

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

VANESSA REZENDE BEVILAQUA

“DETERMINANTES ESTRUTURAIS DA BIOLUMINESCÊNCIA VERMELHA E EFICIÊNCIA CATALÍTICA NA LUCIFERASE DE *Phrixothrix hirtus* E SELEÇÃO DE COMBINAÇÃO EMISSORA DE LUZ VERMELHA DISTANTE COM 6'-AMINO-ANÁLOGOS DE LUCIFERINA”

São Carlos- SP

2019

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

VANESSA REZENDE BEVILAQUA

“DETERMINANTES ESTRUTURAIS DA BIOLUMINESCÊNCIA VERMELHA E EFICIÊNCIA CATALÍTICA NA LUCIFERASE DE *Phrixothrix hirtus* E SELEÇÃO DE COMBINAÇÃO EMISSORA DE LUZ VERMELHA DISTANTE COM 6'-AMINO-ANÁLOGOS DE LUCIFERINA”

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

Orientação: Prof. Dr. Vadim Viviani

São Carlos- SP

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Vanessa Rezende Bevilacqua, realizada em 06/12/2019:

Prof. Dr. Vadim Viviani
UFSCar

Profa. Dra. Monica Jones Costa
UFSCar

Profa. Dra. Ana Claudia Lessinger
UFSCar

Profa. Dra. Renata Lima
UNISO

Profa. Dra. Marcia Regina Brochetto Braga
UNESP

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos n° 2015/06875-4, n° 2018/24889-0 e n° 2010/05426-8; da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-401.867/2016-1).

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor e amigo Dr. Vadim Viviani, que desde a Iniciação Científica acreditou em mim, incentivando-me sempre a seguir em frente, mesmo diante das dificuldades e desafios. Agradeço também pela oportunidade de aprender e ensinar em um laboratório de excelência na área de bioluminescência, pelo apoio tecnológico, intelectual e pela paciência.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – nrºs. Processos 2015/06875-4, 2018/24889-0 e 2010/05426-8) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq 401.867/2016-1), pelo auxílio financeiro.

À todos os professores e secretárias do Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da UFSCar- Campus São Carlos, por possibilitarem a construção de meus conhecimentos e auxílio em questões burocráticas.

À todos funcionários da Universidade Federal de São Carlos – Campus Sorocaba, lembrando especialmente, dos responsáveis pela limpeza e pela manutenção, que nos proporcionaram um ambiente mais agradável e confortável de trabalho em nosso laboratório. Agradeço pela disponibilização de espaço físico e recursos técnicos. Aos alunos, aos quais monitorei e que extraíram de mim meu melhor como aprendiz de professora.

A Takuto Matsuhashi e Professor Takashi Hirano (University of Electro-Communications- Department of Engineering Science) pela síntese dos amino-análogos e ao professor Paulo Sérgio Oliveira (Laboratório Nacional de Biociências- LNBio, Campinas) por ter realizado a modelagem do sítio ativo das luciferases.

Aos integrantes do Instituto Nacional de Ciência Industrial Avançada e Tecnologia (AIST), localizado em Tsukuba, Japão, por terem me recebido gentilmente no período de estágio BEPE. Além de proporcionarem uma grande experiência e aprendizado.

Aos meus colegas do laboratório, os que ficaram e os que se foram pelo aprendizado. Em especial, à querida Rogilene Prado por toda sua paciência em me ajudar com meus primeiros passos no laboratório e por ter sido um exemplo de humildade, lealdade e benevolência. Ao meu querido coorientado Gabriel Pelentir que, além de me permitir retribuir ao laboratório o aprendizado a mim proporcionado, também demonstrou comprometimento e curiosidade com a pesquisa, incentivando-me em etapas cruciais do doutorado.

À todos que tornaram possível a conclusão desse trabalho.

E, principalmente, à minha família, em especial, aos meus pais, Olga e Leon, e a minha irmã Livia, que ora em seus momentos próximos e ora distantes, me deram apoio incondicional em toda essa trajetória do doutorado. Obrigada por me escutarem, pelos conselhos, paciência, carinho e por contribuírem para me manter sempre lutando por meus objetivos. Vocês foram meu baluarte.

Dominar o outro é força; dominar-se é o verdadeiro poder.

(Lao Tsé)

RESUMO

As luciferases são as enzimas responsáveis pela bioluminescência. Essas enzimas catalisam a oxidação de luciferinas, nas quais a energia é liberada na forma de luz com alta eficiência. As luciferases oriundas de vagalumes norte-americano, europeu e japonês são as mais conhecidas e têm sido as mais utilizadas para fins analíticos, entretanto, possuem aplicabilidade limitada em bioimagem de tecidos de mamíferos, pois sua estrutura está adaptada à produção de bioluminescência de cor verde-amarelada, que é parcialmente absorvida pela hemoglobina e por tecidos ósseos. A luciferase da larva-trenzinho *Phrixothrix hirtus*, clonada e caracterizada por nosso grupo, é a única que produz naturalmente luz vermelha, e possui alta afinidade para luciferina e razoável afinidade para o ATP, sendo potencialmente útil para ensaios analíticos e amostras pigmentadas. Porém, esta enzima em seu estado selvagem tem baixo rendimento quântico (15%) e termoestabilidade quando comparada com as luciferases emissoras de luz verde (40 a 60%). Com o intuito de compreender melhor a relação entre estrutura e atividade e espectro de bioluminescência, e então desenvolver luciferases mais brilhantes e com espectro deslocado para a o vermelho distante para finalidades de bioimagem, foram realizadas mutagêneses sítio dirigidas no sítio-ativo, e investigado o efeito de 6´amino-análogos nas suas propriedades de bioluminescência. A maioria das mutações do sítio de ligação da luciferina impactaram as propriedades catalíticas, incluindo K_M , constante e eficiência catalítica global e oxidativa, mas não afetaram de forma significativa o espectro, indicando que estes resíduos são importantes para a ligação da luciferina e atividade catalítica, mas não interagem com a oxiluciferina excitada durante a etapa de emissão de luz. As únicas mutações que afetaram os espectros estão localizadas no lado benzotiazólico do sítio de ligação de luciferina. Assim, para entendermos melhor a influência e interações deste lado benzotiazólico do sítio de ligação da luciferina nas propriedades de bioluminescência, utilizamos amino-análogos de luciferina modificados na posição 6´. A luciferase vermelha *P. hirtus* teve maior atividade bioluminescente e espectros mais deslocados para o vermelho distante com amino-análogos mais volumosos na posição 6´ em relação a outras luciferases, indicando uma cavidade maior no lado benzotiazólico do sítio de ligação da luciferina. Modelagem e mutagênese sítio-dirigida, mostraram que a cavidade criada pelo resíduo L348 é crítica para emissão de luz vermelha. Finalmente, a combinação da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix* e o análogo pirrolidinil-luciferina mostrou-se uma combinação emissora de luz vermelha afastada (645 nm) com alta atividade bioluminescente, promissora para finalidades de uso em bioimagem de células e tecidos ricos em hemoglobina.

Palavras-chave: *Phrixothrix hirtus*, propriedades catalíticas, amino-análogos, oxiluciferina, sítio-ativo, luz vermelha distante, amostras pigmentadas.

ABSTRACT

Luciferases are the enzymes responsible for bioluminescence. These enzymes catalyze the oxidation of luciferins, in which the energy is released in the form of light with high efficiency. The luciferases fireflies from North America, Europe and Japan are the most known and have been the most used for analytical purposes, however, they have limited applicability in mammalian tissue bioimaging, because its structure is adapted to the production of yellow-green bioluminescence, which is partially absorbed by hemoglobin and bone tissues. The *Phrixothrix hirtus* railroadworm luciferase, cloned and characterized by our group, is the only one that naturally produces red light, has a high affinity for luciferin and a reasonable affinity for ATP, being potentially useful for analytical assays and pigmented samples. However, the wild-type luciferase has low quantum yield (15%) and thermostability when compared to green light-emitting luciferases (40 to 60%). In order to better understand the relationship between the structure and activity and bioluminescence spectrum in this luciferase, and then to develop brighter and red-shifted luciferase, site-directed mutagenesis were performed in the active site and investigated the 6' amino analogues effect in the bioluminescence properties. The majority of luciferin binding site mutations impacted catalytic properties, including K_M , both overall and oxidative constant and efficiency, but did not affect the spectrum significantly, indicating that these active site residues are important for luciferin binding and catalytic activity, but do not interact with the excited oxyluciferin during the light emission step. The only mutations that affected the spectra are located on the benzothiazolic side of the luciferin binding site. Thus, to better understand the influence and interactions of this benzothiazolic side of the luciferin binding site in the bioluminescent properties, we used luciferin amino-analogues modified in 6'-position. The *P. hirtus* red-emitting luciferase had the highest bioluminescent activity and the most far red-shifted spectra with larger 6' amino-analogs than other luciferases, indicating a larger cavity on the benzothiazolic side of the luciferin binding site. Modeling and site-directed mutagenesis, showed that the cavity created by the L348 residue is critical for red light emission. Finally, the combination of *Phrixothrix* red light-emitting luciferase and Pyrrolidinyl-luciferin analogue produced far red emission (645 nm) with high activity, promising for bioimaging use of hemoglobin cells and tissues.

Keywords: *Phrixothrix hirtus*, catalytic properties, amino analogues, oxyluciferin, active site, far red light, pigmented samples.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amy: luciferase do vagalume *Amydetes vivianii*

1,5- ANS: 1- (anilino) naftaleno 5-sulfonato

ATP: Trifosfato de Adenosina

BRET: *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*

BSA: Soroalbumina Bovina

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

cps: *Counts* por segundo

Dpn I: Endonuclease de *Diplococcus pneumoniae I*

DLSA: 5'-O-[N-(desidroluciferil)-sulfamoil]adenosina

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilondiamina tetracético

GFP: Green Fluorescent Protein

IPTG: Isopropil 2-D-tiogalactopiranosídeo

LH₂: D-luciferina

Mor-LH: 6'-Morpholino- Luciferina

NH₂-LH₂: 6'- Amino-luciferina

NH₂-LH- Me₂: 6' Amino-5-dimetil-luciferina

NMe₂-LH: 6'-Dimetil-amino-luciferina

NMe₂-LH- Me₂: 6'-Dimetil-amino -5-dimetil-luciferina

Pte: Luciferase do elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans*

PxGR: Luciferase emissora de luz verde de *Phrixothrix viviani*

PxRE: Luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixothrix hirtus*

Pyr-LH: 6'-Pirrolidinil- Luciferina

SLL: sítio de ligação da luciferina

TD-DFT : Teoria da resposta funcional da densidade dependente do tempo

2,6 TNS: 2- (4-toluidino) naftaleno-6- sulfonato

TRIS: Tris- hidroximetilaminometano

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Diagrama de Jablonski representando excitação e decaimento dos elétrons, destacando as *Transições radiativas*- absorção, fluorescência e fosforescência e, as *Transições não radiativas*- conversão interna, cruzamento intersistema. (B) Multiplicidade dos estados excitados. S0- estado fundamental denominado HOMO, S1 e T1- estado de maior energia denominado LUMO. Fonte: autor, 2019.....p. 2
- Figura 2.** (A) Clivagem térmica de 1 dioxetano, produzindo 2 moléculas carbonílicas, sendo uma delas no estado excitado. Fonte: adaptado de BECHARA e VIVIANI, 2015. (B) Clivagem térmica de 1 dioxetanona. Fonte: Modificado de WILSON e HASTINGS, 1998.....p. 3
- Figura 3.** (A) Faixa espectral de bioluminescência de organismos marinhos, (B) Cnidário: *Aequorea* , (C, D) anelídeo *Odontosyllis*, (E) Ctenófoto: *Deiopeia*. Autoria: B, E: Steve Haddock, C : James B. Wood, D: Paul Zahl.....p.6
- Figura 4.** Estrutura molecular de luciferinas de organismos aquáticos e terrestres (Modificado de BECHARA e STEVANI, 2017).....p... 7
- Figura 5.** Vagalumes das três famílias: **Lampyridae** (A, B, C, D) *Cratomorphus distinctus* Olivier, 1895 nos estágios larval (A) e adulto (B, C, D); **Elateridae** (E, F) *Pyrophorus divergens* estágio larval e adulto, respectivamente; **Phengodidae** (G) larva de *Phrixotrix hirtus* Olivier, 1909; (H) macho adulto de *Pseudophengodes brasiliensis* Wittmer, 1976. Fonte: Adaptado de VIVIANI e SANTOS, 2012.....p. 10
- Figura 6.** D-Luciferina, o substrato comum à reação bioluminescente de coleópteros.....p. 11
- Figura 7.** Etapas da reação de bioluminescência catalisada pelas luciferases de coleopteros. (a) Inicialmente, a luciferina, ATP-Mg⁺² e luciferase formam um complexo ternário, levando à adenilação da luciferina e liberação de pirofosfato; (b) remoção de um próton do adenilato de luciferina; (c) oxidação por oxigênio molecular; (d) formação de um peróxido que se cicliza (dioxetanona); (e) a dioxetanona se cliva com a formação de CO₂ e oxiluciferina excitada; (f) a oxiluciferina excitada decai emitindo um fóton de luz visível (Adaptado de DAY, *et al.*, 2004).....p. 11
- Figura 8.** Hipótese da Polarizabilidade orientada. (A) Baixa orientação de polarizabilidade representado por um ambiente de pouca mobilidade do solvente, com a presença de interações

repulsivas entre as moléculas de solvente e a molécula excitada aumentando a energia resultando em deslocamento hipsocrômico. **(B)** Alta Polarizabilidade representada por um ambiente de maior mobilidade das moléculas de solvente, permitindo a reorganização ou relaxamento das moléculas do solvente em torno da molécula excitada, resultando em interações mais favoráveis de menor energia entre emissor e as moléculas de solvente, resultando em deslocamento batocrômico. Fonte: Modificado de UGAROVA e BROVKO, 2002.....p. 12

Figura 9. **(A)** Tautomerização da oxiluciferina em suas formas enólica e cetônica. Fonte: Adaptado de BECHARA e VIVIANI, 2014; **(B)** Conformação da oxiluciferina segundo grau de ressonância Fonte: BRANCHINI *et al.* 2004; **(C)** Mecanismo de transferência de carga por torção intramolecular. O ângulo mais relaxado conforme mostra essa figura é responsável pela emissão no vermelho. Fonte: Modificado de BRANCHINI *et al.*, 2002.....p. 14

Figura 10. Oito categorias **(A-H)** dos análogos da luciferina sintetizados. Um representante é exemplificado para cada categoria. A cor da letra A-H está em de acordo com a cor da (s) posição (ões) substituída (s) da categoria correspondente. Fonte: CHENG e LIU, 2018...p. 16

Figura 11. **(A)** Estrutura tridimensional da luciferase do lampirídeo *Photinus pyralis*, representando os três subdomínios do largo domínio N-terminal (Subdomínio A- em azul, Subdomínio B- em roxo e Subdomínio C- em verde) e domínio C- terminal em amarelo que se aproximam possivelmente para envolver os substratos durante a catálise. Fonte: Adaptado de CONTI *et al.* 1996. **(B)** Estrutura da luciferase do lampirídeo de *Luciola cruciata* complexada com o análogo DLSA, demonstrando o domínio N-terminal (cinza) e o domínio C-terminal (azul) Fonte: NAKATSU *et al.* 2006.....p. 19

Figura 12. Modelo proposto por Branchini *et al.* (1998) mostrando o sítio de ligação da luciferina (estrutura central) e do ATP (estrutura à direita) à luciferase. Fonte: Adaptado de BRANCHINI *et al.*, 2004.....p. 23

Figura 13. Modelo tridimensional por homologia da luciferase do lampirídeo *Macrolampis* sp2 (91% de identidade com a luciferase de *P. pyralis*) mostrando a ponte eletrostática entre os resíduos E311 e R337 e a rede de interações polares com a alça entre os resíduos 223 e 235. Fonte: VIVIANI *et al.*, 2016.....p. 24

- Figura 14.** Figura representativa do mecanismo proposto de modulação da cor da bioluminescência pelo pH e metais pesados divalentes em luciferases de lampirídeos. Fonte: VIVIANI *et al.*, 2018.....p. 27
- Figura 15.** Esquema para a construção de luciferases quiméricas dos fengodídeos *Phrixothrix*. Fonte: Adaptado de VIVIANI *et al.*, 2004.....p. 28
- Figura 16.** Estrutura cristalográfica da luciferase emissora de luz vermelha de *P.hirtus*. (A) Vista frontal da conformação octamérica, (B) Vista lateral do octâmero, (C) Zoom dos resíduos presentes nas interações da interface de dímero entre os monômeros (Y26, Y30 e N179 de um dos monômeros e R11 do outro monômero), (D) Zoom dos resíduos presentes nas interações da interface do tetrâmero através dos dímeros (interações predominantemente hidrofóbicas entre Y153, M152 e F162), (E), (F) Estrutura completa de um único monômero mostrando a maior abertura entre os domínios da luciferase de *P.hirtus* em relação à luciferase de *Amydetes vivianii*, respectivamente. Fonte: (CARRASCO *et al*, 2018).p. 32
- Figura 17.** Imagem de bioluminescência *in vivo* utilizando o método de rastreamento celular. Fonte: OHMIYA, 2014.....p. 35
- Figura 18.** Fluxograma da estratégia experimental desse projeto. Fonte: autor, 2019.....p.42
- Figura 19.** Fluxograma de metodologia empregada nesse estudo. Fonte:autor, 2019.....p.42
- Figura 20.** Adenilato de luciferina.....p. 48
- Figura 21.** Estruturas da D- luciferina e 6´amino-análogos. Esses diferentes amino-análogos diferenciam-se pelos grupos assinalados em vermelho localizados na posição 6´ (-OH presente na porção benzotiazólica da luciferina original), os quais possuem diferentes volumes e capacidades de doar de elétrons, além de metilações (assinaladas em azul) na posição do C5 da porção tiazólica. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA *et al.*, 2019.....p. 49
- Figura 22.** (A) Localização dos resíduos do sítio de ligação da luciferina; (B) modelo tridimensional da luciferase PxRE mostrando a localização dos resíduos investigados; (C) multialinhamento dos segmentos do sítio de ligação da luciferina (sombra amarela) da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixothrix hirtus* com outras luciferases de besouros na região entre os resíduos 238-358 (numeração correspondente à luciferase de *Photinus pyralis*): (BZ) Benzotiazólica; (TZ) tiazólica; (BZ / TZ) intermediária entre Benzotiazólica / tiazólica; (BT) inferior; resíduos hidrofóbicos (vermelhos); resíduos polares (verdes); (azul)

resíduos carregados negativamente; (rosa) resíduo carregado positivamente; (sombra cinza) resíduos investigados; (Crt) lampirídeo *Cratomorphus distinctus*; (Amy) lampirídeo *Amydetes vivianii*; (Ppy) lampirídeo *Photinus pyralis*; (Mac) lampirídeo *Macrolampis* sp2; (Pte) Elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans*; (Lcr) *Luciola cruciatta*, não colocamos no artigo; (PxGR) fengodídeo de emissão verde *Phrixothrix vivianii* e (PxRE) luciferase do fengodídeo de emissão vermelha de *Phrixothrix hirtus*. Fonte: BEVILAQUA *et al.*, 2019.....p. 53

Figura 23. Atividade bioluminescente total iniciada com luciferina e ATP, e atividade oxidativa iniciada com LH₂ AMP para os mutantes da luciferase de *Phrixothrix hirtus*. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA *et al.*, 2019.....p. 55

Figura 24. Efeito do pH na atividade da luciferase do vagalume *Amydetes viviani*.. Fonte: PELENTIR *et al.*, 2019.....p. 59

Figura 25. (A) Curva de linearidade da concentração de ATP e atividade da luciferase de *Amydetes vivianii*. (B) (Painéis inferiores)- Efeito comparativo da concentração de substrato na atividade de bioluminescência da luciferase de Amy e luciferases de vagalume comerciais de *P. pyralis* na concentração final de 0,7 µg / mL: (painel esquerdo) ATP: (1) ATP 0,1 mM; (2) ATP 0,05 mM; (3) ATP 0,02 mM; (3) ATP 0,01 mM; (5) ATP 0,005 mM; (Painel direito) luciferina: (1) luciferina 0,1 mM; (2) luciferina 0,05 mM e (3) luciferina 0,01 mM. Fonte: Fonte: PELENTIR *et al.*, 2019.....p. 61

Figura 26. Termoestabilidade de luciferases de vagalume: incubação a 37°C durante 1-48 h; (Linha preta) luciferase de *Amydetes vivianii* e (linha cinza) luciferase comercial de *Photinus pyralis*. Fonte: PELENTIR *et al.*, 2019.....p.61

Figura 27. Atividades relativas da luciferase *Macrolampis* sp2, *P. termitilluminans*, *P. hirtus* e *Amydetes vivianii* com luciferina e diferentes 6'-amino-análogos de luciferina. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA *et al.*, 2019.....p. 64

Figura 28. Espectros de bioluminescência de luciferases de besouros na presença de D-luciferina (cor preta) e seus amino-análogos: 6' Morpholino- Luciferina (cor vermelha), 6- Pirrolidínil- luciferina (cor verde clara), 6' Amino-luciferina (cor roxa), 6' Amino- 5-dimetil luciferina (cor verde escura), 6' Dimetil-amino-5-Dimetil- luciferina (cor azul clara) e 6' Dimetil- aminoluciferina (cor alaranjada). A seta mostra o deslocamento espectral dos amino-análogos em relação à luciferina. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA *et al.*, 2019.....p. 67

Figura 29. Atividade relativa da luciferase selvagem de *P.hirtus* e seus mutantes com os diferentes amino-análogos de luciferina. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA *et al.*, 2019..p. 69

Figura 30. Espectros de Bioluminescência da luciferase de *P. hirtus* e seus na presença de D-luciferina (cor preta) e seus amino-análogos: 6´ Morpholino- Luciferina (cor vermelha), 6´-Pirrolidinil- luciferina (cor verde clara), 6´Amino-luciferina (cor roxa), 6´Amino- 5-dimetil-luciferina (cor verde escura), 6´Dimetilamino-5-Dimetil- luciferina (cor azul clara) e 6´ Dimetil- amino-luciferina (cor alaranjada). A seta mostra o deslocamento espectral dos amino-análogos em relação à luciferina. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA *et al.*, 2019...p. 71

Figura 31. Gráfico de barras da variação espectral em relação ao espectro obtido com luciferina. Barras situadas à esquerda no eixo das coordenadas (y), representam deslocamento para a região azul do espectro, enquanto as barras situadas à direita representam deslocamento espectral batocrômico. Fonte: autor, 2019.....p. 74

Figura 32. (A) Multialinhamento de luciferases de besouros mostrando a posição 348, (B) Sítio ativo das luciferases com o análogo luciferina (DLSA) mostrando uma cavidade maior no local do grupo 6´ fenolato da oxiluciferina. Fonte: BEVILAQUA *et al.*, 2019.....p. 75

Figura 33. (A) Atividades relativas do mutante L348H com os 6´ Amino-análogos em comparação à luciferase selvagem de, (B) Espectros de bioluminescência da luciferase selvagem de *P.hirtus* e seu mutante L348H na presença e ausência de sulfato de guanidina *hirtus*. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA *et al.*, 2019.....p. 77

Figura 34. Modelagem de sítio ativo de luciferases de besouros mostrando uma maior cavidade próximo ao grupo fenolato da oxiluciferina na luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixothrix hirtus*: (A) luciferase de *Pyrearinus termitilluminaans*; (B) luciferase de *Phrixotrix vivianii*; (C) luciferase vermelha de *P. hirtus*. Fonte: BEVILAQUA *et al.*, 2019.p. 82

Figura 35. Diagrama de Jablonski representando o comportamento da oxiluciferina nas luciferases emissoras de luz verde e vermelha. Fonte: autor, 2019.....p. 85

Figura 36. Mecanismo proposto para modulação da cor da bioluminescência no sítio ativo da luciferase de PxRE e luciferases emissoras de luz verde. A ponte salina formada entre os resíduos E311 e R337 desempenham papéis estruturais e catalíticos determinação da cor da bioluminescência, porque estabiliza uma conformação hidrofóbica fechada que promove uma

interação ácido-base mais forte com o fenolato excitado, resultando na emissão verde-amarela na maioria das luciferases. Neste caso o resíduo E311 aceita o próton da oxiluciferina excitada e a estabiliza. Em luciferases pH-sensitivas, quando por algum motivo (microambiente ácido, inserção de metal divalente) essa interação é desfeita, a emissão passa a ser vermelha. A substituição natural correspondente pela leucina (L334) na luciferase de emissão de luz vermelha de PxRE é responsável pelo seu espectro muito deslocado para o vermelho, devido à perda de interação do sítio ativo no fechamento com E311 Fonte: BEVILAQUA *et al.*, 2019.....p. 86

Figura 37. (Painel superior) Larva do tenzinho *Phrixothrix hirtus* exibindo suas lanternas laterais que emitem bioluminescência verde e cabeça que emite luz vermelha e, (Painel inferior) bioluminescência vermelha e vermelha-distante de *E. coli* expressando luciferase de PxRE na presença de (A) D-luciferina; (B) 6'- morfolino-luciferina e (C) 6'-pirrolidinil-luciferina. Fonte: BEVILAQUA *et al.*, 2019.....p. 87

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** *Primers* de subclonagem.....p. 43
- Tabela 2.** *Primers* usados para mutagênese-sítio-dirigida.....p. 44
- Tabela 3.** Sequência nucleotídica dos *primers* usados no sequenciamento das dos mutantes da luciferase de *P.hirtus*.....p. 46
- Tabela 4.** Resumo dos efeitos das mutações no sítio de ligação da luciferina nas propriedades cinéticas da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixothrix hirtus* e seus mutantes.....p. 54
- Tabela 5.** Efeitos das mutações no sítio de ligação da luciferina nos espectros de bioluminescência da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixothrix hirtus* e seus mutantes.....p. 58
- Tabela 6.** Comparação das propriedades de bioluminescência de *Amydetes vivianii* e outras luciferases de vagalumes.....p. 60
- Tabela 7.** Comparação das propriedades de fluorescência da luciferase de *Amydetes vivianii* e outras luciferases.....p. 62
- Tabela 8.** Atividades bioluminescentes de luciferases de besouros com D-luciferina e 6'-amino-análogos.....p. 65
- Tabela 9.** Espectros de bioluminescência das luciferases de besouros com D- luciferina e 6'-amino-análogos.....p. 68
- Tabela 10.** Atividades bioluminescentes da luciferase emissora vermelha de *Phrixohtrix hirtus* e seus mutantes com D-luciferina e 6'-amino-análogos.....p.70
- Tabela 11.** Espectros de Bioluminescência da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix hirtus* e seus mutantes com D- luciferina e 6'-amino-análogos.....p. 72
- Tabela 12.** Relação entre deslocamento dos espectros de bioluminescência luciferase de *P.hirtus* e seus mutantes e a constante de Hammet.....p.73

SUMÁRIO

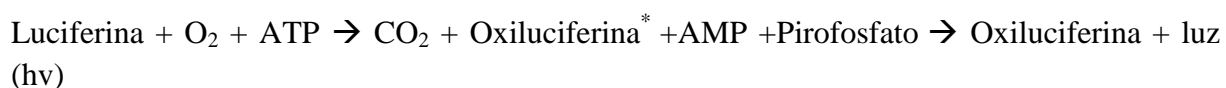
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tipos de Luminescência.....	1
1.2. Quimioluminescência.....	3
1.3. As reações bioluminescentes e suas características	4
1.4. Diversidade Biológica.....	5
1.5. Funções Biológicas.....	6
1.6. Diversidade química de sistemas bioluminescentes.....	6
1.7. A bioluminescência em Coleopteros	9
1.8. O sistema-luciferina-luciferase de besouros.....	10
1.9. Mecanismos propostos de modulação dos espectros de bioluminescência pelas luciferases	12
1.10. Análogos de Luciferina	17
1.11. As luciferases de besouros	20
1.11.1. Estrutura tridimensional	22
1.12. Relação estrutura x função em luciferases de besouros	24
1.12.1. Espectros de bioluminescência.....	25
1.12.2. Cinética e atividade bioluminescente.....	28
1.12.3. Rendimentos quânticos	30
1.13. As luciferases de <i>Phrixothrix</i>	30
1.13.1. Estrutura 3D da luciferase de <i>P.hirtus</i>	34
1.14. Aplicações bioanalíticas das luciferases de besouros.....	35
1.15. Aplicações em Bioimagem.....	36
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. cDNA Luciferases recombinantes	43
4.2. Subclonagem do cDNA da luciferase de <i>Amydetes vivianii</i>	43
4.3. Transformação de bactérias	43
4.4. Seleção de resíduos-alvo para mutagênese sítio-dirigida e desenho dos <i>primers</i>	43
4.5. Mutagênese sítio-dirigida	44
4.6. Eletroforese em gel de agarose.....	44
4.7. Screening de mutantes <i>in vivo</i>	45

4.8. Preparação de DNA Plasmidial (Minipreps).....	45
4.9. Sequenciamento de DNA.	45
4.10. Expressão heteróloga, extração e purificação de luciferases.....	46
4.11. Quantificação de proteínas totais.	47
4.12. Eletroforese em gel de SDS (SDS-PAGE).....	47
4.13. Medidas de atividade da luciferase <i>in vitro</i>	48
4.14. Preparação de adenilato de luciferina.....	48
4.15. Amino-análogos de luciferina.	48
4.16. Atividade da luciferase com amino-análogos.....	49
4.17. Atividade luminescente com adenilato de luciferina.....	49
4.18. Determinação do K_M para a D-luciferina e ATP.....	50
4.19. Determinação das constantes e eficiências catalíticas.....	50
4.20. Espectros de fluorescência.	51
4.21. Espectros de Bioluminescência.....	51
5. RESULTADOS.....	52
5.1. Efeito das mutações no sítio de ligação da luciferina na luciferase emissora de luz vermelha de <i>Phrixothrix hirtus</i>	52
5.1.1. Racionalização da mutagênese sítio dirigida.....	52
5.1.2. Efeito das mutações nos K_M s para Luciferina e ATP.....	53
5.1.3. Efeito na atividade de bioluminescência global e oxidativa.....	54
5.1.4. Efeito nas constantes e eficiências catalíticas.....	55
5.1.5. Efeito nos espectros de bioluminescência.....	57
5.2. Caracterização e comparação da luciferase pH-sensitiva emissora de luz verde de <i>Amydetes vivianii</i> com <i>Phixothrix hirtus</i>	58
5.3. Comparação das Propriedades de bioluminescência de 6'-amino-análogos com luciferases de besouros.....	62
5.3.1. Comparação das atividades de bioluminescência das luciferases de besouros com amino-análogos.....	63
5.3.2. Comparação dos espectros de bioluminescência das luciferases de besouros com amino-análogos.....	65
5.3.3 Propriedades de bioluminescência de Amino-análogos de luciferina com a luciferase de <i>P. hirtus</i> e seus mutantes.....	68
5.4. Modelagem do sítio de ligação da luciferina de <i>Phrixothrix hirtus</i> e outras luciferases.....	74
5.5. Efeito da mutação L348H.....	76

6. DISCUSSÃO	77
6.1. Os resíduos do sítio de ligação da luciferina são importantes para a ligação e catálise	77
6.2. O sítio de ligação da luciferina da PxRE é menos interativo durante a emissão	78
6.3. Interações no lado benzotiazólico do sítio de ligação da luciferina determinam as cores da bioluminescência.....	79
6.4. O tamanho da cavidade influencia as interações específicas com o grupo fenolato da oxiluciferina excitada	80
6.4.1. A cadeia lateral da posição 348 contribui para o tamanho da cavidade e a para a determinação dos espectros de bioluminescência	80
6.4.2. Os espectros de amino-análogos com mutantes da luciferase PxRE evidenciam interações importantes.....	83
6.5. Uma proposta de mecanismo de modulação dos espectros de bioluminescência pelas luciferases de <i>Phrixotrix</i>	84
6.6. Um novo sistema luciferina-luciferase deslocado para o vermelho distante para bioimagem	86
7. CONCLUSÕES.....	88
8. PERSPECTIVAS.....	89
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
10. Produção Científica.....	106

1. INTRODUÇÃO

A bioluminescência é definida como a emissão de luz fria e visível por organismos com finalidades biológicas (HARVEY 1952, HERRING, 1987). Ela ocorre em organismos marinhos e terrestres e assume diferentes funções de comunicação biológica. Trata-se de um tipo específico de quimioluminescência em que a luz é emitida por reações de oxidação altamente exergônicas de um substrato – a luciferina– catalisada por enzimas, conhecidas como luciferases (SELIGER e McELROY, 1965). Essas reações envolvem a produção de intermediários peroxídicos ricos em energia, cuja clivagem leva à formação de um produto no estado excitado singlete (fluorescente), o qual decai para o estado fundamental emitindo um fóton de luz (McCAPRA, 1976).



A bioluminescência é um tópico de interesse multidisciplinar envolvendo física, química e biologia. O estudo da bioluminescência tem contribuído de forma direta e indireta para importantes avanços na compreensão de processos químicos como quimioexcitação, bioquímica, enzimas, biologia molecular, biologia celular, evolução e ecologia. Além disto, os reagentes da bioluminescência de diferentes organismos têm adquirido inúmeras aplicações bioanalíticas ao longo do último século, incluindo análise de cofatores enzimáticos, desenvolvimento de biossensores, análise de poluentes, estudos de expressão gênica e bioimagem (CAMPBELL, 1988; GABRIEL *et al.*, 2014; NAYLOR, 1999; SALA-NEWBY *et al.*, 1999; BRANCHINI *et al.*, 2005, 2018; NAKAJIMA *et al.*, 2005, 2010; VIVIANI e OHMIYA, 2006; RODA *et al.*, 2009). Por esta razão, inúmeros estudos abrangendo diferentes aspectos sobre a bioluminescência têm sido feitos em diversas áreas das ciências, por diversos grupos de pesquisa espalhados pelo mundo.

1.1. Tipos de Luminescência. A luminescência é a emissão de luz pela matéria, ocorrendo a partir de átomos e moléculas em estado eletronicamente excitados (LAKOWICZ, 2006). O termo "luminescência" foi cunhado em 1888 pelo físico e historiador da ciência, o alemão Eilhardt Wiedemann, para "todos aqueles fenômenos de emissão de luz que não são apenas condicionados pelo aumento da temperatura", ou seja, em oposição ao termo incandescência "luz quente", é definida como emissão de "luz fria". Sua categorização é advinda de acordo com a fonte de energia primária que conduz à excitação e suas designações são óbvias uma

vez que são reveladas pelo prefixo (WIEDEMANN, 1888). Na fotoluminescência, por exemplo, a fonte de energia é a própria luz, sendo subdividida em fluorescência e fosforescência (HARVEY, 1957). Na quimioluminescência a energia da luz emitida é fornecida por reações químicas, em geral reações de oxidação muito exotérmicas análogas à combustão.

Em sistemas biológicos, uma molécula pode ser excitada principalmente por fotoexcitação ou por quimioexcitação, e pode seguir dois destinos principais: (I) a *desativação radiativa* que envolve emissão de fótons, como no caso da fluorescência, fosforescência, bioluminescência e na quimioluminescência (CADENAS, 1985) ou (II) *desativação não-radiativa* por processos fotoquímicos (ex: isomerização, clivagem, oxido-redução) e fotofísicos (transferência de energia, desativação térmica) que não envolvem a emissão de fótons de luz visível (CILENTO e ADAM, 1988) (**Fig. 1A**).

Os elétrons das moléculas em seu estado fundamental estão no estado singlete (com um par de elétrons emparelhados e spins opostos) e, quando excitados podem assumir 2 diferentes configurações eletrônicas (**Fig. 1B**): (1) singlete, no qual o elétron que é promovido para um orbital de maior energia mantendo seu spin antiparalelo, tendo um tempo de vida curto ($<10^{-9}$ s) e cuja emissão é denominada fluorescência e; (2) triplete, no qual o elétron é promovido para um nível energético superior metaestável, invertendo o spin por meio do cruzamento intersistema, tendo um tempo de vida maior ($<10^{-6}$ s) e sendo sua emissão denominada fosforescência (LAKOWICZ, 2006).

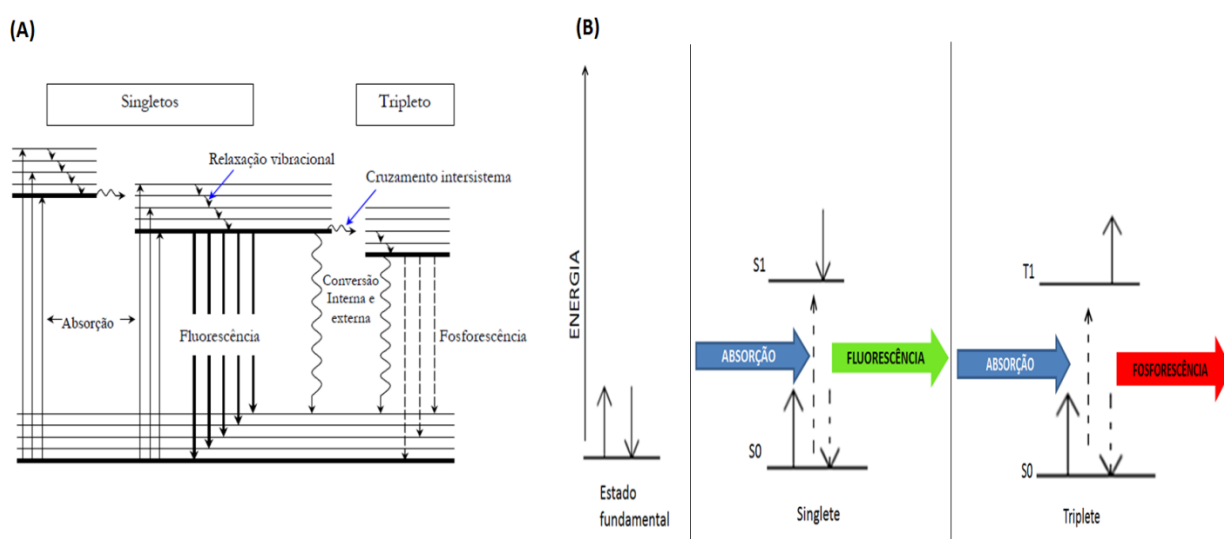


Figura 1. (A) Diagrama de Jablonski representando excitação e decaimento dos elétrons, destacando as *Transições radiativas*- absorção, fluorescência e fosforescência e, as *Transições não radiativas*- conversão interna, cruzamento intersistema. (B) Multiplicidade dos estados excitados. S0- estado fundamental denominado HOMO, S1 e T1- estado de maior energia denominado LUMO. Fonte: autor, 2019.

1.2. Quimioluminescência. Entre os processos químicos suficientemente exotérmicos capazes de gerar uma molécula em seu estado excitado estão: a transferência de elétrons, o aniquilamento de radicais e a clivagem de peróxidos lineares ou cíclicos (CAMPBELL, 1988). O mecanismo proposto para a quimioexcitação em sistemas biológicos é principalmente a clivagem térmica de peróxidos cíclicos (dioxetanos e dioxetanonas) gerando produtos carbonílicos no estado excitado (WILSON, 1995).

Dioxetanos e dioxetanonas são peróxidos cíclicos de anel tetraômico instáveis (**Fig.2**). Com ângulos internos de 90° , ligação O-O muito fraca (32 kcal/mol), os dioxetanos ao sofrerem clivagem produzem duas moléculas carbonílicas mais estáveis, sendo uma delas no estado eletronicamente excitado que acarretará na emissão de fluorescência ou fosforescência, dependendo do substituinte (**Fig. 2a**) (BECHARA e WILSON, 1980; ADAM e BAADER, 1984; CILENTO e ADAM, 1995). As dioxetanonas, em geral, são mais instáveis que dioxetanos, devido à ligação carbonílica no anel tetraômico, com ângulo de ligação de 120° (ADAM e LIU, 1972; SHIMOMURA e JOHNSON 1979; BECHARA e WILSON, 1980; ADAM e BAADER, 1984), sendo o intermediário mais comum em reações bioluminescentes (**Fig. 2b**).

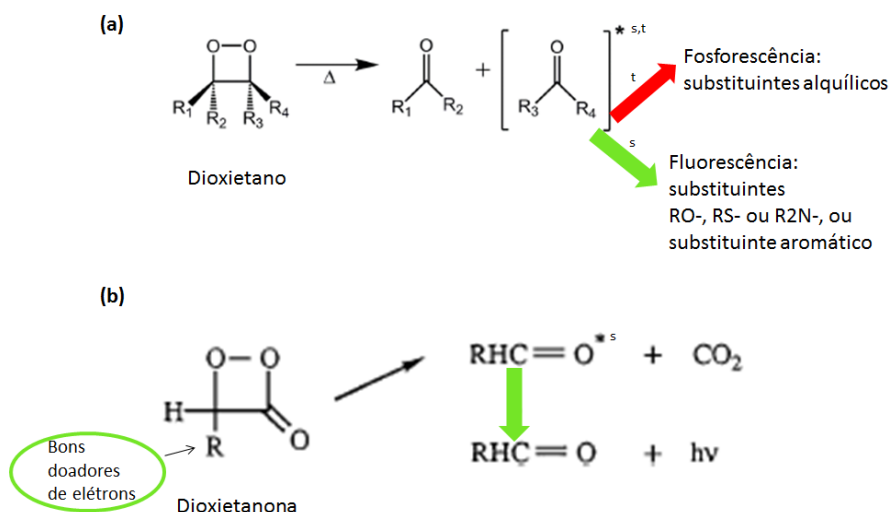


Figura 2. (A) Clivagem térmica de 1 dioxetano, produzindo 2 moléculas carbonílicas, sendo uma delas no estado excitado. Fonte: adaptado de BECHARA e VIVIANI, 2015. (B) Clivagem térmica de 1 dioxetanona. Fonte: Modificado de WILSON e HASTINGS, 1998.

