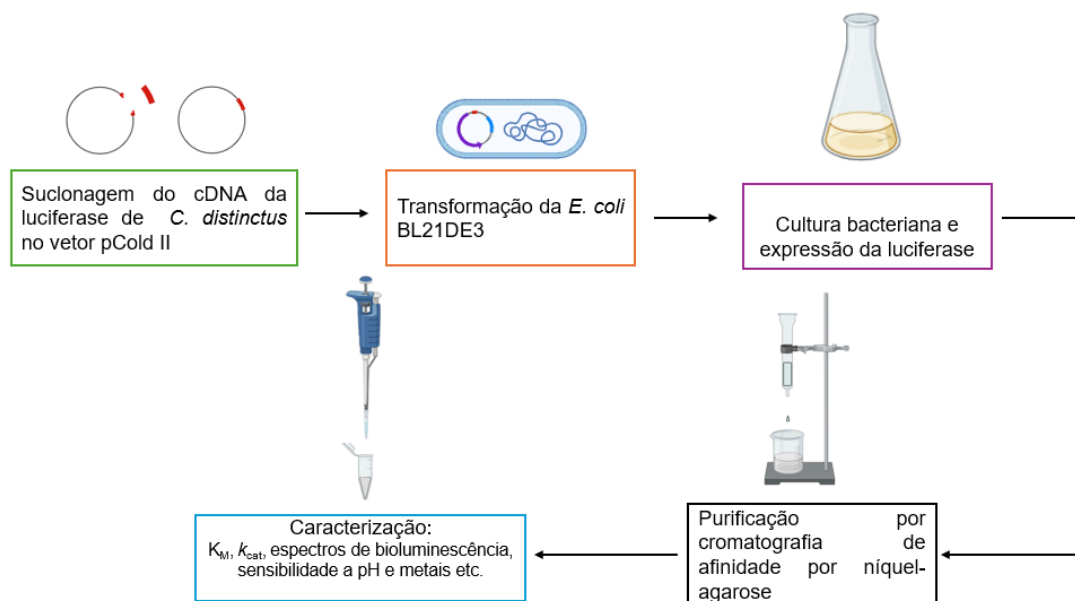
**Medidas de afinidade pelo substrato ( $K_M$ ).** Para a determinação dos valores de  $K_M$  para a D-luciferina, mediu-se a atividade da luciferase em concentrações variadas de luciferina (0,5  $\mu\text{M}$  a 250  $\mu\text{M}$ ) mantendo concentrações saturantes de ATP. Para  $K_M$  de ATP, mediu-se a atividade da luciferase em concentrações variadas de ATP (1  $\mu\text{M}$  a 500  $\mu\text{M}$ ) mantendo a concentração saturante de luciferina de 250  $\mu\text{M}$ . A intensidade em *cps* foi utilizada como medida de  $V_0$  e a intensidade máxima como  $V_{\text{max}}$ . Posteriormente, foram construídos gráficos de Lineweaver-Burk com os inversos das atividades (eixo y) e os inversos das concentrações de substrato (eixo x).

### Determinação da constante catalítica ( $k_{cat}$ ) e eficiência catalítica.

A constante catalítica ( $k_{cat}$ ) da reação, ou número de renovação, foi calculada pela razão de valores de atividade luminescente em *counts* por segundo (*cps*) pelo número de moléculas de luciferase. Assim, considerando o peso molecular de 60 kDa da enzima, no ensaio foram utilizados 5  $\mu$ L, então obtém-se o número de moles de luciferase e, em seguida, o número de moléculas (1 mol =  $6 \times 10^{23}$  moléculas). Logo, a  $k_{cat}$  foi calculada a partir da razão de valores de atividade luminescente (*cps*) pelo número de moléculas de luciferases.

**Termoestabilidade.** Foram separadas alíquotas da luciferase de *C. distinctus* na concentração final de 50  $\mu$ g/mL e estas foram mantidas a 37°C. A atividade bioluminescente foi medida nos tempos 0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min.

**Espectros de Bioluminescência.** Os espectros de bioluminescência *in vitro* foram obtidos em espectroluminômetro AB – 1850 Lumi FI Spectro Capture (ATTO, Tokyo). No ensaio típico foram utilizados 85  $\mu$ L de Tris-HCl 0,10 M pH 8,0; 5  $\mu$ L do extrato ou enzima purificada, 5  $\mu$ L de luciferina 10 mM, e 5  $\mu$ L de ATP 40 mM e MgSO<sub>4</sub> 80 mM (**Fig. 7**). Para o ensaio com metais, foram acrescentadas 5  $\mu$ L de soluções com diferentes concentrações dos sais (Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CdSO<sub>4</sub>, Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).



**Figura 7.** Esquema simplificado da metodologia empregada para subclonagem, expressão, purificação e caracterização das luciferases. Fonte: autoria própria.

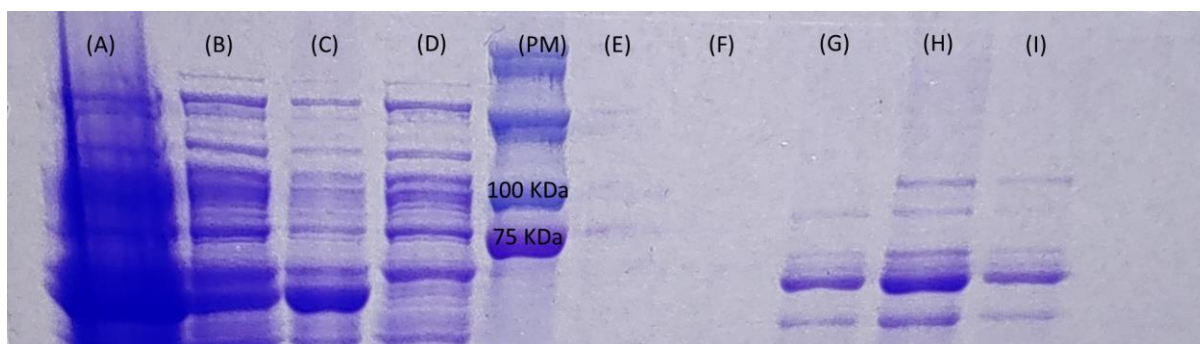
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Luciferase de *Cratomorphus distinctus*

#### 5.1.1. Expressão e purificação

O cDNA da luciferase de *C. distinctus*, anteriormente clonado (VIVIANI *et al.*, 2004), foi códon-humanizado (empresa Genone), e então sub-clonado no vetor pCold II (Takara, Japão) em nosso laboratório. A mistura de ligação foi então usada para transformar *E. coli* XL1-Blue, e colônias positivas para bioluminescência selecionadas e cultivadas para propagação e purificação do plasmídeo.

Células competentes *E. coli* BL21-DE3 foram então transformadas com o mesmo plasmídeo. Em seguida, culturas foram feitas a partir da inoculação dessas células, então, induzidas com IPTG para expressão de luciferase. Posteriormente, estas culturas foram centrifugadas e os pellets lisados. A partir do extrato bruto, a luciferase foi purificada por cromatografia de afinidade cromatografia em coluna com níquel-Agarose, e então dialisada. As etapas de expressão e purificação desta luciferase foram analisadas por SDS-PAGE (**Fig. 8**).



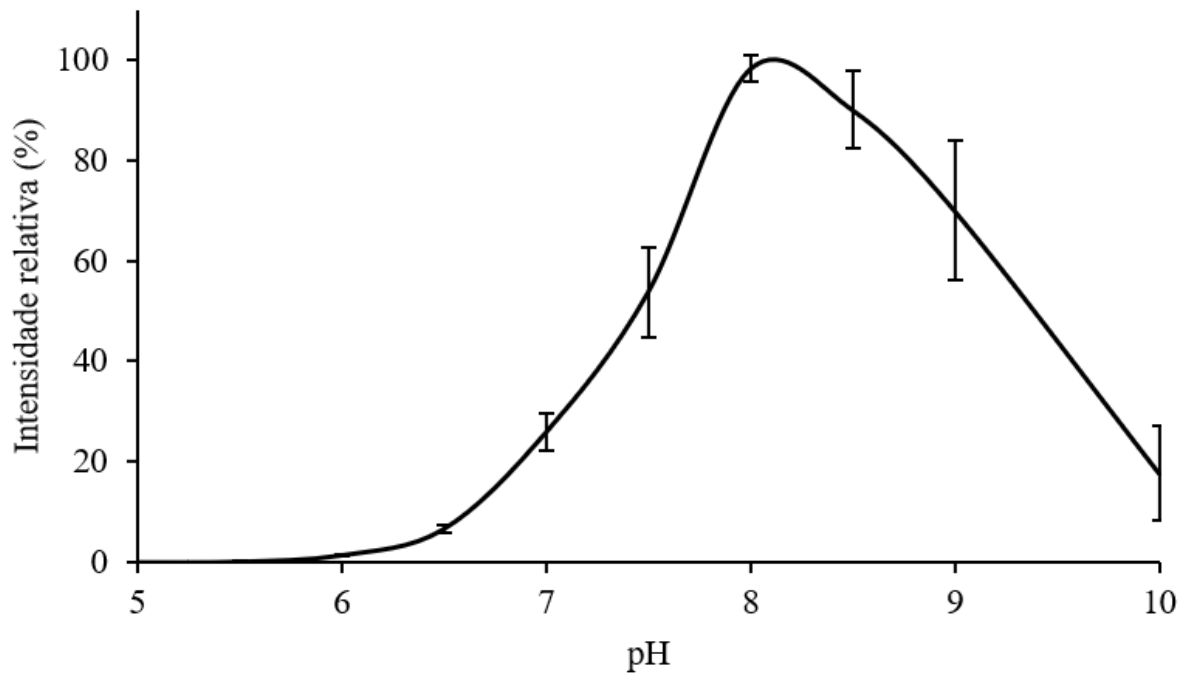
**Figura 8.** SDS-PAGE de diferentes etapas da extração e purificação da luciferase de *C. distinctus*. (A) Homogenato bacteriano; (B) extrato bruto; (C) precipitado; (D) escoamento; (PM) padrões de peso molecular; (E) fração da 1ª lavagem com 20 mM de imidazol; (F) fração da 2ª lavagem; (G) fração da 1ª eluição com 250 mM de imidazol; (H) fração da 2ª eluição; (I) fração da 3ª eluição. Fonte: autoria própria.

