UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Aspectos comparativos das luciferases pH-insensitivas de *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera:Elateridae) e *Phrixotrix* spp (Coleoptera: Phengodidae): Expressão, purificação e propriedades do sítio ativo

ANTONIO JOAQUIM DA SILVA NETO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Abril 2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Resumo

Neste trabalho foi feita a expressão e purificação das luciferases recombinantes do elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans* e dos fengodídeos *Phrixotrix hirtus* e *Phrixotrix viviani,* e a determinação e comparação de suas propriedades físico-químicas. Estimamos os Kms para luciferina e ATP, as constantes catalíticas, pH ótimo e outros dados cinéticos nas três luciferases. Através do uso de sondas fluorescentes, fizemos uma inspeção da polaridade dos sítios de ligação da luciferina. Além disso, foi feita a modelagem molecular para complementar os estudos experimentais e identificar os resíduos do sítio-ativo que afetam a polaridade e os espectros de bioluminescência nestas luciferases. Os dados sugerem que a luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* tem o sítio ativo mais hidrofóbico entre as luciferases estudadas e a luciferase de *Phrixotrix hirtus* o mais polar. Estes dados suportam a importância da polaridade e polarizabilidade orientada na determinação dos espectros de bioluminescência. Além disto, os resultados de termoestabilidade e cinética de luminescência da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* sugerem que esta enzima seja particularmente apropriada para aplicações de bioimageamento.

Abstract

In this work, purification and comparative physical-chemical characterization of the recombinant luciferases from the elaterid *Pyrearinus termitilluminans* and from the phengodids *Phrixotrix hirtus and Phrixotrix viviani* was performed. The Kms for luciferin and ATP, the Kcat, optimum pH and other kinetics data were estimated in the three luciferases. Through fluorescent probes, we assessed the active-site polarity. Furthermore, molecular modeling was performed in order to support the experimental studies and suggest putative active site residues that could be responsible for changes of polarity. These data suggest that the luciferin binding site is more hydrophobic for *Pyrearinus* luciferase than in the other luciferases studied and support the polarity hypothesis as a mechanism for modulation of bioluminescence colors.

SUMÁRIO

Introdução **7**
1 Bioluminescência 7
2 Bioluminescência de besouros 7
3 O sistema luciferina- luciferase de coleópteros 8
4 As luciferases de besouros 10
5 Mecanismos para a emissão das cores na bioluminescência 12
6 Rendimento Quântico das Luciferases 16
7 Luciferases: Estrutura e Função 17
8 Origem da bioluminescência e evolução molecular 23
9 Aplicações biotecnológicas das luciferases 24
II Justificativa **26**
III Objetivos **26**
IV MATERIAIS **27**
2 Equipamentos 27
3 Reagentes e tampões 27
V METODOLOGIA **28**
1 Expressão das luciferases em bactérias 31
1.1 Medidas de luminescência *in vivo* das bactérias. 32
1.2 Medidas de atividade bioluminescente *in vitro*. 32
1.3 Quantificação de proteína pelo método Bradford 32
1.4 Purificação das luciferases por cromatografia de afinidade 32
2 SDS-PAGE 34
3 Western Blotting 34
4 Ensaios de K_m para LH_2 e ATP 35
5 Cálculo do K_D e da K_{cat} 36
6 Determinação do pH ótimo 37
7 Ensaios de termoestabilidade 37
8 Espectros de Fluorescência 38
8.1 Espectros de fluorescência com 2,6-TNS e 1,5-ANS 38
9 Espectros de Bioluminescência 38

10 Modelagem Molecular 39
VI Resultados 40
1 Expressão e Purificação das luciferases de Phrixotrix spp e Pyrearinus termitilluminans 40
2 Determinação das propriedades físico-químicas 43
2.1 Termoestabilidade 46
2.2 Espectros de Fluorescência 47
2.3 Espectros de Bioluminescência 50
3 Modelagem Molecular da Luciferase de Pyrearinus termitilluminans: comparação com as luciferases de Macrolampis sp2 e Phrixotrix 52
3.1 Alinhamento das luciferases 52
3.2 Validação do Modelo da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* 54
3.3 Padrão de Enovelamento da Luciferase de *Pyrearinus* 55
3.4 Sítio de Ligação de ATP do modelo tridimensional da *Pyrearinus termitilluminans* 56
3.5 Sítio de Ligação da Oxiluciferina 58
3.6 Comparação das estruturas das luciferases *Pyrearinus termitilluminans*, *Macrolampis*, *Phrixotrix hirtus* e *Phrixotrix viviani* 59
VI Discussão 67
VII Conclusões 71
VIII Perspectivas 72
IX Referências 73
X Anexos 84