Por muito tempo discutiu-se a natureza dos intermediários ricos em energia das reações quimioluminescentes e bioluminescentes (HASTINGS, 1977; McCAPRA, 1970; RAUHUT, 1969). A hipótese de formação de um intermediário rico em energia, de natureza

dioxetanônica, na reação bioluminescente de vagalumes foi sustentada pela síntese da dimetildioxetanona, instável e quimioluminescente (ADAM e LIU, 1972) e ganhou forças com os experimentos de marcação isotópica de Shimomura e Johnson (1979). Neste caso a quimioluminescência seria o resultado da clivagem direta da dioxetanona em oxiluciferina excitada e CO₂. Posteriormente foi mostrado que o processo de quimioexcitação envolve o mecanismo de *Luminescência Iniciada por Transferência de Elétrons* (CIEEL), hoje chamado de CILT, em que a transferência de elétrons do grupo fenolato para o anel da dioxetanona induz sua clivagem (KOO *et al.*, 1978). Esse tipo de mecanismo depende da presença de um ativador que seja bom doador de elétrons para o anel de dioxetanona (na luciferina de vagalumes, o grupo fenolato), operando possivelmente em vários sistemas químicos e bioluminescentes altamente eficientes, incluindo a bioluminescência dos cnidários, vagalumes e até em bactérias, que não envolve um intermediário dioxetanona (SCHUSTER, 1979; CATALANI e WILSON, 1989; McCAPRA, 1997).

1.3. As reações bioluminescentes e suas características

Em uma reação bioluminescente, moléculas genericamente conhecidas por luciferinas são oxidadas por oxigênio molecular, ou uma de suas espécies reativas, gerando intermediários peroxídicos ricos em energia, em geral dioxetanonas, cuja clivagem gera produtos carbonílicos, um dos quais no estado excitado singlete, que decai para o estado fundamental emitindo um fóton de luz (McCAPRA, 1976). As enzimas que catalisam estes processos são denominadas genericamente de luciferases. Entretanto, em alguns casos específicos, o termo fotoproteína tem sido utilizado (SHIMOMURA, 2006). Nestes casos, a proteína oxida a luciferina e forma um complexo estável com o intermediário peroxídico, que na presença de determinados cofatores como cálcio promovem uma mudança conformacional com a clivagem do intermediário peroxídico, emitindo luz aparentemente uma única vez. Porém, sabe-se que frequentemente a fotoproteína, na presença de certos agentes, pode se regenerar e realizar *turnover* da reação bioluminescente, assim como uma luciferase (WILSON e HASTINGS, 1998).

A eficiência energética de uma reação bioluminescente depende do rendimento quântico, que é definido como o número de fótons de luz visível emitidos por molécula de luciferina oxidada (NIWA *et al.*, 2010^a). O rendimento quântico da bioluminescência (θ_{BL}) depende de 3 fatores: (i) Rendimento químico da reação de oxidação, com a formação de um intermediário “rico em energia” (θ_Q); (ii) rendimento de quimioexcitação que representa a

proporção de moléculas produto formadas no estado excitado excitado (químioexcitação eletrônica) (θ_{EX}); (iii) rendimento de fluorescência do produto final que representa a fração de moléculas excitadas que decaem radiativamente (θ_{FL}). Dessa forma, o rendimento é definido pela multiplicação desses fatores: $\theta_{BL} = \theta_Q \theta_{EX} \theta_{FL}$. O rendimento quântico de reações bioluminescentes, é relativamente alto, variando de 3-61% (WILSON e HASTINGS, 1998; NIWA *et al.*, 2010).

O espectro ou a cor da bioluminescência pode ser afetado pelos seguintes fatores: (1) a estrutura química da molécula emissora; (2) o microambiente químico onde se encontra a molécula emissora (polaridade, pH); (3) a presença de filtros, (4) a presença de aceptores de energia fluorescentes. Assim, de acordo com o tipo de emissor, uma reação bioluminescente pode ser classificada em **direta** (na qual a espécie excitada primária formada na reação de químioexcitação é o próprio emissor de luz) e **sensitizada ou indireta** (na qual a espécie excitada primária transfere energia para um aceptor fluorescente que será o verdadeiro emissor). O processo de BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*), primeiramente descoberto na água-viva e hoje muito utilizado para investigar interações proteína-proteína, envolve a transferência de energia de excitação de um sistema luciferina-luciferase ou fotoproteínas, para uma proteína fluorescente, a GFP (Proteína Fluorescente Verde). A maioria dos sistemas bioluminescentes tem luminescência direta (CAMPBELL, 1988; HASTINGS, 1983, 1995).

1.4. Diversidade Biológica. A bioluminescência é encontrada entre os procariontes (bactérias) e eucariontes (fungos, algas, cnidários, moluscos, anelídeos, artrópodes, equinodermos e cordados), entretanto, a maioria dos organismos bioluminescentes são encontrados no ambiente marinho e emitem em uma ampla faixa espectral que varia do azul ao vermelho (**Fig.3**) (HARVEY, 1952; HERRING, 1978; HADDOCK *et al.*, 2010). Entre os organismos terrestres a classe Insecta possui a maior riqueza em espécies bioluminescentes. A ordem Coleoptera é a mais rica e investigada sob os aspectos bioquímicos (SHIMOMURA, 2006), sendo que a superfamília Elateroidea inclui as principais famílias de besouros bioluminescentes: Lampyridae (comumente chamados de vagalumes), Elateridae (pirilampos ou vagalumes tec-tec) e Phengodidae (larvas trenzinho) (COSTA, 2003).

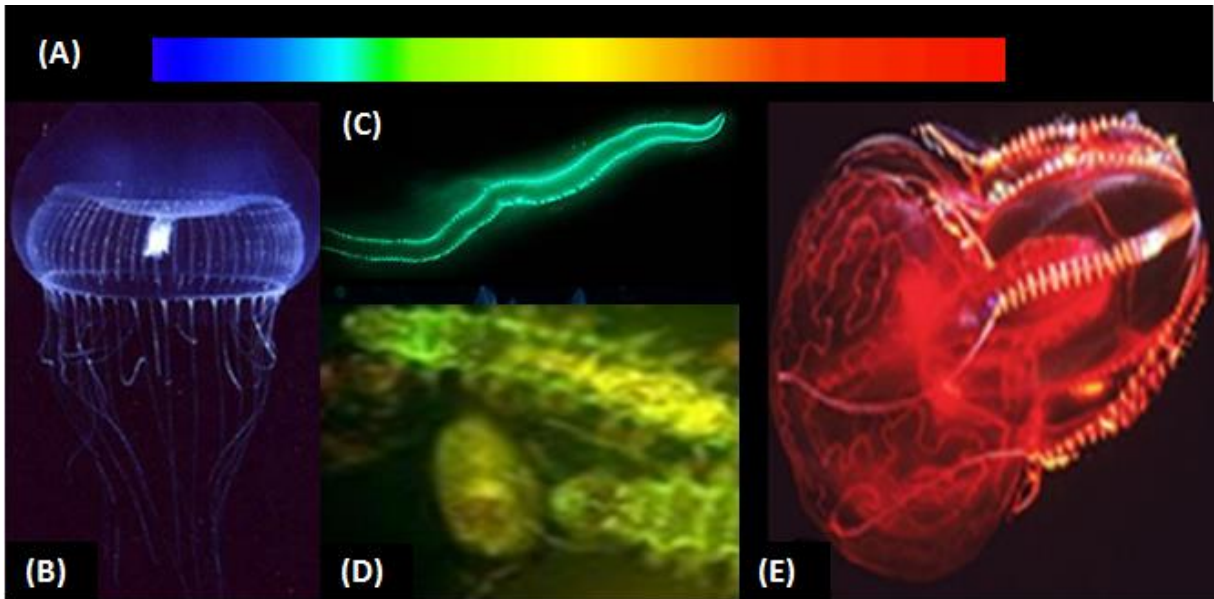


Figura 3. (A) Faixa espectral de bioluminescência de organismos marinhos, (B) Cnidário: *Aequorea*, (C, D) anelídeo *Odontosyllis*, (E) Ctenóforo: *Deiopeia*. Autoria: B, E: Steve Haddock, C: James B. Wood, D: Paul Zahl.

1.5. Funções Biológicas. A emissão de luz por organismos vivos assume principalmente funções de comunicação biológica intra-específicas (atração sexual, manutenção de cardumes, territorialidade), inter-específicas (atração de presas, repulsão de predadores, defesa, aposematismo, dispersão) e iluminação (HERRING, 1978; HASTINGS, 1991). Nos casos mais simples, como em bactérias, a bioluminescência é intracelular, em outros casos, como em crustáceos *Cypridina*, ela é extracelular. Existem peixes que possuem órgãos fotogênicos (fotóforos) que abrigam bactérias bioluminescentes simbióticas. E existem outros casos de organismos como os vagalumes em que órgãos altamente especializados em que houve a evolução para a geração própria de luz (HADDOCK, 2010). Os órgãos fotogênicos, também chamados de fotóforos ou lanternas, são constituídos por fotócitos que são células especializadas na produção de luz desses organismos. Os fotóforos são constituídos por camadas de fotócitos, lentes e camadas refletoras que aumentam a eficiência do sinal luminoso emitido, além de inervação, que promovem o controle temporal da bioluminescência para o desempenho das respectivas funções biológicas.

1.6. Diversidade química de sistemas bioluminescentes

As reações bioluminescentes de diferentes organismos diferem quanto à composição química da luciferina, estrutura das luciferases e co-fatores envolvidos, indicando que a

bioluminescência se originou independentemente mais de 30 vezes durante a evolução (HASTINGS, 1983, 1995; HADDOCK, 2006).

Luciferina é o nome genérico do substrato que gera luz mediante oxidação em qualquer reação bioluminescente. Existe uma grande variedade de luciferinas quimicamente diferentes (**Fig. 4**) (KASKOVA *et al.*, 2016; BECHARA e STEVANI, 2017): (1) FMNH₂/aldeído de cadeia longa em bactérias (*Aliivibrio fischeri*); (2) tetrapirrol linear em dinoflagelados (*Lingulodinium polyedra*, formalmente *Goniaulax*); (3) hispidina em fungos; (4) um formilenol alifático em um molusco (*Latia*); (5) duas imidazolpirazinas em crustáceos (*Vargula*, anteriormente *Cypridina*) e (6) cnidários (*Renilla* e *Aequorea*); (7) um N-isovaleril-3-aminopropanal na minhoca *Diplocardia*; (8) um peptídeo em outra minhoca (*Fridericia*) e (9) uma luciferina benzotiazólica- tiazólica em vagalumes.

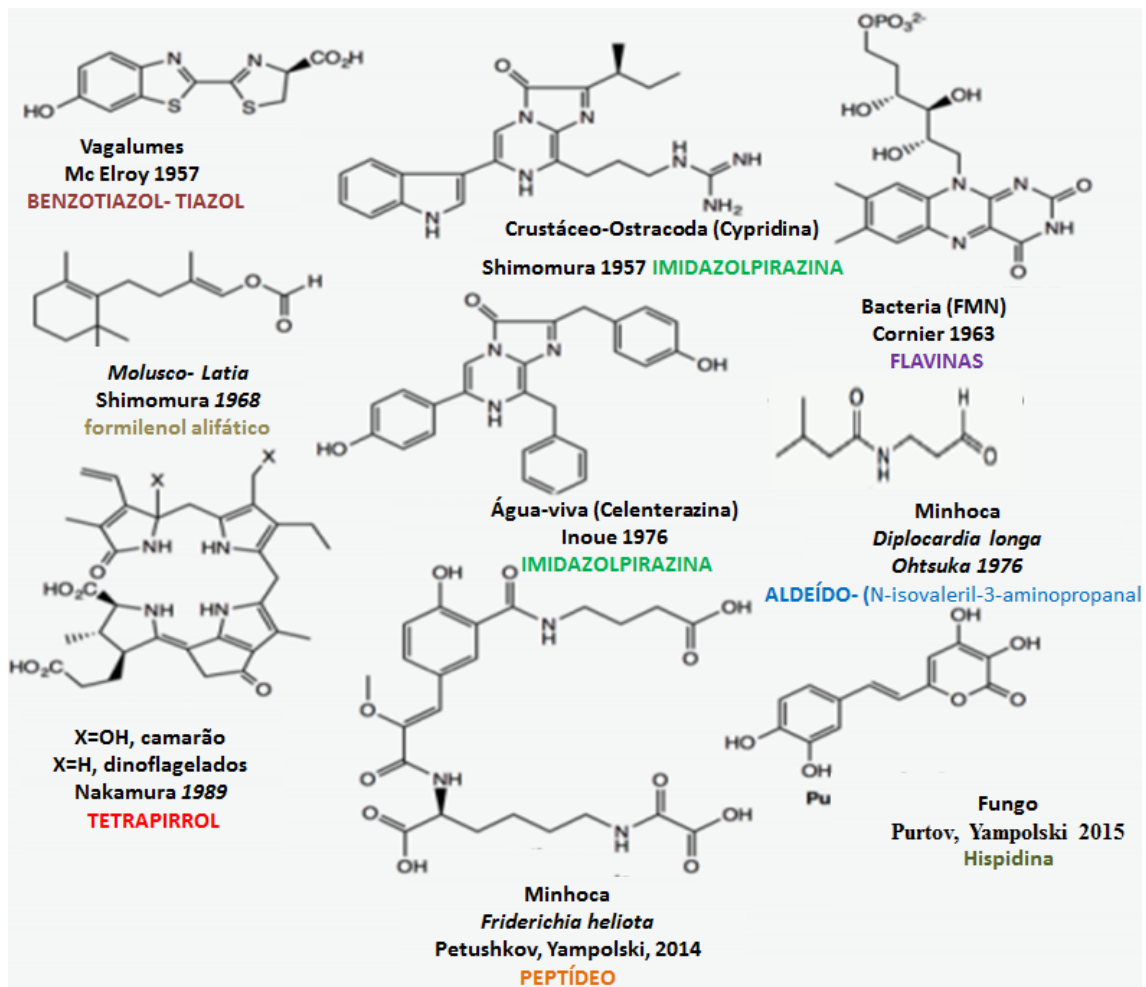


Figura 4. Estrutura molecular de luciferinas de organismos aquáticos e terrestres (Modificado de BECHARA e STEVANI, 2017).

As luciferases são enzimas funcionalmente classificadas como oxigenases, entretanto estruturalmente derivam de proteínas não relacionadas evolutivamente em diferentes organismos (VIVIANI, 2005). Embora os mecanismos de oxidação sejam em geral parecidos, envolvendo oxigênio e geração de intermediários peroxídicos, eles diferem quanto aos detalhes.

A bioluminescência bacteriana é o principal exemplo de uma bioluminescência que envolve a intermediação de um peróxido linear ao invés de uma dioxetanona (WILSON e HASTINGS, 1998). A luciferase catalisa uma oxidação de função mista de um aldeído de cadeia longa (TU, 2004) e 1 riboflavina reduzida, FMNH₂ (LEE *et al.*, 1991, BALDWIN e ZIEGLER, 1992; MEIGHEN, 1994; TU e MAGER, 1995), o que classifica a luciferase como uma monooxigenase flavina-dependente (AST *et al.*, 2007).

No caso da luminescência fúngica, a 3-hidroxisispidina (substrato da reação bioluminescente fúngica) é gerada previamente pela hidroxilação da hispidina na presença de uma hidroxilase dependente de NAD(P)H antes de reagir com a luciferase e o oxigênio para a emissão de luz (530 nm). Além disso, o mecanismo de reação implica um único processo de transferência de elétrons ainda não interpretado (BECHARA e STEVANI, 2017).

A bioluminescência de algas de dinoflagelados contém uma luciferina tetrapirrólica linear, uma luciferase de 140 kDa e uma proteína de ligação à luciferina, ocorrendo em organelas especializadas denominadas de cintilhões que são organelas especializadas na emissão de luz. A reação é desencadeada quando a proteína de ligação de luciferina libera a luciferina em pH ácido, enquanto em pH básico sequestra a luciferina e conseqüentemente suprime a reação (DUNLAP e HASTINGS, 1981).

No cnidário *Renilla reniformis*, envolve a celenterazina como luciferina, uma luciferase e GFP. Embora a reação luciferina-luciferase emita luz azul (486 nm), nos fotócitos de *Renilla*, a luciferase está associada à proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*). O complexo luciferase-oxiluciferina (celenteramida*) excitado transfere energia por BRET para a GFP que fluoresce na região do verde (508 nm), a cor da bioluminescência final deste organismo. Já no caso da água-viva *Aequorea victoria* (hidrozoário), envolve uma fotoproteína resultante um complexo estável de luciferase (aequorina)-luciferina-oxigênio, que mediante a adição de íons Ca²⁺ emite luz verde (509 nm).

O sistema bioluminescente do crustáceo *Vargula higerdorfii* (Cypridinidae) é um dos mais simples, pois depende apenas de luciferina, luciferase e oxigênio para a emissão de luz, (BECHARA e STEVANI, 2017).

1.7. A bioluminescência em Coleopteros

Com mais de 350.000 espécies descritas, a ordem Coleoptera é a mais rica e variada da Classe Insecta, correspondendo a 40% do total de (COSTA, 2003). Lawrence e Newton (1982), classificaram a fauna mundial dos coleópteros em quatro subordens, conforme as características morfológicas: Archostemata, Mysophaga, Adephaga e Polyphaga. Nessa última subordem, encontra-se a superfamília Elateroidea que inclui as três principais famílias com espécies luminescentes, Elateridae, Lampyridae e Phengodidae/Rhagophthalmidae (LAWRENCE e NEWTON, 1995) (**Fig. 5**). Todavia, a maioria das famílias dessa superfamília (Cantharidae, Lycidae, Eucnemidae, Throscidae, Telegeusidae, Omethidae, Omalisidae, entre outras) não apresentam bioluminescência registrada. Além destas famílias, foram descritas espécies bioluminescentes na família Staphylinidae (COSTA *et al.*, 1986; ROSA, 2010).

A família Lampyridae possui o maior número de espécies bioluminescentes, incluindo 1.800 espécies oriundas de aproximadamente 80 gêneros (LLOYD, 2002; VIVIANI, 2002). Os adultos emitem luz verde-amarelada na forma de lampejos por meio dos últimos segmentos abdominais de lanternas localizadas na região ventral, em geral para fins de atração sexual (LLOYD, 2002). Todas as larvas desta família são bioluminescentes e sua função possivelmente está associada à defesa do organismo (SIVINSKY, 1981).

A família Elateridae possui o maior número de espécies não-bioluminescentes. Dos aproximados 400 gêneros e 9.000 espécies descritas, apenas 150 delas são bioluminescentes na fase adulta (COSTA *et al.*, 2010). Conhecidos como vagalumes “tec-tec” ou pirilampos, na fase adulta emitem luminescência contínua esverdeada por meio de duas lanternas protorácicas, e luz de tonalidade que varia do verde-amarelo ao laranja por uma lanterna abdominal que é ativada durante o vôo. As larvas das espécies bioluminescente dessa família possuem luminescência na região dorsal do protórax ou, frequentemente, lanternas puntiformes laterais em cada segmento do corpo.

Por fim, a família Phengodidae é a mais rara e apresenta cerca de 35 gêneros e 200 espécies descritas agrupadas nas subfamílias Phengodinae, com representantes na América, e Rhagophthalminae com representantes na Ásia e Oceania (WITTMER, 1976, 1994). Na fase adulta os machos são alados, de tegumento mole, com élitros muito curtos cobrindo menos da metade das asas e antenas flabeladas, enquanto as fêmeas são ápteras e neotênicas, isto é, apresentam aparência larval, mas são sexualmente maduras (VIVIANI e BECHARA, 1997). Na tribo Mastinocerini (inserida dentro da subfamília Phengodinae), se encontram as espécies

conhecidas popularmente como larvas-trenzinhos, isso porque, as fêmeas e larvas possuem lanternas puntiformes laterais ao longo do corpo que emitem luz verde-amarelada contínua, além de uma lanterna na cabeça que emite luz mais deslocada para o vermelho. A função de suas lanternas laterais está associada à defesa, pois emitem luz quando o inseto é perturbado (VIVIANI e BECHARA, 1997). Por outro lado, a função da bioluminescência das lanternas cefálicas parece estar associada à iluminação durante a caça de presas. Como a maioria dos organismos é pouco sensível à luz vermelha, essa cor de bioluminescência, emitida pela cabeça das larvas do gênero *Phrixothrix*, conferiria a vantagem de passar mais despercebidos por ambos predadores e presas enquanto a larva sonda seu ambiente (SIVINSKY, 1981; VIVIANI e BECHARA, 1997).

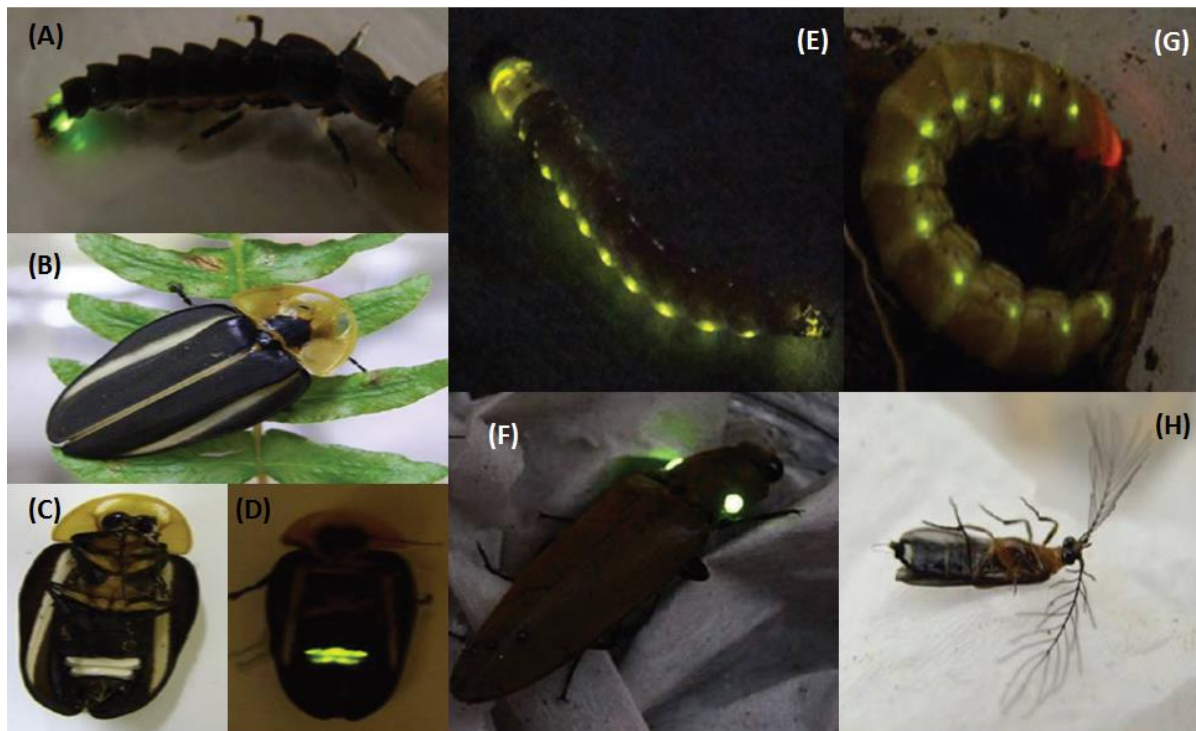


Figura 5. Vagalumes das três famílias: **Lampyridae** (A, B, C, D) *Cratomorphus distinctus* Olivier, 1895 nos estágios larval (A) e adulto (B, C, D); **Elateridae** (E, F) *Pyrophorus divergens* estágio larval e adulto, respectivamente; **Phengodidae** (G) larva de *Phrixothrix hirtus* Olivier, 1909; (H) macho adulto de *Pseudophengodes brasiliensis* Wittmer, 1976. Fonte: Adaptado de VIVIANI e SANTOS, 2012.

1.8.O sistema-luciferina-luciferase de besouros

Um dos mecanismos de bioluminescência terrestre melhor estudados é o de vagalumes. O substrato usado na reação é a D-Luciferina (**Fig. 6**), um composto que consiste de uma porção benzotiazólica ligada a uma porção tiazólica carboxílica de peso molecular

280. A luciferina do vagalume *Photinus pyralis* foi cristalizada e estudada pela primeira vez por Bitler e McElroy (1957) e sua síntese foi efetuada por White *et al.* (1961, 1963), juntamente com seu produto de autooxidação - a desidroluciferina. A luciferina de besouros bioluminescentes das famílias Lampiridae, Elateridae e Phengodidae são idênticas, e a reação bioluminescente essencialmente é a mesma nos vagalumes (COLEPICOLO *et al.*, 1986; VIVIANI e BECHARA, 1993).

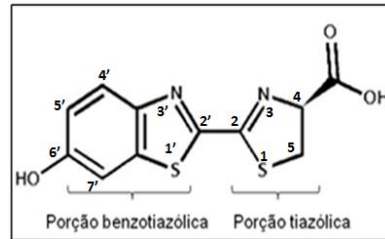


Figura 6: D-Luciferina, o substrato comum à reação bioluminescente de coleópteros.

As luciferases de vagalumes catalisam a oxidação da luciferina por oxigênio molecular com a participação de MgATP (McELROY e DE LUCA, 1978; WOOD, 1995; VIVIANI, 2002). Em uma primeira etapa, a luciferase atua como ligase, catalisando a adenilação da luciferina usando ATP, produzindo adenilato de luciferina, com a liberação de pirofosfato (**Fig. 7a**). Na segunda etapa, a luciferase remove o próton do carbono α (C-4) do adenilato de luciferina e atua como uma oxigenase, (**Fig. 7b**) permitindo que o mesmo seja oxidado (**Fig. 7c**), produzindo uma dioxetanona (**Fig. 7d**). O grupo hidroxila na posição 6' da dioxetanona perde um próton (H^+) gerando a ânion fenolato (**Fig. 7e**) que, pelo mecanismo CIEEL, transfere o elétron do para o anel da dioxetanona, induzindo sua clivagem e gerando dióxido de carbono e oxiluciferina em um estado eletronicamente excitado singlete (**Fig. 7f**) que decai emitindo um fóton de luz (**Fig. 7g**) na região que varia do verde ao vermelho .

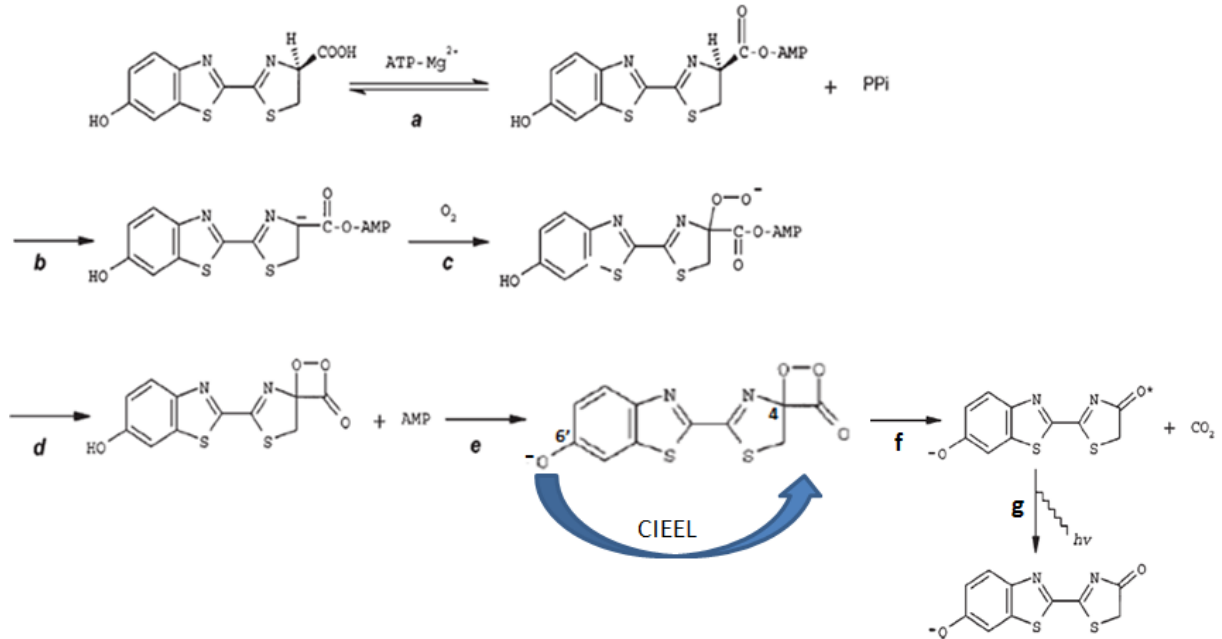


Figura 7. Etapas da reação de bioluminescência catalisada pelas luciferases de coleopteros. (a) Inicialmente, a luciferina, ATP-Mg^{2+} e luciferase formam um complexo ternário, levando à adenilação da luciferina e liberação de pirofosfato; (b) remoção de um próton do adenilato de luciferina; (c) oxidação por oxigênio molecular; (d) formação de um peróxido que se cicliza (dioxetanona); (e) transferência de elétrons da porção fenolato (benzotiazólica) para o anel dioxetanona, (f) a dioxetanona se cliva com a formação de CO_2 e oxiluciferina excitada; (g) a oxiluciferina excitada decai emitindo um fóton de luz visível (Adaptado de DAY, *et al.*, 2004).

1.9. Mecanismos propostos de modulação dos espectros de bioluminescência pelas luciferases

Os espectros de bioluminescência na reação luciferina-luciferase de coleópteros são essencialmente determinados por dois fatores: a estrutura química da molécula emissora (a oxiluciferina excitada) que depende da estrutura do substrato (luciferina), e o microambiente e as interações onde a molécula emissora é gerada (o sítio ativo da luciferase). É sabido que moléculas no estado excitado assumem diferentes propriedades físico-químicas, como polaridade e características ácido-base diferentes em relação ao estado fundamental, e assim terão diferentes interações com o solvente (WELLER, 1961; JAFFÉ *et al.*, 1964).

As luciferases de coleópteros eliciam a produção de luz de diferentes cores (VIVIANI *et al.*, 2001). Os lampirídeos emitem flashes de luz que variam do verde ao amarelo (545-580 nm) (WOOD *et al.* 1995), enquanto os elaterídeos emitem luz contínua na faixa verde-laranja (535-595 nm) (COLEPICOLO *et al.*, 1986) e os fengodídeos possuem o espectro mais amplo variando do verde ao vermelho (535-636 nm) dependendo da espécie e lanterna (VIVIANI e BECHARA, 1993).

A variedade de cores da bioluminescência é assim atribuída às variações na estrutura primária e do microambiente do sítio-ativo das luciferases que perturbam o estado excitado da molécula produto, a oxiluciferina, uma vez que a luciferina é a mesma em todos os casos (VIVIANI, 2002).

Três mecanismos foram originalmente propostos para explicar a determinação da cor da bioluminescência no sítio ativo de luciferases de besouros: (i) efeitos não-específicos (polaridade) do sítio ativo, (ii) efeitos específicos (interações ácido-básicas que afetam a estrutura iônica ou tautomérica da oxiluciferina), (iii) a geometria do sítio ativo.

Efeitos não-específicos. Nesta classe de efeitos, a *polaridade do solvente* e a *polarizabilidade orientada* foram propostos (DeLUCA, MORTON, 1969; UGAROVA, 1998). O efeito solvente baseia-se no fato que as moléculas no estado excitado assumem diferentes polaridades em relação ao estado fundamental, e assim terão diferentes interações com o solvente. No caso da luciferina e oxiluciferina, o estado excitado é mais polar que o estado fundamental, de modo que solventes mais polares estabilizarão e diminuirão a energia do estado excitado, deslocando a emissão para o vermelho (deslocamento batocrômico) ao passo que solventes apolares terão o efeito oposto, isto é, em direção a região azul do espectro (deslocamento hipsocrômico) (DeLUCA, 1969). Um detalhamento da hipótese anterior é a *polarizabilidade orientada* considerada por Ugarova e Brovko (2002). Este mecanismo está relacionado à capacidade das moléculas de solvente de se rearranjarem em torno da molécula excitada. Se as moléculas de solvente puderem se rearranjar em volta da molécula excitada, a energia da mesma será menor e a emissão de luz será mais deslocada para o vermelho. Por outro lado, se as moléculas de solvente estiverem em um ambiente mais rígido, estas não poderão se rearranjar em torno da molécula excitada, caracterizando um estado de maior energia, e assim a emissão será mais deslocada para o azul. (**Fig. 8**).

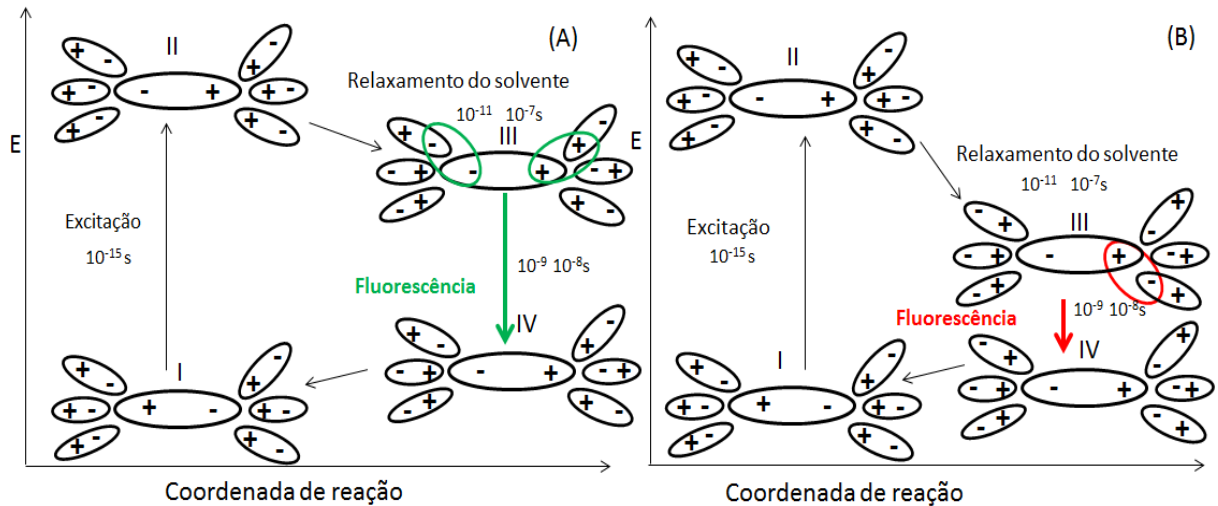


Figura 8. Hipótese da Polarizabilidade orientada. (A) Baixa orientação de polarizabilidade representado por um ambiente de pouca mobilidade do solvente, com a presença de interações repulsivas entre as moléculas de solvente e a molécula excitada aumentando a energia resultando em deslocamento hipsocrômico. (B) Alta Polarizabilidade representada por um ambiente de maior mobilidade das moléculas de solvente, permitindo a reorganização ou relaxamento das moléculas do solvente em torno da molécula excitada, resultando em interações mais favoráveis de menor energia entre emissor e as moléculas de solvente, resultando em deslocamento batocrômico. Fonte: Modificado de UGAROVA e BROVKO, 2002.

Estudos espectroscópicos com a desidroluciferina e do desidroluciferol (que simulam a oxiluciferina) mostraram que a hidroxila da porção benzotiazólica da luciferina inicialmente possui um $pK_a = 8.7$ (ácido fraco) em seu estado fundamental, entretanto, altera seu comportamento para aquele de um ácido forte ($pK_a \sim 1$) no estado excitado (MORTON *et al.*, 1969). Sendo o estado excitado mais polar, então um solvente mais polar estabiliza a molécula excitada, diminuindo sua energia e, conseqüentemente, a emissão ocorre no vermelho. Em contrapartida, um solvente apolar, onde a transferência de prótons do grupo fenólico para o solvente está impedida, ocorre a desestabilização do estado excitado, aumentando sua energia resultando numa emissão mais deslocada para a região azul do espectro.

Interações específicas da oxiluciferina excitada. Nesta classe de efeitos, encontramos interações ácido-base e eletrostáticas com os grupos ceto/enol e fenol/fenolato da oxiluciferina.

White *et al.* (1971) originalmente propuseram que a presença de resíduos básicos no sítio ativo da luciferase estariam envolvidos na abstração do próton C5' da oxiluciferina excitada, promovendo sua tautomerização, sendo que a forma ceto seria responsável pela emissão de luz vermelha e a forma enólica por luz verde-amarela (**Fig. 9A**). Portanto, um equilíbrio tautomérico entre as formas ceto e enólica da oxiluciferina determinariam os

espectros de emissão. Embora esta hipótese originalmente tenha sido aventada para explicar a mudança do espectro do verde para o vermelho em pH ácido nas luciferases de vagalumes (WHITE *et al.*, 1969), atualmente sofre severas críticas, pois: (1) quando a enolização é impedida por meio da introdução de grupos metila no carbono 5 da porção tiazólica da luciferina (carbono vicinal à carbonila), a oxiluciferina produzida na forma cetônica ainda produz luz verde, o que mostra que a forma cetônica pode emitir luz numa ampla faixa do espectro (BRANCHINI *et al.*, 2004); (2) é necessária mais energia para promover a tautomerização da forma ceto (o emissor primordial formado na etapa de quimioexcitação) para a forma enólica (BECHARA e VIVIANI, 2014).

Branchini *et al.* (2004) sugeriram posteriormente que o grau de ressonância da oxiluciferina excitada com a configuração $-N=C-C=N-$ seria responsável pela emissão de luz verde, enquanto a configuração $=N-C=C-N=$ emitiria luz vermelha (**Fig. 9B**). De acordo com os autores, interações eletrostáticas principalmente do lado do grupo fenol poderiam influenciar neste processo de conjugação.

Atualmente, estudos experimentais e teóricos com ambas a oxiluciferina e as luciferases, indicam que os fatores mais importantes na determinação dos espectros são a polaridade do sítio ativo e interações ácido-base e eletrostáticas principalmente com o grupo fenol/fenolato da oxiluciferina excitada (HIRANO *et al.*, 2009; VIVIANI *et al.*, 2013a).

Geometria do sítio ativo. McCAPRA *et al.* (1994) propuseram a *transferência de carga por torção intramolecular*, na qual a forma ceto da oxiluciferina seria suficiente para a emissão de uma ampla faixa de cores de bioluminescência nos vagalumes. A oxiluciferina no estado fundamental estaria numa conformação planar em relação aos anéis tiazínicos. A variação de cores se daria por meio de 2 conformações da oxiluciferina no estado excitado, as quais seriam resultantes da rotação da ligação C2-C2' em torno dos anéis tiazólicos (**Fig. 9C**): (i) uma conformação com ângulo menor que 90° (planar e mais rígido) de maior energia e seria responsável pela emissão verde, (ii) outra com os anéis rotacionados perpendiculares com ângulo diedro de 90° (mais relaxado) de menor energia resultaria na emissão vermelha. Assim a geometria do sítio ativo permitiria diferentes graus de rotação, ou a rotação completa, determinando diferentes cores de bioluminescência. Entretanto, esta hipótese *transferência de carga por torção intramolecular* carece de apoio teórico e comprovação experimental.

Nakatsu *et al.* (2006), por meio da cristalização da luciferase selvagem de *Luciola cruciata* (emissora de luz verde) e de seu mutante S286N (emissor de luz vermelha) complexada com o análogo de adenilato de luciferina DLSA (5'-O-[N-(desidroluciferil)-

sulfamoil] adenosina, demonstrou que em ambos os casos de emissão de luz verde ou vermelha, os anéis tiazólicos encontram-se na mesma configuração planar em relação à ligação C2-C2' da oxiluciferina, colocando a hipótese da *transferência de carga por torção intramolecular* em dúvida.