De acordo com o eletroferograma do gel de SDS-PAGE, pode-se notar que a luciferase de *C. distinctus* é relativamente bem expressa, uma vez que a banda de

~60 kDa (peso molecular estimado para esta luciferase) se destaca na amostra de extração, precipitado e eluições. As eluições de luciferases não estavam totalmente puras, mas pode-se estimar um rendimento de ~0,5 mg de luciferase por litro de cultura de células, o que é um rendimento baixo se comparado com a luciferase de *A. vivianii* que é de ~20 mg/L nas mesmas condições (PELENTIR *et al.*, 2019). Este resultado pode ser explicado pelo fato que o DNA codificante da luciferase de *C. distinctus* é códon-humanizada, o que pode resultar em uma taxa de expressão menor em um sistema bacteriano. Além disso, pode-se afirmar que esta luciferase é bastante insolúvel, uma vez que o eletroferograma mostra que há uma quantidade maior de luciferase na fração precipitada do que na fração do extrato bruto.

### 5.1.2. Efeito do pH na atividade bioluminescente

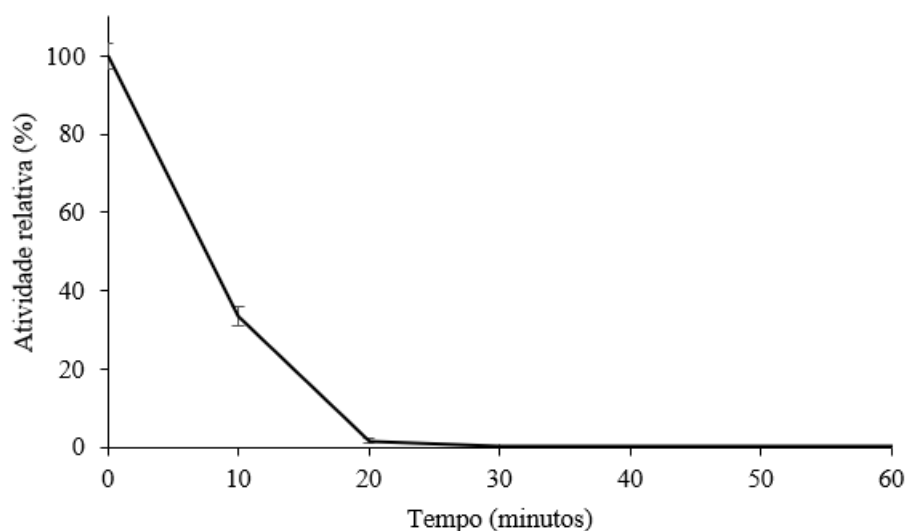
A luciferase de *C. distinctus* purificada possui um pH ótimo ~8,2 (**Fig. 9**), levemente maior do que o valor obtido para o extrato bruto anteriormente relatado, o qual foi 8,0 (VIVIANI *et al.*, 2004). Este valor é similar ao de outras luciferases de vagalumes já caracterizadas e descritas como *P. pyralis* pH 7,9; *Macrolampis* pH 8,2, *A. vivianii* pH 8,0 (VIVIANI *et al.*, 2008; PELENTIR *et al.*, 2019); *B. lividipennis* pH 7,5 (MOREIRA *et al.*, 2022); *A. lineatum* AL1 e AL2, ambas com pH ótimo de 8,0 (CARVALHO *et al.*, 2020).



**Figura 9.** Efeito do pH na atividade bioluminescente da luciferase de *C. distinctus*. Fonte: autoria própria.

### 5.1.3. Termoestabilidade

A luciferase de *C. distinctus* em uma concentração de 0,05 mg/mL não é estável a 37°C (**Fig. 10**). Mais de 60% da sua atividade relativa é perdida nos primeiros 10 minutos e mais de 95% é perdida até os 20 minutos. Aos 30 minutos, sua atividade é zerada. A estabilidade prevista anteriormente por Oliveira e Viviani (2018) para a mesma luciferase em extrato bruto era a perda de 41% de sua atividade total na primeira hora, 81% depois de 3h e 95% depois de 5h. Essa discrepância pode ser resultado da presença de proteínas, incluindo chaperonas no extrato bruto, ajudando a estabilizar e dobrar a proteína que perde a funcionalidade em alta temperatura (ELLIS, 1993).

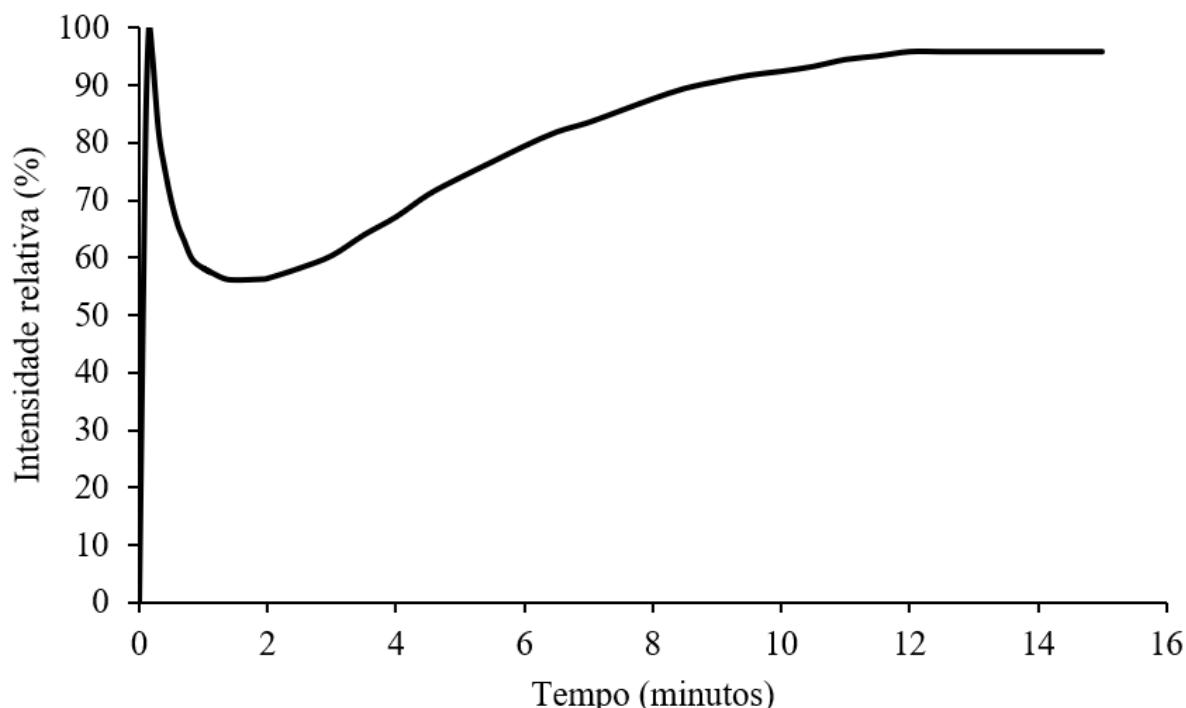


**Figura 10.** Estabilidade da luciferase de *C. distinctus* a 37°C. Fonte: autoria própria.

Para aumentar a termoestabilidade da luciferase de *C. distinctus*, seria interessante realizar mutações em determinados resíduos que favorecem a rigidez da proteína, seu empacotamento hidrofóbico e aumentar, se possível, a quantidade de pontes dissulfeto.

#### 5.1.4. Padrão cinético da reação luminescente

O padrão cinético da reação luminescente da luciferase de *C. distinctus* em pH 8,0 é bimodal (**Fig. 11**), composto por duas fases, similar ao encontrado em outras luciferases. Na primeira parte, ocorre um flash com decaimento rápido, chegando ao pico em 9 segundos a partir do começo da reação e decaindo bruscamente no primeiro minuto. Na segunda parte da reação, ocorre um aumento e decaimento bem mais lentos, nas mesmas condições.



**Figura 11.** Padrão cinética da reação bioluminescente da luciferase de *C. distinctus*. Fonte: autoria própria.

### 5.1.5. Afinidade pelos substratos

A luciferase purificada de *C. distinctus* apresentou um  $K_M$  de 16  $\mu\text{M}$  para D-Luciferina e de 24  $\mu\text{M}$  para ATP, o que significa que esta enzima apresenta alta afinidade por ambos os substratos (**Tab.1**). Dentre as luciferases de lampírideos clonadas em nosso laboratório, esta luciferase apresenta um dos menores valores de  $K_M$  para o ATP, sendo maior apenas que as luciferases de *A. vivianii* (9  $\mu\text{M}$ ) e *A. lineatum* (4  $\mu\text{M}$ ), e menor do que as luciferases de *Macrolampis sp2* (83  $\mu\text{M}$ ), *B. lividipennis* (277  $\mu\text{M}$ ) e *P. pyralis* (250  $\mu\text{M}$ ). Por outro lado, o valor de  $K_M$  para D-luciferina é ligeiramente maior do que aquele reportado para as luciferases de *A. vivianii* (9  $\mu\text{M}$ ), *A. lineatum AL1* (7  $\mu\text{M}$ ) e *P. pyralis* (5  $\mu\text{M}$ ), e um valor próximo da luciferase de *Macrolampis sp2* (20  $\mu\text{M}$ ), enquanto que a luciferase de *B. lividipennis* (46  $\mu\text{M}$ ) apresenta um valor maior (PELENTIR *et al.*, 2019; MOREIRA *et al.*, 2022; CARVALHO *et al.*, 2020).

### 5.1.6. Constante catalítica e eficiências catalíticas



A luciferase purificada de *C. distinctus* tem uma atividade específica de  $6,2 \cdot 10^{11}$  cps mg<sup>-1</sup>, valor alto em relação as de elaterídeos como *P. termitilluminans*, ou de fengodídeos, como *P. hirtus*, *P. vivianii* e até mesmo de alguns lampirídeos como *B. lividipennis* (MOREIRA *et al.*, 2022). Por outro lado, o valor foi menor quando comparado às luciferases dos vagalumes *A. vivianii*, *Macrolampis sp2*, *P. pyralis* e *A. lineatum AL1*. A partir destes valores também foi possível a determinação da constante catalítica,  $k_{cat}$ , cujo valor foi  $76 \cdot 10^{-6}$  cps, bem como as eficiências catalíticas,  $k_{cat}/K_M$  (ATP) e  $k_{cat}/K_M$  (LH<sub>2</sub>), que foram 3,2 e 4,8 c.s<sup>-1</sup>. μM<sup>-1</sup>, respectivamente. A eficiência catalítica para o ATP ( $k_{cat}/K_{MATP}$ ) é comparativamente alta quando comparada à de outras luciferases de coleópteros, o que significa que esta luciferase é altamente eficiente. Já para a luciferina, a eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_M$  LH<sub>2</sub>) é um pouco menor que a das outras luciferases, exceto a de *A. lineatum AL1* (Tab. 2).