Abreviaturas utilizadas neste trabalho

Reagentes

ANS	8-anilino-1-naftaleno ácido sulfônico
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
CAPS	Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfônico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Isopropil-2-D-tiogalactopiranosídeo
LH_2	D-luciferina
PBS	Tampão fosfato salino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TNS	(2-(p-toluidino)-6-naftaleno sulfonato

Constantes físico-químicas

K_M	Constante de Michaelis-Menten
K_D	Constante de decaimento
K_{cat}	Constante catalítica

Ezimas

HRP	Peroxidase de rábano silvestre
Mac	Luciferase de *Macrolampis* sp2
PPy	Luciferase de *Photinus pyralis*
Pte	Luciferase de *Pyrearinus termitilluminans*
PxGR	Luciferase de *Phrixotrix viviani*
PxRE	Luciferase de *Phrixotrix hirtus*

Introdução

1 Bioluminescência

O belo fenômeno da bioluminescência desde sempre atraiu a atenção e a curiosidade de leigos e pesquisadores. É caracterizado pela emissão de luz fria e visível pelos seres vivos, ocorrendo em bactérias, fungos, celenterados, anelídeos, equinodermas, moluscos, peixes e artrópodes (HERRING, 1987).

A bioluminescência ocorre através de enzimas conhecidas como luciferases, que catalisam reações altamente exergônicas onde a energia é liberada preferencialmente na forma de emissão de luz visível (WILSON e HASTINGS, 1998).

Na bioluminescência a emissão de luz possui importantes funções biológicas tais como atração sexual, defesa, camuflagem e atração de presas (HASTINGS, 1983).

A emissão de luz ocorre através da oxidação por oxigênio de compostos conhecidos genericamente por luciferinas em reações catalisadas por enzimas conhecidas por luciferases. No sítio ativo das luciferases, encontram um microambiente propício para a emissão de luz com alto rendimento quântico (número de fótons emitidos por molécula de luciferina oxidada) (VIVIANI, 2006).

2 Bioluminescência de besouros

A bioluminescência ocorre principalmente em ambientes marinhos. Em ambientes terrestres a classe dos insetos é a mais rica em espécies bioluminescentes (VIVIANI, 2002).

Há cerca de 2000 espécies de besouros luminescentes descritos entre as famílias Lampiridae (vaga-lumes), Elateridae (tec-tec) e Phengodidae (larvas-trenzinho) (VIVIANI, 2001).

Os lampirídeos, popularmente conhecidos por vaga-lumes, na fase adulta emitem luz verde-amarelada pela região ventral dos últimos

segmentos abdominais por meio de lampejos cuja finalidade é a atração sexual (LLOYD, 1978).

Os elaterídeos, na fase adulta, emitem luz por duas lanternas localizadas sobre o protórax e uma lanterna abdominal que é ativada somente durante o vôo. As lanternas protorácicas emitem luz contínua na região verde do espectro enquanto as lanternas abdominais emitem luz contínua mais deslocada para o vermelho (BECHARA, 1989). Nos elaterídeos a luminescência provavelmente tem função sexual e defensiva (VIVIANI, 2002).

A larva do besouro elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans* é responsável pelo fenômeno dos cupinzeiros luminosos na região central do Brasil (BECHARA, 1989). Para atrair suas presas, as larvas expõem durante horas seu protórax luminoso na superfície dos cupinzeiros (BECHARA, 1989).

Os fengodídeos são conhecidos como larvas-trenzinho, devido ao fato das fêmeas e larvas possuírem lanternas laterais ao longo do corpo que emitem luz na faixa do verde-laranja do espectro. Espécies sul-americanas da tribo Mastinocerini possuem lanternas cefálicas que emitem do verde-amarelo ao vermelho; as larvas de *Phrixotrix* além das lanternas laterais são as únicas cujas lanternas cefálicas emitem luz vermelha (VIVIANI e BECHARA, 1993, 1997).

3 O sistema luciferina- luciferase de coleópteros

Apesar da variedade na emissão de cores, os besouros utilizam-se do mesmo sistema luciferina-luciferase para a produção de luz.