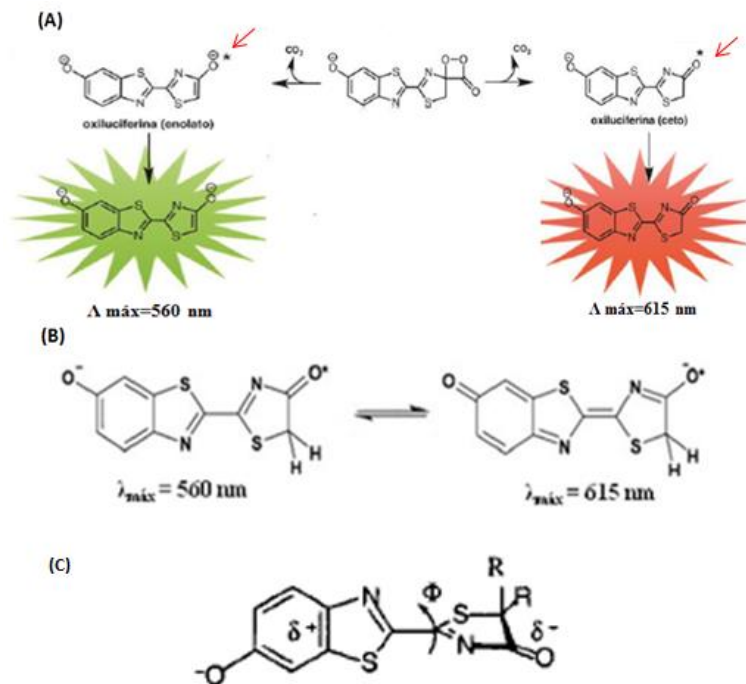


Figura 9. (A) Tautomerização da oxiluciferina em suas formas enólica e cetônica. Fonte: Adaptado de BECHARA e VIVIANI, 2014; (B) Conformação da oxiluciferina segundo grau de ressonância. Fonte: BRANCHINI *et al.* 2004; (C) Mecanismo de transferência de carga por torção intramolecular. O ângulo mais relaxado conforme mostra essa figura é responsável pela emissão no vermelho. Fonte: Modificado de BRANCHINI *et al.*, 2002.

Apesar da hipótese da *transferência de carga por torção intramolecular* não ser mais tão bem aceita, a geometria do sítio-ativo ainda tem um importante papel na determinação das cores, e não deve ser descartada. Resultados experimentais e teóricos sugerem de fato que, alterações da conformação do sítio ativo da luciferase de vagalumes podem afetar tanto a polaridade como interações específicas (VIVIANI *et al.*, 2008). Uma conformação “fechada” do sítio-ativo excluiria água do sítio ativo da luciferase, resultando em luminescência verde-amarelada, ao contrário da conformação “aberta”, que promove a entrada de água e consequente polarização, resulta em luminescência vermelha (KOKSHAROV e UGAROVA, 2008; VIVIANI *et al.*, 2008, 2014).

1.10. Análogos de Luciferina

Uma das formas de alterar os espectros de bioluminescência é através da modificação da estrutura química da luciferina, e por consequência da oxiluciferina resultante. O estudo teórico do emissor de luz da oxiluciferina de vagalumes indicou que a faixa de emissão esperada do substrato original D-LH₂ seja 421-626 nm. Para estender essa faixa de emissão, uma das estratégias é a modificação da estrutura da luciferina (NAUMOV *et al.*, 2009). Desde a década de 1960, vários análogos da luciferina foram sintetizados. White *et al.* (1966) sintetizaram o análogo 6´amino-luciferina (análogo mais simples com o qual trabalhamos neste estudo) pela primeira vez e investigaram suas propriedades espectroscópicas com luciferases de lampirídeos e elaterídeos, mostrando que o espectro da luciferase do vagalume está na região laranja-vermelha, independente do pH. Em seguida, Branchini *et al.* (1989, 2002) a partir do final da década de 80 começaram a sintetizar vários análogos de luciferina com o objetivo de produzir luciferinas com emissão mais deslocada para o vermelho para fins analíticos.

Cheng *et al.* (2018) classificaram os análogos de luciferina em oito categorias (**Fig. 10**), de acordo com as posições substituídas na luciferina:

- 1) Categoria A, a substituição é realizada no anel fenil (nas posições C4', C5' e C7'), e o análogo listado emite luz com desvio para a região vermelha do espectro (WHITE *et al.*, 1966; TAKAKURA *et al.*, 2012; STEINHARDT *et al.*, 2016).
- 2) Categoria B, uma ligação dupla é inserida entre a porção benzotiazólica e tiazólica (JATHOUL *et al.*, 2014). Até o momento, é a categoria que emite a luz mais deslocada para o vermelho sem transferência de energia (BRET).
- 3) Categoria C, a substituição ocorre na posição C5, na qual dois átomos de hidrogênio são substituídos por dois substituintes metila, os quais foram usados para estudar como o efeito estérico do substituinte na posição C5 influencia a reação de adenilação (BRANCHINI *et al.*, 2002). Além disso, a dimetilação no carbono 5 próximo à carbonila da oxiluciferina, impede sua tautomerização, dessa forma, restringe o emissor à forma cetônica.
- 4) Categoria D, a posição do substituinte está no C6', os grupos substituintes incluem N-alquilação, (SHINDE *et al.*, 2006; WOODROOFE *et al.*, 2008; MOFFORD *et al.* 2014; WU *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2012) O-alquilação, (WHITE *et al.*, 1966; YAO *et al.*, 2007^{a,b}) e substituição por átomos únicos diferentes (cloro e

hidrogênio, etc). (DENBURG, 1969; WHITE *et al.*, 1966). Dentro desta classe, se incluem os 6'-aminoanálogos.

6' amino-análogos. Vários 6' amino análogos de luciferina, em que o grupo hidroxila foi substituído por um grupo amino ou seus derivados, foram sintetizados e estudados. A idéia por trás destes estudos foi justamente investigar a influência da hidroxila e outros grupos doadores de elétrons nos espectros de bioluminescência. Foi demonstrado que o análogo 6'-Amino-luciferina funciona como uma sonda bioluminescente pH-insensitiva para investigar a interação do grupo substituinte 6' da oxiluciferina com o ambiente circundante do sítio- ativo em luciferases de coleópteros (HIRANO *et al.*, 2009; VIVIANI *et al.*, 2013^a, 2014). Ensaio protease, de detecção seletiva e sensível de micromoléculas, são baseados principalmente em modificações do substrato original luciferina ou 6' amino-luciferina (YAO *et al.*, 2007; KINDERMANN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2017; VAN DE BITTNER *et al.*, 2010.; TAKAKURA *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2012^{a,b}). Outra categoria de análogos da luciferina, que emitem a emissão de luz deslocada para a região do vermelho através do BRET é nomeada como análogos da luciferina BRET e construídos baseados principalmente na modificação de 6' amino-luciferina (KOJIMA *et al.*, 2013).

- 5) Categoria E, as substituições ocorrem nos heteroátomos (posições S1, S1', N3 e N3'), que podem emitir luz deslocada para o azul, luz vermelha e não emitir luz (BRANCHINI *et al.*, 1989; SUN *et al.*, 2012; McCUTCHEON *et al.*, 2012; IOKA *et al.*, 2016). Um análogo de selênio substituído na posição S1 originado de 6' amino-luciferina, emite luz deslocada para o vermelho, não tem efeitos prejudiciais, e tem potencial para bioimageam (CONLEY *et al.*, 2012).
- 6) Categoria F, o análogo sem um grupo carboxila na posição C4 não emite luz (WHITE *et al.*, 1965). Pode-se inferir que a exclusão do grupo carboxila na posição C4 é vital para emitir luz.
- 7) Categoria G, toda a porção benzotiazólica é substituída. Estes análogos não emitem luz ou emitem luz com baixa intensidade (BRANCHINI *et al.*, 1989, 2000; IWANO *et al.*, 2013) [WHITE *et al.*, 1965; SETO *et al.*, 1963; MIURA *et al.*, 2013].
- 8) Categoria H, a porção tiazólica é parcialmente ou totalmente substituída; este tipo de análogo também não emite luz [IOKA *et al.*, 2016, WHITE *et al.*, 1969].

Levando-se em consideração essas 8 categorias, fica evidente que a manutenção do esqueleto benzotiazólico e de um grupo doador de elétrons na posição 6 da luciferina é fundamental para obter bioluminescência eficiente.

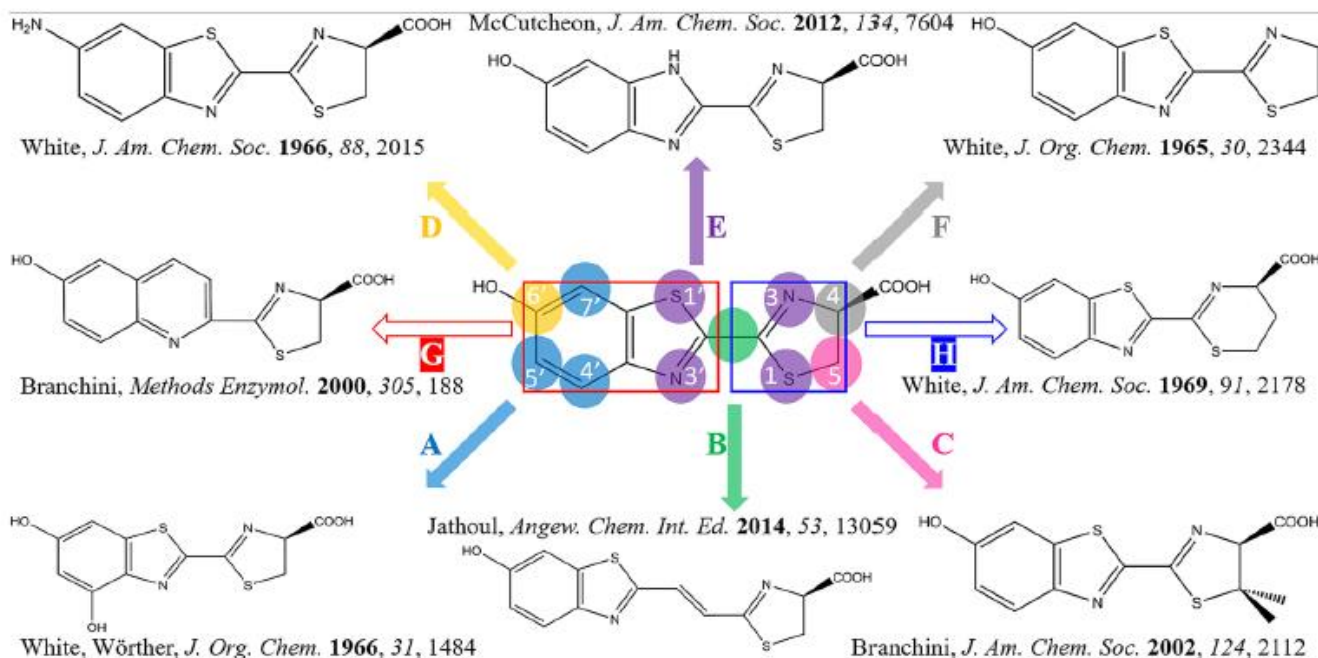


Figura 10. Oito categorias (A-H) dos análogos da luciferina sintetizados. Um representante é exemplificado para cada categoria. A cor da letra A-H está em de acordo com a cor da (s) posição (ões) substituída (s) da categoria correspondente. Fonte: CHENG e LIU, 2018.

Para obtenção de sistemas bioluminescentes vermelho distantes, que tem interesse em bioimagem em tecidos de mamíferos ricos em hemoglobina, apenas as categorias de análogos de A a E da luciferina (citados anteriormente) de vagalumes são utilizadas, uma vez que as modificações das demais categorias mostraram-se inadequadas, pois retiram grupos essenciais para o processo de bioluminescência que requer mais de uma etapa (CHENG *et al.*, 2018).

Estudos teóricos baseados nas propriedades π eletrônicas que empregam cálculos TD-DFT (STRATMANN *et al.*, 1998; RUNGE *et al.*, 1984) para o desenvolvimento desses sistemas sintéticos luciferase-luciferina com maiores comprimentos de onda, apontam para 3 condições necessárias para sua síntese: (i) o efeito do aumento da conjugação dos anéis tiazólicos que, aumentam o deslocamento batocrômico; (ii) o efeito estérico do substituinte, no qual um substituinte de tamanho apropriado é inserido em posição adequada no análogo nas proximidades dos aminoácidos do sítio ativo da luciferase; (iii) o efeito eletrônico do substituinte no análogo, que afeta a doação de elétrons da porção benzotiazólica (substituindo em várias posições - C6' e C4') para a porção tiazólica (principalmente C5). Isso porque é necessário um acúmulo de cargas negativas na porção tiazólica.

Efeito de doação de elétrons dos substituintes. A tendência de doação de elétrons do substituinte introduzido na posição 6 da porção benzotiazólica que contribuirá para o acúmulo de cargas na porção tiazólica, afetando o espectro de bioluminescência, é refletida pela constante de Hammett.

Louis Plack Hammett na década de 1930 verificou em estudo de ionização de ácidos benzóicos e seus derivados meta e para-substituídos em água, uma relação logarítmica entre a constante de dissociação do ácido benzóico não substituído (K_H) e a constante de dissociação de ácidos meta e para-5 substituídos (K_X). Esse valor característico para cada substituinte é representado pelo símbolo σ (constante de Hammett).

$$\sigma = \log (K_X / K_H)$$

Onde:

K_X = constante de dissociação do ácido substituído;

K_H = constante de dissociação do ácido benzóico;

σ = constante do grupo substituinte.

A idéia básica é que, para quaisquer duas reações com dois reagentes aromáticos que diferem apenas no tipo de substituinte, a alteração na energia livre de ativação é proporcional à alteração na energia livre de Gibbs (ΔG° de dissociação). Dessa forma, para grupos retiradores de elétrons o valor de σ é positivo, pois grupos retiradores de elétrons aumentam o valor da constante de dissociação, enquanto grupos doadores de elétrons apresentam um σ negativo, pois diminuem a constante de dissociação (CAREY e SUNDBERG, 2007). Quando σ é positivo, a reação é favorecida por grupos que atraem elétrons e quando σ é negativo, a reação é favorecida por grupos que repelem elétrons. O valor absoluto da constante de Hammett expressa a sensibilidade da reação ao efeito de grupos substituintes.

1.11. As luciferases de besouros

As luciferases das famílias Lampyridae, Elateridae e Phengodidae são proteínas com 542-550 resíduos de aminoácidos, as quais compartilham entre 45-50% de identidade na estrutura primária). Quando comparadas dentro da mesma família o grau de identidade varia entre 60-99%, com massa molecular cerca de 60 kDa. Os dados originais sugeriam que a luciferase de vagalume fosse uma proteína de membrana que se associa a fosfolipídeos

(UGAROVA, 1989). Gould *et al.* (1988) mostraram que as luciferases de vagalumes tem uma sequência sinalizadora que as dirige aos peroxissomos (organelas às quais está associada a fotócitos) após a tradução (HANNA, 1973).

DeWet *et al.* (1985), clonaram a luciferase de *P. pyralis* e desde então várias outras luciferases de besouros das diferentes famílias, principalmente de vagalumes, foram clonadas (TATSUMI *et al.*, 1989; 1992; WOOD *et al.*, 1989; KAJIYAMA e NAKANO, 1991; DEVINE *et al.*, 1993; OHMIYA *et al.*, 1995; SALA-NEWBY *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997; VIVIANI *et al.*, 1999a; 1999b; 2004; 2005; 2011; ALIPOUR *et al.*, 2004; EMAMZADEH *et al.*, 2006; BRANCHINI *et al.*, 2006; AMARAL *et al.*, 2012; 2016).

Nosso grupo de pesquisa foi o responsável pela clonagem de várias luciferases das três famílias emissoras de diferentes cores de luz e com propriedades singulares como é o caso da luciferase da larva-trenzinho *Phrixothrix hirtus*, a única a produzir bioluminescência na faixa vermelho do espectro (623 nm) (VIVIANI *et al.*, 1999b), as luciferases emissoras de luz verde do vagalume *Amydetes viviani* (547 nm) (VIVIANI *et al.*, 2011; PELENTIR *et al.*, 2019) e da larva de cupinzeiro *Pyrearinus termitilluminans* que emitem luz muito deslocada para o azul (VIVIANI *et al.*, 1999^a), sendo essa última luciferase reportada com maior rendimento quântico até o momento (NIWA *et al.*, 2010^b), além da luciferase do vagalume *Macrolampis* com espectro pH-sensitivo (VIVIANI *et al.*, 2005), entre outras (VIVIANI *et al.*, 2004^a; AMARAL *et al.*, 2013, 2016).

De acordo com a sensibilidade espectral ao pH, as luciferases de besouros classificam-se em dois grupos (VIVIANI e BECHARA, 1995): (i) as pH-sensitivas, compreendendo as luciferases de lampirídeos que sofrem deslocamento batocrômico (para a região vermelha do espectro) em pH ácido, temperaturas elevadas e aumento da concentração de cátions de metais pesados¹ (SELIGER e Mc ELROY, 1964) e (ii) as pH-insensitivas que incluem as luciferases de fengodídeos e elaterídeos que não sofrem deslocamento do espectro quando submetidas a estas condições (VIVIANI e BECHARA, 1995).

Polaridade do sítio ativo. A fluorescência dos aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina e, especialmente triptofano, em uma proteína é influenciada pelo ambiente químico e físico no qual se encontram (BRAND e WITHOLT, 1967) podendo ser utilizada como

¹ Atualmente são denominados de metais potencialmente tóxicos. Todavia, adotamos a nomenclatura antiga ainda empregada pela maioria dos artigos consultados nessa tese.

indicador de mudanças conformacionais da proteína. O mesmo se aplica aos corantes fluorescentes covalentemente ligados ou adsorvidos às proteínas.

O uso de fluoróforos como sondas para locais hidrofóbicos em proteínas é conhecido desde a década de 60 e está bem documentado (McCLURE e EDELMAN, 1966, 1967; BRAND *et al.*, 1967). A interação entre fluoróforo excitado (polarizado) e um ambiente mais hidrofóbico (apolar) no sítio ativo da proteína resulta em um deslocamento do espectro para o azul, podendo assim ser utilizado para averiguar mudanças de polaridade associadas a mudanças conformacionais. (LIPPERT *et al.*, 1961; BRAND e WITHOLT, 1967).

DeLuca (1969) mostraram pela primeira vez que o sítio-ativo da luciferase de *P.pyralis* é hidrofóbico, usando as sondas 2- (4-toluidino) naftaleno-6-sulfonato (2,6 TNS) e [1- (anilino) naftaleno 5-sulfonato] (1, 5 ANS). Posteriormente, VIVIANI *et al.* (2006, 2014) usando 2,6 TNS compararam a polaridade do sítio ativo de luciferases de besouros, e confirmaram que o sítio de ligação à luciferina da luciferase emissora de luz vermelha de *P.hirtus* é mais polar do que no caso das luciferases emissoras de luz esverdeada: *P. vivianii*, *P.termitilluminans* e *P.pyralis*.

1.11.1. Estrutura tridimensional

A estrutura tridimensional das luciferases dos lampirídeos *Photinus pyralis* e *Luciola cruciata* foram determinadas por cristalografia de raios X na ausência e na presença de análogos de adenilato de D-luciferina (DLSA), respectivamente (CONTI *et al.*, 1996; NAKATSU *et al.*, 2006), revelando regiões e resíduos de aminoácidos conservados importantes no mecanismo da bioluminescência (**Fig. 11**). As luciferases de besouros são compostas por um grande domínio N' (1-436 aa) e um pequeno domínio C' (443-548 aa) conectados por um loop flexível que provavelmente promove a aproximação desses domínios para envolver os substratos durante a catálise (CONTI *et al.*, 1996). O sítio de ligação do substrato está localizado na porção N-terminal, mas a rotação do sub-domínio C-terminal é crucial para a catálise eficiente das reações de adenilação e oxidação (NAKATSU *et al.*, 2006; SUNDLOV *et al.*, 2012). Sugere-se que durante a etapa de adenilação, os dois domínios assumem uma conformação similar em diferentes enzimas, enquanto nas etapas subsequentes os domínios apresentam diferentes graus de rotação dependendo da enzima (GULICK *et al.*, 2003; VIVIANI, 2008).

Na estrutura cristalográfica da luciferase de *Luciola cruciata*, Nakatsu *et al.* (2006) mostraram que o sítio-ativo desta luciferase apresenta duas conformações, uma aberta e outra fechada, e propuseram que o tamanho da cavidade do sítio ativo seria o responsável pela modulação das cores, sendo que uma maior cavidade permitiria que a oxiluciferina relaxasse e emitisse luz avermelhada, enquanto uma menor cavidade não permitiria esse relaxamento e a luz seria verde-amarela.

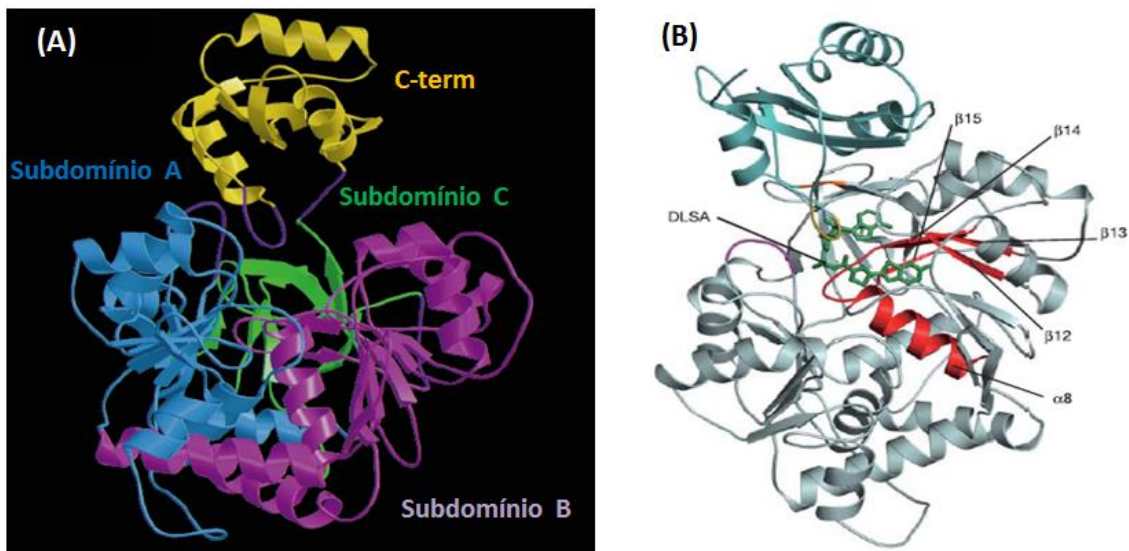


Figura 11. (A) Estrutura tridimensional da luciferase do lampirídeo *Photinus pyralis*, representando os três subdomínios do largo domínio N-terminal (Subdomínio A- em azul, Subdomínio B- em roxo e Subdomínio C- em verde) e domínio C- terminal em amarelo que se aproximam possivelmente para envolver os substratos durante a catálise. Fonte: Adaptado de CONTI *et al.* 1996. (B) Estrutura da luciferase do lampirídeo de *Luciola cruciata* complexada com o análogo DLSA, demonstrando o domínio N-terminal (cinza) e o domínio C-terminal (azul) Fonte: NAKATSU *et al.* 2006.

O sítio de ligação da luciferina. Branchini *et al.* (1998), propuseram por modelagem molecular o primeiro modelo (Fig. 12) no qual o sítio de ligação para o anel adenina do ATP na luciferase envolve os segmentos 316GAP318, 339GYGL342 e V362, enquanto o sítio de ligação da luciferina envolve os peptídeos 341GLT343 e 346TSA348; os resíduos da hélice 245HHGFGMT251; e os resíduos da alça móvel 315GGA317.

A cadeia lateral de R218 está situada na parte inferior (próxima à hidroxila) do bolso de ligação da luciferina na porção benzotiazólica, sendo que esse resíduo juntamente com F247, A348, H245 e K529 parecem fixar a posição da luciferina no sítio de ligação para promover o arranjo necessário para o passo inicial da formação do adenilato (BRANCHINI *et al.* 1998). Além disso, R218 realiza interações com outras partes do sítio incluindo Gly315-Pro318 e Gly339-Thr343 (BRANCHINI *et al.*, 2003). Todavia, no modelo proposto por

Sandalova e Ugarova (1999) não seria R218 o resíduo que estaria situado próximo à hidroxila do bolsão de ligação da luciferina, mas sim R337, uma proposta que é apoiada pela estrutura cristalográfica da luciferase de *P. pyralis* complexada com bromofórmio (CONTI *et al.*, 1997).

O resíduo H245 na luciferase do lampirídeo *P. pyralis* foi apontado como possível base catalítica para abstração de próton C4, estabilizando o carbânion C4, e também para a formação do intermediário adenilato de luciferina para posterior reação com O₂. Muitos desses aminoácidos em posições equivalentes na superfamília formadora de adenilato são bem conservados (CONTI *et al.*, 1996) e provavelmente têm funções similares na ligação ao substrato.

Outra análise de modelagem molecular mostrou que o motivo do grampo β da luciferase (442IleLysTyrLysGlyTyrGlnVal449) no subdomínio A8 localiza-se próximo ao resíduo K529 e à carboxila C4 da porção tiazólica do sítio ativo, e que Lys443 pode fazer interações com o adenilato (BRANCHINI *et al.*, 2005).

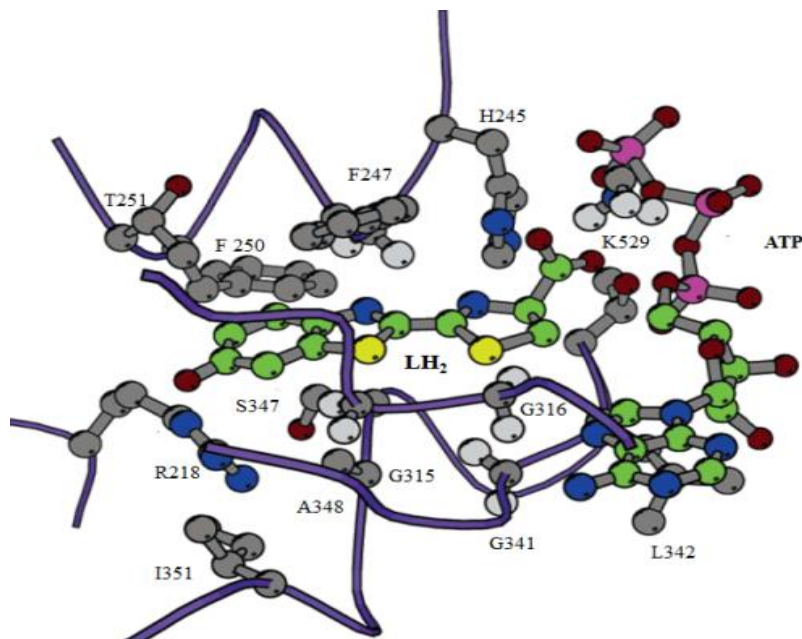


Figura 12. Modelo proposto por Branchini *et al.* (1998) mostrando o sítio de ligação da luciferina (estrutura central) e do ATP (estrutura à direita) à luciferase. Fonte: Adaptado de BRANCHINI *et al.*, 2004.

1.12. Relação estrutura x função em luciferases de besouros

Muitos estudos têm sido realizados ao longo das últimas décadas com as luciferases de besouros, especialmente aquelas de vagalumes, para se entender como a estrutura determina

propriedades cinéticas e os espectros de bioluminescência, através de técnicas de mutagênese randômica, mutagênese sítio-dirigida, quimerização, etc (KAJIYAMA e NAKANO, 1991, 1993; BRANCHINI *et al.*, 1998, 1999, 2001, 2003 ; VIVIANI e OHMIYA, 2000; VIVIANI *et al.*, 2001, 2002, 2007; WOOD, 1995; etc). Frequentemente, os efeitos destas mudanças afetam simultaneamente tanto a cinética como os espectros (BRANCHINI *et al.*, 1999, 2001, TAFRESHI *et al.*, 2007, 2008; VIVIANI *et al.*, 2000, 2004, 2007, 2013).

1.12.1. Espectros de bioluminescência

Os espectros de bioluminescência das luciferases pH-sensitivas (Lampyridae) são mais afetados por mutações pontuais sendo que várias mutações realizadas na estrutura primária destas luciferases resultaram em mutantes vermelhos (KAJIYAMA e NAKANO, 1991; DEVINE *et al.*, 1993; TAFRESHI *et al.*, 2007, 2008; VIVIANI *et al.*, 2005). Entretanto, nas luciferases pH-insensitivas (Elateridae e Phengodidae), são poucas as mutações que afetam consideravelmente os espectros, e em geral a maioria destas tem um menor efeito no espectro do que nas luciferases pH-sensitivas (VIVIANI *et al.*, 2001, 2007, 2008).

Mutações que afetam as cores da bioluminescência pertencem a duas classes principais: (i) aquelas no sítio de ligação da luciferina afetando diretamente a interação com a oxiluciferina excitada e (ii) aquelas distribuídas ao longo da estrutura tridimensional afetando indiretamente os espectros através de mudanças na conformação ou efeitos de longa distância (VIVIANI *et al.*, 2008).

Branchini *et al.* (1998, 1999, 2001, 2003) investigaram o efeito de várias mutações no sítio de ligação da luciferina na luciferase do vagalume lampirídeo *Photinus pyralis*. Houve um deslocamento de 21 nm no mutante G316A, um deslocamento mais acentuado de ~30 nm no mutante F247A e os maiores deslocamentos batocrômicos foram observados (44-60 nm) nos mutantes R218A, H245A, G315A, T343A, S347A, e A348V, mostrando que a interação desses resíduos é importante na determinação do espectro de bioluminescência nas luciferases de vagalumes (BRANCHINI *et al.* 2003).

Ao contrário do mutante H244F que não teve o espectro de bioluminescência alterado, todos os mutantes H245 (possível base catalítica para abstração do próton C4) deslocaram batocromicamente os espectros de emissão (de 579 a 613 nm) na ordem crescente com as substituições Arg <Phe <Ala <Gln <Asn (BRANCHINI *et al.*, 1999). Foi sugerido que a H244 estaria envolvida na estabilização dos anéis tiazólicos no sítio ativo da luciferase, enquanto que H245 poderia estar envolvida com a abstração do próton do C5 e o processo de

tautomerização. Mutações de R337, localizadas próximas ao sítio de ligação, levaram a um deslocamento batocrômico no espectro de bioluminescência de 38 nm, enquanto que a mutação do resíduo K529 que está associado à ancoragem à luciferina na porção superior tiazólica, não causou mudanças significativas no espectro de bioluminescência (BRANCHINI *et al.*, 2001, 2003).

Pesquisas realizadas por nosso grupo de pesquisa com luciferases pH-sensitivas (*Macrolampis* e *Cratomorphus distinctus*) e principalmente com pH-insensitivas (*Pyrearinus termitilluminans*, *Phrixothrix viviani* e *Phrixothrix hirtus*) mostraram que alguns resíduos importantes para os espectros se agrupam nos *loops* entre os resíduos 223-235 e entre 351-360, localizados na segunda camada de resíduos fora do sítio ativo para ligação da luciferina (VIVIANI *et al.*, 2007; MORADI *et al.*, 2009). O loop 223-235, o mais longo nas luciferases de besouros, que conecta os subdomínios A e B, auxilia a manter uma conformação do sítio-ativo “fechada” e hidrofóbica, favorável para a emissão de luz verde (VIVIANI *et al.*, 2008). Os dois *loops* descritos interagem entre si através dos resíduos S284/E311/R337 por meio de uma rede de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas.

Nas luciferases pH-sensitivas, foi demonstrada a existência de uma rede de interações polares envolvendo estes *loops* e resíduos do sítio-ativo, as quais podem estar envolvidas com a sensibilidade ao pH e a mudança de cor da bioluminescência (**Fig. 13**) (VIVIANI *et al.*, 2005, 2007, 2008). De acordo com esta hipótese, mediante alteração de pH, as interações que estabilizariam estes *loops* (forças hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas) seriam enfraquecidas, polarizando o sítio-ativo e ocasionando emissão no vermelho (VIVIANI *et al.*, 2008). Nas luciferases pH-insensitivas, o *loop* 223-235 aparentemente apresenta maior estabilidade, conferida por interações hidrofóbicas e um melhor empacotamento dos resíduos.

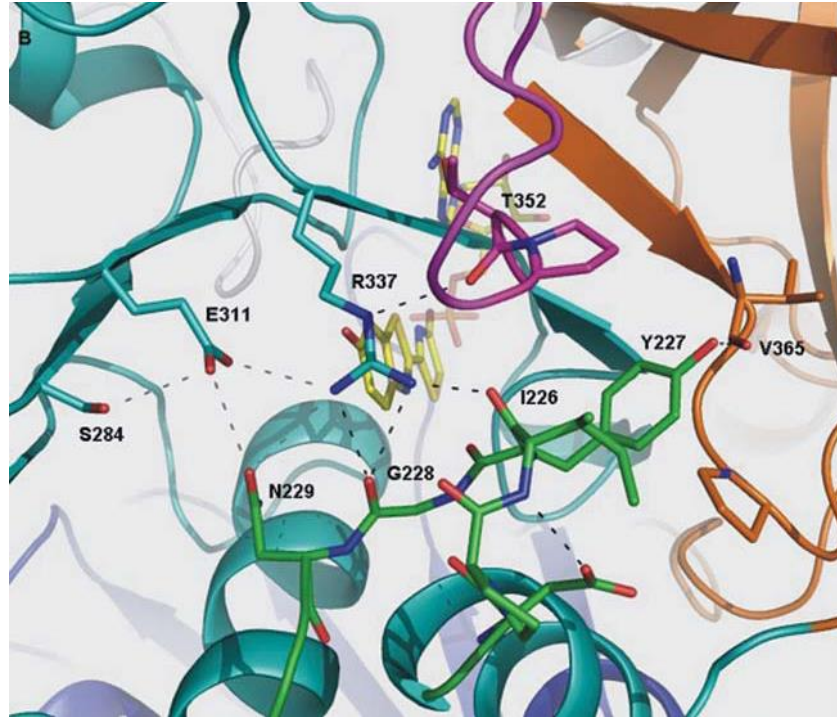


Figura 13. Modelo tridimensional de homologia da luciferase do lampirídeo *Macrolampis* sp2 (91% de identidade com a luciferase de *P. pyralis*) mostrando a ponte eletrostática entre os resíduos E311 e R337 e a rede de interações polares com a alça entre os resíduos 223 e 235. Fonte: VIVIANI *et al.*, 2016.

Estes estudos levaram finalmente Viviani *et al.* (2016, 2018) a identificar que os resíduos E311, R337, H310 e E354, localizados na parte inferior do sítio ativo da luciferina nas luciferase de vagalumes, constituem o sensor de pH e sítio de ligações de metais pesados.

De acordo com estes estudos, a ponte salina externa formada entre H310 e E354, em conjunto à ponte salina interna formada entre E311 e R337, são importantes para a estabilização da conformação fechada do sítio-ativo da luciferase favorável à emissão de luz verde e, possivelmente, forneceriam uma base (E311) e um contracátion² (R337) para a ionização do grupo fenol (VIVIANI *et al.*, 2016). Neste caso, a carboxila de E311 funcionaria como base recebendo o próton da hidroxila 6' da porção benzotiazólica durante a etapa de quimioexcitação, formando o fenolato, que é essencial para promover a transferência de elétrons para o anel de dioxetanona pelo mecanismo do CIEEL. Por outro lado, o grupo guanidina positivamente carregado do resíduo R337, embora estabilize o grupo fenolato no estado fundamental, poderia estabelecer uma interação repulsiva no estado excitado com o grupo fenolato, resultando em um estado de alta energia, responsável pela emissão verde. Em pH mais ácidos ou na presença de metais pesados, os prótons e tais metais se ligam nesta

² O prefixo Contra na palavra contra-cátion significa que é um cátion que faz par eletrostático com o ânion. Nesse caso, o cátion é proveniente de R337 e o ânion de E311.

região, quebrando essas pontes salinas alterando a conformação do sítio ativo para aberta, com a emissão de luz vermelha (Fig. 14).

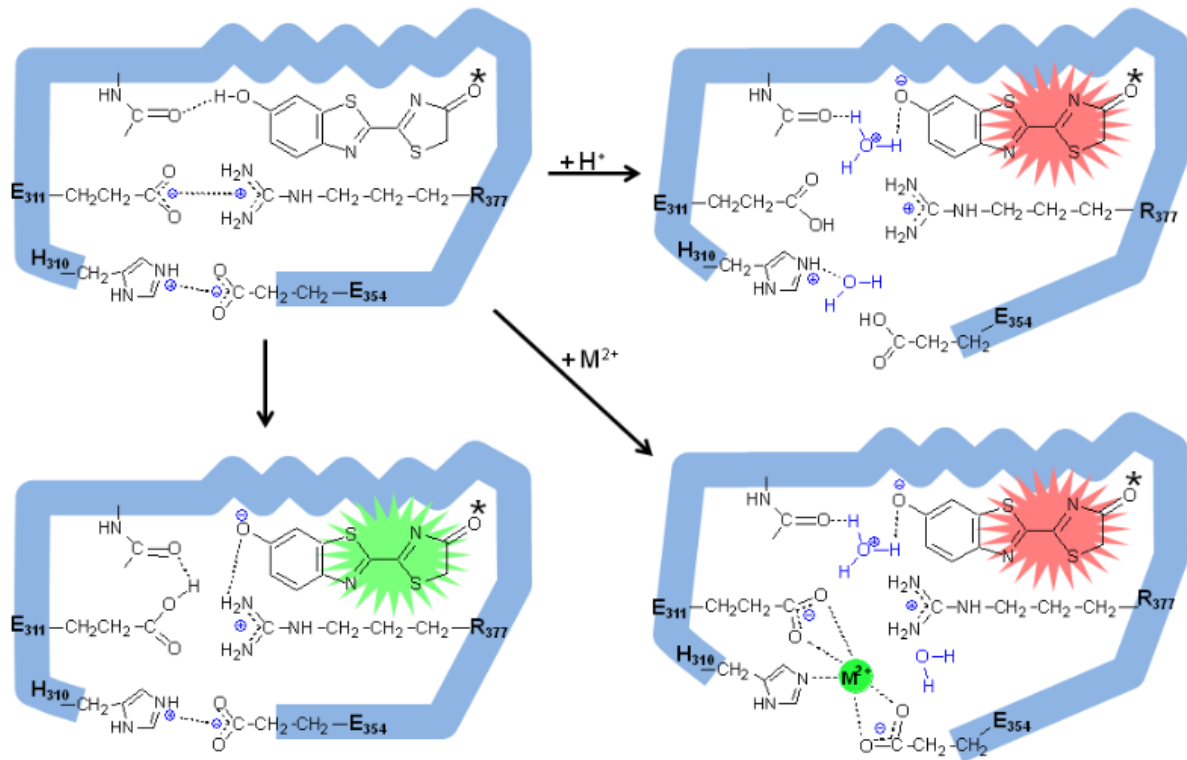


Figura 14. Figura representativa do mecanismo proposto de modulação da cor da bioluminescência pelo pH e metais pesados divalentes em luciferases de lampirídeos. Fonte: VIVIANI *et al.*, 2018.

1.12.2. Cinética e atividade bioluminescente

De acordo com o modelo proposto previamente, inicialmente Branchini *et al.* (1998, 1999) investigaram o efeito na propriedades cinéticas de mutações localizadas na porção tiazólica do sítio de ligação da luciferina, entre elas: H244F, (H245R/ H245F /H245A /H245Q/ H245N/ H245D), (K529R /K529Q), (T343S/ T343A).

Mutações na porção tiazólica. Para a maioria dos mutantes citados, exceto o mutante H244F, os efeitos sobre as constantes catalíticas (k_{cat}) foram mais pronunciados que para os valores de K_M . Em especial, os mutantes do resíduo H245, exibindo valores de k_{cat} 3 vezes (H245A), 16 vezes (H245F), 432 vezes (H245D) e 1702 (H245R) menores que a luciferase selvagem. Portanto, todos os mutantes foram comprometidos cataliticamente. Nessa posição os efeitos mais drásticos no K_M para ambos os substratos foram causados pelas mutações H245D e H245F, provavelmente causados pela interferência das cadeias laterais dessas

substituições com os substratos por repulsão eletrostática e impedimento estérico, respectivamente. A análise dos resultados da cinética dos mutantes H245D e H245F com adenilato de luciferina (AMP-LH₂) demonstraram uma interferência na síntese de adenilato, caracterizando a histidina nessa posição 245 como essencial para sua eficiente formação de adenilato na primeira reação da luciferase (BRANCHINI *et al.*, 1998).

Posteriormente, com intuito de cobrir todo o sítio de ligação com a luciferina e do ATP, Branchini *et al.* (2001, 2003) realizaram diversas outras mutagêneses em todas as regiões do sítio de ligação com a luciferina: **(porção tiazólica: K529A); (porção intermediária):** G246A, 247A, F247L, F247Y, F250G, F250S, T251A, G315A, G316A, G341A, L342A, S347A, A348V, I351A; **(porção benzotiazólica: R218A, R218K, R218Q, R337K, R337Q).**

Mutações na porção intermediária. A grande maioria das mutações afetaram os valores de K_M para ambos os substratos, com exceção de F247Y, F250G, F250L e G316A em que os valores de K_M ficaram próximos aos da luciferase selvagem. O mutante G246A foi o único que aumentou a afinidade para ambos os substratos, diminuindo os valores do K_M 3,5 e 5,5 vezes para luciferina e ATP, respectivamente. Esse mesmo mutante também se destacou por ter sua capacidade de produção de adenilato mais comprometida, identificando esse resíduo como crítico para a catálise da primeira reação de adenilação.