**Tabela 2.** Comparação das propriedades cinéticas e espectrais de luciferases de lampirídeos.

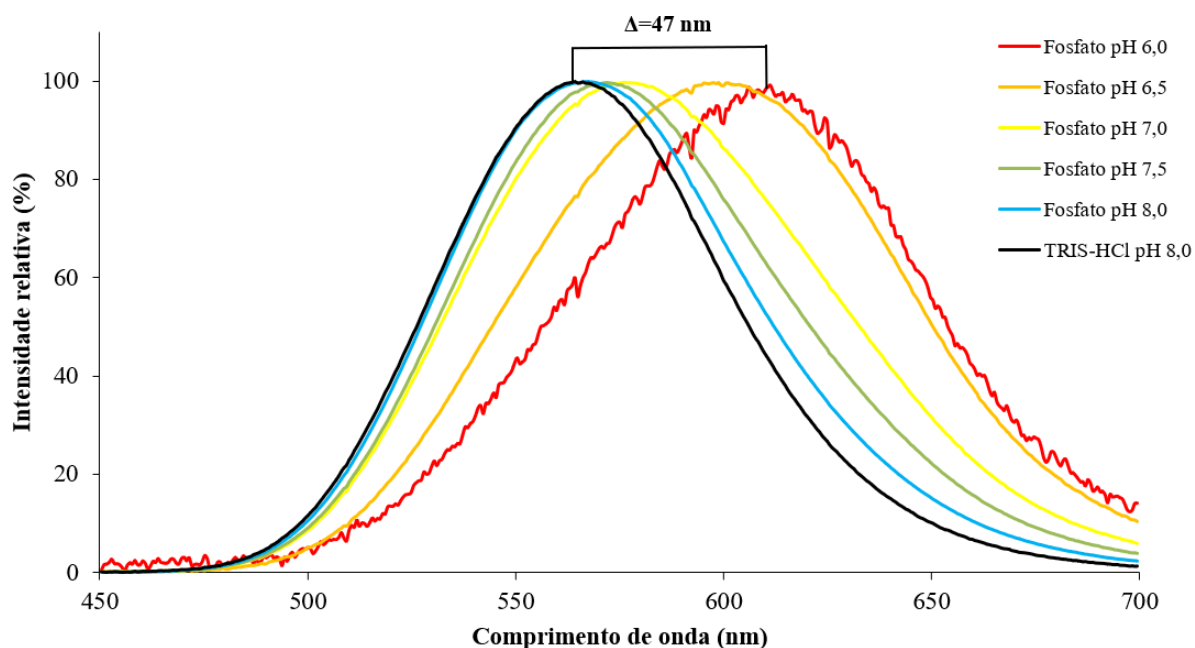
Luciferase	$\lambda_{max}$ [Meia-banda] (nm)	$K_M$ (μM)		Aesp (10 <sup>9</sup> cps mg <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (10 <sup>-6</sup> cps)	$k_{cat}/K_M$ ATP (c.s <sup>-1</sup> ·μM <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ LH <sub>2</sub> (c.s <sup>-1</sup> ·μM <sup>-1</sup> )
		LH <sub>2</sub>	ATP				
<i>Cratomorphus distinctus</i>	564 [85]	16	24	617	76	3,2	4,8
<i>Amydetes vivianii</i>	547 [81]	9	9	890	109	12.0	12.0
<i>Macrolampis sp2.</i>	575[86]	20	83	1198	125	2.0	6.0
<i>Bicellonycha lividipennis</i>	567	277	46	10.5	212	1.0	5.0
<i>Aspisoma lineatum AL1</i>	561 [88]	3	7	40	6	0.9	2
<i>Photinus Pyralis</i>	567[81]	5	250	1037	102	0.5	23

Fonte: Adaptado de PELENTIR *et al.*, 2019.

### 5.1.7. Efeito do pH no espectro de bioluminescência

A luciferase purificada de *C. distinctus* apresenta uma emissão de luz verde-amarelada ( $\lambda_{max} = 564$  nm) em pH 8,0. Já em pH 6,0 o pico de emissão de luz está no vermelho ( $\lambda_{max} = 611$  nm, o que significa que é uma luciferase bastante sensível ao pH, possuindo considerável variação espectral, uma vez que a mudança de pH 8,0 para 6,0 causou um deslocamento de 47 nm (Fig. 12). Este deslocamento foi parecido com aquele observado para a luciferase de *B. lividipennis* sendo maior que aquele observado para as luciferases de *A. vivianii* (36 nm), *Macrolampis sp2.* (37 nm) e *A.*

*lineatum* AL1 (32 nm) (PELENTIR *et al.*, 2019; MOREIRA *et al.*, 2022; CARVALHO *et al.*, 2020).

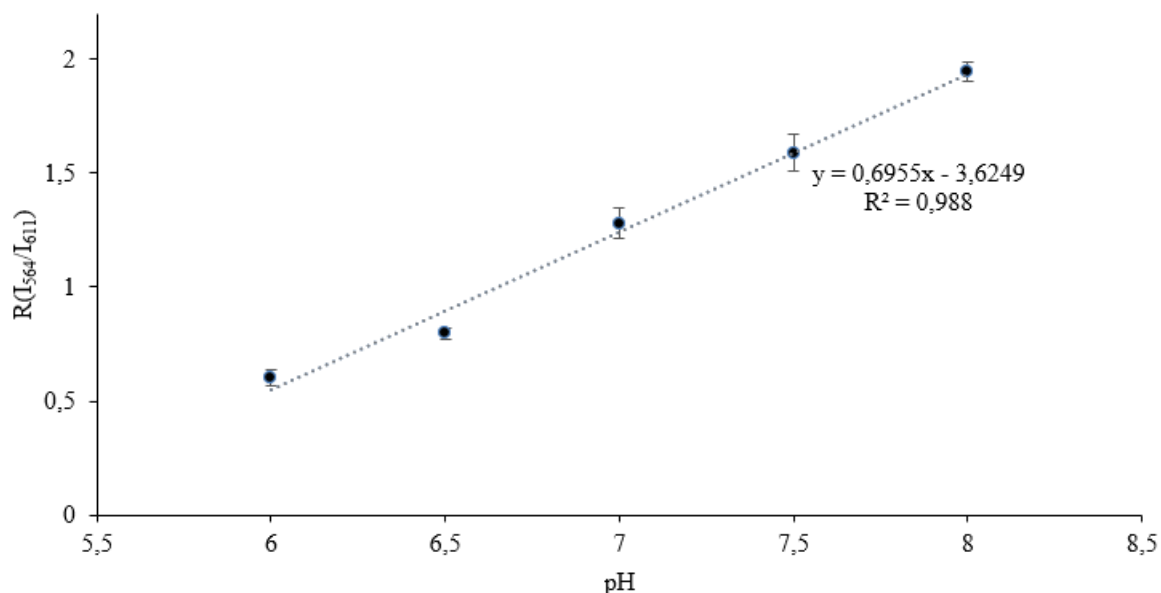


**Figura 12.** Efeito do pH no espectro de bioluminescência da luciferase de *C. distinctus*. Fonte: autoria própria.

Além disso, a variação de pH 7,0 para 6,0 também, causou um grande deslocamento espectral (**Fig. 5**).

### 5.1.8. Aplicabilidade como indicador de pH

A alta sensibilidade espectral desta luciferase ao pH mostra que esta tem um bom potencial como indicador de pH intracelular de alta resolução, já que uma leve redução de pH gera um efeito considerável no espectro de emissão desta enzima. Ao analisar a relação entre pH pela razão das intensidades de luz na região do verde em 564 nm e do vermelho em 611 nm, vemos uma tendência linear (**Fig. 13**).



**Figura 13.** Efeito de pH na razão de intensidade de luz verde e vermelha. Fonte: autoria própria.

As propriedades cinéticas com altas constantes e eficiências catalíticas mostram também que esta luciferase poderia ser um bom gene repórter além de indicador de pH.

Para certos propósitos bioanalíticos, é desejável que a enzima seja mais termoestável do que a luciferase de *C. distinctus*. Para isso, algumas outras luciferases como a de *A. vivianii* seriam mais apropriadas, uma vez que mantém cerca de 60% da sua atividade por mais de 20 horas (PELENTIR *et al.*, 2019; VIVIANI; PELENTIR; BEVILAQUA, 2022).

Apesar disso, para fins de bioimagem de processos biológicos em tempo real, uma luciferase pouco estável também tem potencial como gene repórter, uma vez que sua rápida desnaturação impede que acumule nos tecidos e com isso permite investigar melhor a dinâmica destes processos em tempo real (VIVIANI; OHMIYA, 2006).

### 5.1.9. Efeito de metais pesados no espectro de bioluminescência

O espectro de emissão de luciferases pH-sensíveis sofre alteração na presença de certos metais divalentes mais pesados. No entanto, cada uma dessas enzimas possui diferentes sensibilidades e seletividades aos mesmos (VIVIANI *et al.*,

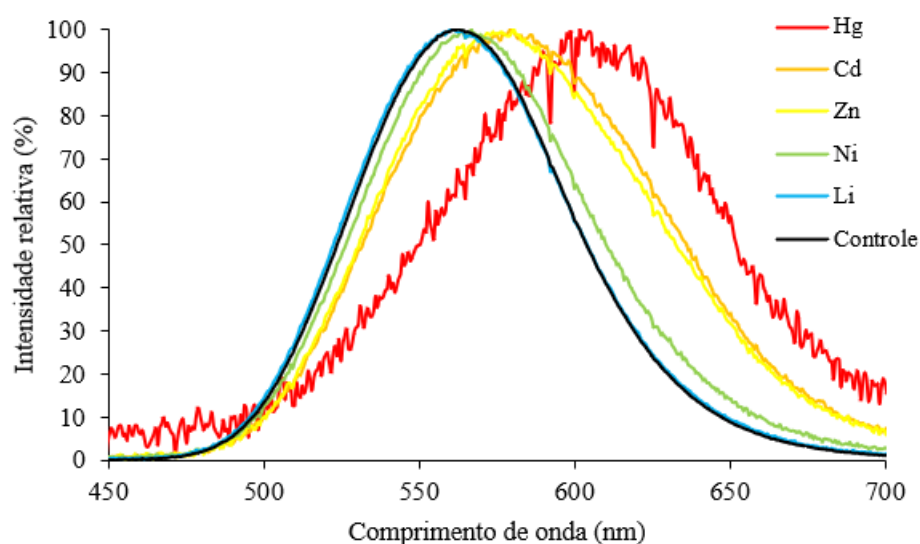
2022). Por essa razão, foram avaliados os espectros de emissão da luciferase de *C. distinctus* na presença de diferentes metais.

Assim como em outras luciferases, o lítio não desloca o espectro de bioluminescência. De forma semelhante, o níquel possui um efeito muito discreto. Por outro lado, metais como zinco e cádmio geram um deslocamento significativo de 10 nm e 17 nm, a uma concentração de 1 mM, respectivamente. O mercúrio foi o que mais deslocou o espectro, cerca de 42 nm a 1 mM (**Tab. 3, Fig. 14 e 15**). O efeito dos metais obedece à seguinte ordem: **Hg > Cd > Zn > Ni > Li**.

**Tabela 3.** Propriedades dos espectros de bioluminescência da luciferase de *C. distinctus* na presença de diferentes metais (concentração final de 1 e 2 mM).

Luciferase	$\lambda_{\max}$ (nm) [Meia-banda]										
	Controle	Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		CdSO <sub>4</sub>		ZnSO <sub>4</sub>		NiSO <sub>4</sub>		Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
		1 mM	2 mM	1 mM	2 mM	1 mM	2 mM	1 mM	2 mM	1 mM	2 mM
<b><i>Cratomorphus</i></b>	564 [85]	606	608	581	586	574	581	565	568	563	564
<b><i>distinctus</i></b>		[102]	[104]	[106]	[108]	[100]	[109]	[85]	[85]	[80]	[80]

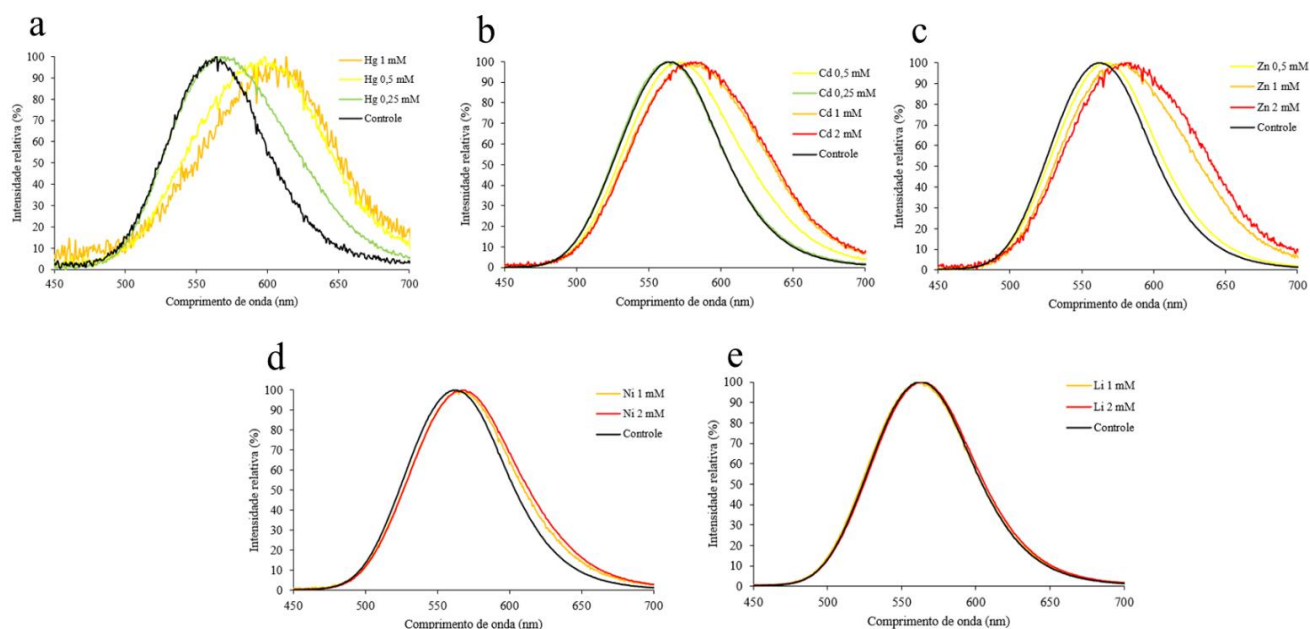
Fonte: autoria própria.



**Figura 14.** Efeito comparativo da adição de sais Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CdSO<sub>4</sub>, Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (concentração final = 1 mM) no espectro de emissão da luciferase de *C. distinctus*. Fonte: autoria própria.

Com base na mudança espectral gerada pela adição de metais (**Fig. 14**), a luciferase purificada de *C. distinctus* apresenta seletividade incomum ao mercúrio quando comparada a outros metais, uma vez que concentrações finais entre 60 e 50

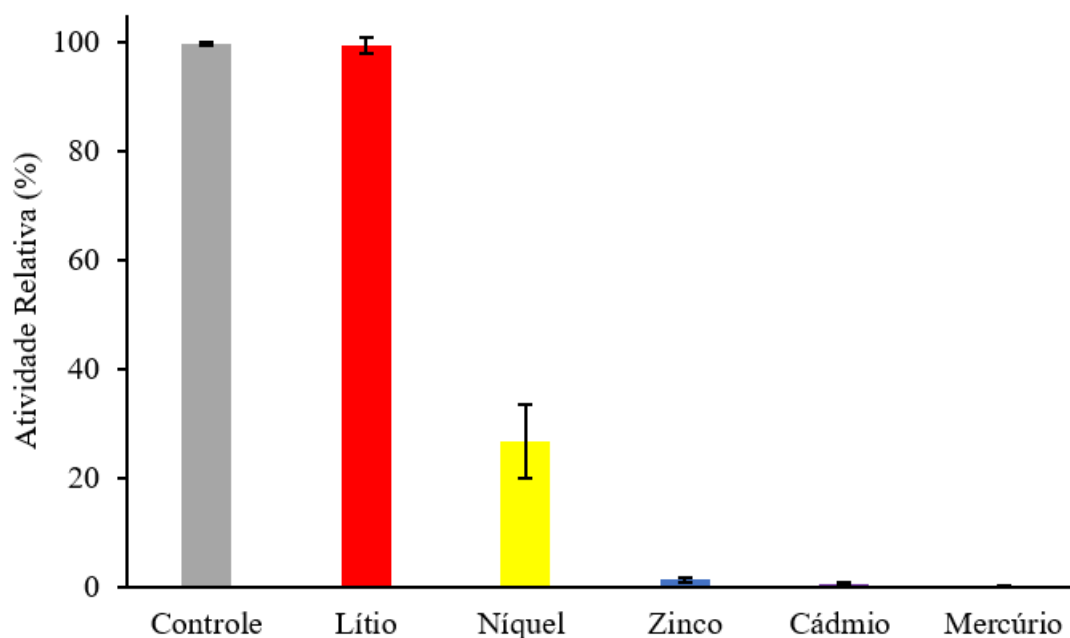
$\mu\text{M}$  foram suficientes para mudar consideravelmente o espectro ( $\sim 25\text{ nm}$ ), o que demonstra um potencial bioanalítico promissor como um biossensor específico de mercúrio. Comparativamente, a luciferase de *A. vivianii* é capaz de detectar  $100\ \mu\text{M}$  de cádmio e  $60\ \mu\text{M}$  de mercúrio (PELENTIR *et al.*, 2019) e a de *Macrolampis sp2* selvagem com uma detecção mínima de  $170\ \mu\text{M}$  de mercúrio (VIVIANI *et al.*, 2022).



**Figura 15.** Efeito de metais no espectro de bioluminescência da luciferase de *C. distinctus*: a)  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ; b)  $\text{CdSO}_4$ ; c)  $\text{ZnSO}_4$ ; d)  $\text{NiSO}_4$ ; e)  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ . Fonte: autoria própria.

### 5.1.10. Efeito dos metais na atividade bioluminescente

Foram avaliados os efeitos dos mesmos metais na atividade bioluminescente desta luciferase (**Fig. 16**). Assim como em outras luciferases, o lítio não afeta a atividade bioluminescente. Por outro lado, o níquel, que não gera efeito considerável no espectro, reduzindo a atividade bioluminescente em cerca de 75%. Já os demais metais zinco, cádmio e mercúrio afetam a atividade bioluminescente ainda mais, levando a uma redução de cerca de 99%. Esse padrão de baixíssima atividade na presença destes metais também é observado nas luciferases de *A. vivianii* e *A. lineatum* (PELENTIR *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2020).



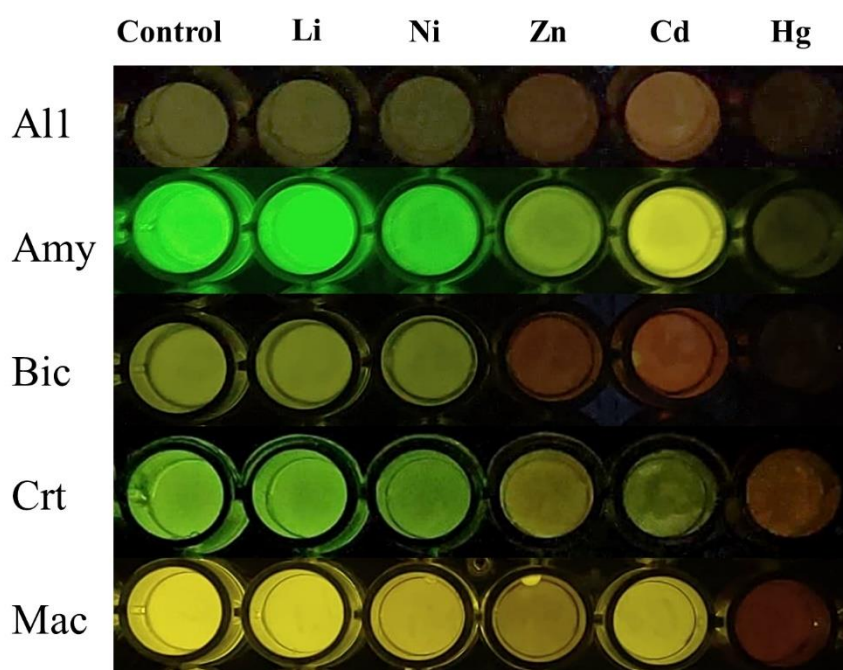
**Figura 16.** Efeito da adição de 1mM dos sais  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  na atividade bioluminescente da luciferase de *C. distinctus*. Fonte: autoria própria.