Mutações na porção benzotiazólica. Nessa porção, foram investigadas as argininas: R218, que é invariável, e R337 que é conservada na maioria das luciferases. Discutiu-se qual dessas duas argininas exerceria a função de estabilização do fenolato (BRANCHINI *et al.*, 1998; SANDALOVA e UGAROVA, 1999). Os valores elevados de K_M para os mutantes R218 para LH₂, em contraste aos dos mutantes de R337 que foram similares à luciferase selvagem, forneceram evidências de que R218 é um resíduo essencial para a ligação ao LH₂, entretanto a importância estrutural e catalítica de R337 não deve ser descartada, como será visto adiante nesta tese (págs: 31, 32, 80 e 81). Para os vários mutantes de R218 e R337, a perda da cadeia lateral carregada positivamente causou efeitos mais drásticos, diminuindo acentuadamente as atividades específicas e as constantes catalíticas. Entre essas mutações aquela com efeito mais pronunciado foi a mutação R218A que aumentou os valores do K_M 20 e 387 vezes para luciferina e ATP, respectivamente.

Mutações no motivo do grampo β . Finalmente, Branchini *et al.* (2005) por meio de modelagem molecular investigaram mais profundamente o efeito da porção tiazólica do sítio ativo. O resíduo K443, próximo ao resíduo K529 e à carboxila C4 da porção tiazólica do sítio ativo, seria um forte candidato a fazer interações com os fosfatos do adenilato de luciferina. A análise dos resultados das mutações pontuais e duplas de K443A e K529A, juntamente ao adenilato de luciferina mostraram que esses resíduos funcionam independentemente. Além disso, surpreendentemente, obtiveram a primeira mutação K445Q que acarretou no aumento da constante catalítica 1,4 vezes em relação à luciferase selvagem.

1.12.3. Rendimentos quânticos

O rendimento quântico para a luciferase de *Photinus pyralis*, foi originalmente medido por Seliger e McElroy (1959), obtendo-se o valor de 0,88, o mais alto entre todos os sistemas bioluminescentes. Entretanto, novas medidas feitas mais recentemente, apresentaram um resultado consideravelmente inferior, de 0,41 (ANDO *et al.*, 2008). A comparação do rendimento quântico de diferentes luciferases de besouros, incluindo algumas de origem brasileira, mostrou que a luciferase do elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans* (Pte), apresenta o maior valor de rendimento quântico, 0,61, e a luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixothrix hirtus* (PxRE) o menor valor, de 0,15 (NIWA *et al.*, 2010b). Os resultados também mostram uma tendência geral de menores valores de rendimentos quânticos para luciferases mutantes emissoras de luz vermelha em relação àquelas que emitem luz verde. Além disso, o rendimento quântico preliminar (0,13) da protoluciferase de *Zophobas*, que também emite luz vermelha, foi surpreendentemente próximo ao da luciferase vermelha de *Phrixothrix* (VIVIANI *et al.*, 2013), resultado que corrobora essa tendência.

1.13. As luciferases de *Phrixothrix*

As luciferases das larvas-trenzinho de *Phrixothrix* produzem bioluminescência nas regiões verde e vermelho do espectro, dependendo das lanternas de origem, sendo as únicas luciferases que produzem naturalmente bioluminescência vermelha (VIVIANI *et al.*, 2007). Em 1999, Viviani *et al.* clonaram os cDNAs das luciferases emissoras de luz verde e

vermelha das lanternas laterais de *Phrixothrix vivianii* (PxGR- 546 nm) e cefálicas de *Phrixothrix hirtus* (PxRE- 623 nm), respectivamente.

A comparação das estruturas primárias de ambas luciferases (PxRE e PxGR) mostrou que a identidade entre as luciferases de *Phrixothrix* (71%) é menor do que o esperado para proteínas de diferentes espécies do mesmo gênero, geralmente acima de 80% nas luciferases de elaterídeos e de lampirídeos (DEVINE *et al.*, 1993; SALA-NEWBY, 1996). Foi mostrado posteriormente que estas duas luciferases são parálogas (ARNOLDI *et al.*, 2010). Outras diferenças entre estas luciferases são observadas nas propriedades cinéticas: a luciferase de emissão vermelha de PxRE exibe cinética rápida e afinidade alta pelos substratos, enquanto a luciferase PxGR exibe cinética do tipo lenta e afinidade mais baixa pelos substratos. Os valores de K_M para luciferina e ATP nas luciferases PxRE e PxGR são: ($7 \pm 0,7 \mu\text{M}$; $130 \mu\text{M}$) e ($64 \pm 10 \mu\text{M}$, $330 \mu\text{M}$), respectivamente.

Construção de quimeras. Com intuito de identificar a região de maior influência para a cor da bioluminescência em luciferases de fengodídeos foram construídas quimeras de luciferases a partir de fragmentos de resíduos de aminoácidos das luciferases emissoras de luz verde de PxGR e emissoras de luz vermelha de PxRE (**Fig. 15**) (VIVIANI e OHMIYA, 2000; VIVIANI *et al.*, 2004^b).

Construções contendo resíduos 1-344 da luciferase emissora de luz vermelha com os resíduos 345-545 da luciferase emissora de luz verde resultaram em uma luciferase emissora de luz vermelha (PxREGR: 613 nm), enquanto a construção reversa resultou na emissão verde (PxGRRE: 552 nm), levando a conclusão que a região 1–344 determinaria a cor da bioluminescência nas luciferases de fengodídeos (VIVIANI *et al.*, 2000).

Posteriormente, Viviani *et al.* (2004) produziram novas quimeras. A quimera PxRE220GR (PxRE: resíduos 1-219; PxGR: 220 -545) apresentou espectro de emissão (571 nm) mais próximo ao da luciferase PxGR, sugerindo que a região acima do resíduo 220 de PxGR seria mais importante na determinação do espectro. Dessa forma, agora restava estudar o fragmento 220-344 (que corresponde a maior parte do subdomínio B). Notavelmente, a introdução do segmento entre os resíduos 220-344 da luciferase de PxGR na luciferase PxRE (PxREGRRE) resultou na emissão de luz vermelha-alaranjada (603 nm), indicando que a região 220-344 por si só não determina o espectro de bioluminescência. Além disso, a sequência antes o resíduo 220 da luciferase emissora de verde é incompatível para emissão de luz com a sequência acima resíduo 220 de PxRE. Esses resultados sugeriram que os fragmentos antes e depois do resíduo 220, que correspondem subdomínios distintos, podem se

empacotar de maneira diferente nas luciferases emissoras de verde e vermelho, afetando a conformação do sítio ativo.

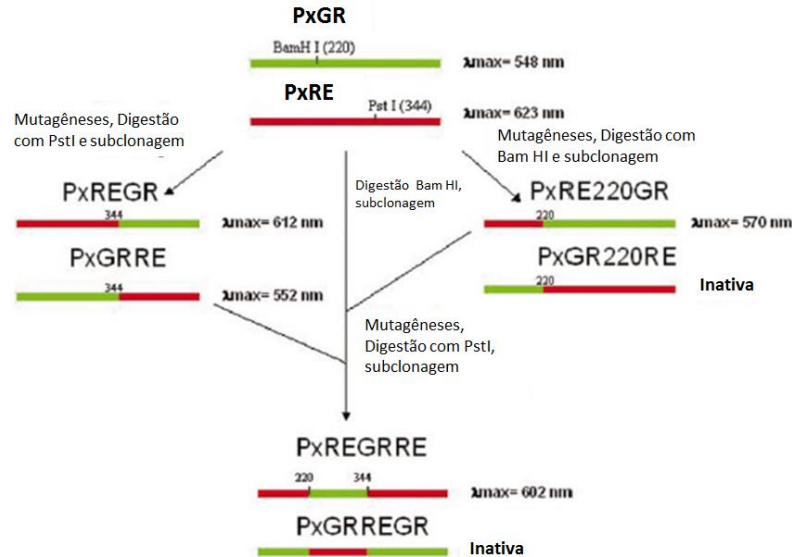


Figura 15: Esquema para a construção de luciferases quiméricas dos fengodídeos *Phrixothrix*. Fonte: Adaptado de VIVIANI *et al.*, 2004.

Mutagênese sítio-dirigida. A comparação entre as luciferases dos fengodídeos *P. hirtus* (P_xRE) e *P. viviani* (P_xGr) em conjunto com outras luciferases de besouros sugeriram potenciais sítios envolvidos com a determinação da cor da bioluminescência: (1) a presença de um resíduo arginina adicional na posição 353 na luciferase emissora de luz vermelha P_xRE; (2) a presença de resíduos únicos em P_xRE, entre eles A314S, I334L e I348L; e (3) uma diminuição no caráter hidrofóbico da luciferase emissora de vermelho (P_xRE) em relação à verde (P_xGR) em torno dos resíduos 350-362, bem como as substituições C311T, I334L, I348L e C344S, que estão localizados no lado benzotiazólico do sítio de ligação à luciferina (VIVIANI *et al.*, 1999^b, 2007). A influência de várias destas substituições foi investigada.

Entretanto, foram poucas as mutações pontuais afetaram os espectros de bioluminescência nestas luciferases, e aquelas que afetaram, em geral, menos dramaticamente que em lampirídeos (VIVIANI *et al.*, 2008).

Na luciferase P_xRE a deleção do resíduo R353 não teve efeito sobre os espectros de bioluminescência, indicando que o R353 adicional não é responsável pela cor da bioluminescência na luciferase P_xRE (VIVIANI *et al.*, 2007) como proposto originalmente (VIVIANI *et al.*, 1998). Curiosamente, a inserção de arginina na posição 353 na luciferase emissora de luz verde do lampirídeo *Lampyrus turkestanicus*, mudou o espectro do verde para

o espectro vermelho, conjuntamente com um aumento da temperatura ótima e da atividade luminescente da enzima (TAFRESHI *et al.*, 2007).

Com base nos estudos de modelagem na luciferase de *P. pyralis* que apontaram o resíduo invariável R218 (R215 em luciferases de *Phrixothrix*) como crítico para a estabilização do fenolato da luciferina (BRANCHINI *et al.*, 1998), foram realizadas mutações nas luciferases de PxGR e PxRE. A substituição R215S na luciferase emissora de verde de PxGR provocou um grande desvio para o vermelho (30 nm) e perda de atividade considerável, enquanto para a luciferase de PxRE a mesma mutação teve pouco efeito no espectro (~ 8 nm), indicando que o resíduo pode ser importante para emissão de luz verde, mas não para a emissão de luz vermelha (VIVIANI *et al.*, 2000).

Estes dados são reforçados pelo efeito de deslocamento hipsocrômico causado pela guanidina (que simularia o grupo guanidina de uma arginina perdida) nos espectros de bioluminescência da luciferase vermelha de PxRE e do mutante R215S de PxGR, sugerindo pela primeira vez a possível ausência de uma arginina importante para emissão de luz verde na luciferase vermelha, e sua presença na luciferase emissora de luz verde (VIVIANI e OHMIYA, 2000; VIVIANI *et al.*, 2006). Especulou-se originalmente que esta arginina poderia ser a própria R215, que é invariável nas luciferases, e que de alguma forma, a cadeia lateral poderia estar desalinhada em relação ao grupo fenolato da oxiluciferina na luciferase emissora de luz vermelha de PxRE. Além disto, a mesma mutação R215S na luciferase do elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans* (Pte) não teve efeito no espectro, mostrando que R215 não é essencial para a emissão de luz verde em todas as luciferases de besouros, como se imaginava inicialmente.

Outra mutação que teve um deslocamento de 28 nm para o vermelho na luciferase PXGR foi T226N (VIVIANI *et al.*, 2001). Notavelmente, a mutação dupla de R215 e T226 em PxGR resultou em um desvio para o vermelho (595 nm), cuja magnitude foi menor que o valor esperado para um efeito aditivo. Os resultados sugeriram a existência de uma possível interação entre estes resíduos (VIVIANI *et al.*, 2001, 2007).

Apenas três as mutações tiveram efeitos marcantes na luciferase emissora de luz vermelha de PxRE: (I) mutação T226N que resultou em um deslocamento de 10 nm para o azul no espectro, (VIVIANI *et al.*, 2001), (II) a mutação (C311T) que foi capaz de causar um deslocamento hipsocrômico de cerca de 17 nm (VIVIANI *et al.*, 2013^a) e , (III) a mutação L334R que resultou em um deslocamento hipsocrômico de 11 nm (VIVIANI *et al.*, 2016).

Estudos de modelagem molecular com luciferases de representantes das três famílias (*Phrixothrix*, *Pyrearinus termitilluminans* e *Macrolampis*) mostraram que a ligação peptídica

do resíduo variável representado por C311, T311 e S314, respectivamente, também está localizado próximo ao fenolato de luciferina e poderia ser um candidato importante na determinação da cor da bioluminescência. A mutação (C311T) na luciferase emissora de luz vermelha de PxRE acarretou no maior deslocamento espectral já obtido até então.

A mutação L334R na luciferase vermelha de PxRE, correspondente ao resíduo conservado R337 que faz a interação com E311 no sensor de pH de luciferases de vagalumes e luciferases verde-amarelas, acarretou um deslocamento para o azul, mostrando a importância da presença de arginina nesta posição. Além disso, notavelmente, o mutante L334R de PxRE não apresentou deslocamento hipsocrômico no espectro de bioluminescência na presença de sulfato de guanidina, como ocorre com a luciferase selvagem e seus mutantes (VIVIANI e OHMIYA, 2000) corroborando que a posição 334 deva corresponder, conforme sugerido, à arginina perdida no sítio-ativo da luciferase vermelha.

1.13.1. Estrutura 3D da luciferase de *P.hirtus*. Recentemente, a primeira estrutura tridimensional cristalográfica da luciferase de *Phrixothrix hirtus* (PxRE) também foi resolvida, revelando que esta enzima, é a única diferentemente de todas as outras estudadas até então, que possui uma estrutura quaternária octamérica (**Fig. 16 a-d**) (CARRASCO *et al.*, 2018). Além disso, os autores mostraram que a conformação da luciferase de PxRE tem a maior abertura entre os domínios N- terminal N e C-terminais entre as luciferases com estruturas cristalinas conhecidas. (PxRE- com um ângulo de $\sim 125^\circ$ entre os eixos que cruzam a massa central de cada domínio, *Amydetes*- com um ângulo de $\sim 35^\circ$) (**Fig. 16 e, f**). Os resultados mostraram também que o espectro de emissão desta luciferase não é afetado pelas mutações da interface que resultam na fragmentação do octâmero de PxRE em dímeros e monômeros, portanto, concluíram que a emissão de PxRE não é resultado de sua estrutura quaternária. Os autores sugeriram que a emissão de luz vermelha é intrínseca a dobra estrutural do monômero PxRE e origina-se do empacotamento específico e do microambiente de seu sítio ativo, corroborando os resultados já publicados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (VIVIANI *et al.*, 2007, 2016). Nesse mesmo trabalho, também resolveram a estrutura da luciferase de *Amydetes vivianii*, também clonada por nosso grupo de pesquisa.

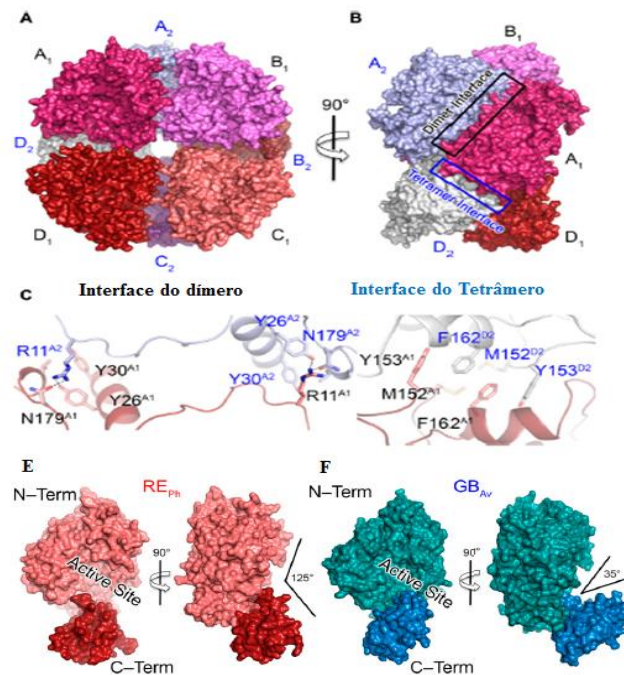


Figura 16. Estrutura cristalográfica da luciferase emissora de luz vermelha de *P.hirtus*. (A) Vista frontal da conformação octamérica, (B) Vista lateral do octâmero, (C) Zoom dos resíduos presentes nas interações da interface de dímero entre os monômeros (Y26, Y30 e N179 de um dos monômeros e R11 do outro monômero), (D) Zoom dos resíduos presentes nas interações da interface do tetrâmero através dos dímeros (interações predominantemente hidrofóbicas entre Y153, M152 e F162), (E), (F) Estrutura completa de um único monômero mostrando a maior abertura entre os domínios da luciferase de *P.hirtus* em relação à luciferase de *Amydetes vivianii*, respectivamente. Fonte: (CARRASCO *et al.*, 2018).

1.14. Aplicações bioanalíticas das luciferases de besouros

Desde a purificação do primeiro sistema bioluminescente de vagalumes (GREEN e McELROY, 1956; BITLER e McELROY, 1957), sua luciferase e luciferina têm sido empregadas em uma ampla variedade de aplicações. Como reagentes analíticos e clínicos, as luciferases têm sido utilizadas para: análise de contaminação microbiológica de alimentos e fluidos biológicos, medidas de ATP para monitoramento da biomassa, avaliação da viabilidade celular, ensaios enzimáticos que envolvam formação ou consumo de ATP, etc (STANLEY, 1989; LUNDIN *et al.*, 1989; CAMPBELL, 1988; COMHAIRE *et al.*, 1989).

A clonagem do cDNA de luciferases de vagalumes possibilitou o surgimento de uma nova gama de aplicações. O gene da luciferase tem sido utilizado como um dos mais sensíveis repórteres para expressão gênica em células vivas e tecidos, bem como para o desenvolvimento de biosensores de poluentes, metais pesados e pH-intracelular (GOULD e SUBRAMANI, 1988; NAYLOR, 1999; VIVIANI e OHMIYA, 2006; MICHELINI *et al.*, 2007; RODA *et al.*, 2009; GABRIEL *et al.*, 2014; BRANCHINI *et al.*, 2018).

Na área das ciências biomédicas e indústria farmacêutica, os genes das luciferases têm sido muito utilizados para estudos de bioimagem de progressão e regressão viral e bacteriana (KOVACS, 1991; VIVIANI e OHMIYA 2006; ANDREU *et al.*, 2010) e na regressão tumoral em modelos animais (HORST *et al.*, 2011).

A diversidade de aplicações foi expandida com o uso das luciferases em sistemas repórter múltiplos que utilizam concomitantemente genes codificantes de várias luciferases emissoras de diferentes cores de luz para análise simultânea de múltiplos eventos celulares (NAKAJIMA *et al.*, 2005; VIVIANI e OHMIYA, 2006).

A maioria das luciferases de coleópteros empregadas no campo da biotecnologia são de um conjunto limitado de luciferases de vagalumes norte-americanos (*Photinus pyralis*), japoneses (*Luciola cruciata*) e europeus (*Luciola mingrelica*) que passaram por processos de otimização por engenharia de proteínas, como mutagênese sítio-dirigida, mutagênese randômica e quimerização. Essas luciferases emitem luz na região verde-amarelada do espectro, que é parcialmente absorvida pela hemoglobina, por tecidos ósseos e pela melanina, não sendo dessa forma, tão eficientes para finalidades de ensaio e bioimagem em amostras pigmentadas, incluindo tecidos biológicos (VIVIANI e OHMIYA, 2006; LI *et al.*, 2009).

A luciferase de *Phrixotrix hirtus* (PxRE), possui a vantagem de ser a única clonada que naturalmente emite luz vermelha e, conseqüentemente sua luz ser absorvida em menor proporção em amostras pigmentadas (VIVIANI *et al.*, 1999). As luciferases de PxRE juntamente com a de *P. termitilluminsans* (ambas de besouros bioluminescentes clonados em nosso laboratório) já vêm sendo empregadas para imagem células de mamíferos e já apresentam aplicação efetiva na forma de *kits* de genes repórter tricolor (NAKAJIMA *et al.*, 2004, 2005, 2010).

Entretanto, apesar de sua potencial aplicabilidade, a luciferase emissora de luz vermelha de PxRE ainda apresenta algumas limitações impostas pela sua baixa termoestabilidade, menor eficiência catalítica e baixo rendimento quântico (LI *et al.*, 2010; VIVIANI *et al.*, 2006; NIWA *et al.*, 2010^b). Portanto, processos de otimização são necessários para melhorar sua atividade bioluminescente e para deslocar o espectro em direção ao vermelho distante.

1.15. Aplicações em Bioimagem

Segundo o Centro de bioimagem avançada da Dinamarca (CAB) da Universidade de Copenhague, a bioimagem refere-se a métodos que visualizam de forma não-invasiva os

processos biológicos em tempo real, interferindo o mínimo possível nos processos vitais. A bioimagem abrange desde a observação de estruturas subcelulares e células inteiras até organismos multicelulares inteiros. Como fontes para a geração de imagem, as técnicas de bioimageamento incluem abordagens magnéticas, baseadas em radiação e ópticas (HEMMER *et al.*, 2013).

Entre as técnicas de imagem óptica conhecidas, o uso de genes repórteres fluorescentes ou bioluminescentes são os métodos mais sensíveis e usam o procedimento mais simples e econômico. Todavia, a necessidade de irradiação de luz externa traz inconvenientes como fototoxicidade, autoabsorção e autofluorescência, que colocam os métodos fluorescentes em desvantagem em relação aos métodos bioluminescentes. Por outro lado, as técnicas bioluminescentes têm a vantagem de produzir a luz própria muito especificamente sem necessidade de irradiação e problemas associados às técnicas de fluorescência. Além disso, contrastando com a GFP que é uma proteína estável e que acumula ao longo do tempo, a instabilidade da maioria das luciferases, faz com que estas não se acumulem nas células, emitindo um sinal bioluminescente que reflete a concentração de luciferase expressa em tempo real (BAUER *et al.*, 2013). Às técnicas que envolvem bioluminescência para visualização e registros de processos biológicos, dá-se o nome de Imagem por Bioluminescência (*Bioluminescence Imaging* ou BLI). Devidos aos motivos expostos acima, elas são mais apropriadas para obtenção de imagens quantitativas em tempo real, podem ser realizados *in vivo* e *in vitro* quando o substrato é administrado nas células (GROSS e PIWNICA-WORMS, 2005; WELSH e KAY, 2005; LUKER e LUKER, 2008).

A bioluminescência do sistema luciferina-luciferase de vagalumes tem sido utilizada para monitorar processos biológicos a nível molecular e celular. Na pesquisa pré-clínica do câncer, bioimagens são obtidas por meio dessa técnica e tornou-se um padrão para monitorar o crescimento do tumor, interações proteína-proteína e atividade molecular específica em linhagens celulares e organismos modelos (REHEMTULLA *et al.*, 2000; LUKER *et al.*, 2004; OZAKI *et al.*, 2012).

Como exemplo cita-se Rehemtulla *et al.* (2000) que utilizou o método de rastreamento celular para obtenção de bioimagens *in vivo* (**Fig.17**). Nesse caso, o vetor plasmídeo repórter consistindo de 3 sequências (promotor constitutivo, do gene da luciferase e gene de resistência a antibióticos) foi transfectado em células cancerígenas alvo, fazendo com que ocorresse a expressão do gene da luciferase nas células vivas. Após estabelecimento da linhagem celular estável expressando a luciferase, foi realizado o transplante para o rato, e as

células transfectadas foram rastreadas por bioluminescência usando câmara de fotodeteção CCD, após injeção de luciferina na corrente sanguínea do rato.

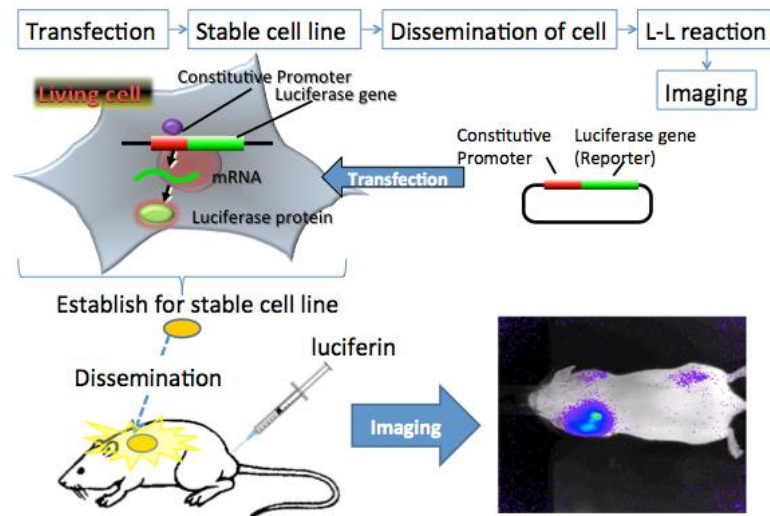


Figura 17: Imagem de bioluminescência *in vivo* utilizando o método de rastreamento celular.

Entretanto, em bioimagem de tecidos de mamíferos que são ricos em hemoglobina e mioglobina, o uso de luciferases que emitem na região do azul ao verde tem inconvenientes. A hemoglobina, mioglobina ($\lambda=415-577$ nm) e melanina ($\lambda < 600$ nm) dominam absorção em tecidos de mamíferos, dificultando a detecção de sinais que emanam dos tecidos profundos (IWANO *et al.*, 2013). Dessa forma, somente luciferases com bioluminescência com emissão de luz mais avermelhadas podem vir a contornar esse obstáculo para fins de bioimagem. Esforços têm sido feitos para modificar o espectro de emissão de bioluminescência de sistemas luciferina-luciferase para o vermelho e aumentar a eficiência de penetração da luz em tecidos biológicos. Para isto tem se empregado técnicas de modificação das luciferases por engenharia genética ou a modificação química dos substratos, (**conforme mencionado no capítulo 1.10. Análogos de Luciferina**) ou ambos concomitantemente.

Recentemente, vários análogos da luciferina de besouros que produzem bioluminescência vermelha distante e quase infravermelha (NIR) foram sintetizados (JATHOUL *et al.*, 2014; KOJIMA *et al.*, 2013). Neste contexto, destaca-se akalumine (IWANO *et al.*, 2013), um análogo de luciferina que tem uma conjugação estendida entre os anéis benzotiazólico e tiazólico, que apesar de emitir em 675 nm, possuía alta hidrofobicidade. Dessa forma, foi modificado para cloridrato de akalumine (KUCHIMARU *et al.*, 2016) com intuito de obter maior solubilidade em água e conseqüentemente aplicabilidade em bioimagens *in vivo*. Sua combinação com uma luciferase modificada melhorou a

sensibilidade de detecção de alvos de metástase no pulmão, todavia, sua baixa eficiência emissiva ainda requer otimização química.

Hall *et al.* (2018) desenvolveram um mutante da luciferase de elaterídeo que utiliza dois novos substratos naftil-luciferina (730 nm e 743 nm) para produzir emissão próximo ao infravermelho. Essa combinação culminou em um sinal de luminescência estável e a emissão deslocada para o vermelho distante (758 nm) que permite a precisão necessária para a realização de tomografia multiespectral de tecidos profundos. Apesar disto, este sistema tem atividade bioluminescente, entre 5000 a 10.000 vezes inferior à obtida com luciferina, o substrato selvagem.

Neste contexto, a luciferase de PxRE, por ser a única que produz naturalmente bioluminescência vermelha (626 nm) entre luciferases de besouros, destaca-se como um ponto de partida interessante para o desenvolvimento de novas luciferases com espectros deslocadas no vermelho distante para fins de bioimagem.

2. JUSTIFICATIVA

A luciferase de *Phrixotrix hirtus* (PxRE) é a única luciferase naturalmente emissora de luz vermelha, apresentando alto potencial de aplicação como reagente bioanalítico em ensaios para detecção de ATP em amostras pigmentadas, e como gene repórter para marcação de células e tecidos de mamíferos em bioimagem de processos biológicos e patológicos. Entretanto, sua aplicabilidade ainda é limitada pela sua menor eficiência catalítica, termoestabilidade e rendimento quântico. Além disto, existe a demanda por luciferases emissoras de luz vermelha distante (FR) ou próximo do infra-vermelho (NIR) para finalidades de bioimagem em mamíferos. Porém ainda não está claro como esta enzima pode catalisar a produção de luz vermelha com relativa eficiência, ao invés da mais trivial luz verde-amarela de outros besouros. Apesar dos vários estudos realizados principalmente por nosso grupo, esta luciferase ainda carece de mais estudos, diferentemente da luciferase do vagalume *P. pyralis*. Existe necessidade de investigar e melhorar as propriedades cinéticas e espectrais desta luciferase, através de técnicas de engenharia genética. Sendo assim, neste trabalho utilizamos a mutagênese sítio-dirigida de resíduos dos sítios de ligação de ATP e luciferina para melhor compreender como estes resíduos afetam a eficiência catalítica desta enzima, e então compreender como a estrutura do sítio-ativo desta luciferase está adaptada à emissão de luz

vermelha. Finalmente, para entender a influência específica do sítio de ligação do grupo fenolato da oxiluciferina e suas interações na emissão de luz vermelha, investigamos as propriedades de bioluminescência de amino-análogos de luciferina modificados na posição 6' com esta luciferase, seus mutantes e outras luciferases que emitem luz verde-amarelada. Neste processo selecionamos combinações desta luciferase com 6' amino-análogos que emitem luz vermelha distante, com potencial uso em bioimagem.

3.OBJETIVOS

Os objetivos originais desse projeto eram investigar os efeitos de mutações do sítio de ligação da luciferina e ATP na eficiência catalítica e nos espectros de bioluminescência da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix hirtus* (PxRE), com o intuito de entender a relação entre estrutura, atividade e espectros de bioluminescência, para posteriormente modificar e melhorar sua eficiência desta enzima e eventualmente e produzir variantes com espectros mais deslocados para o vermelho distante. Assim os objetivos específicos foram:

- Investigar o efeito de mutações nos sítios de ligação da luciferina e ATP nos K_M s para estes substratos, k_{cat} e eficiências catalíticas,
- Investigar o efeito das mesmas mutações nos espectros de bioluminescência para melhor entender como a estrutura desta enzima está adaptada à emissão de luz vermelha,
- Investigar o efeito de 6' amino-análogos de luciferina com substituintes apresentando diferentes volumes e propriedades de doação de elétrons, nos espectros de bioluminescência e propriedades catalíticas desta luciferase, seus mutantes e outras luciferases emissoras de luz verde-amarela, com o intuito de compreender as interações desta parte do sítio-ativo com o grupo 6' da oxiluciferina,
- Investigar combinações da luciferase emissora de luz vermelha e seus mutantes, com amino-análogos, que produzam luz mais deslocada para o vermelho distante.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho, investigamos o efeito da mutação dos resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da luciferina (SLL) na ligação deste substrato, nas constantes e eficiências catalíticas, e nos espectros de bioluminescência da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixothrix hirtus* (PxRE), com o objetivo de aprofundar o conhecimento sobre a relação entre estrutura e função desta luciferase única, e então melhorar sua eficiência catalítica e produzir luciferases emissoras de luz vermelha mais eficientes.

Para tanto, realizamos as seguintes etapas: (1) primeiramente inserimos mutações pontuais no SLL na luciferase de PxRE e investigamos o efeito delas nas propriedades cinéticas (K_{MS} para luciferina, ATP e adenilato de luciferina, atividades específicas, constantes e eficiências catalíticas) e nos espectros de bioluminescência; (2) também expressamos e purificamos e caracterizamos cineticamente a luciferase de *Amydetes vivianii* (Amy), que emite no extremo azul nas luciferases de besouros, como mais um modelo para entender como o sítio ativo se distingue entre as luciferases emissoras de diferentes cores de luz; (3) em seguida, comparamos as propriedades de bioluminescência da luciferase de PxRE e outras luciferases emissoras de luz verde-amarela usando novos 6'-amino-análogos de luciferina, para entendermos melhor a influência específica do sub-sítio de ligação do grupo 6'-fenol da luciferina, e suas interações, nas propriedades de bioluminescência. Esses diferentes amino-análogos, diferenciam-se pelos substituintes na posição 6' (-OH presente na porção benzotiazólica da luciferina original), os quais possuem diferentes volumes e capacidades de doar de elétrons para o anel benzotiazólico da oxiluciferina; (4) esta última abordagem também teve como objetivo secundário selecionar possíveis combinações de análogos de luciferina e luciferases mutantes de *Phrixotrix* com emissões mais deslocadas para o vermelho, do que o sistema luciferina-luciferase selvagem de PxRE; (5) finalmente, comparamos a estrutura do SLL destas luciferases de besouros que emitem diferentes cores de bioluminescência por modelagem para identificarmos resíduos de aminoácidos que afetam o tamanho da cavidade de ligação do grupo fenolato e os espectros de bioluminescência nesta luciferase vermelha.

A figura 18 sumariza as estratégias empregadas neste estudo e a figura 19 sumariza sua metodologia:

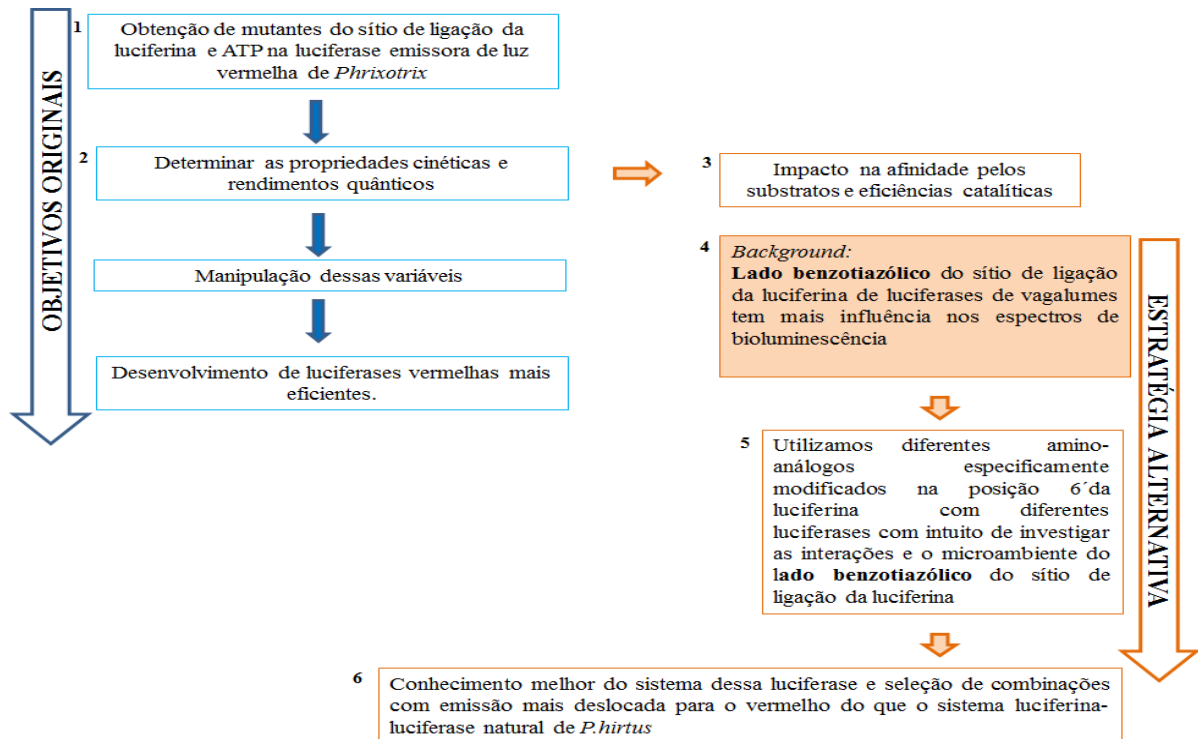


Figura 18. Fluxograma da estratégia experimental desse projeto. Fonte: autor, 2019.

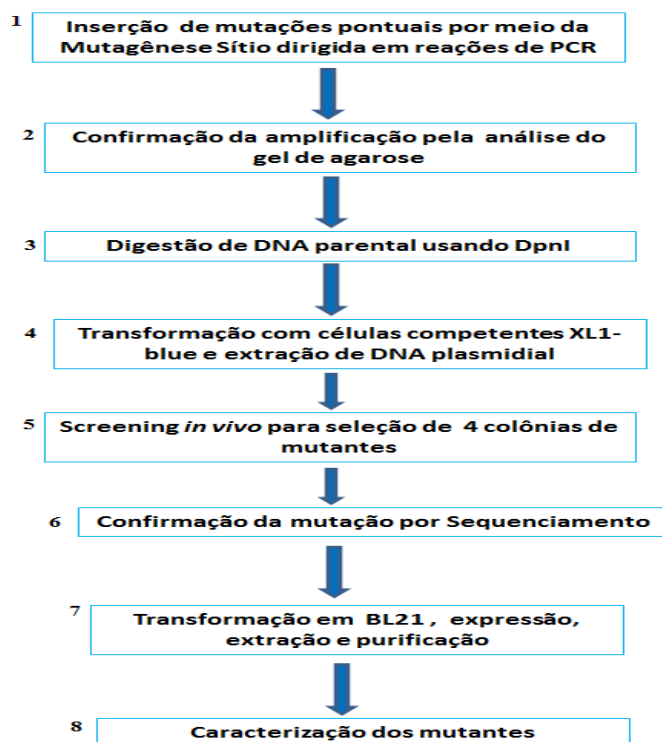


Figura 19. Fluxograma de metodologia empregada nesse estudo. Fonte: autor, 2019.

4.1. cDNA Luciferases recombinantes. O cDNA para as luciferases de PxRE, *Pyrearinus termitilluminans* (Pte), *Macrolampis sp2* foram previamente subclonados no plasmídeo pCold™II (Takara, Japão) (VIVIANI *et al.*, 1999^a; 1999^b, 2005). A luciferase de *Phrixothrix vivianii* (PxGR) foi subclonada no vetor pCAN (pCANGR; VIVIANI *et al.*, 2006), enquanto as luciferases de *Amydetes vivianii* e *Phyrophorus angustus* no vetor pSport (Invitrogen) (VIVIANI *et al.*, 2011; AMARAL *et al.*, 2016). O cDNA da luciferase de *Cratomorphus distinctus* está no vetor pBluescript vector (Agilent) (VIVIANI *et al.*, 2004). A luciferase quimérica RE220GR encontra-se em vetor pTHis (VIVIANI *et al.*, 2004).

4.2. Subclonagem do cDNA da luciferase de *Amydetes vivianii*. Para subclonar o cDNA da luciferase *Amydetes viviani* (Amy) do vetor pSport para o vetor pCold™ II (Takara, Japão), o cDNA da luciferase foi amplificado por PCR com *primers* que conferem os sítios de restrição NdeI e HindIII, e subclonado nos respectivos sítios de restrição do vetor pCold™ II (Takara, Japão). Os *primers* foram construídos segundo especificações abaixo:

Tabela 1. *Primers* de subclonagem

<i>Primers</i>	Sequência
Foward:	TTGCGACCACATATGGCATCAGAAGACAAAAT
Reverse:	GAGGACGTGAAGCTTTTATAACTTGGATTTTT
Em negrito- Sítios de restrição Nde foward e Hind III reverse, respectivamente	

4.3. Transformação de bactérias. Amostras de 50 µL de células competentes *E. coli* (XL-Blue ou BL21/DE3) e 5 µL do DNA plasmidial da luciferase recombinante (~10-50 ng) foram misturadas em tubo de microcentrífuga gelado incubados por 30 minutos no gelo e submetidas a um choque térmico de 45 segundos a 42° C. Novamente, a solução foi incubada no gelo por mais 2 minutos e 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.

4.4. Seleção de resíduos-alvo para mutagênese sítio-dirigida e desenho dos *primers*. Tendo como referência a luciferase de *Photinus pyralis* e embasados em multialinhamentos das regiões do sítio de ligação da luciferina (SLL) na estrutura primária das luciferases,

realizamos a seleção de resíduos-alvo para mutagênese sítio-dirigida na luciferase de PxRE (BRANCHINI *et al.*, 1998, 1999, 2003, 2005; VIVIANI *et al.*, 2013): RE-H241F, H242K, S314T, RE-L348H, RE-K441A. Além disso, investigamos também outros mutantes já obtidos pelo grupo de pesquisa: RE-N351C, RE-N351E, RE-R353E (OLIVEIRA, 2019), RE-L344R (VIVIANI *et al.*, 2016). Os *primers* da Tab. 2 foram desenhados baseados na sequência da luciferase de *P.hirtus* e então confeccionados pela empresa Thermofisher.

Tabela 2. *Primers* usados para mutagênese-sítio-dirigida preparados para esse projeto

<i>Primers</i>	Sequência
RE-H241F	Foward: GCC CCT TTC TTC CAC GCC TTC Reverse: GAA GGC GTG GAA GAA AGG GGC
RE-H242K	Foward: GCC CCT TTC CAC AAA GCC TTC Reverse: GAA GGC TTT GTG GAA AGG GGC
RE-S314T	Foward: C TGT GGC GGC ACC CCT CTG GG Reverse: CC CAG AGG GGT GCC GCC ACA G
RE-L348H	Foward:GCC CTG ATC CAC AGC CCC AAC G Reverse: CGT TGG GGC TGT GGA TCA GGG C
RE-K441A	Foward: GAG CTC ATC GCG TAC AAG GGC Reverse: GCC CTT GTA CGC GAT GAG CTC

*Os códons de modificação encontram-se em negrito.