### 5.1.11. Aplicabilidade como sensor de metais: Comparação com outras luciferases

Metais potencialmente tóxicos geram grandes prejuízos à saúde ambiental e humana. Estudos indicam que concentrações entre 100 e 300  $\mu\text{M}$  de cádmio em células de fígado de rato reduzem a atividade de diversas proteínas antioxidantes (BERTIN; AVERBECK, 2006) e concentrações maiores que 2,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  geram efeitos genotóxicos (SÁNCHEZ-ALARCÓN *et al.*, 2021).

Como é possível observar na **Fig. 17**, cada luciferase investigada pelo nosso grupo possui uma sensibilidade única a diferentes metais. A luciferase de *C. distinctus* apresentou uma sensibilidade maior aos metais zinco, cádmio e mercúrio, em ordem crescente. Esta luciferase foi também a que apresentou visualmente maior deslocamento espectral a esse metal. Foi possível observar que, em comparação às luciferases de *A. lineatum 1* e *B. lividipenis*, a de *C. distinctus* manteve maior atividade bioluminescente relativa em 1 mM com mercúrio que as outras luciferases. Para o cádmio, a luciferase de *A. vivianii* apresentou maior sensibilidade, mantendo boa parte da atividade bioluminescente.

De acordo os estudos de VIVIANI *et al.*, 2022, na presença de 2 mM de mercúrio, as luciferases selvagens de *A. vivianii* e *Macrolampis sp2* tem seu espectro de bioluminescência deslocado em 33 nm e 34 nm para o vermelho, respectivamente. Enquanto isso, na mesma concentração, a luciferase de *C. distinctus* apresenta um deslocamento de 44 nm (**Tab. 3**). O maior deslocamento com o mercúrio (44 nm) em relação a outras luciferases, indica que a luciferase de *Cratomorphus distinctus* possui uma maior afinidade por este metal (**Tab. 2**).



**Figura 17.** Fotografia da bioluminescência das luciferases pH-sensíveis na presença de diferentes metais: Al1 (*A. lineatum 1*), Amy (*A. vivianii*), Bic (*B. lividipenis*), Crt (*C. distinctus*) e Mac (*Macrolampis sp2*). Concentração final de 1 mM de LiSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CdSO<sub>4</sub> e Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Obtida com Motorola Edge 20 Pro. Fonte: autoria própria.

Com base na **Fig.17** e **Tab. 4**, podemos comparar o efeito dos metais em seu espectro de bioluminescência, bem como em sua atividade bioluminescente. Levando em conta as propriedades intrínsecas de cada luciferase, pode-se determinar qual ou quais luciferases apresentam as melhores propriedades para ser utilizada como um bom biossensor de metais.

A luciferase de Al1 é mais sensível ao mercúrio, comparada a outros metais, no entanto, apresenta a desvantagem de ter uma atividade específica muito baixa ( $40 \cdot 10^9 \text{ cps mg}^{-1}$ ) e uma cinética luminescente muito rápida, o que impede realizar a leitura da reação bioluminescente por muito tempo (CARVALHO *et al.*, 2020). A luciferase de

*B. lividipenis* apresenta um bom deslocamento com zinco, cádmio e mercúrio, porém, sua atividade específica muito baixa ( $10 \cdot 10^9 \text{ cps mg}^{-1}$ ) impede que seja utilizada como um biossensor de metais eficiente (MOREIRA *et al.*, 2022). Já a de *Macrolampis sp2* é mais eficiente e apresenta uma boa sensibilidade a mercúrio, porém, seu espectro naturalmente mais deslocado para o vermelho (572 nm), limita o deslocamento espectral. A luciferase de *Amydetes vivianii* apresenta uma boa sensibilidade ao cádmio e mercúrio. Além disso, é altamente eficiente e estável, o que faz desta luciferase um bom biossensor destes metais, especialmente para cádmio, uma vez que mantém uma atividade alta na presença do mesmo. (VIVIANI *et al.*, 2022; PELENTIR *et al.*, 2019). A luciferase de *Amydetes* é de fato já utilizada em aulas práticas de bioquímica, e análises de cádmio (Viviani *et al.*, 2023). Já a luciferase de *C. distinctus* é a que possui o maior deslocamento espectral com mercúrio dentre as demais luciferases, além disso, possui uma boa atividade específica ( $617 \cdot 10^9 \text{ cps.mg}^{-1}$ ), o que faz dessa luciferase um promissor reagente bioanalítico para detecção de mercúrio. Em suma, pode-se afirmar que as luciferases de *Macrolampis sp2*. e *C. distinctus* são muito promissoras para biossensores de mercúrio, já a luciferase de *A. vivianii*, para o cádmio (VIVIANI *et al.*, 2022; PELENTIR, *et al.*, 2019, CARVALHO *et al.*, 2020; MOREIRA *et al.*, 2022).

**Tabela 4.** Efeito da adição de 2 mM de diferentes metais no espectro de bioluminescência de luciferases de lampirídeos.

Luciferases	Comprimento de onda (nm)	$\Delta_\lambda$ (nm) *				Aesp. ( $10^9 \text{ cps mg}^{-1}$ )	Meia-vida a 37 °C (Horas)
	Controle	ZnSO <sub>4</sub>	CdSO <sub>4</sub>	Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	pH 6		
<b>Al1**</b>	573	10	20	24	32	40	<1
<b>Amy</b>	549	4	29	33	34	890	12
<b>Bic**</b>	567	~22	~36	~31	47	10	<1
<b>Crt</b>	564	17	22	44	47	617	<1
<b>Mac</b>	573	9	19	34	37	1198	1,5

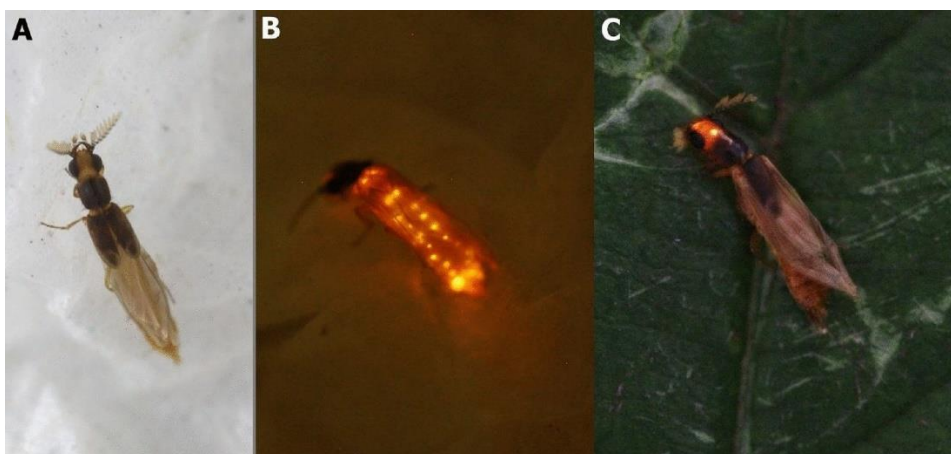
Fonte: adaptado de VIVIANI; PELENTIR; BEVILAQUA, 2022 e MOREIRA *et al.*, 2022.

\* Em relação ao controle; \*\*valor referente a 1 mM do metal



## 5.2. A Luciferase emissora de luz laranja do fengodídeo *Euryopa clarindae*

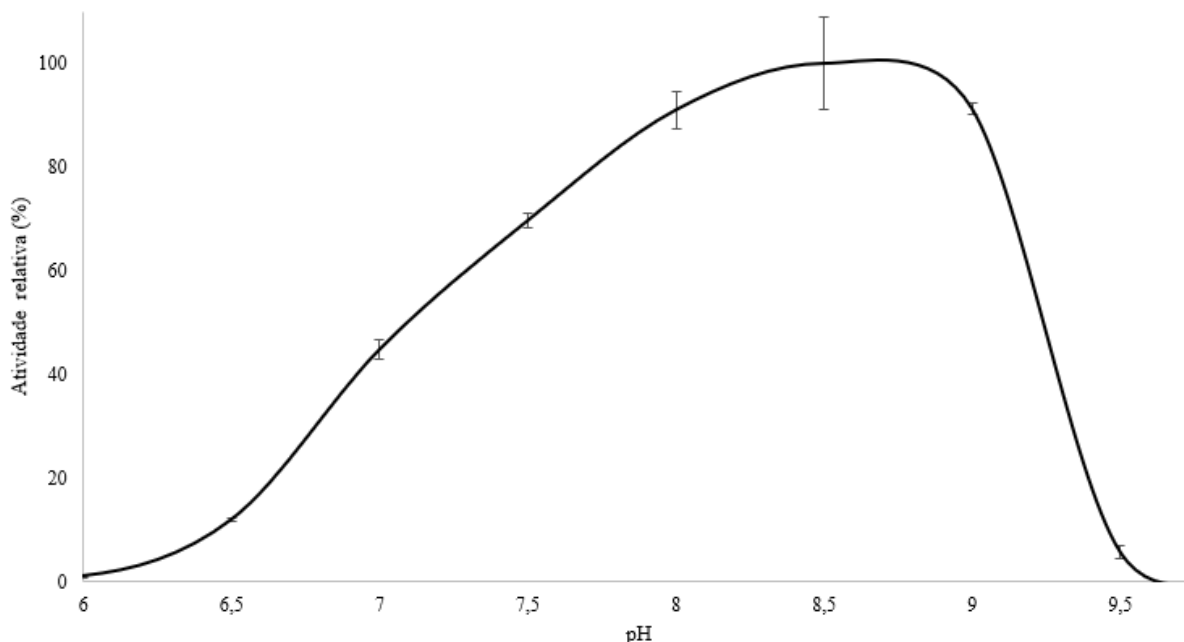
A luciferase de adultos de *E. clarindae* (**Fig. 18**), um raro vagalume fengodídeo encontrado no Cerrado brasileiro e uma das poucas espécies que produzem luz laranja-avermelhada, foi recentemente clonada, sequenciada em vetor pSport e, neste trabalho de mestrado, caracterizada (VIVIANI *et al.*, 2023).



**Figura 18.** Fengodídeo emissor de luz laranja: (A) Macho adulto de *Euryopa clarindae*; (B) Indivíduo adulto de *E. clarindae* exibindo bioluminescência no corpo; (C) Indivíduo adulto de *E. clarindae* exibindo bioluminescência na cabeça (VIVIANI *et al.*, 2024).

### 5.2.1. Efeito do pH na atividade bioluminescente

O pH ótimo da luciferase de *E. clarindae* está ~9,0 (**Fig. 19**), numa região mais alcalina do que o da maioria das luciferases de besouros (VIVIANI *et al.*, 2008; PELENTIR *et al.*, 2019). Além disso, esta luciferase tem alta atividade numa ampla faixa de pH em relação a outras luciferases, já que mantém mais de 60 % de atividade entre o pH 7,5 e 9,0.



**Figura 19.** Efeito do pH na atividade bioluminescente da luciferase de *E. clarindae*. Fonte: autoria própria.

### 5.2.2. Propriedades cinéticas

**Afinidade pelos substratos.** O  $K_M$  da luciferase de *E. clarindae* para luciferina foi alto, cerca de  $93 \mu\text{M}$ , e para o ATP foi  $169 \mu\text{M}$  (**Tab. 4**). O valor do  $K_M$  para luciferina é cerca de 5 vezes maior que o da luciferase emissora de luz vermelha da cabeça de *P. hirtus* e 5 vezes menor que o da luciferase emissora de luz verde do corpo de *P. vivianii*, ambas também da família Phengodidae. Assim, estes valores são intermediários entre os valores das luciferases verdes de lanternas laterais de *P. vivianii* e da luciferase vermelha da cabeça de *P. hirtus* (VIVIANI *et al.*, 2023).

Quando comparada as luciferases de lampirídeos, o  $K_M$  da luciferase de *E. clarindae* para LH<sub>2</sub> é bem maior que nas luciferases de *A. vivianii*, *Macrolampis sp2*, *P. pyralis*, *A. lineatum AL1*. Em contrapartida, o  $K_M$  para ATP da luciferase de *E. clarindae* é menor que na luciferase de *P. pyralis*, porém maior que nas luciferase de *A. vivianii*, *Macrolampis sp2*, *A. lineatum* (PELENTIR *et al.*, 2019; MOREIRA *et al.*, 2022; CARVALHO *et al.*, 2020).

**Tabela 5.** Comparação de propriedades estruturais e cinéticas de diferentes luciferases de coleópteros.

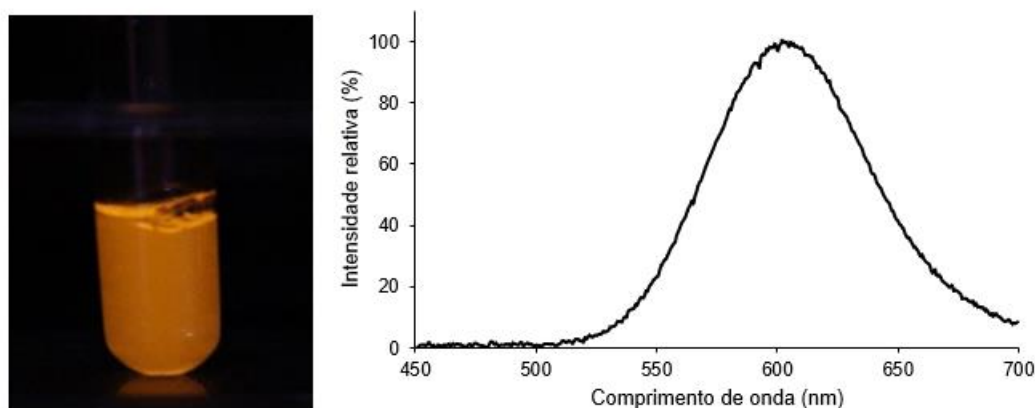
Luciferase	Nº resíduos	pH	t <sub>1/2</sub> (s)	K <sub>M</sub> LH <sub>2</sub> (µM)	K <sub>M</sub> ATP (µM)	λ <sub>max</sub> (nm)	Aplicações efetivas ou potenciais
<b>Lampyridae</b>							
<i>Photinus pyralis</i>	550	7.8	28	5	250	560	Reagente bioanalítico, Gene repórter, sensor celular e bioimagem em tempo real etc [1,2]
<i>Amydetes vivianii</i>	547	8,0	1200	9	9	547	Sensor de cádmio e indicador de pH termooestável [3, 5]
<i>Macrolampis sp2</i>	550	8,2	-	20	83	575	Indicador de pH [4, 5]
<i>Cratomorphus distinctus</i>	547	8,2	-	16	24	564	Indicador de pH, biossensor para mercúrio, bioimagem em tempo real [5]
<b>Elateridae</b>							
<i>Pyrearinus termitilluminans</i>	543	8.0	115	80	360	538	Gene repórter para bioimagem, sensor <i>light off</i> de metais [6,7]
<i>Pyrophorus angustus</i>	543	8,5	-	17	160	595	_____
<i>Fulgeochlizus bruchi</i>	543	9	-	12	140	542	_____
<b>Ragophtalmidae</b>							
<i>Ragophtalmus ohbai</i>	543		110	1300	-	554	Gene repórter [8]
<b>Phengodidae</b>							
<i>Phrixotrix viviani</i> (L)	545	8.0	2310	64	330	548	_____
<i>Phrixotrix hirtus</i> (L)	545	8.0	300	45	260	563	_____
<i>Phrixotrix hirtus</i> (H)	546		35	7	230	623	Gene repórter para bioimagem em tecidos pigmentados [9]

<i>Euryopa clarindae</i>	548	8.5	42	93	169	600	Gene repórter em sistemas múltiplos <sup>[10]</sup>
--------------------------	-----	-----	----	----	-----	-----	---

Fonte: Adaptado de <sup>[1]</sup> De WET et al., 1987; <sup>[2]</sup> BRANCHINI et al., 2010; <sup>[3]</sup> PELENTIR et al., 2019, <sup>[4]</sup> GABRIEL; VIVIANI, 2014; <sup>[5]</sup> VIVIANI et al., 2022; <sup>[6]</sup> NAKAJIMA et al., 2010; <sup>[7]</sup> GABRIEL; LOPES; VIVIANI, 2014; <sup>[8]</sup> NAKAJIMA et al., 2005; <sup>[9]</sup> NAKAJIMA et al., 2004; <sup>[10]</sup> VIVIANI et al., 2024.

### 5.2.3. Espectro de bioluminescência

O espectro de bioluminescência *in vitro* da luciferase de *E. clarindae* em pH 8,0 tem seu pico em 600 nm (**Fig. 20**), sendo, portanto, uma das luciferases com luz mais deslocada para o vermelho entre as luciferases de coleópteros. Entre as luciferases emissoras de luz laranja clonadas até o momento, que eram oriundas de espécies de elaterídeo *Pyrophorus*, esta é aquela com o espectro mais deslocado para o vermelho. Por ser pH-insensitiva, ensaios em diferentes pHs não mostraram mudança significativa no pico de emissão.



**Figura 20.** Espectro de bioluminescência *in vitro* da luciferase de *Euryopa clarindae* e imagem da bioluminescência *in vitro* na presença de D-luciferina, magnésio e ATP (VIVIANI et al., 2023).

### 5.3. Subclonagem, expressão e propriedades da luciferase purificada de *E. clarindae*

Embora a luciferase já tenha sido clonada, sequenciada e caracterizada em extratos brutos, uma caracterização mais detalhada com a luciferase purificada foi necessária, especialmente para determinar as propriedades cinéticas com mais

exatidão. Assim, o cDNA da luciferase de *E. clarindae* que estava em vetor pSport foi subclonado em vetor pCold II (Takara) possibilitando que esta enzima fosse expressa em maiores níveis em bactérias *E. coli* BL21-DE3 e assim possibilitando sua purificação, e uma caracterização mais detalhada de suas propriedades cinéticas.

Dessa forma, foi possível comparar os parâmetros cinéticos da luciferase de *E. clarindae* em extrato bruto e a enzima purificada. A atividade específica das amostras purificadas foi de  $\sim 1,0 \times 10^{11}$  cps/mg e sua constante catalítica ( $k_{cat}$ ), sendo de  $1.2 \times 10^{-7}$  cps (Tab. 5), sendo valores altos quando comparados aqueles de outras luciferases de fengodídeos.

**Tabela 6.** Propriedades cinéticas da luciferase no extrato bruto e purificada.

Luciferase	$\lambda_{max}$ [Meia- banda] (nm)	$K_M$ ( $\mu M$ )		Aesp ( $10^9$ cps mg $^{-1}$ )	$k_{cat}$ ( $10^{-6}$ cps)	$k_{cat}/K_M$ ATP (c.s $^{-1}$ . $\mu M^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ LH <sub>2</sub> (c.s $^{-1}$ . $\mu M^{-1}$ )
		LH <sub>2</sub>	ATP				
Extrato bruto (pSport-Eury)	600	93	169	$\sim 2,0$	-	-	-
Purificada (pCold- Eury)	600	70	170	$102 \pm 5,5$	$12 \pm 0,6$	0,07	0,17

Fonte: autoria própria.

A enzima parcialmente purificada, apresenta valores de  $K_M$  ligeiramente menores para a luciferina e idêntico para o ATP em relação aos valores determinados para os extratos brutos. Estas diferenças são esperadas, considerando que os extratos brutos contêm outras proteínas e eventualmente inibidores que podem afetar a cinética da luciferase.

Como esperado, o espectro de bioluminescência da forma purificada da luciferase não sofreu nenhuma mudança.

### 5.3.1. Aplicabilidade bioanalítica potencial da luciferase de *Euryopa clarindae*

Considerando que a luciferase de *E. clarindae* apresenta uma atividade específica alta e um espectro de emissão na região do laranja, o gene desta enzima poderia ser utilizado em conjunto com os genes de luciferases emissoras de luz verde e vermelha, em sistemas repórteres bioluminescentes triplos, que permitem monitorar

a expressão de três genes simultaneamente por meio da intensidade de luz verde, laranja e vermelha.