4.5. Mutagênese sítio-dirigida. Para a técnica de mutagênese sítio-dirigida foi utilizado o Kit “Phusion High Fidelity DNA Polymerase” (Thermo Scientific) segundo o protocolo do fornecedor. A técnica baseia-se em obter mutações pontuais no DNA. Para o procedimento foram utilizados dois oligonucleotídeos complementares contendo a mutação desejada, conforme as Tabelas 1 e 2. Durante o PCR com a Phusion polimerase ocorreu a incorporação da mutação. Para a técnica foram utilizados 1 µL do plasmídeo (50 ng), 1 µL de cada primer (125 ng), 12,5 µL de Phusion polimerase, 9,5 µL de água ultrapura estéril e submetidas à técnica de PCR. A reação em cadeia de polimerase (PCR) seguiu às seguintes etapas: (1) desnaturação a 95°C por 2 minutos; (2) 20 ciclos a 95°C; (3) síntese de DNA com 20 ciclos de 10 segundos a 55°C; (3) estágio de extensão com 20 ciclos de 3 minutos a 70°C e, por fim, 1 ciclo por 7 minutos a 70°C. Posteriormente, o DNA parental que não foi mutado, foi digerido com a enzima de restrição *Dpn I*.

4.6. Eletroforese em gel de agarose. A análise de DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% (peso/ volume), em tampão TAE 1x (Tris-acetato 20 mM e EDTA 0,5 mM pH 8,0), corrida em 100 volts por 40 minutos e revelado em transluminador UV (ATTO, Tóquio, Japão) pela fluorescência do corante de DNA Nancy- 520 (Sigma). Foram aplicados no gel

alíquotas de 1,0 µl de padrões de peso molecular DNA de 1 Kb (Ludwig Biotecnologia, Alvorada, Brasil) e 0,5 do tampão da amostra (constituído de glicerina, azul de bromofenol e xileno cianol) para marcação da corrida. Nos demais poços foram aplicadas alíquotas de 5 µl de DNA plasmidial e 0,5 µl do tampão de monitoramento da corrida.

4.7. Screening de mutantes *in vivo*. Após a mutagênese sítio-dirigida e posterior digestão com *DpnI*, células de *E. coli* X11-Blue foram transformadas com o cDNA obtido a partir das reações. As colônias obtidas com a transformação foram, então, por meio de membranas de nitrocelulose, transferidas para placas contendo IPTG 1 mM e induzidas à temperatura de 18°C por 12 horas. Em seguida, as placas foram borrifadas com solução de D-luciferina 1 mM (diluída em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0) e submetidas à fotodeteção em uma câmera CCD. As colônias de mutantes que apresentaram luminescência foram comparadas àquelas controle da luciferase selvagem, sendo 4 delas selecionadas e isoladas para a extração do DNA plasmidial e posterior sequenciamento.

4.8. Preparação de DNA Plasmidial (Minipreps). A mini-preparação de DNA plasmidial foi realizada usando o “Kit Miniprep” (GE *Healthcare*), segundo o protocolo do fabricante. As colônias contendo a luciferase mutante foram selecionadas e cultivadas *overnight* em 5 mL de meio de cultura LB/ampicilina (100 µg/mL). A cultura foi centrifugada a 12000g por 15 minutos para a remoção do meio de cultura. O *pellet* foi ressuspensão em condições alcalinas extremas por 5 minutos para obtenção das células lisadas (soluções de ressuspensão e de lise, respectivamente). Novamente, a solução foi centrifugada a 12000g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado cuidadosamente e transferido para uma mini-coluna dentro de um tubo coletor. A solução foi neutralizada e ajustada para condições ótimas de adsorção do DNA a membrana de purificação. A mini-coluna foi então lavada com tampão de lavagem para a remoção de impurezas e posteriormente o DNA plasmidial foi eluído, com tampão de eluição. O DNA plasmidial, agora puro e livre de nucleases, foi eluído com tampão de eluição, foi armazenado a -20 °C para posterior sequenciamento.

4.9. Sequenciamento de DNA. O cDNA foi sequenciado utilizando o Kit “ BigDye Terminator V3.1” (Applied Biosystems, USA), pelo método de Sanger. O local de sequenciamento foi a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus Jaboticabal (FCAV)- Departamento de Tecnologia (UNESP- Jaboticabal). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram sintetizados pela empresa Life Technologies e constam na tabela adiante.

Tabela 3. Sequência nucleotídica dos *primers* usados no sequenciamento das dos mutantes da luciferase de *P.hirtus*.

<i>Primers</i>	Sequência
pCold	Foward: CGC CAT ATC GCC GAA AGG CAC Reverse: GGC AGG GAT CTT AGA TTC TG
Seq100	Foward: GGG GAT TCC AAT GGC CAC AT
Seq200	Foward: CG GCC TGC CTA AGG GCG TGG
Seq260	Foward: GCC TGA AGA TCG TGA TGG TG

4.10. Expressão heteróloga, extração e purificação de luciferases

Expressão. 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 (OD₆₀₀), e então induzidas com IPTG (Isopropiltiogalactosídeo) 0,4 mM a 18° C sob agitação de 225 rpm, por uma noite.

Extração. Volumes de 100 mL de culturas induzidas foram transferidos para tubos tipo Falcon e centrifugados a 2.500 g por 15 minutos a 4 °C para coleta do *pellet*. As células coletadas foram ressuspensas em 5 mL de tampão de extração gelado (Fosfato 50 mM pH 7,0; 300 mM NaCl, 10mM Imidazol), mais 150 µL de coquetel antiprotease. A lise celular foi realizada por ultrassonicação (Misonix, Nova York, USA) com 5 repetições e a amostra lisada foi centrifugada a 15.000 g a 4° C por 15 minutos. O sobrenadante, denominado de extrato bruto, 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 com o 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 7,0; 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 em ensaio padrão da enzima e 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%).

4.11. Quantificação de proteínas totais. Para medir a concentração de proteínas totais foi utilizado o método de Bradford (1976). A técnica se baseia na ligação da proteína com o corante Comassie Blue que tem uma absorbância máxima em 590 nm. 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).

4.12. 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, pH8,8, 0,1% SDS, 0,05 % de persulfato de amônio e 0,05 % TEMED.

Gel de empilhamento. 4% Acrilamida-bisacrilamida, 0,125M TRIS-HCl pH6,8, 0,1% SDS, 0,05 % de persulfato de amônio e 0,1% TEMED.**Preparo das amostras.** 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, 20% de glicerol, 40% SDS 10%, 10% 2-mercapetanol e 2% de bromofenol-blue) e aquecidas a 95°C por 5 minutos em bloco termostático para que desnaturassem.

Eletroforese das amostras. Os géis previamente preparados foram colocados em uma cuba de eletroforese e imersos em tampão de corrida (16,3% de TRIS, 78% de glicina e 5,4% de SDS pH 8,3). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese por um período de 60 minutos, sob a tensão de 120 V. Decorrido o tempo, 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, sendo trocado 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.

4.13. Medidas de atividade da luciferase *in vitro*. Após a expressão e extração e purificação, a atividade luminescente foi medida na presença de ATP e luciferina. No ensaio típico, foram usados 85 μL de Tris-HCl 0,10 M pH 8,0; 5 μL do extrato contendo a luciferase ou luciferase purificada, 5 μL de luciferina 10 mM diluída em água Mili-Q e 5 μL de 40 mM ATP e 80 mM MgSO_4 . A atividade luminescente foi obtida através de medidas de intensidade de luminescência em luminômetro AB2200 (ATTO, Tokyo, Japão) em *counts* por segundo (*cps*). As atividades específicas foram calculadas a partir da atividade em *cps*, sobre a concentração de proteína total. Também medimos a atividade luminescente com amino análogos de luciferina e com adenilato de luciferina.

4.14. Preparação de adenilato de luciferina. Conforme Viviani *et al.* (2006), 5 mg de luciferina ácida e 15 mg de AMP (adenosina monofosfato) foram misturados em 1 mL de DMSO anidro e, posteriormente, 100 mg de dicitlohexilcarboidimida dissolvida em 800 μL de DMSO foram misturados em tubo em condições anaeróbicas por 15 minutos. A suspensão foi precipitada com 5 mL de acetona gelada e, subsequentemente, centrifugando-a a 3000 giros por 10 minutos, e lavada 2 vezes com acetona gelada. O precipitado branco foi secado com fluxo de gás Argônio e ressuspenso em 1,5 mL de tampão Citrato de Sódio 10 mM, pH 4,5 e 40 mM de NaCl. Finalmente, as alíquotas de 300 μL foram distribuídas em 5 microtubos, tomando o cuidado para não retirar o precipitado, e estas estocadas a -80°C . A concentração final do adenilato de luciferina (**Fig. 20**) não pode ser quantificada por ter espectro de absorção e fluorescência que se sobrepõe com luciferina, entretanto, a concentração baseada na estequiometria utilizada foi estimada ser menor ou igual a 1 mM. Como medida utilizou-se a atividade quimioluminescente espontânea do adenilato de luciferina em solução Tris-HCl 0,10 M pH, 8,0, cuja atividade se manteve relativamente constante (500 a 800 *cps*) em diferentes preparações.

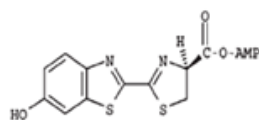


Figura 20. Adenilato de luciferina

4.15. Amino-análogos de luciferina. Os 6'-amino-análogos de luciferina (6'-Amino-luciferina, 6'-Amino-5-dimetil-luciferina, 6'-Dimetil-amino-luciferina, 6'-Dimetil-amino-5-Dimetil-luciferina, 6' Morpholino-luciferina e 6'-Pirrolidinil-luciferina) (**Fig. 21**) foram sintetizados e fornecidos pelo grupo do Prof. T. Hirano (Tokyo Electr. Comm. University,

Tóquio, Japão). Sendo que os dois primeiros 6'-amino-análogos já haviam sido investigados anteriormente (VIVIANI *et al.*, 2014).

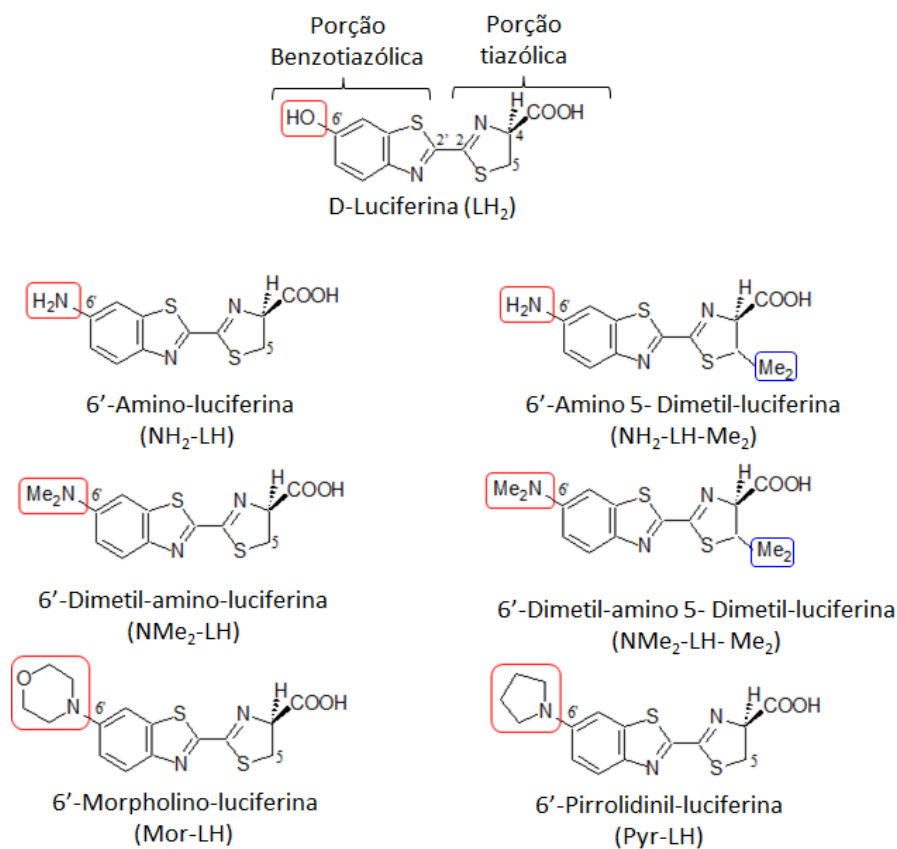


Figura 21. Estruturas da D- luciferina e 6' amino-análogos. Esses diferentes amino-análogos diferenciam-se pelos grupos assinalados em vermelho localizados na posição 6' (-OH presente na porção benzotiazólica da luciferina original), os quais possuem diferentes volumes e capacidades de doar de elétrons, além de metilações (assinaladas em azul) na posição do C5 da porção tiazólica. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA *et al.*, 2019.

4.16. Atividade da luciferase com amino-análogos. Para os amino-análogos a atividade foi medida misturando-se 85 µL de Tris-HCl 0,10 M pH 8,0; 5 µL da luciferase purificada, 5 µL do amino- análogo 10 mM diluído em DMSO (6'-Amino-luciferina, 6'-Amino-5-dimetil-luciferina, 6'-Dimetil-amino-luciferina, 6'Dimetilamino-5-Dimetil-luciferina, 6' Morfolino-luciferina e 6'-Pirrolidinil-luciferina), e 5 µL de ATP 40 mM e MgSO₄ 80 mM.

4.17. Atividade luminescente com adenilato de luciferina. Para o caso de medidas de atividade luminescente com adenilato de luciferina (LH₂AMP), foram utilizados 90 µL de Tris-HCl 0,10 M pH 8,0; 5 µL da luciferase purificada e 5 µL de adenilato de luciferina. Para verificar a atividade quimioluminescente espontânea basal de adenilato de luciferina misturou-se 95 µL de Tris-HCl 0,10 M pH 8,0 e 5 µL de (LH₂AMP).

4.18. Determinação do K_M para a D-luciferina e ATP. Para obtenção dos valores dos K_M dos mutantes da luciferase para a D-luciferina e ATP foram realizadas medições das atividades luminescentes das enzimas como medidas de velocidade inicial em diferentes concentrações do substrato em questão, em concentração saturante do outro substrato. Para a determinação dos K_M s para luciferina foram misturados, em um tubo de luminômetro, 85 μL de tampão TRIS-HCl 0,10 M pH 8,0, 5 μL de amostra contendo luciferase, 5 μL de D-luciferina nas diferentes concentrações (concentrações finais de luciferina: 0,001; 0,003; 0,015; 0,025; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 e 1 mM), e 5 μL de ATP 40 mM/MgSO₄ 80 mM. Para o ensaio do K_M dos mutantes para o ATP foi utilizado o mesmo ensaio, utilizando-se diferentes concentrações de ATP (concentração final de ATP: 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1; 2; 3 e 4 mM), diluídas em solução de MgSO₄ 80 mM e mantendo a concentração final de luciferina em 0,5 mM. Os valores de K_M foram obtidos por meio de um gráfico de Lineweaver-Burk (ou duplo-recíproco), em que os inversos dos valores de concentração de D-luciferina e ATP e das atividades luminescentes normalizadas foram plotadas no gráfico, encontrando o valor do K_M pelo inverso do valor da intersecção da reta com o eixo “x”, conforme Nelson e Cox (2011).

4.19. Determinação das constantes e eficiências catalíticas. A constante catalítica (k_{cat}) da reação bioluminescente total, definida como o número de moléculas de substrato convertidas em produto por uma única molécula de enzima por unidade de tempo, foi calculada pela razão de valores de atividade luminescente em counts por segundo (*cps*) pelo número de moléculas de luciferase, utilizando as frações purificadas com maiores atividades específicas (VIVIANI *et al.*, 2006), assumindo-se que a pureza das amostras de luciferase foi de ~90%. Abaixo se descreve o procedimento utilizado para calcular a constante catalítica.

Levando-se em consideração que o peso molecular de PxRE igual a 60.951 Da (VIVIANI *et al.*, 1999^b), a concentração de enzima e sua pureza de 90%, pode-se obter o valor da quantidade de moles de luciferase. Como foram utilizados para o ensaio 5 μL , obtém-se o número de moles de luciferase e, conseqüentemente, o número de moléculas (1 mol = 6×10^{23} moléculas). Por fim, a constante catalítica (k_{cat}), pode então ser calculada pela razão de valores de atividade luminescente (*cps*) pelo número de moléculas de luciferase.

Considerando-se que o fator de conversão de *cps* em fótons por segundo (hv/s) ainda não pode ser determinado, os valores de constante catalítica devem ser considerados como relativos e comparáveis somente entre as luciferases e mutantes nas condições usadas em nossos ensaios luminométricos.

Constante de oxidação (k_{ox}). A constante catalítica de oxidação foi calculada por meio da atividade luminescente da luciferase usando como substrato o produto da primeira reação de adenilação (**vide figura 6 na Introdução**), o adenilato de luciferina (LH_2AMP), ao invés dos substratos originais ATP e luciferina.

Eficiência catalítica. A eficiência catalítica das enzimas purificadas foi calculada através da razão entre as constantes catalíticas e os K_M para os substratos (k_{cat} / K_M).

4.20. Espectros de fluorescência. Os espectros de fluorescência da proteína foram medidos usando o espectrofluorômetro Hitachi F4500. **Fluorescência 2,6-TNS.** Os espectros de fluorescência com 2- (4-toluidino) naftaleno-6- do sulfonato (2,6-TNS) foram medidos usando 100 μL de luciferase purificada (50-100 $\mu g / mL$) com 899 μL de tampão fosfato 0,1M filtrado (pH 6,0 e 8,0) e 1 μL de 2,6- TNS (1 mM). Os espectros de fluorescência foram excitados a 320 nm e digitalizados de 350-600 nm (fenda de emissão = 10 nm e fenda de excitação = 2,5 nm). **Fluorescência de proteínas.** A fluorescência do triptofano e de outros resíduos aromáticos foi medida para a proteína purificada em concentrações entre 50-100 $\mu g / mL$ misturadas em um tampão fosfato 0,10 mM pré-filtrado a pH 6,0 e 8,0. Os espectros de fluorescência foram obtidos por excitação a 280 nm e varredura de 300-600 nm (fenda de emissão = 10 nm e fenda de excitação = 2,5 nm). Todas as medidas foram feitas em triplicata com preparações independentes de luciferase.

4.21. Espectros de Bioluminescência. Os espectros de bioluminescência foram obtidos em espectroluminômetro AB – 1850 Lumi FI Spectro Capture (ATTO, Tokyo). No ensaio típico foram utilizados 85 μL de Tris-HCl 0,10 M pH 8,0; 5 μL do extrato ou enzima purificada, 5 μL de luciferina 10 mM ou análogo de luciferina (6'-Morpholino-luciferina, 6'-Pirrolidinil-Luciferina, 6'-Dimetil-amino-luciferina, 6'-Dimetil-amino-5-Dimetil-luciferina, 6'-Amino-luciferina e 6' amino- 5-dimetil- luciferina-) (**Fig. 19**) e 5 μL de ATP 40 mM e $MgSO_4$ 80 mM. Os espectros de bioluminescência com adenilato de luciferina foram obtidos com 90 μL de Tris-HCl 0.10 M pH 8,0; 5 μL enzima purificada, e 5 μL de ATP 40 mM e $MgSO_4$ 80 mM.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito das mutações no sítio de ligação da luciferina na luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixothrix hirtus*

5.1.1. Racionalização da mutagênese sítio dirigida

Com o intuito de compreender o efeito das mutações do sítio de ligação da luciferina (SLL) na luciferase de PxRE no espectro de bioluminescência e eficiência catalítica, e então melhorar a eficiência catalítica dessa enzima, produzimos mutantes em diferentes partes do SLL e averiguamos seu efeito nos espectros de bioluminescência, K_{MS} para luciferina e ATP, constantes e eficiências catalíticas.

Os resíduos investigados nesta tese basicamente compreendem três segmentos distintos do sítio de ligação da luciferina (SLL) (**Fig. 22**): **(TZ: porção tiazólica)** que inclui as mutações H241F e H242K no segmento 241HHGF244. O respectivo resíduo H245 na luciferase do lampirídeo *Photinus pyralis* nesse segmento (H242 na luciferase de PxRE) foi apontado como possível base catalítica para abstração de próton C4 e estabilização do carbânion C4; **(TZ / BT: parte intermediária entre porção tiazólica e benzotiazólica)** contendo a mutação S314T está localizada no loop catalítico 311CGGS31449. O objetivo dessa mutação era analisar o efeito do aumento do tamanho da cadeia lateral nas propriedades catalíticas; **(BT: porção benzotiazólica)** que além da mutação L334R que já havia sido realizada por nosso grupo (VIVIANI *et al.*, 2016), esta porção abrange os mutantes N351C, N351E e R353E que estão localizados no loop 351–360 que sabidamente influencia as cores da bioluminescência em outras luciferases de besouros.

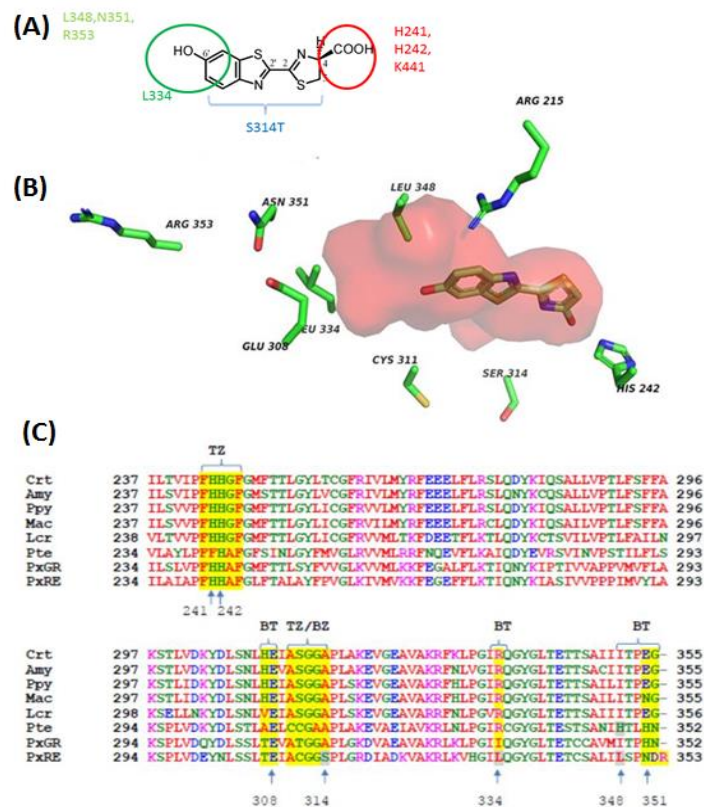


Figura 22. (A) Localização dos resíduos do sítio de ligação da luciferina; (B) modelo tridimensional da luciferase PxRE mostrando a localização dos resíduos investigados; (C) multialinhamento dos segmentos do sítio de ligação da luciferina (sombra amarela) da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixothrix hirtus* com outras luciferases de besouros na região entre os resíduos 238-358 (numeração correspondente à luciferase de *Photinus pyralis*): (BZ) Benzotiazólica; (TZ) tiazólica; (BZ / TZ) intermediária entre Benzotiazólica / tiazólica; (BT) inferior; resíduos hidrofóbicos (vermelhos); resíduos polares (verdes); (azul) resíduos carregados negativamente; (rosa) resíduo carregado positivamente; (sombra cinza) resíduos investigados; (Crt) lampirídeo *Cratomorphus distinctus*; (Amy) lampirídeo *Amydetes vivianii*; (Ppy) lampirídeo *Photinus pyralis*; (Mac) lampirídeo *Macrolampis* sp2; (Pte) Elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans*; (Lcr) *Luciola cruciatta*, não colocamos no artigo; (PxGR) fengodídeo de emissão verde *Phrixothrix vivianii* e (PxRE) luciferase do fengodídeo de emissão vermelha de *Phrixothrix hirtus*. Fonte: BEVILAQUA *et al.*, 2019.

5.1.2. Efeito das mutações nos K_M s para Luciferina e ATP

O K_M para o ATP para a enzima do tipo selvagem é de 230 μ M. Com exceção do mutante S314T, localizado entre os anéis tiazólic e benzotiazólic, todas as demais mutações na luciferase de PxRE causaram um aumento na afinidade para o substrato, diminuindo o valor do K_M para o ATP, independentemente de sua localização no SLL (**Tab. 4**). As mutações H242K e S314T, bem como aquelas que estão localizadas mais próximas da porção benzotiazólic (L334R e N351C) causaram um aumento na afinidade para esse substrato. Entre eles, os mutantes S314T e N351C apresentaram os menores valores de K_M para esse substrato. Pelo fato das mutações N351E e N351C apresentarem efeitos opostos, é possível

que a inserção de uma carga negativa nesse *loop*, onde está localizado o resíduo 351, afete negativamente a ligação da luciferina.

Tabela 4. Resumo dos efeitos das mutações no sítio de ligação da luciferina nas propriedades cinéticas da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixothrix hirtus* e seus mutantes.

Luciferase	K _M (μM)		Atividade específica **	Atividade Oxidativa**	k _{cat}	k _{ox}	k _{cat} /K _M		k _{ox} /K _M	
	ATP	LH ₂	(10 ⁹ cps/mg) [Atividade Relativa]		(10 ⁷ ⁶ cps/mol écula)	(10 ⁶ ⁶ cps/moléc ula)	ATP	(LH ₂)	ATP	(LH ₂)
RE	230	7	70 [100]	65 [93]	8,3	7,8	0,04	1,2	0,034	1,11
H241F	43	56	43 [61]	45 [64]	4	4,2	0,1	0,073	0,098	0,075
H242K	23	5	65 [93]	98 [140]	6,22	9,32	0,28	1,3	0,414	1,86
S314T	424	3	80 [114]	100 [142]	7,8	9,7	0,02	2,61	0,023	3,2
L334R	22	6	160 [229]	217 [310]	14	20	0,65	2,42	0,96	3,56
L348H	37	10	134 [191]	96 [137]	12,7	9,2	0,34	1,2	0,25	0,87
N351C	3,7	0,7	8,1 [11]	15 [21]	0,769	1,42	0,2	1,09	0,38	2
N351E	136	82	57 [81]	20 [29]	5,5	2	0,04	0,066	0,014	0,024
R353E	16	11	2 [3]	1,5 [2]	0,85	0,34	0,053	0,077	0,021	0,03
K441A	43	74	7,37 [10.5]	7,53 [10.75]	0,69	0,71	0,016	0,009	0,0165	0,009

* O desvio padrão da atividade específica é em média 26% e varia de 0,4 a 50%, ** Atividades Relativas em relação à D- luciferina (LH₂).

5.1.3. Efeito na atividade de bioluminescência global e oxidativa

Comparamos as atividades global da luciferase iniciada com luciferina e ATP, e oxidativa iniciada com adenilato de luciferina (LH₂AMP: o produto da primeira reação de adenilação, e substrato para a segunda reação oxidativa) nos diferentes mutantes (**Fig. 23; vide Tab. 4**). A atividade bioluminescente medida com o adenilato de luciferina reflete apenas a segunda etapa oxidativa, uma vez que pula a etapa de adenilação iniciada a partir de luciferina e ATP. Portanto, considera-se que quando a atividade global de bioluminescência é superior à oxidativa, a mutação afetou principalmente a atividade oxidativa, enquanto quando a mutação diminui a atividade bioluminescente global em relação à atividade de oxidação, o principal impacto foi causado na primeira etapa de adenilação.

Anteriormente, foi comparada a atividade oxidativa de luciferases de diferentes famílias e da enzima tipo-luciferase de *Zophobas* e foi descoberto que para a maioria das luciferases, a atividade oxidativa é semelhante à atividade global (VIVIANI *et al.*, 2010). As exceções foram a luciferase de *P. termitilluminans* (Pte) que apresentou atividade oxidativa

um pouco inferior à atividade global e a enzima tipo-luciferase de *Zophobas* que apresentou atividade oxidativa superior à atividade global.

Como esperado, para a maioria dos mutantes a atividade específica diminuiu. Para os mutantes N351E e R353E, ambas as atividades geral e oxidativas foram impactadas negativamente. Os mutantes S314T, L334R e L348H (mutação que será discutida mais adiante) apresentaram maiores atividades específicas, destacando-se entre as demais mutações (vide Tab. 4).

Para a maioria dos mutantes (H241F, S314T, N351E, R353E, K441A) da luciferase de PxRE, a razão entre a atividade global de bioluminescência/atividade oxidativa foi semelhante, aproximadamente 1, indicando que as mutações não afetaram a atividade oxidativa. Para os mutantes H242K e L334R, a razão foi <1 , indicando que a atividade oxidativa foi aumentada, enquanto que para os mutantes L348H e N351E, a proporção foi >1 , indicando que eles impactaram a atividade oxidativa (Fig. 23).

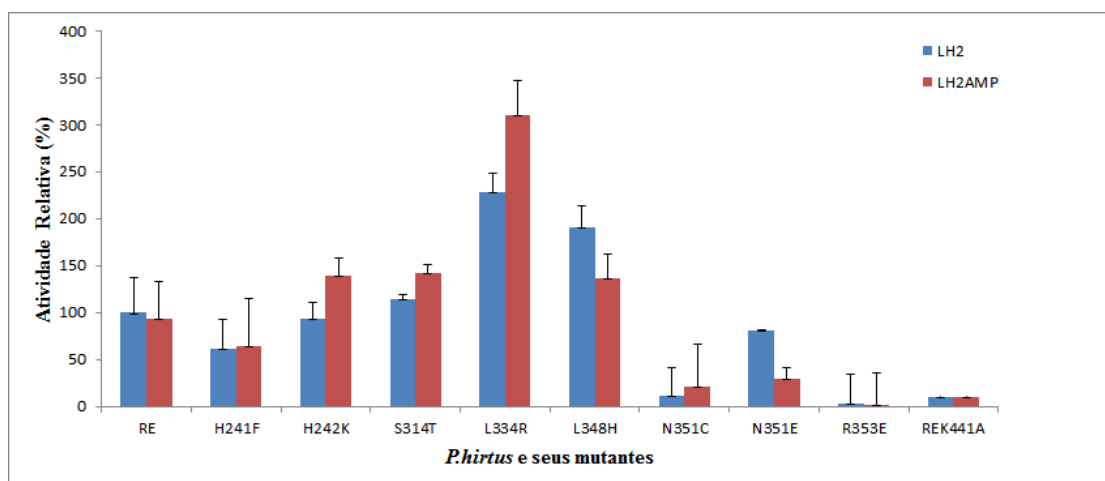


Figura 23. Atividade bioluminescente total iniciada com luciferina e ATP, e atividade oxidativa iniciada com adenilato de luciferina (LH₂AMP) para os mutantes da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixothrix hirtus*. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA *et al.*, 2019.

5.1.4. Efeito nas constantes e eficiências catalíticas

Os valores absolutos de k_{cat} e k_{ox} em s^{-1} não puderam ser determinados, uma vez que os valores da $V_{m\acute{a}x}$ para a reação bioluminescente da luciferase foram dados em *cps* (*counts por segundo*), e não em fótons/s (valores absolutos), e, portanto, os valores dessas constantes foram relatados em *cps/molécula* (*counts por segundo/molécula*). Embora esses valores não sejam absolutos, podem ser usados com segurança como valores relativos de constantes catalíticas para as luciferases comparadas neste estudo.

A maioria dos mutantes alterou consideravelmente os valores de constantes e eficiências catalíticas (**vide Tab. 4**).

Entre todos os mutantes, L334R destacou-se por apresentar todas as propriedades cinéticas melhoradas (**vide Tab. 4**). Os altos valores de eficiências do mutante L334R são resultado da razão entre elevados valores da constante catalítica e menores valores de K_M . O mutante do sítio de ligação da luciferina H242K também se destacou em relação às propriedades cinéticas aumentadas, entretanto, menos que L334R. O mutante S314T, apesar de apresentar um maior K_M para o ATP, apresentou menores valores de K_M para a luciferina, refletindo na maior eficiência catalítica apenas para o último substrato.

A mutação S314T, apesar de conservadora (**vide Fig. 22**), substituiu um resíduo menor por outro maior, mas com polaridades semelhantes, diminuindo levemente o tamanho da cavidade próximo aos anéis tiazólico e benzotiazólico da luciferina, contribuindo para aumentar a afinidade pela luciferina e provavelmente estabilizar a luciferina perto de outros grupos catalíticos responsáveis pela reação oxidativa, aumentando a eficiência catalítica (**vide Tab.4**).

Estes resultados contrastam com o mutante N351C que, apesar de ter baixos valores de K_M e, portanto, altas afinidades para ambos os substratos, apresentam os menores valores para constantes e eficiências catalíticas (**vide Tab.4**).

Finalmente, em relação à luciferase selvagem, os mutantes N351E, K441A, H241F e R353E apresentaram valores mais elevados de K_M para luciferina e menores constantes catalíticas, sendo os mutantes menos eficientes.

A mutação H241F foi obtida baseada no fato que esta posição é importante para estabilizar estericamente os anéis benzotiazólico e tiazólico da luciferina (BRANCHINI *et al.*, 2004), e luciferases de elaterídeos apresentam fenilalanina nesta posição (VIVIANI *et al.*, 1999; VIVIANI, 2002). Entretanto, quando comparada à mutação adjacente H242K, a mutação H241F teve efeitos mais impactantes nas propriedades cinéticas dessa luciferase. Isso se deve possivelmente à natureza polar e carga da cadeia lateral da histidina em relação à fenilalanina (apolar), na medida em que apresentam cadeias laterais que conservam o caráter de aromaticidade e volume.

No mutante H242K, apesar da polaridade da cadeia lateral do aminoácido ser mantida, temos uma mudança mais acentuada na característica da cadeia lateral, pois temos a substituição de uma cadeia lateral volumosa (His- $pK_R > 6$) por uma menos volumosa e com uma carga positiva mais permanente do que a histidina (Lis- $K_R > 10,52$). Entretanto devemos

ser cautelosos em considerar o estado de carga destas cadeias laterais, pois o pKa das cadeias laterais pode mudar consideravelmente no microambiente do sítio-ativo de uma proteína.

Vale ressaltar que a substituição H242K (resíduo inváriavel) na luciferase de PxRE aumentou a eficiência catalítica principalmente pelo aumento da constante catalítica oxidativa, indicando que a lisina nessa posição influencia especialmente a reação de oxidação, como seria esperado pelos resultados publicados por Branchini (1999). A inserção de uma carga positiva permanente de lisina pode ajudar a estabilizar a carbânion C4 (da luciferina) durante a etapa de oxigenação, aumentando a eficiência da etapa oxidativa.

Em conjunto, os resultados revelaram uma tendência de maiores eficiências catalíticas para mutantes de maior afinidade pela luciferina (**Tab. 4**).

5.1.5. Efeito nos espectros de bioluminescência

A maioria dos mutantes não tiveram seus espectros de bioluminescência alterados em relação à luciferase selvagem (**Tab. 5**). Para o mutante H242K (localizado no sítio de ligação do anel tiazólico), houve um ligeiro deslocamento batocrômico contrastando com o mutante L334R (localizado no sítio de ligação do fenolato no assoalho do sítio de ligação da luciferina), que causou um deslocamento hipsocrômico considerável de 12 nm (VIVIANI *et al.*, 2016). Notavelmente, as únicas mutações que afetaram cor de bioluminescência na luciferase PxRE (T226N, C311T, L334R e L348H que será discutida mais adiante) estão localizadas na parte inferior do sítio de ligação da luciferina próximo ao grupo fenolato (VIVIANI *et al.*, 2002, 2016, 2018).

Tabela 5. Efeitos das mutações no sítio de ligação da luciferina nos espectros de bioluminescência da luciferase emissora de luz vermelha de *P. hirtus* e seus mutantes.

Porção do sítio de ligação da luciferina	Luciferase	λ_{\max} (nm)*
		[Meia-Banda]
	RE	626 [82]
TZ	H241F	622 [82]
	H242K	629 [79]
TZ-BT	S314T	626 [75]
BT	L334R	612 [80]
	L348H	608[89]
	N351C	622 [79]
	N351E	621 [79]
	R353E	626 [74]
	K441A	624 [79]

5.2. Caracterização e comparação da luciferase pH-sensitiva emissora de luz verde de *Amydetes vivianii* com *Phixothrix hirtus*

Entre as luciferases de besouros bioluminescentes conhecidas, a luciferase do lampirídeo brasileiro *Amydetes vivianii* (Amy) destaca-se pela emissão da bioluminescência mais deslocada para o azul entre as luciferases de vagalumes (VIVIANI *et al.*, 2011), logo depois da luciferase do elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans* (Pte). Dessa forma, esta luciferase pode ser um bom modelo comparativo com a luciferase emissora de luz vermelha de PxRE, que tem espectro mais deslocado para o vermelho. A luciferase recombinante de *Amydetes* foi inicialmente cineticamente caracterizada em extrato bruto, mas não havia sido purificada. Realizei assim a subclonagem do gene da luciferase em vetor de expressão, coorientei o estudante de iniciação científica Gabriel Felder Pelentir no processo de purificação e caracterização da luciferase de Amy.

O pH ótimo dessa luciferase foi semelhante ao de outras luciferases de besouros bioluminescentes, próximas a 8,0 (**Fig. 24**). No entanto, esta enzima exibe uma curva mais ampla com alta atividade entre pH 8,0 e 9,0 (PELENTIR *et al.*, 2019).

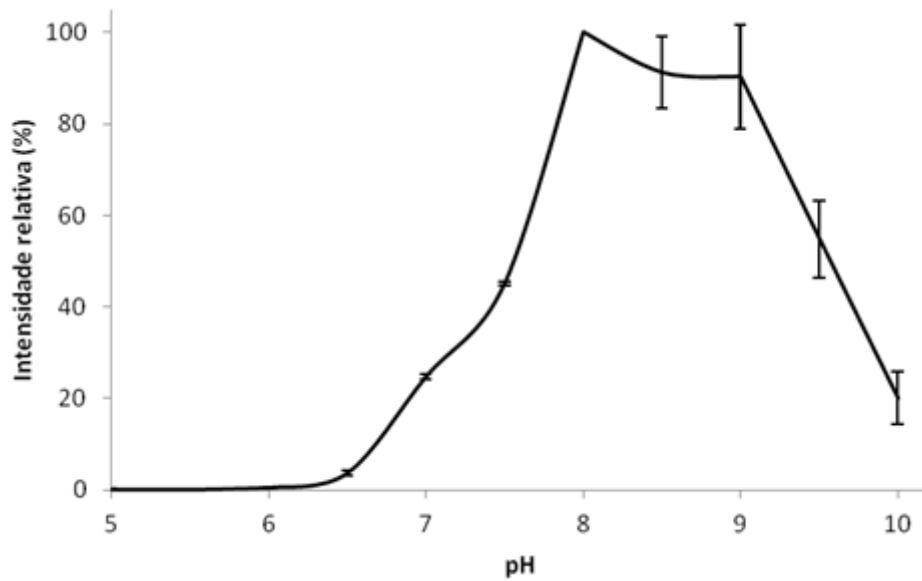


Figura 24. Efeito do pH na atividade da luciferase do vagalume *Amydetes viviani*. Fonte: PELENTIR *et al.*, 2019.

Os valores de K_M para luciferina e ATP foram próximos de $9 \mu\text{M}$, o valor de K_M para o ATP é o valor mais baixo já relatado entre as luciferases de outros besouros. Estes baixos valores refletem afinidades mais altas para esses substratos, especialmente para o ATP.

A luciferase de *Amy* exibiu k_{cat} e k_{ox} semelhantes a outras luciferases de vagalumes, no entanto, devido ao seu valor muito baixo de K_M para o ATP, essa enzima exibiu maior eficiência catalítica para esse substrato (**Tab. 6**), mostrando seu potencial uso analítico para ensaios sensíveis de ATP.

Tabela 6. Comparação das propriedades de bioluminescência de *Amydetes vivianii* e outras luciferases de besouros clonadas pelo nosso grupo e a luciferase comercial de *Photinus pyralis*.

Luciferase	λ_{\max} (nm)*	K_M (μ M)		Atividade e específica a**	Atividade Oxidativa **	k_{cat}	k_{ox}	k_{cat}/K_M		k_{ox}/K_M	
	[Meia- Banda]	ATP	LH ₂	(10 ⁹ cps/mg) [Relative Activity]		(10 ⁶ cps/molé cula)	(10 ⁶ cps/molé cula)	ATP	LH ₂	ATP	LH ₂
Lampiridae											
<i>Amydetes viviani</i>	547 [81]	9	9	890	730	109	81	12,1	12,1	9	9
<i>Macrolampis</i>	575 [86]	83	20	1198	1008	125	106	1,5	6,25	1,3	5,3
<i>Photinus pyralis</i>	567 [81]	250	5	1037	910	116	102	0,46	23	0,4	20,5
Elateridae											
<i>Pyrearinus termitilluminans</i>	546 [87]	370	80	290	55	29	56	0,78	3,625	0,15	0,7
Phengodidae											
<i>Phrixothrix hirtus</i>	626 [82]	230	7	70	65	8,3	7,8	0,04	1,2	0,034	1,11
<i>Phrixotrix vivianii</i>	558 [89]	330	64	37,9	33	3,79	3,12	0,011	0,059	0,009	0,04 8

* O desvio padrão da atividade específica é em média 6, 5% e varia de 1 a 32%, ** Atividades Relativas em relação à D- luciferina (LH₂).

Considerando a maior eficiência catalítica para o ATP, obtivemos uma curva do efeito da concentração de ATP na atividade de bioluminescência da luciferase de Amy. Com base nessa curva, é possível estimar o ATP até a concentração femtomolar, com uma linearidade variando de 10⁻¹⁰ a 10⁻¹⁵M (**Fig. 25A**). Então nós analisamos o efeito da concentração de ATP em ensaios de bioluminescência *in vitro* usando luciferase de *Amydetes* comparativamente à luciferase comercial de *Photinus pyralis*. A luciferase de *Amydetes* exibiu maior intensidade de bioluminescência, mesmo em menores concentrações de ATP ou luciferina quando comparado com a luciferase *P. pyralis* (**Fig. 25B**). Estes resultados mostram que a luciferase de *Amydetes* é especialmente adequada para ensaios de ATP mais sensíveis.

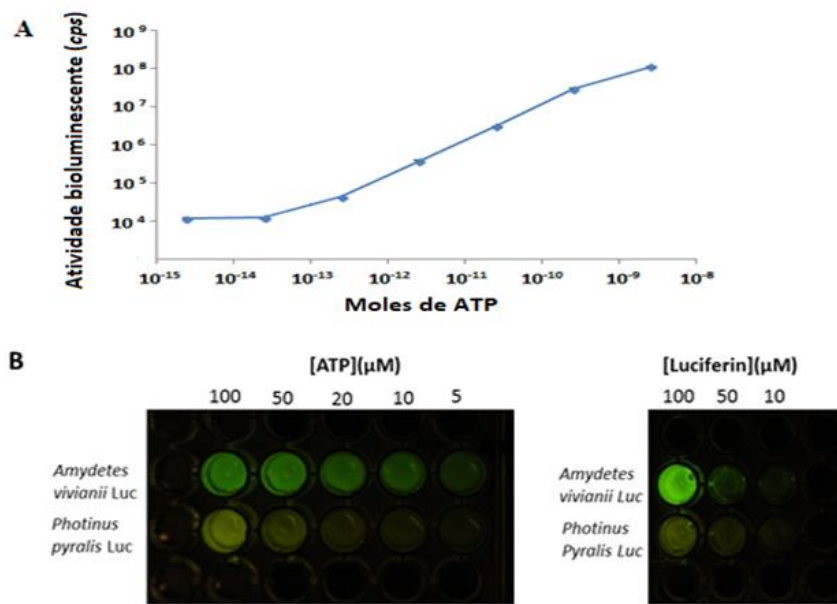


Figura 25. (A) Curva de linearidade da concentração de ATP e atividade da luciferase de *Amydetes vivianii*. (B) (Painéis inferiores)- Efeito comparativo da concentração de substrato na atividade de bioluminescência da luciferase de Amy e luciferases de vagalume comerciais de *P. pyralis* na concentração final de 0,7 μg / mL: (painel esquerdo) ATP: (1) ATP 0,1 mM; (2) ATP 0,05 mM; (3) ATP 0,02 mM; (3) ATP 0,01 mM; (5) ATP 0,005 mM; (Painel direito) luciferina: (1) luciferina 0,1 mM; (2) luciferina 0,05 mM e (3) luciferina 0,01 mM. Fonte: PELENTIR *et al.*, 2019.

A luciferase purificada, de modo semelhante à luciferase em extratos brutos (OLIVEIRA e VIVIANI, 2017) também mostrou maior estabilidade a 37°C em relação a outras luciferases estudadas, inclusive a luciferase comercial de *P.pyralis* (Fig. 26).

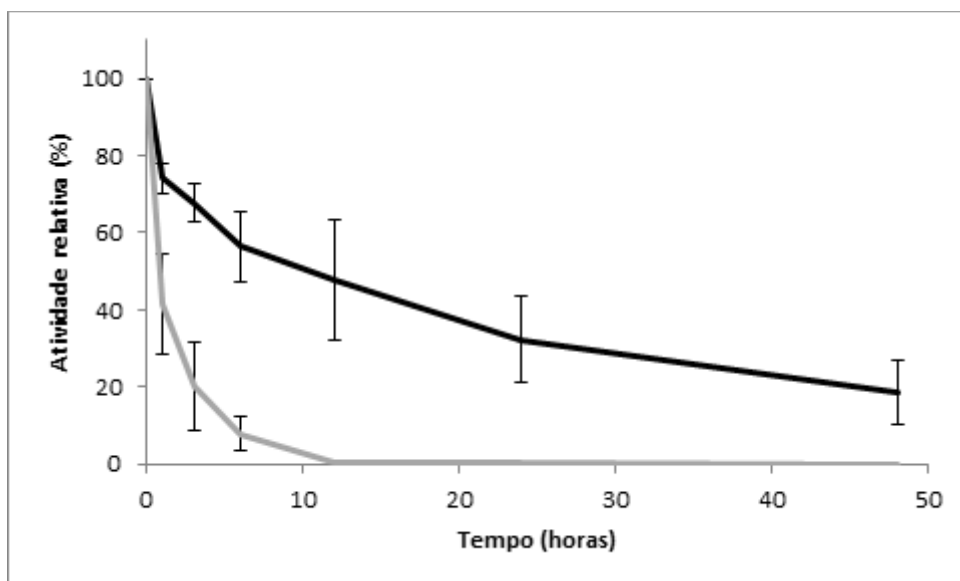


Figura 26. Termoestabilidade de luciferases de *Amydetes vivianii*: incubação a 37°C durante 1-48 h; (Linha preta) luciferase de *Amydetes vivianii* e (linha cinza) luciferase comercial de *Photinus pyralis*. Fonte: PELENTIR *et al.*, 2019.

Polaridade do sítio-ativo. Para verificar se havia uma relação entre a cor da bioluminescência, e a polaridade do sítio ativo, também medimos os espectros de fluorescência do 2,6-TNS para sondar a polaridade do sítio ativo da luciferase de Amy e compará-la com outras luciferases de besouros, em especial a luciferase de PxRE. O espectro de fluorescência do 2,6-TNS com a luciferase de *Amydetes* foi desviado para azul, similarmente ao da luciferase do lampirídeo *Photinus pyralis* e do elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans* (VIVIANI *et al.*, 2014) (**Tab. 7**), indicando um ambiente mais hidrofóbico do que na luciferase de *P.hirtus* que tem o espectro com 2,6-TNS deslocado para a região do vermelho, indicando um ambiente mais hidrofílico.

Tabela 7. Comparação das propriedades de fluorescência da luciferase de *Amydetes vivianii* e outras luciferases

Luciferase	λ_{FL} (nm)		λ_{FL} (nm)	
	Tryptofano		2,6-TNS	
	pH 8	pH 6	pH 8	pH 6
<i>Amydetes vivianii</i>	337	337	427	428
<i>Photinus pyralis</i> *	337	333	428	429
<i>Pyrearinus termitilluminans</i> *	336	338	428	429
<i>Phrixotrix hirtus</i> *	334	333	438	

Fontes: PELENTIR *et al.*, 2019.* VIVIANI *et al.*, (2014)

5.3. Comparação das Propriedades de bioluminescência de 6'-amino-análogos com luciferases de besouros

Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos de determinação dos espectros de bioluminescência, anteriormente, foram analisados os efeitos de 2 amino-análogos (6'-amino-luciferina e 6'-amino-5-dimetil-luciferina) nos espectros de bioluminescência de luciferases de besouros (VIVIANI *et al.*, 2014). Estes estudos haviam sido feitos para verificar se a forma ceto ou enólica da oxiluciferina estariam envolvidas na determinação dos espectros de bioluminescência, e assim se a hipótese da tautomerização da oxiluciferina explicaria a emissão de luz verde e vermelha. As formas dimetiladas, que não podem enolizar

neste lado do anel tiazólico e, portanto, permanecem na forma cetônica, foram testadas, para ver se o efeito de tautomerização explicaria ou não a modulação dos espectros, conforme a hipótese original de White *et al.* (1969). Se o processo de tautomerização determinasse as cores de bioluminescência, então esperaria-se que a cor de bioluminescência fosse diferente para 6'-amino-luciferina, que em princípio poderia enolizar, e para a sua forma dimetilada na posição 5', que permanece restrita a forma cetônica. Todavia, o espectro para ambos análogos (6'-amino-luciferina e sua forma dimetilada) foram idênticos, mostrando que a forma cetônica da amino-oxiluciferina, e por inferência da oxiluciferina, é o emissor de luz de diferentes cores (VIVIANI *et al.*, 2014).

Nesta tese, aprofundamos o estudo anterior. Considerando os resultados anteriores que indicam que o grupo fenol da porção benzotiazólica determina os espectros, ao invés da porção tiazólica que influenciaria na tautomerização ceto-enólica, decidimos então investigar agora a influência da porção benzotiazólica do sítio de ligação da luciferina, na determinação dos espectros. Para isto, comparamos os espectros e atividades de bioluminescência de novos amino-análogos (6'-Dimetil-amino-luciferina, 6'-Dimetil-amino-5-dimetil-luciferina, 6'-Morpholino-Luciferina e 6'-Pirrolidinil-Luciferina), em que a posição 6' foi modificada com grupos substituintes mais volumosos e com diferentes tendências de doação de elétrons (refletido pelos valores da constante de Hammett) em relação à hidroxila original do grupo fenol da luciferina, com luciferases de besouros que emitem diferentes cores de luz, especialmente a luciferase emissora de luz vermelha de PxRE e seus mutantes.

5.3.1. Comparação das atividades de bioluminescência das luciferases de besouros com amino-análogos

Notavelmente, a luciferase emissora de luz vermelha de *P.hirtus* (PxRE), além de exibir espectros mais deslocados para o vermelho (6'-Dimetil-amino-LH₂: 638 nm, 6'-Dimetil-amino-5-dimetil-LH₂: 639 nm, Morpholino-LH₂: 634 nm e Pirrolidinil-LH₂: 644 nm), apresentou uma atividade de bioluminescência com estes análogos maiores, quando comparada a outras luciferases emissoras de luz verde-amarela (**Fig. 27; Tab. 8**). Em contrapartida, a luciferase, pH-insensitiva emissora de luz verde do elaterídeo *P. termitilluminans* (Pte), apresentou as menores atividades entre todas as luciferases com os 6'-amino-análogos (principalmente Morpholino-LH₂ e Pirrolidinil-LH₂) quando comparada ao substrato original D-luciferina.

As luciferases pH-sensitivas dos lampirídeos *Macrolampis* sp2 e *Amydetes vivianii*, apresentaram atividades menores que a luciferase emissora de luz vermelha PxRE e maiores que as luciferases de elaterídeos emissora de luz-verde Pte e laranja de *Pyrophorus angustus* (Tab. 8).

As maiores atividades de bioluminescência da luciferase emissora de luz vermelha PxRE com 6'-amino-análogos em relação à luciferina (Fig. 27), indicam que estes substratos volumosos na porção 6' podem ser bem acomodados no sítio-ativo destas luciferases, indicando uma cavidade maior nesta região do sítio-ativo.

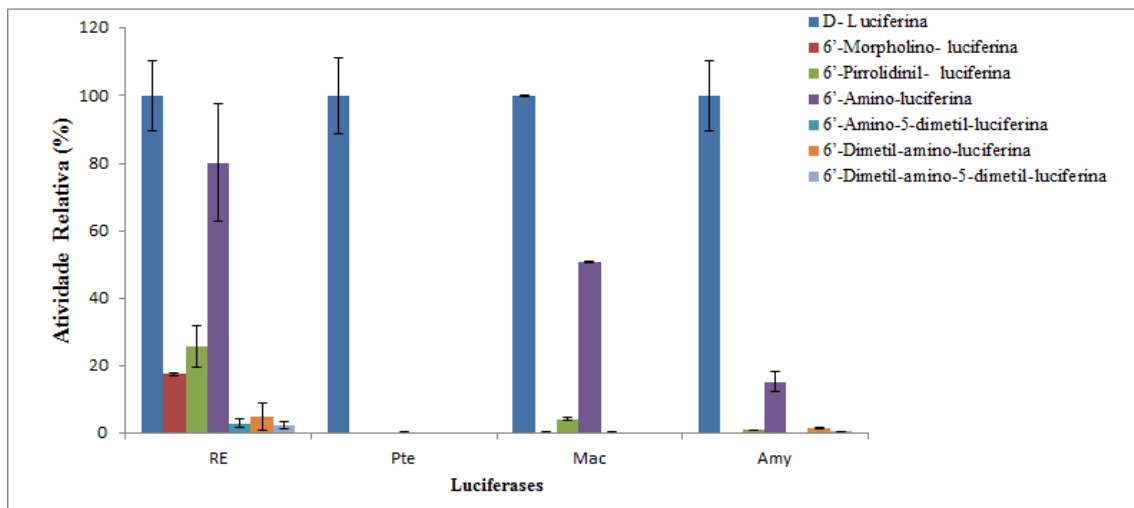


Figura 27. Atividades relativas da luciferase *Macrolampis* sp2, *P. termitilluminans*, *P. hirtus* e *Amydetes vivianii* com luciferina e diferentes 6'-amino-análogos de luciferina. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA *et al.*, 2019.

Tabela 8. Atividades bioluminescentes de luciferases de besouros com D-luciferina e 6'-amino-análogos.

Luciferase	Atividade (10 ⁹ cps/mg)* [Atividade Relativa]**						
	LH ₂	NH ₂ -LH ₂	NH ₂ -LH-Me ₂	NMe ₂ -LH	NMe ₂ -LH-Me ₂	Mor-LH	Pyr-LH
Lampirídeos							
<i>Amydetes viviani</i>	130 [100]	45 [35,2]	0,81 [0,63]	1,2 [1]	0,33 [0,2]	0,83 [0,6]	6,6 [5,2]
<i>Cratomorphus</i>	37 [100]	1,7 [4,6]	0,015 [0,04]	0,02 [0,05]	0,019 [0,003]	2,9 [0,008]	3,4 [0,9]
<i>Macrolampis</i>	200 [100]	100 [50,6]	0,7 [0,34]	0,4 [0,18]	0,2 [0,009]	0,6 [0,3]	8 [4,3]
Elaterídeo							
<i>Pyrearinus termitilluminans</i>	200 [100]	0,6 [0,4]	0,02 [0,012]	0,03 [0,02]	0,02 [0,009]	0,2 [0,09]	0,05 [0,03]
H348L	78,5 [100]	0,07 [0,09]	-	0,03 [0,04]	-	0,014 [0,017]	0,005 [0,0061]
<i>Pyrophorus angustus</i>	51 [100]	0,45 [0,09]	0,13 [0,25]	0,015 [0,03]	0,005[0,01]	0,4 [0,007]	0,06[0,1]
Fengodídeo							
<i>Phrixothrix vivianii</i>	230 [100]	3,5 [15,3]	0,02 [0,097]	0,33 [1,43]	0,14 [0,6]	0,02 [0,082]	0,21 [0,9]
RE220GR	12 [100]	1 [8]	0,012 [0,1]	0,057 [0,45]	0,13[1]	0,08 [0,64]	0,34 [2,7]
<i>Phrixothrix hirtus</i>	70 [100]	56 [80]	2,1 [3]	3,4 [4,84]	17[2,4]	12 [17,6]	18 [25,7]

* O desvio padrão da atividade específica é em média 6% e varia de 1x10⁻³ a 17%, ** Atividades Relativas em relação à D- luciferina (LH₂).

5.3.2. Comparação dos espectros de bioluminescência das luciferases de besouros com amino-análogos

Similarmente aos resultados obtidos com os primeiros 6' amino-análogos (6' Amino-luciferina e 6' Amino-5-dimetil-luciferina), a maioria das luciferases de besouros que emitem luz verde-amarela exibiram espectros deslocados para a região do vermelho com a grande maioria dos amino-análogos em relação à luciferina, especialmente as luciferases pH-sensitivas (*Amydetes vivianii*, *Macrolampis* sp2 e *Cratomorphus distinctus*) (**Fig. 28; Tab. 9**).

Os análogos 6'-amino- luciferina e o 6'-amino- 5'- dimetil- luciferina diferem apenas pela dimetilação, a qual impede a formação da forma enólica. Os espectros comparativos para as luciferases de besouros em geral se sobrepuseram para esses dois análogos, e para a luciferase de PxRE e seus mutantes o comportamento foi o mesmo. Dessa forma, mais uma vez demonstrou-se que a forma ceto da amino-oxiluciferina, e por inferência da oxiluciferina, é o emissor mais provável por todas as cores de bioluminescência exibidas pelas diferentes

luciferases de besouros. Portanto, a porção benzotiazólica do sítio de ligação da luciferina de cada luciferase determina as cores da bioluminescência (VIVIANI *et al.*, 2014).

Excepcionalmente, a luciferase do elaterídeo *P. termitilluminans* apresentou comportamento diferenciado, uma vez que os espectros com 6'-Dimetil-amino-luciferina, 6'-Dimetil-amino-5-Dimetil- luciferina, 6'-Pirrolidinil-luciferina e 6'-Morpholino-luciferina foram similares aos obtidos com a luciferina, enquanto que o 6'-Amino-luciferina e 6'-Amino-5-dimetil-luciferina causaram deslocamentos batocrômicos (**Fig. 28**).

Por outro lado, a luciferase emissora de luz vermelha de PxRE com os amino-análogos 6'-Amino-luciferina e 6'-Amino-5-dimetil-luciferina apresentou um comportamento inverso ao das luciferases verde-amarelas, apresentando um deslocamento hipsocrômico em relação à luciferina (VIVIANI *et al.*, 2016), enquanto que os amino-análogos mais volumosos e com diferentes tendências de transferência de elétrons (6'-Dimetil-amino-luciferina, 6'-Dimetil-amino -5-dimetil-luciferina, 6'-Morpholino- Luciferina e 6'-Pirrolidinil- Luciferina), testados neste trabalho, apresentaram um deslocamento batocrômico, destacando-se 6'-Pirrolidinil-Luciferina com pico de bioluminescência de 644 nm, no vermelho distante (**Fig. 28; Tab. 9**).

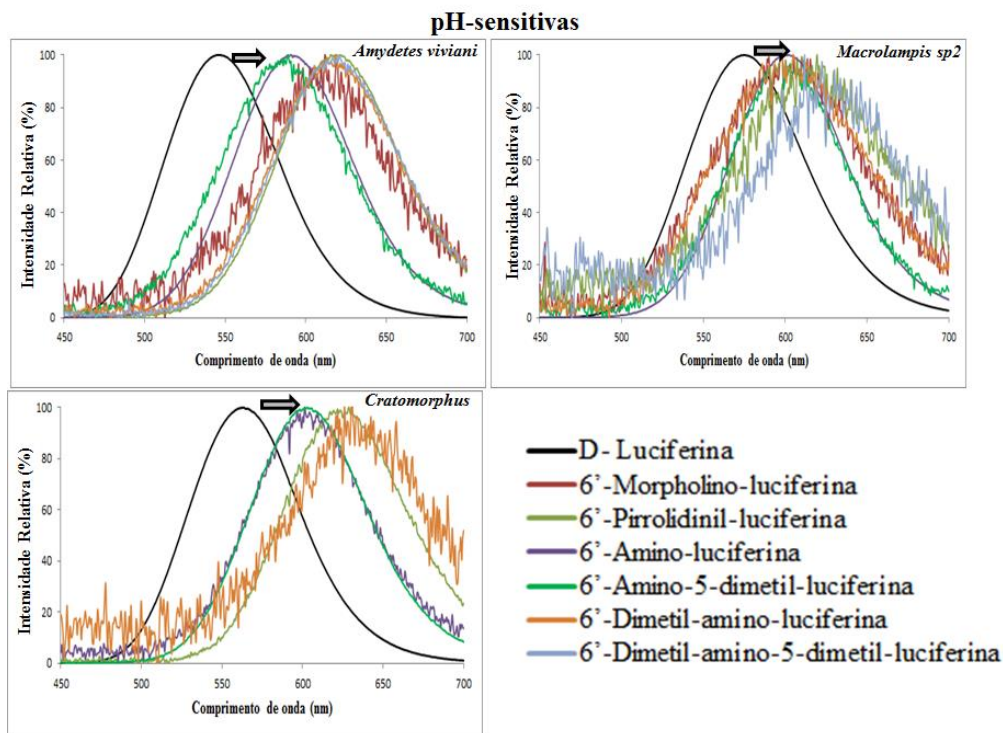


Figura 28. Espectros de bioluminescência de luciferases de besouros na presença de D- luciferina (cor preta) e seus amino-análogos: 6^o Morpholino- Luciferina (cor vermelha), 6- Pirrolidinil- luciferina (cor verde clara), 6^oAmino-luciferina (cor roxa), 6^oAmino- 5-dimetil luciferina (cor verde escura), 6^oDimetil-amino-5-Dimetil-luciferina (cor azul clara) e 6^o Dimetil- aminoluciferina (cor alaranjada). A seta mostra o deslocamento espectral dos amino-análogos em relação à luciferina. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA *et al.*, 2019.

Tabela 9. Picos de espectros de bioluminescência das luciferases de besouros com D-luciferina e 6'-amino-análogos.

Luciferase	Amax [Half-Band] (nm)*						
	LH ₂	NH ₂ -LH ₂	NH ₂ -LH-Me ₂	NMe ₂ -LH	NMe ₂ -LH-Me ₂	Mor-LH	Pyr-LH
Lampiridae							
<i>Amydetes viviani</i>	547 [85]	591 [90]	589 [96]	618 [95]	621 [99]	612 [104]	615 [95]
<i>Cratomorphus</i>	563 [85]	601 [79]	603 [87]	626 [107]	†	#	629 [97]
<i>Macrolampis</i>	575 [86]	602 [83]	598 [83]	605 [110]	618 [88]	597[114]	619 [107]
Elateridae							
<i>Pyrearinus termitilluminans</i>	546 [87]	563 [92]	567 [92]	549 [93]	551 [87.5]	551 [84]	548 [89]
<i>Pyrophorus angustus</i>	591 [78]	#	#	#	#	#	#
Phengodidae							
<i>Phrixothrix vivianii</i>	558 [89]	587 [86]	583 [85]	608 [91]	606 [92]	579 [109]	611 [87]
RE220GR	584 [86]	593 [86]	593 [87.5]	624 [90]	622.5 [88.8]	597 [92]	614 [89]
<i>Phrixothrix hirtus</i> (WT)	626[82]	612 [87]	615 [86]	638 [86]	639 [92]	634 [92]	644 [84]

*O erro estimado do pico é ± 2.5 nm. Acima de 620 nm o erro era estimado em ± 3 nm. # As atividades muito mais baixas não permitiram medir os espectros de bioluminescência.

5.3.3 Propriedades de bioluminescência de Amino-análogos de luciferina com a luciferase de *P. hirtus* e seus mutantes

Uma vez comparados os espectros de bioluminescência com amino-análogos e verificado que a luciferase vermelha de PxRE tem maior atividade e espectros mais deslocados para o vermelho em relação a outras luciferases, decidimos então comparar as propriedades de bioluminescência destes amino-análogos com os mutantes desta luciferase: RE-H241F, RE-H242K, RE-S314T, RE-L334R, RE-N351C, RE-N351E, RE-R353E, RE-K441A.

5.3.3.1 Atividade bioluminescente

Semelhantemente à luciferase selvagem, os mutantes da luciferase de *P.hirtus* (PxRE) em geral também apresentaram atividade elevada com os amino-análogos em relação à luciferina (**Fig. 29, Tab. 10**). Para a maioria dos mutantes e a própria luciferase selvagem, a atividade bioluminescente, em ordem decrescente foi: (D-Luciferina > 6'- Amino-luciferina > 6'-Pirrolidinil- Luciferina > 6'-Morpholino- Luciferina). Entretanto, o mutante H242K foi o único que desviou dessa tendência, pois apresentou uma atividade superior com 6'- amino-

luciferina em relação à D-luciferina, enquanto que apresentou baixíssima atividade com 6'-Pirrolidinil- Luciferina e 6'-Morfolino- Luciferina.

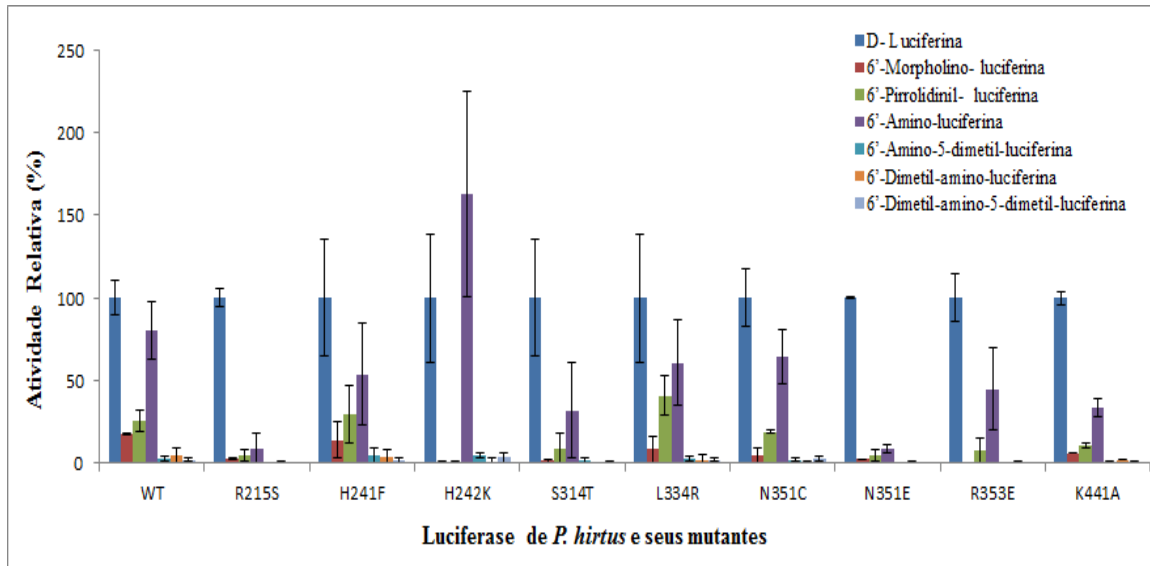


Figura 29. Atividade relativa da luciferase selvagem de *P.hirtus* e seus mutantes com os diferentes amino-análogos de luciferina. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA *et al.*, 2019

Vale destacar também que, entre todos os mutantes, o mutante R215S, apesar de uma grande perda de atividade, obteve os maiores deslocamentos batocrômicos com os novos amino-análogos (6'-Dimetil-amino-luciferina, 6'-Dimetilamino-5-dimetil-luciferina, 6'-Morpholino-luciferina e 6'-Pirrolidinil-Luciferina). A arginina 215 é invariável entre as luciferases de besouros, independentemente da cor de bioluminescência, e foi sugerido que este resíduo poderia ter um papel modulador nas cores de bioluminescência de luciferases verde-amarelas, mas não na luciferase vermelha de PxRE (VIVIANI e OHMIYA, 2000; VIVIANI *et al.*, 2002, 2006).

Tabela 10. Atividades de bioluminescência da luciferase emissora vermelha de *Phrixothrix hirtus* e seus mutantes com D-luciferina e 6'-amino-análogos.

Luciferase	Atividade (10^9 cps/mg)* [Atividade Relativa]**						
	LH ₂	NH ₂ -LH ₂	NH ₂ -LH-Me ₂	NMe ₂ -LH	NMe ₂ -LH-Me ₂	Mor-LH	Pyr-LH
<i>Phrixothrix hirtus</i> (selvagem)	70 [100]	56 [80]	2,1 [3]	3,4 [4,84]	17 [2,4]	12 [17,6]	18 [25,7]
R215S	2,2 [100]	0,54 [24]	0,002 [0,1]	0,016 [0,7]	0,0084[0,038]	0,026 [1,2]	0,3 [12,8]
H241F	47 [100]	25 [54]	2 [4,4]	1,7 [3,6]	1[0,2]	6,6 [14,1]	14 [30]
H242K	52 [100]	84 [162]	2,6 [5]	0,004 [0,007]	1,9 [3,7]	0,07 [0,1]	0,09 [0,2]
S314T	21,5 [100]	69 [32]	3,4 [1,6]	0,009 [0,004]	2,6 [1,2]	3,2 [1,5]	20 [9,2]
L334R	160 [100]	82 [60,8]	34 [2,5]	3 [2,2]	2,7 [2]	11 [8,3]	55 [41]
L348H	134 [100]	18 [10,8]	49 [30,4]	0,8 [0,5]	1,1 [0,7]	6,4 [4]	4,4 [2,7]
N351C	8,1 [100]	54 [64,5]	1,8 [2,2]	0,61[0,7]	2,17 [2,6]	4,1 [4,5]	16 [19]
N351E	57 [100]	52 [9]	0,023 [0,04]	0,49 [0,8]	0,44 [0,8]	1,6 [2,9]	2,80 [5]
R353E	20 [100]	90 [45]	0,059 [0,3]	0,08 [0,4]	0,052 [0,3]	0,073 [0,4]	1,5 [7,4]
K441A	11 [100]	3,8 [33,3]	0,090 [0,8]	0,27 [2,3]	0,150 [1,3]	0,730 [6,3]	1,2 [10,6]

* O desvio padrão da atividade específica é em média 7,85% e varia de 0,8 a 62%, ** Atividades Relativas em relação à D- luciferina (LH₂).

5.3.3.2. Espectros de bioluminescência

Quando comparamos os espectros de bioluminescência da luciferase selvagem de *P.hirtus* (PxRE) com os espectros da maioria de seus mutantes na presença de cada um dos amino-análogos, observou-se que estas em geral tiveram picos de emissão semelhantes entre si (**Fig. 30; Tab. 11**). O único mutante que desviou desse padrão, novamente foi o H242K que, com o 6'-Pirrolidinil-luciferina, tendo seu espectro deslocado 7 nm para a região azul ao invés do vermelho. Este desvio da norma pode indicar a ocorrência de uma nova interação estabelecida entre K242 e os amino-análogos, em relação ao resíduo selvagem de histidina.

Vale destacar também que, entre todos os mutantes, o mutante R215S obteve os maiores deslocamentos batocrômicos com os novos amino-análogos (6'-Dimetil-amino-luciferina, 6'-Dimetilamino-5-dimetil-luciferina, 6'-Morpholino- Luciferina e 6'-Pirrolidinil-luciferina) concomitantemente a uma maior perda de atividade.

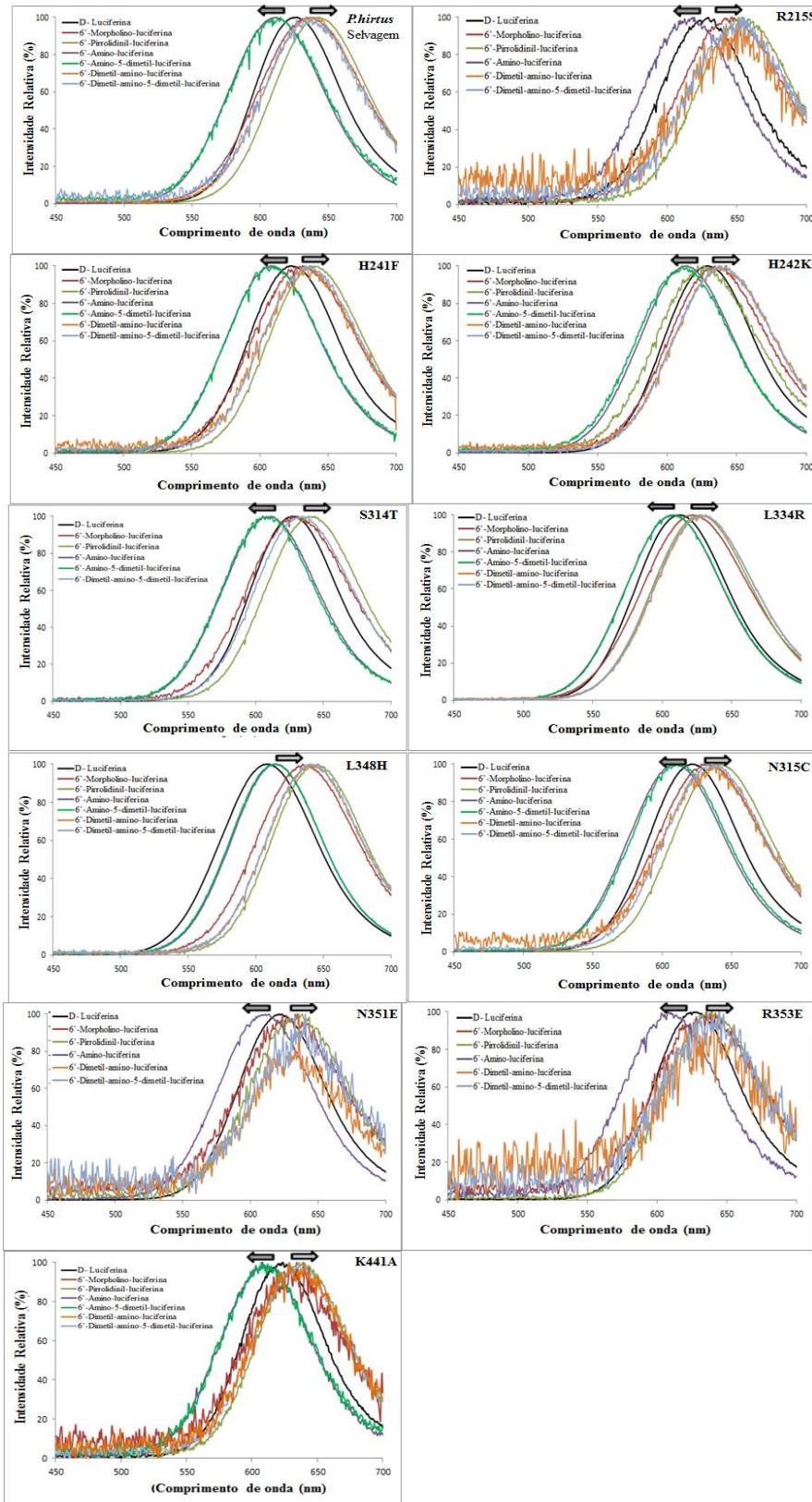


Figura 30. Espectros de bioluminescência da luciferase de *P. hirtus* e seus na presença de D- luciferina (cor preta) e seus amino-análogos: 6' Morpholino- Luciferina (cor vermelha), 6'- Pirrolidinil- luciferina (cor verde clara), 6'Amino-luciferina (cor roxa), 6'Amino- 5-dimetil- luciferina (cor verde escura), 6'Dimetil-amino-5-Dimetil- luciferina (cor azul clara) e 6' Dimetil- amino-luciferina (cor alaranjada). A seta mostra o deslocamento espectral dos amino-análogos em relação à luciferina. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA *et al.*, 2019.

Tabela 11. Espectros de bioluminescência da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix hirtus* e seus mutantes com D- luciferina e 6'-amino-análogos.

Luciferase	Amax [Half-Band] (nm)*						
	LH ₂	NH ₂ -LH ₂	NH ₂ -LH-Me ₂	NMe ₂ -LH	NMe ₂ -LH-Me ₂	Mor-LH	Pyr-LH
<i>Phrixothrix hirtus</i> (selvagem)	626 [82]	612 [87]	615 [86]	638 [86]	639 [92]	634 [92]	644 [84]
R215S	630 [80]	620 [86]	†	651 [80]	655,3 [87]	647 [94]	654 [87]
H241F	622 [82]	608 [89]	608 [85]	634 [87]	636 [89]	631[99]	638 [88]
H242K	629 [79]	614 [86]	611 [87]	640 [86]	638 [88]	634 [86]	622 [91]
S314T	626 [75]	612 [85]	605 [84]	#	634 [88]	626 [92]	639 [87]
L334R	613 [80]	608 [85]	610 [84]	631 [89]	626 [89]	621 [94]	628 [85]
L348H	608 [89]	613 [89]	613 [85]	640 [85]	646,5 [87]	635 [91]	646 [74]
N351C	622 [79]	611 [83]	610 [82]	640 [99]	638 [89]	628 [92]	642 [85]
N351E	621 [79]	614 [84]	†	636 [89]	640 [89]	635 [90]	638 [90]
R353E	626 [74]	608 [82]	†	640 [84]	645 [88]	635 [94]	639 [83]
K441A	623,6 [79,2]	608[84,2]	607 [85,4]	639,5 [84]	628,3 [86,6]	634,2 [94]	636 [87,8]

*O erro estimado do pico é ± 2.5 nm. Acima de 620 nm o erro era estimado em ± 3 nm. # As atividades muito mais baixas não permitiram medir os espectros de bioluminescência.

5.3.3.3. Relação dos deslocamentos de espectros de bioluminescência com a Constante de Hammett dos substituintes 6'

Com o intuito de verificar o efeito da tendência de doação de elétrons (refletida pela constante de Hammett) dos substituintes na posição 6' para o anel tiazólico nos espectros de bioluminescência dos amino-análogos em relação a luciferina, comparamos os valores de deslocamentos batocrômicos da luciferase de *P.hirtus* (PxRE) com diferentes amino-análogos e as constantes de Hammett. Sendo todos os valores das constantes de Hammett dos substituintes negativos (**Tab. 12**), todos eles caracterizam-se por serem bons doadores de elétrons.

O maior valor absoluto da constante de Hammett é do substituinte pirrolidina, que em teoria é o que tem maior poder de doar elétrons para a porção tiazólica e, por conseguinte, resultaria no espectro mais deslocado para o vermelho. De fato, este análogo teve o espectro mais deslocado para o vermelho.

Levando-se em consideração apenas a constante de Hammett, a ordem decrescente de deslocamento batocrômico seria: (1) Pirrolidina, (2) Dimetil-amina, (3) fenolato (substrato original), (4) amino e (5) Morfolina (**Tab. 12**). Entretanto, os análogos 6'-Amino-luciferina,

6'-Amino-5-dimetil-luciferina, 6' Morpholino-luciferina) não seguiram essa tendência. Os análogos 6'-Amino-luciferina e 6'-Amino-5-dimetil-luciferina, que possuem o substituinte amino, causaram em alguns casos deslocamentos consideráveis (7 a 21 nm) para o azul, ao invés do vermelho (**Fig. 31**). Por outro lado, o análogo 6'- Morpholino-luciferina resultou em deslocamentos batocrômicos consideráveis, apesar de ter a menor tendência em doar elétrons. Isso se deve, em parte, ao efeito estérico do substituinte volumoso.

Por outro lado, não houve uma correlação entre atividade e constante de Hammet. Dessa forma, conclui-se que o substituinte o pirrolidina é o que possui a melhor relação entre efeito estérico com a luciferase de PxRE e capacidade doadora de elétrons, resultando em uma combinação com alta atividade bioluminescente e emissão mais deslocada para o vermelho distante.

Tabela 12. Relação entre deslocamento dos espectros de bioluminescência luciferase de *P.hirtus* e seus mutantes e a constante de Hammet.

Nome do substituinte	Constante de Hammet	Pico de emissão em PxRE
(1) Pirrolidina	-0,90	623 → 644
(2) Dimetilamina	-0,83	623 → 639
(3) Fenolato	-0,81	623
(4) Amino	-0,66	623 → 615
(5) Morfolina	-0,50	623 → 634

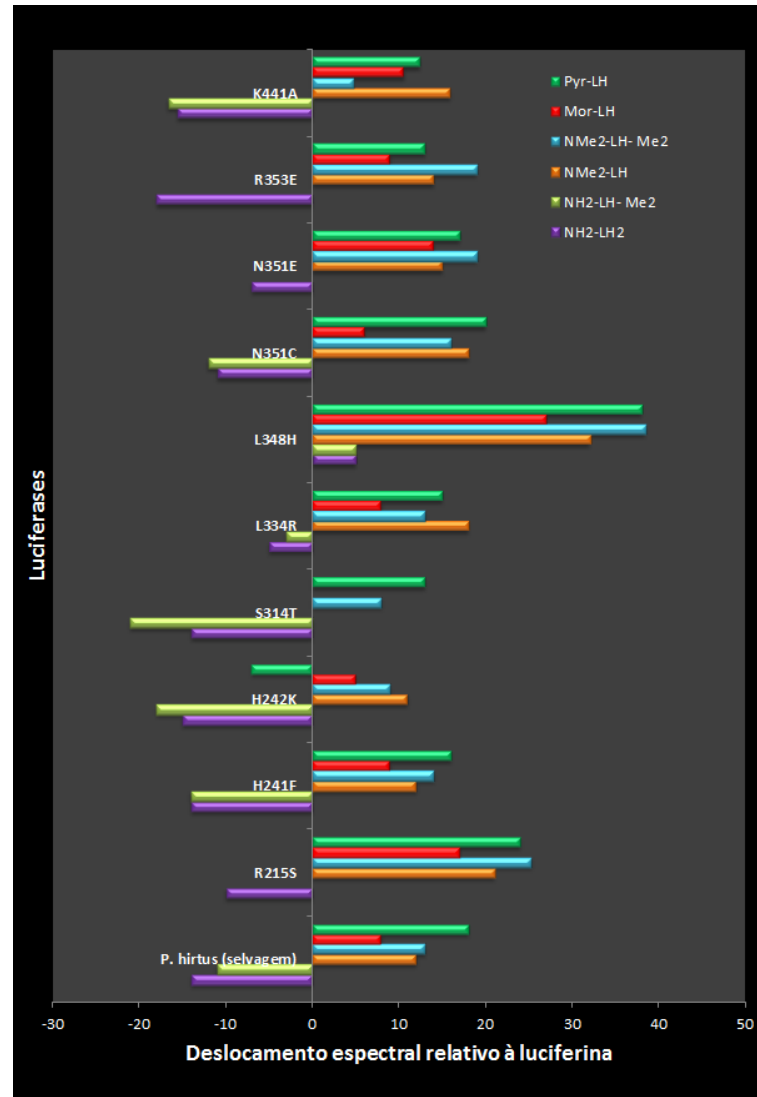


Figura 31. Gráfico de barras da variação espectral em relação ao espectro obtido com luciferina. Barras situadas à esquerda no eixo das coordenadas (y), representam deslocamento para a região azul do espectro, enquanto as barras situadas à direita representam deslocamento espectral batocrômico. Fonte: autor, 2019.