## 6. CONCLUSÕES

A clonagem e caracterização de novas luciferases de besouros são necessárias para prospectar novas aplicações bioanalíticas. Neste contexto, nesta dissertação apresentamos a expressão em bactérias, purificação e caracterização de duas novas luciferases, a luciferase pH-sensitiva do lampirídeo *Cratomorphus distinctus* e a luciferase emissora de luz laranja do fengodídeo *Euryopa clarindae*.

A luciferase do vagalume lampirídeo *C. distinctus* apresenta atividade específica e eficiências catalíticas altas comparáveis a outras luciferases de lampirídeos. Além disso, também possui alta sensibilidade ao pH e uma seletividade maior ao mercúrio quando comparada a outros metais tóxicos e outras luciferases. Estas propriedades bem como sua instabilidade, conferem a esta luciferase potencialidades bioanalíticas como indicador de pH e gene repórter para analisar processos em tempo real, e também como proteína sensora para detecção e quantificação ratiométrica de mercúrio.

A luciferase emissora de luz laranja do fengodídeo *Euryopa clarindae* é a segunda luciferase com espectro mais deslocado para o vermelho a ser clonada até o momento, logo depois da luciferase vermelha de *Phrixotrix hirtus*. Suas propriedades cinéticas com  $K_{MS}$  e espectros de bioluminescência são intermediárias entre as luciferases emissoras de luz verde e vermelha de fengodídeos, indicando que esta luciferase possa ser um intermediário evolutivo entre as luciferases emissoras de luz verde e vermelha de fengodídeos. Por isso, esta luciferase constitui um bom objeto de estudo para melhor entender a relação entre estrutura das luciferases e espectros de bioluminescência, e os mecanismos de modulação de cores das luciferases de coleópteros. Além disto, esta luciferase, por emitir luz laranja, pode servir como um bom gene repórter para sistemas triplos que usam luciferases emissoras de luz verde, laranja e vermelha.

## 7. PERSPECTIVAS

**O presente trabalho abre a possibilidade de realizar os seguintes estudos:**

- Mutagênese sítio-dirigida na luciferase de *C. distinctus* para aprimorar sua estabilidade e avaliar seu uso como indicador de pH intracelular de mamíferos, visando sua aplicação em bioimagem;
- Realizar estudos de mutagênese sítio-dirigida com a luciferase de *E. clarindae* para estudar o mecanismo de modulação de cores nas luciferases de fengodídeos;
- Avaliar a atividade e espectro de emissão da luciferase de *E. clarindae* com amino-análogos de luciferina para obter informações sobre seu sítio ativo;
- Avaliar a aplicabilidade da luciferase de *E. clarindae* em sistemas repórter bioluminescentes triplos, que permitem monitorar a expressão de até três genes, baseado na intensidade de luz verde, laranja e vermelha emitidas.

## 8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

**Artigo publicado:** Viviani, V. R., Benites, G. R., Souza, D. R., Pelentir, G. F., Reis, R. M., Bechara, E. J., & Tomazini, A. (2023). The orange light emitting luciferase from the rare *Euryopa clarindae* adult railroadworm (Coleoptera: Phengodidae): structural/functional and evolutionary relationship with green and red emitting luciferases. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1-13.

### **Artigo em preparação**

BENITES, Gabrielle R., PELENTIR, Gabriel F., VIVIANI, Vadim R. Prospecting *Cratomorphus distinctus* firefly luciferase as a sensor of heavy metals and pH: comparison with other color tuning luciferases.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIPOUR, B. S. et al. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm, *Lampyrus turkestanicus*. **Biochem.iophys. Res. Commun.**, v. 325, p. 215–222, 2004.

AMARAL, Danilo T. et al. A new orange emitting luciferase from the Southern-Amazon *Pyrophorus angustus* (Coleoptera: Elateridae) click-beetle: structure and bioluminescence color relationship, evolutionary and ecological considerations. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 15, p. 1148-1154, 2016.

AMARAL, Danilo T.; PRADO, Rogilene A.; VIVIANI, Vadim R. Luciferase from *Fulgeochlizus bruchi* (Coleoptera: Elateridae), a Brazilian click-beetle with a single abdominal lantern: molecular evolution, biological function and comparison with other click-beetle luciferases. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 11, p. 1259-1267, 2012.

AMARAL, DANILO T.; PRADO, ROGILENE A.; VIVIANI, VADIM 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, p. 1259-1267, 2013.

AMARAL, Danilo T.; SILVA, Jaqueline R.; VIVIANI, Vadim R. Transcriptomes from the photogenic and non-photogenic tissues and life stages of the *Aspisma lineatum* firefly (Coleoptera: Lampyridae): Implications for the evolutionary origins of bioluminescence and its associated light organs. **Gene Reports**, v. 8, p. 150-159, 2017.

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

ASCHNER, Michael; ASCHNER, Judy Lynn. Mercury neurotoxicity: mechanisms of blood-brain barrier transport. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 14, n. 2, p. 169-176, 1990.

BECHARA, Etelvino JH; VIVIANI, Vadim R. Luzes vivas na escuridão: Fatos e Casos. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 3-40, 2015.

BERTIN, G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1549-1559, 2006.

BEVILAQUA, V. R. et al. Phrixotrix luciferase and 6'-aminoluciferins reveal a larger luciferin phenolate binding site and provide novel far-red combinations for bioimaging purposes. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 8998, 2019.

BRANCHINI, B. R. et al. Luciferase from the Italian firefly *Luciola italica*: Molecular cloning and expression. **Comp. Biochem. Physiol.**, Part B, v. 145, p. 159–167, 2006.

BRANCHINI, Bruce R. et al. An alternative mechanism of bioluminescence color determination in firefly luciferase. **Biochemistry**, v. 43, n. 23, p. 7255-7262, 2004.

BRANCHINI, Bruce R. et al. 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, Bruce R. et al. Red-emitting luciferases for bioluminescence reporter and imaging applications. **Analytical biochemistry**, v. 396, n. 2, p. 290-297, 2010.

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.



CARVALHO, M. C. et al. Luciferase isozymes from the Brazilian *Aspisma lineatum* (Lampyridae) firefly: origin of efficient pH-sensitive lantern luciferases from fat body pH-insensitive ancestors. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 19, p. 1750-1764, 2020.

CONTI, E.; FRANKS, N. P.; BRICK, P. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. **Struc.**, v. 4, p. 287-298, 1996.

CRIVAT, Georgeta; TARASKA, Justin W. Imaging proteins inside cells with fluorescent tags. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 8-16, 2012.

CROWSON, R. A. A review of the classification of Cantharoidea (Coleoptera), with the definition of two new families, Cneoglossidae and Omethidae. **Rev. Univ. Madrid**, v. 21, p. 35-77, 1972.

DAY, John C.; TISI, Laurence C.; BAILEY, Mark J. Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin. **Luminescence: The journal of biological and chemical luminescence**, v. 19, n. 1, p. 8-20, 2004.

DELUCA, Marlene. Hydrophobic nature of the active site of firefly luciferase. **Biochemistry**, v. 8, n. 1, p. 160-166, 1969.

DELUCA, Marlene. Hydrophobic nature of the active site of firefly luciferase. **Biochemistry**, v. 8, n. 1, p. 160-166, 1969.

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. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v.1173 (2), p: 121-132, 1993.

DeWET, J. R.; WOOD, K.V; HELINSKY, D.R.; DeLUCA, M. Cloning of firefly luciferase cDNA and expression. Of active luciferase in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 82, p. 7870-7873, 1985.

DE WET, Jeffrey R. et al. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. **Molecular and cellular biology**, v. 7, n. 2, p. 725-737, 1987.

DOSTALEK, Pavel; BRANYIK, TOMÁŠ. Prospects for rapid bioluminescent detection methods in the food industry—a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 23, n. 3, p. 85-92, 2003.

DSOUZA, Herman S.; MENEZES, Geraldine; VENKATESH, T. Fetal lead exposure: encephalopathy in a child. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 17, p. 9-11, 2002.

ELLIS, Emily A.; OAKLEY, Todd H. High rates of species accumulation in animals with bioluminescent courtship displays. **Current Biology**, v. 26, n. 14, p. 1916-1921, 2016.

ELLIS, Reginald John. The general concept of molecular chaperones. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 339, n. 1289, p. 257-261, 1993.

EMAMZADEH, A. R. et al. cDNA Cloning, expression and homology modeling of a luciferase from the firefly *Lampyroidea maculata*. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 39, p. 578–585, 2006.

FRANKLIN, Scott et al. Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. **The Plant Journal**, v. 30, n. 6, p. 733-744, 2002.

Gabriel, G.V.; 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.** , 13, 1661–1670, 2014.

GABRIEL, Gabriele VM; LOPES, P. S.; VIVIANI, V. R. Suitability of *Macrolampis* firefly and *Pyrearinus* click beetle luciferases for bacterial light off toxicity biosensor. **Analytical biochemistry**, v. 445, p. 73-79, 2014.

Gabriel, G.V.; Yasuno, R.; Mitani, Y.; Ohmiya, Y.; Viviani, V.R. Novel application of *Macrolampis* sp2 firefly luciferase for intracellular pH-biosensing in mammalian cells. ***Photochem. Photobiol. Sci.***, **18**, 1212–1217, 2019.

GABRIEL, Gabriele VM; VIVIANI, Vadim 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. 408, p. 8881-8893, 2016.

HADDOCK, Steven HD; MOLINE, Mark A.; CASE, James F. Bioluminescence in the sea. ***Annual review of marine science***, v. 2, p. 443-493, 2010.

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

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

HERRING, P. J. Systematic distribution of bioluminescence in living organisms. ***Journal of Bioluminescence and chemiluminescence***, v. 1, p. 147-163, 1987.

HERRING, Peter J. Systematic distribution of bioluminescence in living organisms. ***Journal of bioluminescence and chemiluminescence***, v. 1, n. 3, p. 147-163, 1987.

IWANO, Satoshi et al. Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. ***Science***, v. 359, n. 6378, p. 935-939, 2018.

KAJIYAMA, N.; NAKANO, E. Isolation and characterization of mutants of firefly luciferase which produce colors of light. ***Protein Engineering Design & Selection***, v. 4(6), p: 691-693, 1991.