5.4. Modelagem do sítio de ligação da luciferina de *Phrixothrix hirtus* e outras luciferases

As maiores atividades específicas da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixothrix hirtus* (PxRE) com os amino-análogos mostrados anteriormente, indicam que esta luciferase apresenta um sítio ativo distinto, com uma cavidade maior na porção do grupo fenol da luciferina, podendo acomodar análogos de luciferina com grandes substituintes na posição 6'.

Assim, para melhor entendermos a relação entre estrutura do sítio-ativo destas luciferases e atividade bioluminescente com amino-análogos, realizamos em colaboração com o Prof. Paulo S. Oliveira do LnBio, a modelagem do sítio-ativo de três luciferases que emitem

diferentes cores de luz [*P.termitilluminans* (538 nm), *P. vivianii* (548 nm), e *P.hirtus* (626 nm)] complexadas com um análogo de adenilato de luciferina, DLSA (5'-O-[N-(desidroluciferil)-sulfamoil]adenosina).

De fato, a modelagem mostrou que as três luciferases apresentam cavidades de ligação do grupo fenolato com tamanhos distintos (**Fig. 32**). A luciferase do elaterídeo *P. termitilluminans* (Pte), que possui a menor cavidade de ligação do grupo fenolato, exibe menor atividade com esses análogos. A luciferase de *Phrixothrix viviani* (PxGR) também de emissão verde tem uma cavidade maior. Finalmente, a luciferase de PxRE, a mais ativa entre todas com os amino-análogos volumosos, mostrou a maior cavidade.

Uma análise mais detalhada mostrou que nesta cavidade a cadeia lateral do resíduo na posição 348 tem uma maior contribuição para o tamanho da cavidade. Na luciferase de *P.termitilluminans* (Pte), a cavidade é preenchida pela grande cadeia lateral de imidazol da H348 (**Fig. 32**). Na luciferase de PxGR a cavidade maior é preenchida pela isoleucina I348. Finalmente, na luciferase de PxRE, que tem a menor cavidade, encontra-se a cadeia lateral da L348, que embora tenha o mesmo tamanho global da cadeia lateral da Isoleucina encontrada na luciferase de PxGR, assume uma orientação diferente, abrindo espaço para cavidade de ligação do fenolato da oxiluciferina. Apesar da cadeia lateral da posição 348 ter maior contribuição no tamanho da cavidade de ligação do fenolato, outras substituições na região também podem contribuir também com este volume, entre elas T311, R215 e I283.

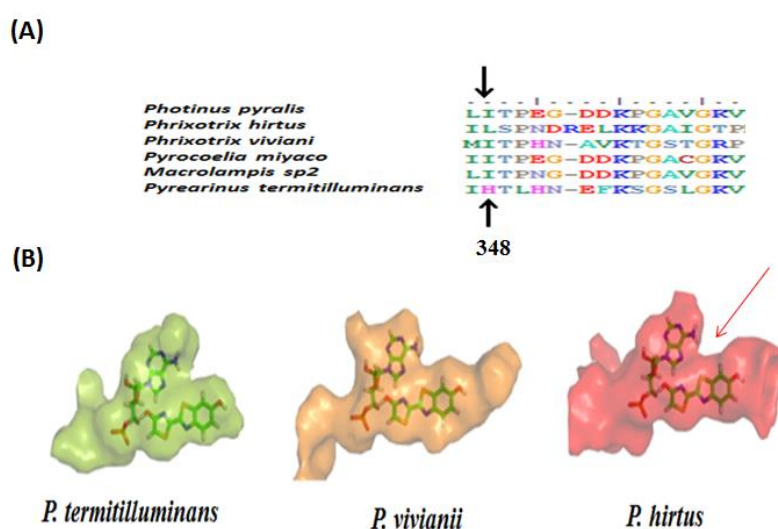


Figura 32. (A) Multialinhamento de luciferases de besouros mostrando a posição 348, (B) Sítio ativo das luciferases com o análogo luciferina (DLSA) mostrando uma cavidade maior no local do grupo 6' fenolato da oxiluciferina. Fonte: BEVILAQUA *et al.*, 2019.

5.5. Efeito da mutação L348H

Considerando que as substituições naturais na posição 348 afetam o tamanho da cavidade de ligação ao fenolato da oxiluciferina, decidimos investigar se a mutação nesta posição afeta de fato a atividade dos amino-análogos e as cores de bioluminescência.

Na luciferase emissora de luz vermelha de PxRE substituímos a L348 pela histidina, que é encontrada nas luciferases de elaterídeos, que exibem as atividades mais baixas com amino-análogos. A mutação L348H resultou em uma grande queda da atividade com amino-análogos em relação à luciferina (~ 4%) à da luciferase do tipo selvagem (**Fig. 33A**). Além disso, a mutação também resultou em um grande deslocamento hipsocrômico de 20 nm, resultando em um mutante emissor de luz laranja (**Fig. 33B**).

Por outro lado, a mutação reversa na luciferase de *P.termitilluminans*, H348L, diminuiu consideravelmente a atividade de ambas a D-luciferina e 6'-aminoanálogos, e causou um desvio para o vermelho de ~ 15 nm com a luciferina.

Analizamos também o efeito da guanidina, que é conhecida por deslocar o espectro da luciferase do tipo selvagem de *P.hirtus* e da maioria dos seus mutantes para o azul, simulando a falta de uma arginina na posição 334 (L334), que é crítica para emissão de luz mais deslocada para o azul em luciferases verde-amarelas (VIVIANI *et al.*, 2016). A maioria das luciferases que emitem luz verde-amarela exibem arginina na posição correspondente (R337), que é importante para estabelecer uma ponte salina com E311, fechando o sítio ativo e estabelecendo uma interação eletrostática com oxiluciferina excitada, favorecendo a emissão de luz verde (VIVIANI *et al.*, 2016). Entretanto, para o mutante L348H, a guanidina não causou nenhum efeito nos espectros de bioluminescência (**Fig. 33A**), indicando que a histidina nesta posição remove o efeito da guanidina.

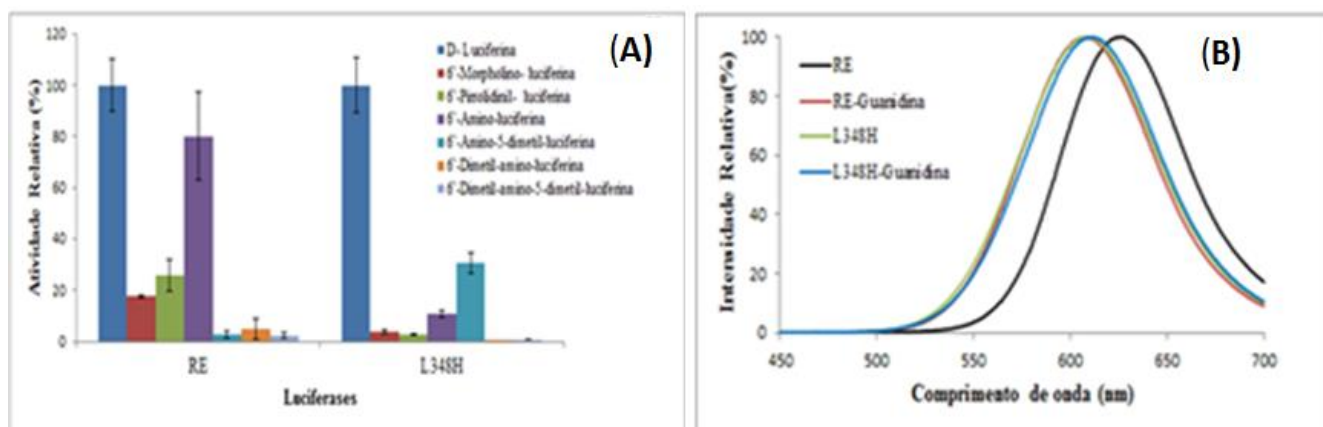


Figura 33. (A) Atividades relativas do mutante L348H com os 6' Amino-análogos em comparação à luciferase selvagem de *P.hirtus*, (B) Espectros de bioluminescência da luciferase selvagem de *P.hirtus* e seu mutante L348H na presença e ausência de sulfato de guanidina *hirtus*. Fonte: Adaptado de BEVILAQUA *et al.*, 2019.

6. DISCUSSÃO

6.1. Os resíduos do sítio de ligação da luciferina são importantes para a ligação e catálise

Como esperado, a mutação da maioria dos resíduos conservados ou invariantes do sítio de ligação da luciferina (SLL), que circundam as porções tiazólica e benzotiazólica da luciferina, afetou o K_M e as constantes catalíticas, indicando que estes são importantes para ligação ao substrato e catálise na luciferase de PxRE. Estes resíduos são em geral invariantes ou conservados entre as luciferases de besouros que emitem diferentes cores de bioluminescência, portanto, não são necessariamente envolvidos na determinação dos espectros da bioluminescência. Apesar disso, nas luciferases de vagalumes lampirídeos, mutações de vários desses resíduos resultaram em desvios para o vermelho (VIVIANI e OHMIYA, 2000; BRANCHINI *et al.*, 2001, 2003; VIVIANI *et al.*, 2002, 2006).

A maioria mutações nas porções tiazólicas e benzotiazólica do SLL da luciferase PxRE teve impactos negativos (vide Tab. 4), confirmando a sua importância para ligação da luciferina e catálise da reação. Somente os mutantes H242K, S314T e L334R (H245, S317 e R337 na luciferase de *P. pyralis*) tiveram eficiências catalíticas aumentadas.

O resíduo invariante H245 na luciferase de *P. pyralis* (correspondente a H242 da luciferase de PxRE) já foi demonstrado ter papel catalítico na estabilização do intermediário pentavalente na parte tiazólica do SLL e, possivelmente, atuando como a base hipotética que abstrairia o próton C4, estabilizando o carbânion durante a etapa oxidativa (BRANCHINI *et*

al., 1998, 2003). Também foi demonstrado que este resíduo desempenha uma função importante na discriminação estérica do substrato, D-luciferina, contra L-luciferina (VIVIANI *et al.*, 2013; PRADO *et al.*, 2016). A substituição H242K na luciferase de PxRE aumentou a constante e a eficiência catalíticas oxidativa, indicando que a lisina nessa posição aumenta a taxa de reação de oxidação. A inserção da lisina, um aminoácido de menor volume e maior comprimento, mas com carga positiva mais permanente em pH fisiológico, pode ajudar a estabilizar a carbânion C4 durante a etapa de oxigenação, aumentando a constante de oxidação.

A mutação S314T, apesar de conservadora, substituiu um resíduo menor por outro um pouco maior e um pouco menos polar, diminuindo levemente o tamanho da cavidade entre os anéis da porção benzotiazólica e tiazólica da luciferina, possivelmente contribuindo para aumentar a afinidade pela luciferina e estabilizar a luciferina perto de outros grupos catalíticos responsáveis pela reação oxidativa, aumentando a eficiência catalítica.

6.2. O sítio de ligação da luciferina da PxRE é menos interativo durante a emissão

Apesar dos efeitos cinéticos, nenhuma das mutações (H241F, H24K, S341T) afetaram o espectro de bioluminescência da luciferase de PxRE (**Tab. 11**), similarmente às mutações realizadas no sítio de ligação da luciferina publicadas anteriormente (R215S, H242A, A243G) (VIVIANI e OHMIYA, 2000; VIVIANI *et al.*, 2002, 2007). A ausência de efeito da maioria das mutações nos espectros de bioluminescência da luciferase emissora de luz vermelha PxRE, em contraste com outras luciferases emissoras de luz verde-amarelada, nas quais as mutações correspondentes resultam em desvios para o vermelho ou até mutantes vermelhos (BRANCHINI *et al.*, 2001, 2003; VIVIANI e OHMIYA, 2000; VIVIANI *et al.*, 2002, 2006), indicam que a interação destes resíduos com a oxiluciferina excitada é importante para a emissão de luz verde, mas não para a emissão de luz vermelha.

Como a etapa de emissão de luz ocorre logo após a etapa oxidativa, a falta de efeito da maioria das mutações no sítio de ligação da luciferina no espectro de bioluminescência da luciferase PxRE indica que, embora estes resíduos sejam importantes para a ligação da luciferina nas etapas catalíticas, durante a etapa de excitação e emissão de luz as cadeias laterais destes resíduos não interagem com a oxiluciferina excitada. Isso está de acordo com estudos não-enzimáticos com quimioluminescência de adenilato de luciferina, que mostraram que a quimioluminescência vermelha requer um microambiente menos estruturado e mais relaxado do que aquele requisitado para a quimioluminescência esverdeada (VIVIANI e

OHMIYA, 2006). Estudos com as sondas fluorescentes TNS, ANS e amino-análogos, mostraram que o sítio de ligação da luciferina é consideravelmente mais polar para a luciferase de PxRE em relação a outros luciferases emissoras de verde-amarela, inclusive aquela do vagalume *Amydetes* investigada aqui, concordando com a hipótese de um sítio de ligação da luciferina menos interativo nesta luciferase (KAKIUCHI *et al.*, 2017; VIVIANI, *et al.*, 2014).

6.3. Interações no lado benzotiazólico do sítio de ligação da luciferina determinam as cores da bioluminescência

As únicas mutações que até agora afetaram cor de bioluminescência na luciferase PxRE, foram T226N, C311T e L334R (VIVIANI *et al.*, 2002, 2016, 2018), que estão localizadas na parte inferior do sítio de ligação da luciferina (lado benzotiazólico), indicando que essa porção do sítio-ativo é realmente crítica para modular as cores de bioluminescência. Isto foi corroborado por estudos mutagênese com outras luciferases por nosso e outros grupos de pesquisa (VIVIANI *et al.*, 2007, 2008; MORADI *et al.*, 2009). Por outro lado, o deslocamento hipsocrômico causado por essas mutações na luciferase emissora de luz vermelha, indica que, de alguma forma, a mutação destes resíduos pode estabelecer novas interações entre essa porção do sítio de ligação da luciferina (SLL) e o grupo fenolato de oxiluciferina excitada, aumentando a energia do seu estado excitado.

Os resultados vêm a corroborar nossos resultados recentes com luciferases de lampirídeos, os quais mostram que pH e metais pesados também afetam esse lado do SLL, modulando o espectro de bioluminescência (VIVIANI *et al.*, 2016, 2018). A mutação L334R, por exemplo, foi previamente mostrada alterar o espectro da luciferase de PxRE por conta do reestabelecimento de uma ponte salina com E308 (E311 na luciferase do lampirídeo de *P. pyralis*) e, provavelmente, por estabelecer uma interação eletrostática com fenolato de oxiluciferina excitada, interação esta que estaria naturalmente presente em luciferases emissoras de luz verde-amarela (VIVIANI *et al.*, 2016, 2018). A nova interação formada entre E308 e R334 na luciferase de PxRE, pode ajudar a fechar e comprimir o fundo do sítio de ligação da luciferina, alinhando a oxiluciferina em direção a outros grupos catalíticos, contribuindo para o aumento das eficiências catalíticas, principalmente a oxidativa. Muito recentemente, Hall *et al.* (2018) também obtiveram uma luciferase emissora de vermelho (617 nm) mediante a mutação R334S em uma luciferase de elaterídeo, reforçando nossa hipótese

proposta anteriormente sobre a importância do R334 para a emissão de luz verde nas luciferases de besouros (VIVIANI *et al.*, 2005, 2016, 2018).

6.4. O tamanho da cavidade influencia as interações específicas com o grupo fenolato da oxiluciferina excitada

Os resultados mostrados aqui também indicam que o tamanho da cavidade é um fator determinante na modulação da cor da bioluminescência. O deslocamento batocrômico causado pelos 6´amino-análogos (principalmente 6´- Pirrolidinil- luciferina) é consistente com as propriedades de doação de elétrons desses substituintes e também atestam a existência de uma maior cavidade no SLL que permite uma maior mobilidade do grupo fenolato da oxiluciferina excitada, com perda de energia vibracional. Na cavidade maior observada na luciferase PxRE, há mais espaço para as moléculas de água e para a mobilidade de oxiluciferina excitada, polarizando o ambiente e finalmente explicando a falta de interações específicas das cadeias laterais dos resíduos do SLL com o grupo fenolato de oxiluciferina excitada, durante a etapa de emissão de luz.

Por outro lado, uma cavidade menor, como aquela encontrada nas luciferases de besouros emissores de luz verde-amarelada, promove interações mais fortes entre o fenolato da oxiluciferina excitada e os grupos do sítio ativo.

6.4.1. A cadeia lateral da posição 348 contribui para o tamanho da cavidade e a para a determinação dos espectros de bioluminescência

Os resultados das atividades dos amino-análogos volumosos, adicionados ao efeito da mutação L348H, na luciferase de PxRE, em contraposição aos obtidos com as demais luciferases e à mutação reversa H348L na luciferase de *P. termitilluminans* (Pte), indicam que o tamanho e a orientação da cadeia lateral na posição 348 é crítica para acomodação de amino-análogos. A orientação e menor tamanho da cadeia lateral de L348 na luciferase vermelha de PxRE justifica a acomodação dos grandes 6´amino-análogos substituídos, explicando a maior atividade bioluminescência da luciferase de PxRE em relação a outras luciferases de besouros (**Fig. 34**). Por outro lado, a grande cadeia lateral do grupo imidazol da H348 em luciferases de elaterídeos dificulta a acomodação dos grandes substituintes amino dos análogos.

O deslocamento hispocrômico de 20 nm causado pela mutação L348H, na luciferase de PxRE, e os 15 nm de deslocamento batocrômico na mutação inversa, H348L, na luciferase verde de Pte (**Tab. 9**), também indicam que a posição 348 é crítica para a determinação da cor da bioluminescência em luciferases pH-insensitivas. As variações de frequência (cm^{-1}), que são proporcionais às variações de energia associadas com os deslocamentos espectrais causados por estas mutações, apresentaram valores semelhantes, mas em direções opostas (PxRE: $\Delta F_{L348H} = 47 \text{ cm}^{-1}$; e luciferase de Pte: $\Delta F_{H348L} = -47 \text{ cm}^{-1}$), indicando que essas mutações realmente apresentam efeitos antagônicos nas duas luciferases, como esperado.

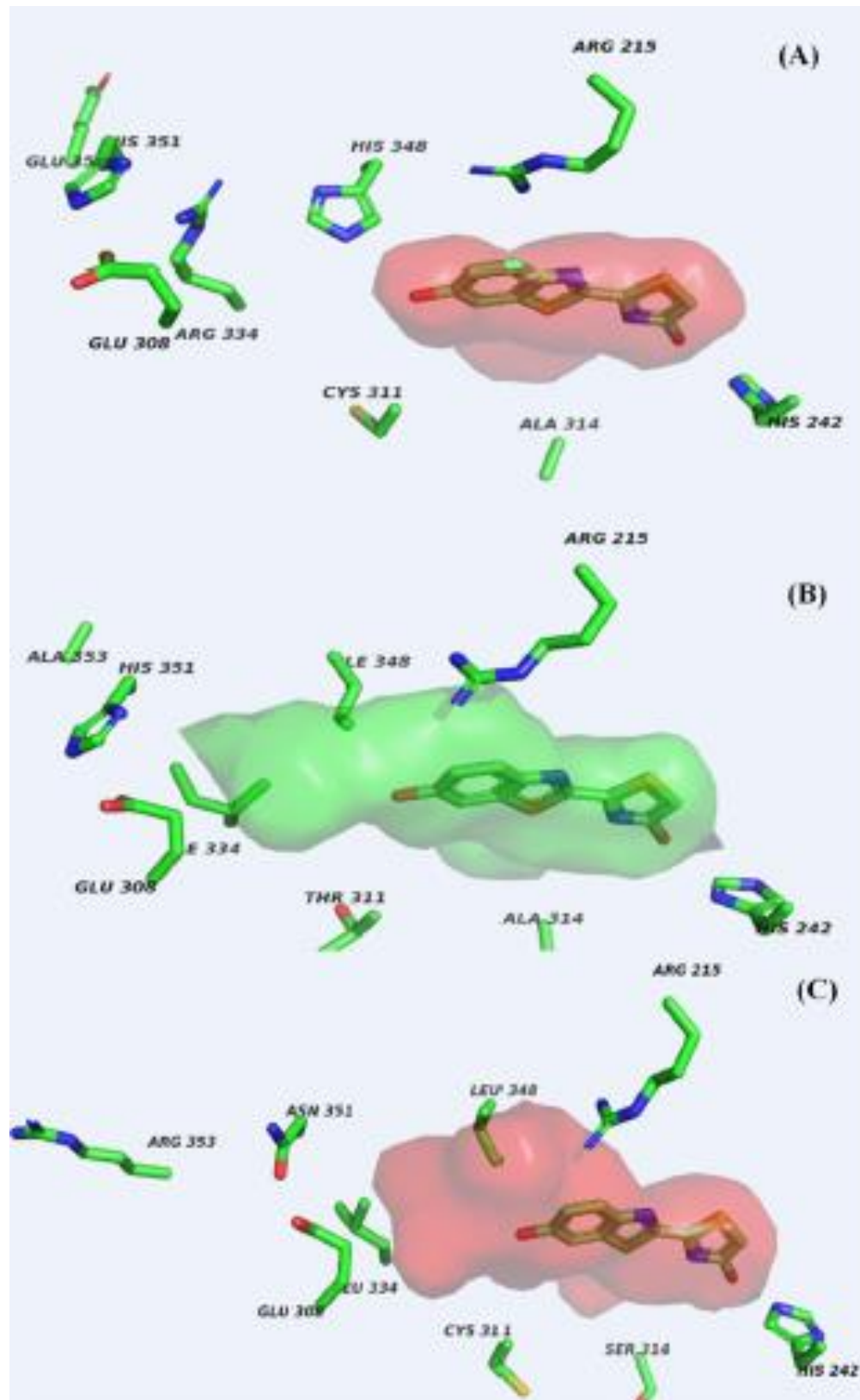


Figura 34. Modelagem de sítio ativo de luciferases de besouros mostrando uma maior cavidade próximo ao grupo fenolato da oxiluciferina na luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix hirtus*: (A) luciferase de *Pyrearinus termitilluminans*; (B) luciferase de *Phrixotrix vivianii*; (C) luciferase vermelha de *P. hirtus*. Fonte: BEVILAQUA *et al.*, 2019

6.4.2. Os espectros de amino-análogos com mutantes da luciferase PxRE evidenciam interações importantes

Os efeitos diferenciais dos amino-análogos nos espectros de bioluminescência da luciferase de PxRE, bem como a ausência de efeito da guanidina nos mutantes L334R e L348H em relação à luciferase de tipo selvagem, fornecem pistas importantes sobre as interações entre a oxiluciferina excitada e o sítio de ligação da enzima e o mecanismo subjacente à determinação da cor da bioluminescência nas luciferases de besouros.

O pequeno desvio anômalo para o vermelho (~ 5 nm) observado para o mutante L348H com NH₂-LH₂ (**Tab.11**), quando comparado à luciferase selvagem e a outros mutantes que exibem deslocamentos hipsocrômicos (> 10 nm) com esse análogo, sugerem o estabelecimento de uma nova interação entre a cadeia lateral de imidazol do H348 e o grupo amino de NH₂-LH₂, que de outra forma estaria ausente na cavidade maior encontrada na enzima selvagem.

A guanidina, é conhecida por causar deslocamento hipsocrômico nos espectros na luciferase de PxRE e na maioria de seus mutantes, simulando uma arginina perdida (L334 em PxRE e o respectivo R337 nas luciferase de lampirídeos). A falta do deslocamento hipsocrômico no mutante L348H na presença de guanidina, indica que a cadeia lateral maior da histidina pode de fato excluir a guanidina dessa cavidade, substituindo sua interação com fenolato de oxiluciferina.

A orientação e tamanho das cadeias laterais de R215 e V284 e a ligação peptídica de C311, cujas mutações foram previamente demonstradas serem importantes para cores de bioluminescência em diferentes luciferases de besouros (VIVIANI e OHMIYA, 2000; NAKATSU *et al.* 2006; VIVIANI *et al.*, 2013), também contribuem tanto para aumentar o tamanho da cavidade do grupo fenolato na luciferase de PxRE, como no possível estabelecimento de interações específicas com os substituintes 6' dos amino-análogos.

O resíduo invariante R215 (R218 na luciferase de *P. pyralis*) já havia sido demonstrado ser importante para a bioluminescência verde em PxGR e *Photinus pyralis*, mas não para emissão vermelha na luciferase PxRE (VIVIANI e OHMIYA, 2000; VIVIANI *et al.*, 2006). Sugerimos nestes trabalhos publicados que, de alguma forma, o grupo guanidina da cadeia lateral R215 estaria deslocado em relação ao grupo fenolato da oxiluciferina no caso específico da luciferase PxRE, enquanto que nas luciferases emissoras de luz verde como, PxGR e *P.pyralis*, a cadeia lateral de R215 estaria orientada mais próxima do fenolato de oxiluciferina. Os estudos de modelagem apresentados aqui mostraram que, de fato, a cadeia

lateral R215 está orientada perpendicularmente ao fenolato de oxiluciferina na luciferase de PxRE, enquanto orientação é mais paralela na luciferase PxGR (vide Fig. 34). Adicionalmente, na luciferase PxGR, a rotação da cadeia lateral R215 e a substituição de L348 por isoleucina contribuem para reduzir o tamanho desta parte da cavidade.

Os espectros de bioluminescência consideravelmente deslocados para o vermelho no mutante R215S com os 6' amino-análogos, sugerem que a cadeia lateral do resíduo na posição 215 poderia estabelecer uma nova interação com os volumosos substituintes na posição 6' dos análogos, interação esta que estaria ausente com 6' amino-análogos menores ou com o substrato original luciferina.

Com relação à controvérsia sobre o papel das argininas R218 e R337 na ligação do grupo fenolato da oxiluciferina, por Sandalova e Ugarova (1999) e Branchini *et al.* (1998), nossos resultados com luciferases de besouros mostraram que a R334 é essencial para manter uma conformação do sítio-ativo mais fechada e provavelmente estaria envolvida numa interação com o grupo fenolato. Por outro lado, a R218, apesar de ser invariável, nem sempre é essencial para a cor, na medida que somente as luciferases de *P.pyralis* e PxGR tiveram espectros afetados por esta mutação, enquanto que a luciferase emissora de luz verde de Pte, e vermelha de PxRE não tiveram os espectros afetados. Nossos resultados sugerem que estas argininas desempenhem papéis compensatórios. Na luciferase de PxRE em que existe a falta das duas argininas (R218- está não alinhada ao grupo fenolato) e L334, essa porção benzotiazólica do SLL fica mais relaxada emitindo luz vermelha. Notavelmente, embora na luciferase de PxGR também não haja arginina na posição 334 (I334), a cadeia lateral do resíduo R218 está orientada em relação ao grupo fenolato, possivelmente compensando a perda da arginina na posição 334 e resultando na emissão de luz verde verde.

6.5. Uma proposta de mecanismo de modulação dos espectros de bioluminescência pelas luciferases de *Phrixotrix*

Tomados em conjunto, nossos resultados confirmam a importância do fundo do SLL (porção benzotiazólica) na determinação da cor da bioluminescência nas luciferases de besouros, e indicam que o tamanho da bolsa de ligação do fenolato de oxiluciferina desempenha um papel crítico na modulação das cores de bioluminescência.

No caso de luciferases de lampirídeos pH-sensitivas, já havíamos mostrado que metais pesados e o pH afetam as pontes salinas entre E311/R337 (portão interno) e H310/E354 (portão externo), que fecham eletrostaticamente essa parte do sítio de ligação da oxiluciferina

(VIVIANI *et al.*, 2016; GABRIEL e VIVIANI, 2016; VIVIANI *et al.*, 2018), modulando o tamanho e a rigidez dessa cavidade, e a capacidade de reter o próton liberado pelo grupo fenol da oxiluciferina excitada próximo ao grupo fenolato em um estado de alta energia (**vide Fig. 13 e 14 na introdução**).

No caso singular da luciferase PxRE, existe uma cavidade de ligação ao fenol naturalmente maior e mais polar nessa porção do sítio de ligação da luciferina, reduzindo as interações específicas entre o fenolato da oxiluciferina excitada e o sítio de ligação da luciferina, conseqüentemente, reduzindo a capacidade de reter o próton liberado pela oxiluciferina excitada próximo ao seu fenolato em um estado de alta energia e, conseqüentemente, permitindo que a oxiluciferina excitada relaxe para um estado de menor energia, promovendo a emissão de luz vermelha (**Fig. 35; Fig 36**). Por outro lado, nas luciferases pH-insensíveis emissoras de luz verde-amarelada, essa cavidade é naturalmente preenchida por cadeias laterais maiores, excluindo água, aumentando as interações ácido-base e eletrostáticas específicas com a oxiluciferina excitada, reterdo o próton liberado da oxiluciferina excitada próximo de seu fenolato em um estado de alta energia, deslocando o espectro de emissão para o azul (**Fig. 35; Fig 36**).

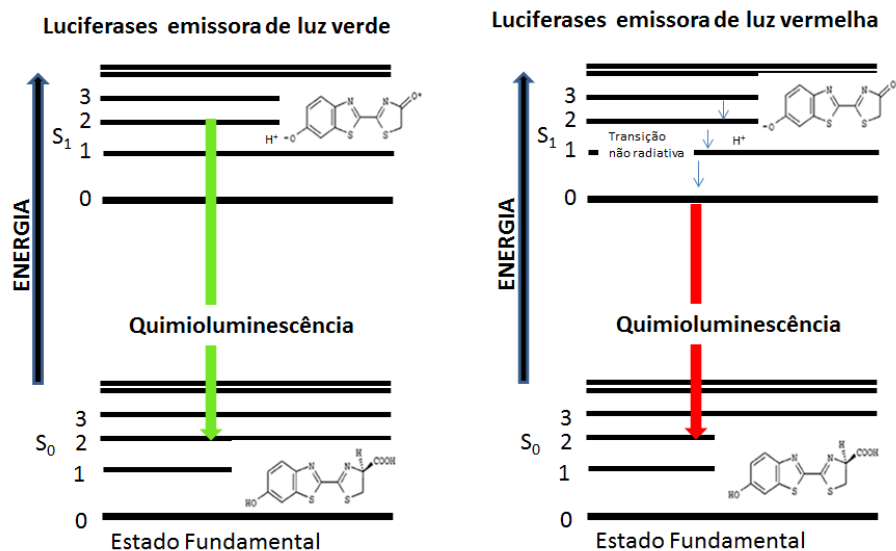


Figura 35. Diagrama de Jablonski representando o comportamento da oxiluciferina nas luciferases emissoras de luz verde e vermelha. Fonte: autor, 2019.

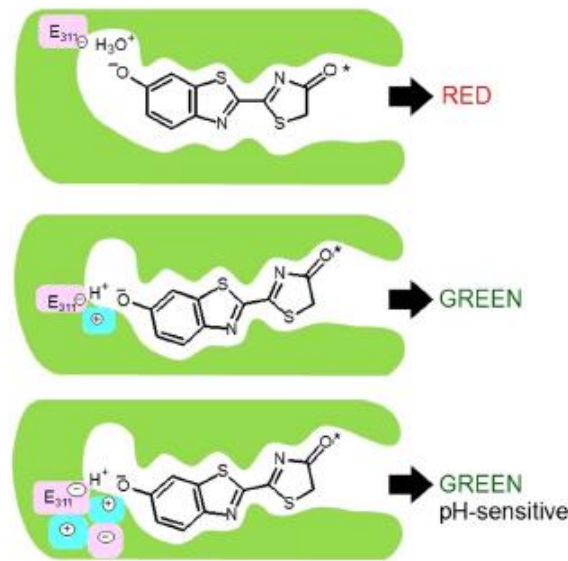


Figura 36. Mecanismo proposto para modulação da cor da bioluminescência no sítio ativo da luciferase de PxRE e luciferases emissoras de luz verde. A ponte salina formada entre os resíduos E311 e R337 desempenham papéis estruturais e catalíticos determinação da cor da bioluminescência, porque estabiliza uma conformação hidrofóbica fechada que promove uma interação ácido-base mais forte com o fenolato excitado, resultando na emissão verde-amarela na maioria das luciferases. Neste caso o resíduo E311 aceita o próton da oxiluciferina excitada e a estabiliza. Em luciferases pH-sensíveis, quando por algum motivo (microambiente ácido, inserção de metal divalente) essa interação é desfeita, a emissão passa a ser vermelha. A substituição natural correspondente pela leucina (L334) na luciferase de emissão de luz vermelha de PxRE é responsável pelo seu espectro muito deslocado para o vermelho, devido à perda de interação do sítio ativo no fechamento com E311
Fonte: BEVILAQUA *et al.*, 2019.

Portanto, durante a evolução, a estrutura exclusiva do sítio de ligação da luciferase PxRE adaptou-se a um compromisso entre dois fatores: (I) a acomodação apertada das partes tiazólica e benzotiazólica da luciferina dentro do sítio de ligação da luciferina para promover eficientemente as reações de adenilação e oxidação, aumentando a taxa de emissão de luz e (II) um aumento do tamanho da cavidade da bolsa de ligação do grupo fenolato durante a etapa emissiva, relaxando e polarizando o ambiente ao redor do grupo fenolato da oxiluciferina excitada, produzindo luz vermelha. Dessa forma, a bioluminescência vermelha na luciferase de PxRE não é uma questão de interações específicas envolvidas nesse processo, mas sim o resultado da falta destas interações.

6.6. Um novo sistema luciferina-luciferase deslocado para o vermelho distante para bioimagem

Um resultado de interesse aplicado resultante do desenvolvimento desta tese, foi a seleção, pela primeira vez, de uma combinação da luciferase PxRE e/ou seus mutantes, com 6'-aminoanálogos que produzem bioluminescência deslocada para o vermelho-distante (> 640

nm) com atividade relativamente alta quando comparada a outras luciferases de besouros. Isso também pode ser demonstrado *in vivo* com colônias da bactéria *E. coli* que expressam a luciferase de PxRE (**Fig. 37**). Até então, nenhuma mutação foi capaz de deslocar o espectro para o vermelho distante nesta luciferase naturalmente emissora de luz vermelha.

Combinações luciferina-luciferase que emitem no vermelho-distante (664 a 758 nm) foram obtidas recentemente usando análogos de naftil-luciferina em conjunto a uma luciferase modificada de elaterídeo (KUCHIMARU *et al.*, 2016; KAKIUCHI *et al.*, 2017; HALL *et al.*, 2018), todavia a atividade bioluminescente foi entre 5000 a 10.000 vezes menor quando comparado à luciferina, o substrato selvagem (HALL *et al.*, 2018) Dessa forma, embora a combinação da luciferase PxRE com os análogos 6'-aminoluciferina modificados ainda emita em uma região menos deslocada para o vermelho-distante (FR ou Far-red) do que o sistema usando naftil-luciferina ou akalumine, ainda assim fornece uma combinação relativamente mais eficiente em termos de atividade, pois a atividade bioluminescente com estes análogos é da faixa de 10-25% em relação à luciferina selvagem. Além disso, este sistema ainda tem potencial para o desenvolvimento ulterior de novas combinações que sejam mais ativas e com maior desvio para o vermelho distante (> 640 nm), condições essas adequadas para o emprego em técnicas de bioimagem em tempo real em células de mamíferos e tecidos ricos em hemoglobina e melanina.

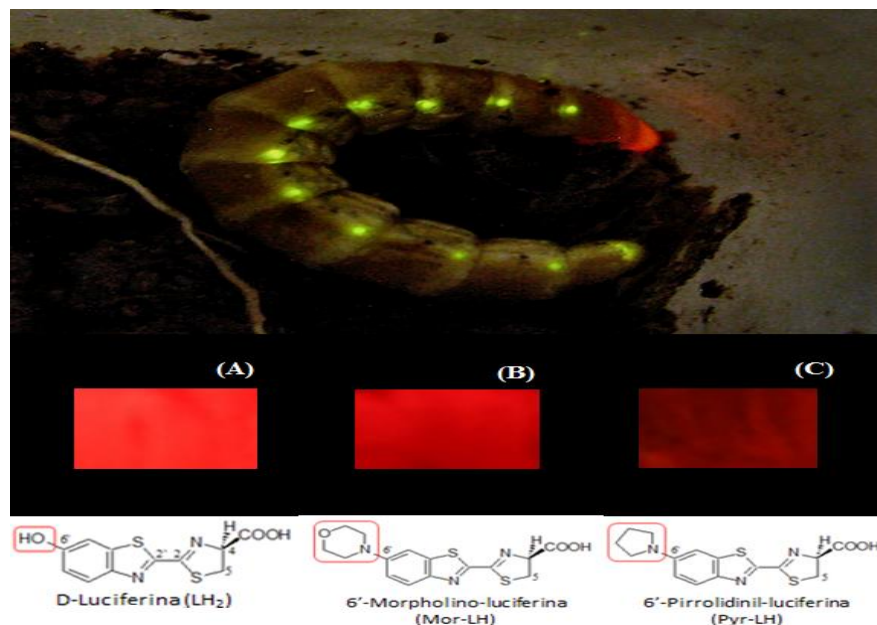


Figura 37. (Painel superior) Larva do tenzinho *Phrixothrix hirtus* exibindo suas lanternas laterais que emitem bioluminescência verde e cabeça que emite luz vermelha e, (Painel inferior) bioluminescência vermelha e vermelha-distante de *E. coli* expressando luciferase de PxRE na presença de (A) D-luciferina; (B) 6'-morfolino-luciferina e (C) 6'-pirrolidinil-luciferina. Fonte: BEVILAQUA *et al.*, 2019.

7. CONCLUSÕES

A luciferase de *Phrixotrix* é a única luciferase que naturalmente emite luz vermelha (623 nm). Por esta razão, além de ser um modelo de estudo ideal para entender como as luciferases de besouros emitem diferentes cores de bioluminescência, ela também apresenta potencial aplicação como reagente analítico e principalmente gene repórter para bioimagem em tecidos de mamíferos e amostra pigmentadas. Entretanto, esta enzima é em geral menos eficiente que outras luciferases emissoras de luz verde-amarela, e seu espectro, apesar de ser o único na região do vermelho, ainda está longe de ser ideal para aplicações em bioimagem que exigem emissões no vermelho-distante (FR) e infravermelho próximo (NIR). Além disto, apesar de vários estudos, ainda não estava claro como a estrutura desta luciferase determina o espectro de emissão no vermelho.

No trabalho desta tese, essencialmente mostramos que o sítio de ligação da luciferina (SLL) da luciferase PxRE é menos interativo durante a etapa de emissão de luz, e apresenta uma maior cavidade de ligação do grupo fenolato. Podemos sumarizar as principais conclusões abaixo:

1. O impacto da maioria das mutações de resíduos no SLL nas afinidades para os substratos e eficiências catalíticas, e a respectiva falta do efeito nos espectros de bioluminescência, indicam que a luciferase emissora de luz vermelha de PxRE exibe um sítio ativo diferenciado, mais interativo durante as etapas catalíticas, e consideravelmente menos interativo durante a etapa de emissão de luz do que as demais luciferases que emitem luz verde-amarela.
2. As únicas mutações que afetaram o espectro de bioluminescência estão localizadas no assoalho do SLL próxima ao grupo fenolato, e deslocaram o espectro para o azul, indicando que o estabelecimento de interações específicas com a oxiluciferina excitada nesta parte do sítio-ativo são críticas pra modular os espectros de bioluminescência.
3. A maior atividade de bioluminescência desta luciferase com os 6' amino-análogos em relação a outras luciferases e estudos de modelagem mostraram que esta enzima apresenta uma cavidade de ligação do grupo fenolato na porção benzotiazólica do sítio de ligação maior do que outras luciferases emissoras de luz verde-amarela.