KRULWICH, T.A.; SACHS, G.; PADAN, E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. ***Nat. Rev. Microbiol.*** **2011**, 9, 330–343.

LACERDA, L. D. Evolution of mercury contamination in Brazil. ***Water, Air, and Soil Pollution***, v. 97, p. 247-255, 1997.

LANDRIGAN, Philip J.; TODD, Andrew C. Lead poisoning. ***Western Journal of Medicine***, v. 161, n. 2, p. 153, 1994.

LAWRENCE, J.F.; NEWTON, A.F. JR. Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references, and data on family-group names). In: ***Bioluminescence in Action (Ed. P. Herring)***. New York, **Academy Press**, p. 109-127. 1995.

LI, Y. et al. Cloning and sequencing of a cDNA for the firefly luciferase from *Photuris pennsylvanica*. ***Biochem. Biophys. Acta.***, v. 1339, p. 39–52, 1997.

McCAPRA, F. et al. The chemical origin of color differences in beetle bioluminescence. In: **Campbell, A.K.; Kricka, L. J.; Stanley, P. E. *Bioluminescence and Chemiluminescence: fundamental and applied aspects***, Chichester: **John Wiley and Sons**, p: 387-391, 1994

McELROY, W. D.; DeLUCA, M. Chemistry of firefly bioluminescence. *Bioluminescence in Action*. **Academic Press**, New York, p: 109-127, 1978.

MORADI, A., HOSSEINKHANI, S., NADERI-MANESH, H., SADEGHIZADEH, M. e ALIPOUR, B. A. Effect of charge distribution in a flexible loop on the bioluminescence color of fireflies luciferase. ***Biochem.*** v. 48, p. 575–582, 2009.

MOREIRA, A. C. et al. Cloning and molecular properties of a novel luciferase from the Brazilian *Bicellonycha lividipennis* (Lampyridae: Photurinae) firefly: comparison with other firefly luciferases. ***Photochemical & Photobiological Sciences***, v. 21, n. 9, p. 1559-1571, 2022.

NAKAJIMA, Y. et al. Improved expression of novel red- and green-emitting luciferases of *Phrixothrix* railroad worms in mammalian cells. **Biosc. Biotechnol. Biochem.**, v. 68, p. 948– 951, 2004.

NAKAJIMA, Yoshihiro et al. Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. **Biotechniques**, v. 38, n. 6, p. 891-894, 2005.

NAKAJIMA, Y; OHMIYA, Y. Bioluminescence assays: multicolor luciferase assay, secreted luciferase assay and imaging luciferase assay. **Expert Opinion Drug Discovery**, v. 5, p. 835– 849, 2010.

NAKAJIMA, Yoshihiro *et al.* Enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10011, 2010.

NAKATSU, T., ICHIYAMA, S., HIRATAKE, J., SALDANHA, A., KOBASHI, N., SAKATA, K., KATO, H. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. **Nature**, v. 440, p: 372-376, 2006.

NAWROT, Tim S. et al. Association of total cancer and lung cancer with environmental exposure to cadmium: the meta-analytical evidence. **Cancer Causes & Control**, v. 26, p. 1281-1288, 2015.

OLIVEIRA, Gabriela; VIVIANI, Vadim R. Comparison of the thermostability of recombinant luciferases from Brazilian bioluminescent beetles: Relationship with kinetics and bioluminescence colours. **Luminescence**, v. 33, n. 2, p. 282-288, 2018.

PATACAS, R. C. Desenvolvimento, caracterização e otimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas. 2007. 139 f. **Dissertação. (Mestrado em Química)** - Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2007.

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. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 18, p. 2061-2070, 2019.

POLLOK, Brian A.; HEIM, Roger. Using GFP in FRET-based applications. **Trends in cell biology**, v. 9, n. 2, p. 57-60, 1999.

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. J.**, v. 313, p. 761–767, 1996.

SÁNCHEZ-ALARCÓN, Juana et al. Genotoxicity of mercury and its derivatives demonstrated in vitro and in vivo in human populations studies. Systematic review. **Toxics**, v. 9, n. 12, p. 326, 2021.

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

SYED, Aisha J.; ANDERSON, James C. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 9, p. 5668-5705, 2021.

TAFRESHI, N. K.; SADEGHIZADEH, M.; EMAMZADEH, R.; RANJBAR, B.; NADERIMANESH, H.; HOSSEINKHANI, S. Site-directed mutagenesis of firefly luciferase: implication of conserved residue(s) in bioluminescence emission spectra among firefly luciferases. **Biochemical Journal**, v. 412, p: 27-33, 2008.

TAFRESHI, N. K; HOSSEINKHANI, S.; SADEGHIZADEH, M.; SADEGHI, M.; RANJBAR, B.; NADERIMANESH, H. The influence of insertion of a critical residue (Arg356) in Structure and Bioluminescence Spectra of firefly Luciferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n.12, p: 8641-8647, 2007.

TATSUMI, H. et al. Luciferase cDNA from Japanese firefly *Luciola cruciata*: cloning, structure and expression in *E. coli*. **J. Biolum. Chemilum.**, v. 3, p. 75–78, 1989.

TATSUMI, H.; KAJIYAMA, N.; NAKANO, E. Molecular cloning and expression in *E. coli* of a cDNA encoding luciferase of a firefly *Luciola lateralis*. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1131, p. 161–165, 1992.

UGAROVA, N. N.; BROVKO, L. Yu. Protein structure and bioluminescent spectra for firefly bioluminescence. **Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence**, v. 17, n. 5, p. 321-330, 2002.

UGAROVA, N. N.; BROVKO, L. Yu. Protein structure and bioluminescent spectra for firefly bioluminescence. **Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence**, v. 17, n. 5, p. 321-330, 2002.

VIVIANI, V.; BECHARA, E. J. H. Bioluminescence of Brazilian fireflies (Coleoptera: Lampyridae): spectral distribution and pH effect on luciferase-elicited colors. Comparison with elaterid and phengodid luciferases. **Photochemistry and Photobiology**, v. 62, p. 490- 492, 1995.

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

VIVIANI, V. R.; PEREZ, G. O.; SILVA, A. C. R.; BECHARA, E. J. H.; REINACH, F. R. Cloning and Molecular Characterization of the cDNA for the Brazilian Larval Click-beetle *Pyrearinus termitilluminans* Luciferase. **Photochemistry and Photobiology**, v.70, p. 254- 260, 1999a.

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

VIVIANI, V. R.; OHMIYA, Y. Bioluminescence color determinants of *Phrixothrix* railroadworm luciferases: chimeric luciferases, site-directed mutagenesis of Arg 215 and guanidine effect. **Photochemistry and Photobiology**, v. 72(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. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, p. 1286-1291, 2001.

VIVIANI, V. R. The origin, diversity and structure function relationships of insect luciferases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p.1833-1850, 2002.

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

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, 2004.

VIVIANI, V. R.; OHELMAYER, T. L.; ARNOLDI, F. G. C.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. A new firefly luciferase with bimodal spectrum: structural determinants of spectral sensitivity in firefly luciferases. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p: 843-848, 2005.

VIVIANI, V. R.; OHMIYA, Y. Beetle luciferases: colorful lights on biological processes and diseases. **Photoprot. Bioanal., Darmstadt: Wiley-VCH**, p. 49–63, 2006.

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

VIVIANI, V. R.; ARNOLDI, F. G. C.; NETO, A. J. S.; OHELMAYER, T. L.; BECHARA, E. J. H.; OHMIYA, Y. The structural origin and biological function of pH-sensitivity in firefly luciferases. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 7, p: 159–169, 2008.

Viviani, V. R., Silva Neto, A. J., Arnoldi, F. G., Barbosa, J. A., & Ohmiya, Y.. The influence of the loop between residues 223-235 in beetle luciferase bioluminescence spectra: A Solvent gate for the active site of pH-sensitive luciferases. **Photochemistry and photobiology**, 84(1), 138-144, 2008.

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. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 7, p: 159–169, 2008.

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

VIVIANI, V. R.; SIMÕES, A. F. ; BEVILAQUA, V. R. ; GABRIEL, G. V. M ; 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**, v. 55, p. 4764-4776, 2016.

VIVIANI, VADIM R; GABRIEL, GABRIELE V. M. ; BEVILAQUA, VANESSA 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, p. 17594, 2018.

VIVIANI, Vadim R. et al. A very bright far-red bioluminescence emitting combination based on engineered railroad worm luciferase and 6'-amino-analogs for bioimaging purposes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 303, 2020.

VIVIANI, Vadim R.; PELENTIR, Gabriel F.; BEVILAQUA, Vanessa R. Bioluminescence Color-Tuning Firefly Luciferases: Engineering and Prospects for Real-Time Intracellular pH Imaging and Heavy Metal Biosensing. **Biosensors**, v. 12, n. 6, p. 400, 2022.

VIVIANI, Vadim R. et al. Inventory and ecological aspects of bioluminescent beetles in the Cerrado ecosystem and its decline around Emas National Park (Brazil). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 116, n. 6, p. 386-403, 2023.

VIVIANI, V. R. et al. The orange light emitting luciferase from the rare *Euryopa clarindae* adult railroadworm (Coleoptera: Phengodidae): structural/functional and evolutionary relationship with green and red emitting luciferases. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 257-269, 2024.

VELTEN, Jeff; POGSON, B.; CAZZONELLI, Christopher Ian. Luciferase as a reporter of gene activity in plants. **Transgenic Plant J**, v. 2, n. 2, p. 1-13, 2008.

WHITE, Emil H. et al. The chemi- and bioluminescence of firefly luciferin: an efficient chemical production of electronically excited states. **Bioorganic Chemistry**, v. 1, n. 1-2, p. 92-122, 1971.

WILSON, Thérèse; HASTINGS, J. Woodland. Bioluminescence. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 14, n. 1, p. 197-230, 1998.

WOOD, K. V. et al. Bioluminescent click beetles revisited. **J. Biolum. Chemilum.**, v. 4, p. 31–39, 1989.

WOOD, K. V. The Chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence. **Photochemistry and Photobiology**, v. 62, p. 662-673, 1995.

WU, Huiqing et al. Study on rapid quantitative detection of total bacterial counts by the ATP-bioluminescence and application in probiotic products. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 5, p. 921-929, 2011.

ZIMMER, Marc. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. **Chemical reviews**, v. 102, n. 3, p. 759-782, 2002.