4. Nesta cavidade, o tamanho e a orientação da cadeia lateral do resíduo 348 são críticos para a acomodação de 6' amino-análogos e para a modulação das cores de bioluminescência.
5. Na luciferase de PxRE, a maior cavidade diminui a rigidez e aumenta a polaridade, reduzindo as interações específicas com a oxiluciferina excitada e a capacidade de reter o próton liberado pelo grupo fenol da oxiluciferina no estado excitado, diminuindo a energia entre os estados excitado e fundamental, resultando na emissão de luz vermelha.
6. Nas luciferases emissoras de luz verde-amarela, cavidades menores, mais rígidas e menos polares, favorecem interações específicas, e comprimem o próton liberado pela oxiluciferina excitada próximo ao grupo fenolato, em um estado de alta energia, resultando na emissão de luz mais deslocada para o azul.
7. A maior atividade de bioluminescência e os espectros mais deslocados para a região do vermelho distante para a luciferase emissora de luz vermelha de PxRE fornecem uma nova e promissora combinação luciferase/substrato para fins de bioimagem em células e tecidos de mamíferos.

8. PERSPECTIVAS

O presente projeto permitiu a melhor compreensão da estrutura diferenciada do sítio ativo da luciferase emissora de luz vermelha de *P.hirtus* em relação às demais luciferases, abrindo a possibilidade de modificá-lo para produzir luciferases mais eficientes. Além disso, há uma perspectiva para o desenvolvimento de combinações da luciferase de PxRE com amino-análogos emissoras de luz na região do vermelho distante para finalidades de bioimageamento. Também foi aberta a perspectiva de determinação de rendimento quântico da luciferase emissora de luz vermelha de PxRE e seus mutantes com os amino-análogos, após estágio BEPE realizado em colaboração com o Prof. K. Niwa e Y. Ohmiya no AIST no Japão. Este trabalho está sendo continuado em nosso laboratório na UFSCAR.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, W.; LIU, J. C. Alpha-peroxy lactones synthesis and chemiluminescence. **Journal of the American Chemical Society**. v. 94, p. 2894, 1972.

ADAM, W.; BAADER, W. J. 1,2-Dioxetane - synthesis, characterization, stability, and chemi-luminescence. **Angewandte Chemie**, v. 23, 166, 1984.

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.; 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, D. T.; OLIVEIRA, G.; SILVA, J.; VIVIANI, V. 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**. 2016.

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

ANDREU, N.; ZELMER, A.; FLETCHER, T.; ELKINGTON, P. T.; WARD, T. H.; RIPOLL, J.; PARISH, T.; BANCROFT, G. J.; SCHAIBLE, U.; ROBERTSON, B. D.; WILES, S. Optimization of bioluminescent reporters for use with Mycobacteria. **PLoS ONE**, v. 5, p. 1-16, 2010.

ARNOLDI F.G.; DA SILVA NETO A.J.; VIVIANI V.R. Molecular insights on the evolution of the lateral and head lantern luciferases and bioluminescence colors in Mastinocerini railroad-worms (Coleoptera: Phengodidae). **Photochem. Photobiol. Sci.** v. 9, n. 1, p.87-92, 2010.

AST, J. C. *et al.* *Photobacterium kishitanii* sp. Nov., A luminous marine bacterium symbiotic with deep-sea fishes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.57, p.2073-2078, 2007.

BALDWIN, T.O; ZIEGLER, M.M. The biochemistry and molecular biology of bacterial luminescence. **Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes**, ed. F Muller, pp. 467–530, 1992.

BAUER, R.C. *Imaging & Microscopy*, Wiley-vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Git verlag, Weinheim, Germany, p. 32–34, 2013. Disponível em: <<http://bioimaging.unige.ch/application/files/4714/6668/2776/Bioluminescence-microscopy-Bauer.pdf>> Acesso em 26 de Setembro de 2019.

BECHARA, E. J. H.; WILSON, T. Alkyl substituent effects on dioxetane properties. Tetraethyl-, dicyclohexylidene-, and 3,4- dimethyl-3,4-di-*n*-butyldioxetanes. A discussion of decomposition mechanism. **Journal of Organic Chemistry**, v.45, p. 526, 1980.

BECHARA, E. J. H; VIVIANI, V. R. Luzes Vivas na Escuridão: Fatos e Casos. **Rev. Virtual Quim.**, v. 7 (1), p. 3-40, 2014.

BECHARA, ETELVINO J.H. e STEVANI, CASSIUS V. Brazilian Bioluminescent Beetles: Reflections on Catching Glimpses of Light in the Atlantic Forest and Cerrado. **An Acad Bras Cienc.** v.90, p. 664-675, 2017.

BEVILAQUA, V. R.; MATSUHASHI, T.; OLIVEIRA, G. ; OLIVEIRA, P. S. L.; HIRANO, T.; VIVIANI, V. R. . 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, p. 8998, 2019.

BITLER, B. e MCELROY, W.D. Preparation and Properties of Crystalline Firefly Luciferin. **Arch. Biochem. Biophys.** v.72, p.358-368, 1957.

BRANCHINI, B. R.; HAYWARD, M. M.; BAMFORD, S.; BRENNAN, P. M.; LAJINESS, E. J. Chemical synthesis of firefly luciferin analogs and inhibitors. **Photochem. Photobiol.** v.49, p.689–695, 1989.

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

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

BRANCHINI, B. R.; MAGYAR, R. A.; MURTIASHAW, M. H.; PORTIER, N. C. The role of active site residue arginine 218 in firefly luciferase bioluminescence. **Biochemistry**, v: 40 (8), p: 2410-2418, 2001.

BRANCHINI B. R., MURTIASHAW M. H., MAGYAR R. A., PORTIER N.C., RUGGIERO M. C., STROH J. G. Yellow-green and red firefly bioluminescence from 5,5-dimethyloxyluciferin. **J.Am. Chem. Soc.**, v. 124, p: 2112–2113, 2002.

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

BRANCHINI, B. R.; SOUTHWORTH, T.L.; MURTIASHAW, M.H.; MAGYAR, R.A.; GONZALEZ, S.A.; RUGGIERO, M.C.; STROH, J.G. An alternative mechanism of bioluminescence color determination in firefly luciferase. **Biochemistry**, v.43, p. 7255-7262, 2004.

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

BRANCHINI, B. R. *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, B. R.; SOUTHWORTH, T. L., FONTAINE, D. M., DAVIS, A. L.; BEHNEY, C. E.; MURTIASHAW, M. H. A *Photinus pyralis* and *Luciola italica* Chimeric Firefly Luciferase Produces Enhanced Bioluminescence. **Biochemistry**. v.53, n.40, p. 6287-6289, 2014.

BRANCHINI *et al.*, A Firefly Luciferase Dual Color Bioluminescence Reporter Assay Using Two Substrates To Simultaneously Monitor Two Gene Expression Events. v. 8, p. 1-7, 2018.

BRAND, W. e BERNARD W. Investigation of conformational changes. 1967.

CAB. Centro de bioimagem avançada da Dinamarca, University of Copenhagen. Disponível em: <https://cab.ku.dk/what_is_bioimaging/>. Acesso em 22/09/2019.

CADENAS, E. Oxidative stress and formation of excited species. Em Oxidative Stress (Helmut Sies ed.) **Academic Press**. New York, 1985.

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

CAREY e SUNDBERG (2007) In: Spenelli Junior, R. Trabalho de conclusão de Curso para obtenção do grau de bacharel em Química. Estudo do mecanismo de reações de sistemas benzílicos derivados da 4-metil-7-hidroxicumarina, Santo André, SP. 2018. Disponível: <http://ccnh.ufabc.edu.br/arquivos/CENTRAL/4.Ensino/1.Graduacao/TCCs/TCC_Ronaldo-Spinelli-Junior-Final.pdf> Acesso em 05 de Setembro de 2019.

CARRASCO- LÓPEZ, C.; FERREIRA, J. C; LUI, N. M.; SCHRAMM, S.; BERRAUD-PACHE, 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.

CATALANI LH, WILSON T. Electron transfer and chemiluminescence. Two inefficient systems: 1,4-dimethoxy-9,10-diphenylanthracene peroxide and diphenoyl peroxide. **J. Am. Chem. Soc.** v.111, p. 2633–39, 1989.

CHENG, Y.Y e LIU, Y.J. Theoretical Development of Near-Infrared Bioluminescent Systems. **Chem. Eur. J.**, v.24,p. 1 – 14, 2018.

CILENTO, G.; ADAM, W. Photochemistry and photobiology without light. **Photochem. Photobiol.** v.48:361-368, p.1988.

CILENTO, G.; ADAM, W. From free radicals to electronically excited states. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 19, p. 103, 1995.

COLEPICOLO, P.; COSTA,C; BECHARA, E. J. H. Brazilian species of luminescent Elateriade. Luciferin identification and bioluminescence spectra. **Insect Biochem.**, v.16, p. 803-810, 1986.

COMHAIRE, F. H., L. VERMEULEN, L. MONSIEUR AND A. HINTING. Determination of adenosine triphosphate in human semen to estimate the fertilizing potential and to quantify sperm antibodies. **J. Biolum. Chemilum.** v.4, p. 399- 405, 1989.

CONLEY, N. R.; DRAGULESCU-ANDRASI, A.; RAO, J.; MOERNER, W. E. A Selenium Analogue of Firefly D-Luciferin with Red-Shifted Bioluminescence Emission **Angew. Chem. Int.** v.51, p. 3350 –3353, Ed. 2012.

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.

CONTI, E.; STACHELHAUS, T.; MARAHIEL, M. A.; BRICK, P. Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin. **SEMBO J.** **16**, 4174-4183, 1997.

COSTA, C.; S. A. VANIN e P. COLEPICOLO NETO. Larvae of Neotropical Coleoptera. XIV. First Record of Bioluminescence in the family Staphylinidae (Xantholinini). **Revista Brasileira de Entomologia.** 30: 101–104, 1986.

COSTA, C. Estado de conocimiento de los Coleoptera neotropicales. **Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa** (Versão Eletrônica 32), 2003.

COSTA, C.; VANIN, S.A. Coleoptera Larval Fauna Associated with Termite Nests (Isoptera) with Emphasis on the “Bioluminescent Termite Nests” from Central Brazil. **Psyche: A Journal of Entomology**, Cambridge, v. 2010, p. 1-13, 2010.

DAY, J. C.; TISI, L.C.; BAILEY, M. J. Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin. **Luminescence**, v.19, p. 8-20, 2004.

DeLANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. Disponível em: <http://www.pymol.sourceforge.net>, 2002.

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

DeLUCA e McELROY. Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions **Biochemistry**, v.13 (5), p: 921–925, 1974.

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

DENBURG, J. L.; LEE, R. T.; McELROY, W. D. **Substrate-binding properties of firefly luciferase**: I. Luciferin-binding site. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 134, p. 381– 394, 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.

DUNLAP, J.C., HASTINGS, **Biochemistry** 20, 983, 1981. *In*: Viviani, V. R. Luciferases: The light generating enzymes. In *Recent Progress of Bio/Chemiluminescence and Fluorescence Analysis in Photosynthesis*. Cap 1:p 1-16, 2005.

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.

- FRANKS, N.P., JENKINS A., CONTI E., LIEB W.R. AND P. BRICK. Structural basis for the inhibition of firefly luciferase by a general anesthetic. *Biophys. J.* v.75, p. 2205-2211, 1998.
- GABRIEL, G. V. M.; VIVIANI, V. R. Novel application of pH-sensitive firefly luciferases as dual reporter genes for simultaneous ratiometric analysis of intracellular pH and gene expression/location. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 13, p. 1661–1670, 2014.
- GOULD, S.J.; SUBRAMANI, S. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal. Biochem.* v.175,p.5-13. 1988.
- GREEN, A. A. e W. D. MCELROY. Crystalline firefly luciferase. *Biochim. Biophys. Acta.* p.170-176, 1956.
- GROSS S., AND PIWNICA-WORMS D. Spying on cancer: molecular imaging *in vivo* with genetically encoded reporters. *Cancer Cell.* v. 7, p.5–15, 2005.
- GULICK A. M., STARAI A. J., HORSWILL A. R., HOMICK K. M. AND J. C. ESCALANTE- SEMERENA. The 1.75 Å crystal structure of acetyl CoA Synthetase Bound to Adenosine-5'-propylphosphate and Coenzyme A. *Biochemistry.* v.42, p. 2866-2873, 2003.
- HADDOCK, S. H. D. Luminous marine organisms. *Photoproteins in Bioanalysis*, p. 25-47, 2006.
- HADDOCK, S. H.; MOLINE, M. A.; CASE, J. F. *Bioluminescence in the sea.* Ann. Ver. Mar. Sci., v. 2. p.443-93, 2010.
- HALL M. P.; GRUBBER M. G.; HANNA, H R. R.; JENNES-CLOUGH M. L.; WOOD K.V. Stabilization of firefly luciferase using directed evolution, **Bioluminescence and Chemiluminescence Perspectives for the 21st Century Proceedings of 10th International Symposium**, p. 392-395, 1998.
- HALL, M. P.; WOODROOFE, C. C. ; WOOD, M. G.; QUE, I.; VAN'T ROOT, M. RIDWAN, Y; SHI, C.; KIRKLAND, T. A.; ENCELL, LANCE P. ; WOOD, K. V.; LÖWIK, CLEMENS e MEZZANOTTE, L. Click beetle luciferase mutant and near infrared naphthyl-luciferins for improved bioluminescence imaging. *Nature communications.* v.9, p.132, 2018.
- HANNA, C.H.; HOPKINS, T.A. e BUCK, TIEMANN, J. Control of luminescence in phengodid beetles. *J. Insect Physiol.* V.19, p. 1327-1339. 1973.
- HARVEY, E.N. Bioluminescence. **Academic press. New York.** 1952.
- HARVEY, E.N. A history of Luminescence. From the earliest times until 1900. Philadelphia: The American Society, 770p, 1957.
- HASTINGS, W. J. Bacterial bioluminescence. *Ann. Ver. Microbiol.* v.31, p.549-595, 1977.
- HASTINGS, J. W. 1983. Biological diversity, chemical mechanisms and evolutionary origins of bioluminescent systems. *Journal of Molecular Evolution*, v. 19, p: 309-321.
- HASTINGS, W.J. Bioluminescence. In Neural and Integrative Animal Physiology (Ladd. Pross ed.) Wiley-Liss, 1991.
- HASTINGS, J.W. Bioluminescence: similar chemistries but many different evolutionary origins. *Journal of photochemistry and photobiology.* v.62, p. 599-600, 1995.

HEMMER, E.; VENKATACHALAM, N.; HYODO, H.; HATTORI, A.; EBINA, Y.; KISHIMOTO, H.; SOGA, K. Upconverting and NIR Emitting Rare Earth based Nanostructures for NIR-Bioimaging. *Nanoscale*. DOI: 10.1039/b000000x, 2013.

HERRING, P. J. A classification of luminous organisms. In *Bioluminescence in action* (P.J. Herring ed.) p.461-476. **Academic Press. New York**, 1978.

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

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

HORST, G. V. D.; ASTEN, J.J.; FIGDOR, A.; HOOGEN, C.; CHEUNG, H.; BEVERS, R. F.; PELGER, R. C.; PLUIJM, G. Real-time cancer cell tracking by bioluminescence in a preclinical model of human bladder cancer growth and metastasis. **European Urology**, v. 60, p. 337-343, 2011.

IOKA, S. SAITOH, T.; IWANO, S.; SUZUKI, K.; MAKI, S. A.; MIYAWAKI, A.; IMOTO, M.; NISHIYAMA, S. Synthesis of Firefly Luciferin Analogues and Evaluation of the Luminescent Properties. **Chem. Eur. J.**, v. 22, p. 9330 –9337, 2016.

IWANO, S.; OBATA,R; MIURA,C.; KIYAMA, M.; HAMA, K.; NAKAMURA, M.; AMANO,Y.; KOJIMA,S.; HIRANO, T.; MAKI, S.; NIWA, N. Development of simple firefly luciferin analogs emitting blue, green, red, and near-infrared biological window light. **Tetrahedron**: v.69, p.3847–3856, 2013.

JAFFE, H. H., BEVERIDGE, D. L.; JONES, H. L. **J. Am. Chem. SOC.** v. 86, p. 2932, 1964.

JATHOUL, A. P.; H. GROUNDS, J. C. ANDERSON, M. A. Pule, A Dual-Color Far-Red to Near-Infrared Firefly Luciferin Analogue Designed for Multiparametric Bioluminescence Imaging. **Angew. Chem. Int. Ed.** 53, p. 13059 –13063, 2014.

JOERN, J. M. DNA Shuffling. 2003. *In*: Arnold, F.; Georgiou, G. *Methods in Molecular Biology*, vol. 231: Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols. Edited by: F. H. Arnold and G. Georgiou . Humana Press Inc., Totowa, NJ. p. 85-89.

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.

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

KAKIUCHI, M. *et al.* Electronic and steric effects of cyclic amino-substituents of luciferin analogues on a firefly luciferin-luciferase reaction. **Chem Letters**. v. 46, p. 1090–1092, 2017.

KASKOVA ZM, TSARKOVA AS AND YAMPOLSKY IV. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. **Chem Soc Ver.** v. 45, p. 6048-6077, 2016.

KINDERMANN, M.; ROSCHITZKI-VOSER, H CAGLIC, D.; REPNIK, U.; MINIEJEW, C.; MITTL, P. R. E. KOSEC, G.; GRUETTER , M. G., TURK, B.; WENDT, K. U. Selective

and Sensitive Monitoring of Caspase-1 Activity by a Novel Bioluminescent Activity-Based Probe. *Chem. Biol.*, v. 17, p.999– 1007, 2010.

KITAYAMA ,Y.; KONDO ,T. ; NAKAHIRA, Y ; NISHIMURA, H.; OHMIYA,Y.; OYAMA, T . An In vivo Dual-Reporter System of Cyanobacteria Using Two Railroad-Worm Luciferases with Different Color Emissions. **Plant Cell Physiol.** v. 45(1), p. 109–113, 2004.

KOJIMA, R.; TAKAKURA, H.; OZAWA, T.; TADA, Y.; NAGANO, T.; URANO, Y. Rational Design and Development of Near-Infrared-Emitting Firefly Luciferins Available In Vivo **Angew.Chem. Int.** v. 52, p. 1175 –1179, Ed. 2013.

KOKSHAROV, M. I.; UGAROVA, N. N. Random mutagenesis of *Luciola mingrelica* firefly luciferase mutant enzymes with bioluminescence spectra showing low pH sensitivity. **Biochem.**, v. 73, p. 862–869, 2008.

KOO, J. Y.; SCHMIDT, S. P.; SCHUSTER, GB Bioluminescence of firefly - key steps in formation of electronically excited-state for model systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences U. S.**v. 75, p.30, 1978.

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

KUCHIMARU, T., IWANO, S, KIYAMA, M. MITSUMATA,S.; KADONOSONO, T.; NIWA, H; MAKI, S. e KIZAKA-KONDOH, S. A luciferin analogue generating near-infrared bioluminescence achieves highly sensitive deep-tissue imaging. **Nature communications.** 7:11856, 2016.

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. **Springer.** 3 edição. 2006. Disponível em: < <http://nathan.instras.com/MyDocsDB/doc-800.pdf>> Acesso em: 2019

LAW, G. H. E.; GANDELMAN, O. A.; TISI, L. C.; LOWE, C. R.; MURRAY, J. A. H. Mutagenesis of solvent-exposed amino acids in *Photinus pyralis* luciferase improves thermostability and pH-tolerance. **Biochemical Journal**, v: 397, p: 305-312, 2006.

LAWRENCE, J.F.; NEWTON, A.F. Evolution and classification of beetles. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 13: p: 261-290, 1982.

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.

LEE J, MATHESON IBC, MULLER F, O’KANE DJ, VERVOORT J, VISSER AJWG. The mechanism of bacterial bioluminescence. **Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes**, ed. F Muller, pp. 109–51, 1991.

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.

LI, X.; NAKAJIMA, Y.; NIWA, K.; VIVIANI, V. R.; OHMIYA, Y. Enhanced red-emitting railroad worm luciferase for bioassays and bioimaging. **Protein Science**, v. 19. p: 26-33, 2010.

LIPPERT, W.; LUEDER, F.; MOLL, W.; NAEGELE, H.; BOOS, H.; PRIGGE, I.; EIBOLD-BLANKENSTEIN, **Angew. Chem.** v. 73, p. 695, 1961.

LLOYD, J. E. Insect Bioluminescence. **Bioluminescence in Action**, London, p: 241-272, 1978.

LLOYD, J.E. Lampyridae. In: ARNETT, R.A. et al. (Eds.), **American Beetles, Vol. 2**. Boca Raton, CRC Press, pp. 187–196, 2002.

LUKER, K. E. SMITH, M.C, LUKER, G.D, GAMMON, S.T, PIWNICA-WORMS, H, PIWNICA-WORMS, D. Kinetics of regulated protein-protein interactions revealed with firefly luciferase complementation imaging in cells and living animals. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 101, 12288–12293, 2004.

LUKER K. E.; LUKER G. D. Applications of bioluminescence imaging to antiviral research and therapy: multiple luciferase enzymes and quantitation. **Antiviral Res.** 78: 179–187, 2008.

LUNDIN, A., H. HALLANDER, A. KALLNER, U. K. LUNDIN AND E. OSTERBERG. Bacteriuria testing by the ATP method as an integral part in the diagnosis and therapy of urinary tract infection (UTI). **J. Biolum. Chemilum.** 4: 381-389, 1989.

McCAPRA, F. The chemiluminescence of organos compounds. **Pure Appl. Chem.** 24: 611-629, 1970.

McCAPRA, F.; Z.RAZAVI. Biosynthesis of luciferin in *Pyrophorus pellucens*. **JCS Chem. Comm.** 153-154, 1976.

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.

McCAPRA F. Mechanisms in chemiluminescence and bioluminescence—unfinished business. In *Bioluminescence and Chemiluminescence*, ed. JW Hastings, LJ Kricka, PE Stanley, pp. 7–15. Chichester: Wiley & Sons, 1997.

McCUTCHEON, D. C.; PALEY, M. A.; STEINHARDT, R. C.; PRESCHER, J. A. Expedient Synthesis of Electronically Modified Luciferins for Bioluminescence Imaging. **J. Am. Chem. Soc.**, 134, 7604–7607, 2012.

McELROY WD. The energy source for bioluminescence in an isolated system. **Proc Natl Acad Sci. USA** 33: 342-345, 1947.

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

McCLURE, W. D.; EDELMAN, G. M. **Biochemistry**. v.5, p.1908, 1966.

MEIGHEN, E.A. Genetics of bacterial bioluminescence. **Annu. Rev. Genet.** v. 28, p.117–39, 1994.

MICHELINI, E. *et al.* Analytical and biotechnological use of bioluminescent proteins. In: VIVIANI, V. R.; OHMIYA, Y. **Luciferases and fluorescent proteins: Principles and advances in biotechnology and bioimaging**. Transworld Research Network: India, p. 161–182, 2007.

MIURA, C.; KIYAMA, M.; IWANO, S.; ITO, K.; OBATA, R.; HIRANO, T.; MAKI, S.; NIWA, H. Synthesis and luminescence properties of biphenyl-type firefly luciferin analogs with a new, near-infrared light-emitting bioluminophore. **Tetrahedron**. 69, 9726– 9734, 2013.

MOFFORD, D. M. REDDY, G. R.; MILLER, S. C. Aminoluciferins Extend Firefly Luciferase Bioluminescence into the Near-Infrared and Can Be Preferred Substrates over d-Luciferin. **J. Am. Chem. Soc.** 136, 13277 –13282, 2014.

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.

MORTON, A. R.; HOPKINS, A.T.; SELIGER, H. H. The Spectroscopic Properties of firefly Luciferin and Related Compounds. An approach to product Emission. **Biochemistry**. 8: 1598-1607, 1969.

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, Y.; KIMURA, T.; SUGATA, K.; ENOMOTO, T.; ASAKAWA, A.; KUBOTA, H.; IKEDA, M.; OHMIYA, Y. Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. **BioTechniques**, v. 38, p: 891-894, 2005.

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

NAUMOV, P.; OZAWA, Y.; OHKUBO, K.; FUKUZUMI, S. Structure & Spectroscopy of Oxyluciferin, the Light Emitter of the Firefly Bioluminescence. **J. Am. Chem. Soc.** v.131, p.11590-11605, 2009.

NAYLOR, L. H. Reporter gene technology: the future looks bright. **Biochem. Pharm.**, v. 58, p. 749–757, 1999.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5 ed. Porto Alegre: **Artmed**, 1304 p, 2011.

NIWA, K.; ICHINO, Y; OHMIYA, Y. Quantum yield measurements of firefly bioluminescence reactions using a commercial luminometer. **Chem. Lett.** v. 39, p. 291–293, 2010^a.

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

OHMIYA, Y. *et al.* Cloning, expression, and sequence analysis of cDNA for the luciferase from the Japanese fireflies, *Pyrocoelia miyako* and *Hotaria parvula*. **Photochem. Photobiol.**, v. 62, p. 309–313, 1995.

OHMIYA, Y. Cell based assays and imaging. 2014. **Applications of Bioluminescence**. Disponível em: <<http://photobiology.info/Ohmiya.html>>. Acesso em: 22 de Setembro de 2019.

OLIVEIRA, G. Estudo comparativo do efeito da temperatura na estabilidade e espectros de bioluminescência das luciferases de *Phrixotrix hirtus* e outros besouros bioluminescentes. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, São Carlos- SP, 2019.

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

OLIVIER, E. Lampyridae. In: JUNK, W.; SCHENKLING, S. Coleoptera Catalogus. Berlin: [s.n], 1910. (pars 9)

OZAKI, M., HAGA, S. e OZAWA, T. *In vivo* monitoring of liver damage using caspase-3 probe. **Theranostics**. v.2, p.207–214, 2012.

PRADO, R. A., SANTOS, C. R., KATO, D. I., MURAKAMI, M. T. e VIVIANI, V. R. The dark and bright sides of an enzyme: a three dimensional structure of the n-terminal domain of zophobas morio luciferase-like enzyme, inferences on the biological function and origin of oxygenase/luciferase activity. **Photochem. Photobiol. Sci.** v.15(5), p.654–665, 2016.

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.

RAUHUT, M. M. Chemiluminescence from concert peroxide decomposition reactions. **Acc. Chem. Res.** v. 2, p. 80-87, 1969.

REHEMTULLA, A. STEGMAN, L. D.; CARDOZO, S. J.; GUPTA, SHEILA; HALL, DANIEL E ; CONTAG, CHRISTOPHER H; ROSS' BRIAN D. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using *in vivo* bioluminescence imaging. *Neoplasia*. v. 2, p.491–495, 2000.

RODA, A.; GUARDIGLI, M.; MICHELINE, E.; MIRASOLI, M. Bioluminescence in analytical chemistry and in vivo imaging. **Trends in Analytical Chemistry**. v.28, p. 307, 2009.

ROSA, S. P. Second record of bioluminescence in larvae of *Xantholinus* Dejean (Staphylinidae, Xantholinini) from Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 54(1), p. 147–148, 2010.

RUNGE, E. GROSS, E. K. U. Density-Functional Theory for Time-Dependent Systems **Phys. Rev. Lett.** v. 52, p. 997 – 1000, 1984.

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.

SALA-NEWBY, G. B. *et al.* Bioluminescent and chemiluminescent indicators for molecular signalling and function in living cells. **Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis**. London: Academic Press, p. 251–271, 1999.

SANDALOVA T. P.; UGAROVA N. N. Model of the active site of firefly luciferase. **Biochemistry** (Moscow) v. 64, p. 962-967, 1999.

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

SELIGER, H. H.; W. D. McElroy. Quantum yield in oxidation of firefly luciferin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 1, p. 21–24, 1959.

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.

SELIGER, H. H; McELROY., W, D. Bioluminescence- Enzyme catalyzed chemiluminescence. *In: Light; Physical and Biological Action* (H. H. Seliger e W.D. McElroy ed.) Academic Press. New York. p: 169-198, 1965.

SETO, S.; OGURA, K.; NISHIYAMA, Y. Cycloheptathiazole Derivatives. II. Synthesis of a Seven-membered Analog of Firefly Luciferin **Bull. Chem. Soc. Jpn.** v. 36, p.173 – 175, 1963.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F. H. Elimination of the effect of contaminating CO₂ in the O-18-labeling of the CO₂ produced in bioluminescent reactions. **Photochemistry and Photobiology.** v.30, p. 89, 1979.

SHIMOMURA O, INOUE S, JOHNSON FH, HANEDA Y. Widespread occurrence of coelenterazine in marine bioluminescence. **Comp. Biochem. Physiol.**v. 65. p.435–37, 1980.

SHIMOMURA, O. Presence of coelenterazine in non- bioluminescent marine organisms. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 86B, p. 361-363, 1987.

SHIMOMURA, O. Bioluminescence: chemical principles and methods. **World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd** , p: 1-27, 2006.

SHINDE, R; PERKINS, J. CONTAG, C. H. Luciferin Derivatives for Enhanced *in vitro* and *in vivo* Bioluminescence Assays. **Biochemistry.** v. 45, p.11103– 11112, 2006.

SILVA NETO, A. J.; SCORSATO, V.; ARNOLDI, F. G. C.; VIVIANI, V. R. *Pyrearinus termitilluminans* Larval Click Beetle Luciferase: Active Site Properties, Structure and Function Relationships and comparison with Other Beetle Luciferases. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, p: 1748-1754, 2009.

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

SMITH, J. W. *et al.* Optimizing biosensor design with computer modeling: a case study involving creatine. In: CASE, J. F. *et al.* **Bioluminescence and Chemiluminescence**. Singapore: World Scientific, p. 309–312, 2000.

STANLEY, P. E. A review of the bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology. **J. Biolum. Chemilum.** v.4, p. 375-380, 1989.

STEINHARDT, R. C.; O'NEILL, J. M. ; RATHBUN, C. M.; MCCUTCHEON, D. C. ; PALEY, M. A.; PRESCHER, J. A. Design and Synthesis of an Alkynyl Luciferin Analogue for Bioluminescence Imaging. **Chem. Eur. J.**, 22, 3671–3675, 2016.

STRATMANN, R. E.; SCUSERIA, G; FRISCH, E. M. J. An efficient implementation of time-dependent density-functional theory for the calculation of excitation energies of large molecules. **Chem. Phys.** v. 109, p.8218–8224, 1998.

STEMMER, W. P. C. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91, v.10, p. 747–10,751, 1994.

SUN, Y.-Q.; LIU, J.; WANG, P.; ZHANG, J.; GUO, W. ANGEW. Corrigendum: D-Luciferin Analogues: a Multicolor Toolbox for Bioluminescence Imaging. **Chem. Int. Ed.** 51, 10691, 2012.

SUNDLOV, J. A.; FONTAINE, D. M.; SOUTHWORTH, T. L.; BRANCHINI, B. R.; GULICK, A. M. Crystal Structure of Firefly Luciferase in a Second Catalytic Conformation Supports a Domain Alternation Mechanism. **Biochemistry.** v.51, p.6493–6495, 2012.

TAFRESHI, N. K; HOSSEINKHANI, S.; SADEGHIZADEH, M.; SADEGHI, M.; RANJBAR, B.; NADERI-MANESH, 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.

TAFRESHI, N. K.; SADEGHIZADEH, M.; EMAMZADEH, R.; RANJBAR, B.; NADERI-MANESH, 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.

TAKAKURA, H.; KOJIMA, R.; URANO, Y.; TERAJ, T.; HANAOKA, K.; NAGANO, T. Aminoluciferins as Functional Bioluminogenic Substrates of Firefly Luciferase. **Chem. Asian J.** v. 6, p.1800–1810, 2011.

TAKAKURA, H.; KOJIMA, R.; OZAWA, T. NAGANO, T. URANO, Y. Development of 5'- and 7'-Substituted Luciferin Analogues as Acid-Tolerant Substrates of Firefly Luciferase **ChemBioChem.** v.13, 1424–1427, 2012.

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.

THOMSON, C. M; HERRING, P. J; CAMPBELL, A. K. The widespread occurrence and tissue distribution of the imidazolopyrazine luciferins. **J. Biolum. Chemilum.** v.12, p.87–91, 1997.

TU, S. C, MAGER, H.I.X. Biochemistry of bacterial bioluminescence. **Photochem. Photobiol.**v. 62, p. 615–24, 1995.

TU, S.C. Bacterial bioluminescence: biochemistry. In: HORSPELL, W.M.; LENCI, F. CRC Handbook of organic photochemistry and photobiology. Washington, D.C: CRC Press LLC, p.1-17, 2004.

UGAROVA, N.N. Luciferase of *Luciola mingrelica* fireflies. Kinetics and regulation mechanism. **J. Biolum. Chemilum.** v. 4, p.406-417, 1989.

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

VAN DE BITTNER, G. C. ; DUBIKOVSKAYA, E. A.; BERTOZZI, C. R.; CHANG, C. J. In vivo imaging of hydrogen peroxide production in a murine tumor model with a chemoselective bioluminescent **repórter**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 107, p. 21316 – 21321, 2010.

VIVIANI, V.R.; BECHARA, E.J.H. Biophysical and biochemical aspects of phengodid bioluminescence. **Photochemistry and Photobiology**, v. 58, p: 615-622, 1993.

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 Phrixotrix railroad-worm 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 pH-sensitivity 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 *Lampyrus noctiluca* and Asiatic *Pyrocoelia* luciferases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v: 139, p.151-156, 2004^a.

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

VIVIANI, V. R. Luciferases: The light generating enzymes. In Recent Progress of Bio/Chemiluminescence and Fluorescence Analysis in Photosynthesis. Cap 1:p 1-16, 2005^a.

VIVIANI, V. R.; OHELMMEYER, 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.; ARNOLDI, F.; SILVA NETO, A. J.; VENKATESH, B.; OGAWA, F. T.; OHMIYA, Y. Active-site properties of *Phrixotrix* railroad worm green and red bioluminescence-eliciting luciferases. **The Journal of Biochemistry**, v. 140, p. 467-474, 2006.

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

VIVIANI, V.R. OHMIYA, Y. Bovine serum albumin displays luciferase-like activity in presence of luciferyl adenylate: insights on the origin of protoluciferase activity and bioluminescence colours. **Luminescence**, v. 21, p: 262–267, 2006^b.

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

VIVIANI, V.R. (2008) In: Diniz, F. **Biotecnologia : modernas técnicas de engenharia genética unem setores em prol do desenvolvimento nacional.** *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 2–5.

VIVIANI, V. R.; ARNOLDI, F. G. C.; NETO, A. J. S.; OHELMMEYER, 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.; SANTOS, R. M. Bioluminescent Coleoptera of Biological Station of Boracéia (Salesópolis, SP, Brazil): diversity, bioluminescence and habitat distribution. **Biota Neotropica**. v.12, p.21–34, 2012.

VIVIANI, V. R.; AMARAL, D. T.; NEVES, D. R.; SIMÕES, A.; ARNOLDI, F. G. C. The Luciferin Binding Site Residues C/T311 (S314) Influence the Bioluminescence Color of Beetle Luciferases through Main-Chain Interaction with Oxyluciferin Phenolate. **Biochemistry** (Easton), v.52, p: 19–27, 2013a.

VIVIANI, V.R.; PRADO, R. A.; NEVES, D.R.; KATO, D.; BARBOSA, J. A. A Route from Darkness to Light: Emergence and Evolution of Luciferase Activity in AMP- CoA- Ligases inferred from a Mealworm Luciferase- like Enzyme. **Biochemistry**, v. 52, n.23, p.3963-3973, 2013b.

VIVIANI, V. R., NEVES, D. R., AMARAL, D. T., PRADO, R. A., MATSUHASHI, T., AND HIRANO, T. Bioluminescence of beetle luciferases with 6'-Amino-D-luciferin analogues reveals excited keto-oxyluciferin as the emitter and phenolate/luciferin binding site interactions modulate bioluminescence colors. **Biochemistry**, v.53, p. 5208–5220, 2014.

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.

WANG, J.; LEE, T. S.; ZHANG, Z.; TUNG, C.-H. A Bioluminogenic Probe for Monitoring Tyrosinase Activity. Chem. Asian J., v.12, p. 397 –400, 2017.

WELLER, A. Progress in Reaction Kinetics, Vol. I, Porter, G., and Stevens, B., Ed., New York, N. Y., Pergamon, p 187, 1961.

WELSH, D. K.; KAY, S. A. Bioluminescence imaging in living organisms. **Curr. Opin. Biotechnol.** 16: 73–78, 2005.

WHITE, E. H.; MC CAPRA, F.; FIELD e McELROY, W. D. The structure and Synthesis of Firefly Luciferin. **J. Am. Chem. Soc.** v. 83, p. 2402-2403, 1961.

WHITE, E. H.; MC CAPRA, F.; FIELD. The Structure and Synthesis of firefly Luciferin. **J. Am. Chem. Soc.** v.85, p. 337-343, 1963.

WHITE, E. H.; WORTHER, H.; FIELD, G. F.; MCELROY, W. D. Analogs of Firefly Luciferin . **J. Org. Chem.**,v. 30,p. 2344 – 2348, 1965.

WHITE, E. H., WORTHER, H., SELIGER, H. H., AND McELROY, W. D. Amino-analogs of firefly luciferin and biological activity thereof. **J. Am. Chem. Soc.** 88, 2015–2019, 1966.

WHITE, E. H; RAPAPORT, E. ; HOPKINS, T. A.; SELIGER, H. H. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 91, p. 2178 –2180, 1969.

WHITE, E. H.; RAPAPORT, R.; SELIGER, H. H.; HOPKINS, T. A. The chemi- and bioluminescence of firefly luciferin: an efficient chemical production of excited states. **Bioorg. Chem.**, v. 1, p. 92-122, 1971.

WIEDEMANN, E., AND J. B. MESSERSCHMITT. Ober Fluoreszenz und Phosphoreszenz. I. Abhandlung, II. Gültigkeit des Talbot'schen Gesetzes. *Ann. der Physik* 34: 446-463, 463-469, 1888.

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

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

WILSON, T.; HASTINGS, J. W. Bioluminescence – Living Lights, Lights for Living, **Harvard University Press**: Cambridge. (U. S. A.), 2013.

WITTMER, W. Arbeiten zueiner revision der Familie Phengodidae (Coleoptera). **Entomologischen Arbeiten aus dem Museum G. Frey**, v. 27, p. 415-524, 1976.

WITTMER, W.; OHBA, N. Neue Rhagophthalmidae (Coleoptera) aus China und benachbarten Landern. **Japanese Journal of Entomology**, v.62, n.2, p.341-355, 1994.

WOOD, K.V.; DE LUCA, M; HELINSKY, D, R. e SUBRAMANI, S. Firefly luciferase Gene: Structure and Expression in Mammalian Cells. *Molec. Cell. Biol.* v.7, p.725-737, 1987.

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.

WOODROOFE, C. C.; SHULTZ, J. W. WOOD, M. G.; OSTERMAN, J. CALI, J. J. DAILY, W. J. MEISENHEIMER, P. L. KLAUBERT, D. H. N-Alkylated 6'-Aminoluciferins are bioluminescent Substrates for Ultra-Glo and QuantiLum Luciferase: New Potential Scaffolds for Bioluminescent Assays. *Biochemistry*, v. 47, 10383– 10393, 2008.

WOODROOFE, C. C.; MEISENHEIMER, P. L.; KLAUBERT, D. H.; KOVIC, Y.; ROSENBERG, J. C.; BEHNEY, C. E.; SOUTHWORTH, T. L.; BRANCHINI, B. R.. Novel Heterocyclic Analogues of Firefly Luciferin. **Biochemistry**, v.51, p. 9807 –9813, 2012.

WU, W; SU, J.; TANG, C.; BAI, H.; MA, Z.; ZHANG, T.; YUAN, Z.; LI, Z.; ZHOU, W.; ZHANG, H.; LIU, Z.; WANG, Y.; ZHOU, Y. ; DU, L.; GU, L.; LI, M. cybLuc: An Effective Aminoluciferin Derivative for Deep Bioluminescence. **Imaging Anal. Chem.** v.89, p.4808–4816, 2017.

YANG, Y.; SHAO, Q.; DENG, R.; WANG, C.; TENG, X.; CHENG, K.; CHENG, Z.; HUANG, L.; LIU, Z.; LIU, X.; XING, B. *In Vitro* and *In Vivo* Uncaging and Bioluminescence Imaging by Using Photocaged Upconversion Nanoparticles. **Angew. Chem. Int.**, v. 51, p. 3125 – 3129, Ed. 2012.

YAO, H.; SO, M.-K; RAO, J. A Bioluminogenic Substrate for In Vivo Imaging of β -Lactamase Activity. **Angew. Chem. Int.**, v. 46, p. 7031– 7034, Ed. 2007.

10. Produção Científica

BEVILAQUA, V. R.; MATSUHASHI, T.; OLIVEIRA, G. ; OLIVEIRA, P. S. L.; HIRANO, T.; VIVIANI, V. R. . 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, p. 8998, 2019.

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.

VIVIANI, VADIM R. ; AMARAL, DANILO T. ; **BEVILAQUA, VANESSA R.** ; FALASCHI, RAFAELA L. . *Orfelia* -type luciferin and its associated storage protein in the non-luminescent cave worm *Neoditomyia* sp. (Diptera: Keroplatidae) from the Atlantic rainforest: biological and evolutionary implications. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 55, p. 4764, 2018.

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. ; SIMÕES, ALINE F. ; **BEVILAQUA, VANESSA RESENDE** ; DE MELLO GABRIEL, GABRIELE VERÔNICA ; ARNOLDI, FREDERICO G. C. ; HIRANO, TAKASHI . 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.