A primeira luciferase e luciferina purificadas foram as do lampirídeo norte-americano *Photinus pyralis* (GREEN e McELROY, 1956, BITLER e MCELROY, 1957).

A luciferina de lampirídeos é um composto benzotiazólico com massa molar de 280 Da, tendo como subprodutos de auto-oxidação a desidroluciferina, um inibidor competitivo da atividade luminescente, e como produto da reação bioluminescente, a oxiluciferina. A oxiluciferina é um

composto muito instável cuja estrutura foi deduzida a partir da síntese de análogos com espectros de fluorescência e quimiluminescência semelhantes aos da bioluminescência (MORTON, HOPKINS e SELIGER, 1969) (Figura 1).

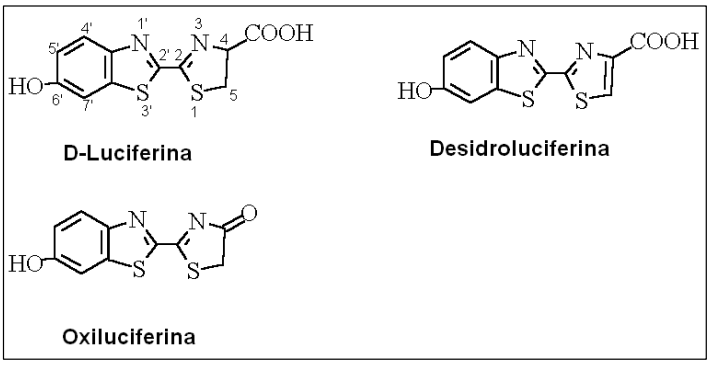


Figura 1 - Luciferina e produtos de oxidação

A luciferina e seus produtos de oxidação apresentam propriedades espectroscópicas semelhantes (MORTON, HOPKINS e SELIGER, 1969, BOWIE et al., 1973).

No estado excitado singlete, em meio aquoso, ocorre a dissociação do próton da hidroxila fenólica do carbono 6' enquanto em solventes apolares esta dissociação é inibida. Dessa forma, em meio aquoso, há fluorescência na faixa do verde-amarelo (λ_{max}= 530-540 nm) e em solventes apolares ocorre fluorescência no azul (λ_{max}= 430-450 nm) (MORTON, HOPKINS e SELIGER, 1969, 1969). Considerando que os besouros emitem luz somente na faixa do verde ao vermelho, foi deduzido que a bioluminescência ocorre mediante a dissociação deste proton 6' (BOWIE et al.., 1973; FUKUSHIMA, 1991, GANDELMAN et al., 1993).

4 As luciferases de besouros

As luciferases de coleópteros são monômeros cataliticamente ativos com cerca de 60 kDa (DE WET et al, 1985). A primeira luciferase a ter sua sequência primária deduzida foi a do lampirídeo norte-americano *Photinus pyralis* (DE WET *et al*. 1985). O cDNA de *Photinus pyralis* consiste de um fragmento de 1.6 Kb que codifica um polipeptídio de 550 resíduos de aminoácidos, possuindo em seu C-terminal o tripeptídio sinalizador SKL que o dirige para os peroxissomos (GOULD et al, 1967). As luciferases de lampirídeos possuem de 546 a 550 resíduos, compartilham ente si 67 a 94% de identidade em nível de estrutura primária (WOOD, 1995). As luciferases de elaterídeos são polipeptídios de 542 a 543 resíduos e preservam entre si 82 a 99% de identidade seqüencial (WOOD et al. 1989; VIVIANI et al, 1999a). As luciferases de fengodídeos possuem de 543 a 546 resíduos, com 56 a 71% de identidade seqüencial entre si (GRUBER et al., 1996; VIVIANI et al., 1999b ; OHMYIA et al., 2000) e 46 a 50% de identidade com as demais luciferases de elaterídeos e lampirídeos.

As luciferases fazem parte de uma super-família de proteínas chamadas AMP-ligases que incluem as acil-CoA ligases e enzimas envolvidas na síntese de peptídeos não-ribossomais (NRPS) (GULICK et al. 1993, J. MAY et al.. 2002).

A luciferase de vaga-lumes catalisa a oxidação da luciferina por oxigênio molecular na presença de magnésio e ATP (BOWIE et al., 1973). É uma enzima bifuncional, catalizando a reação bioluminescente em duas etapas (Figura 2):

(I) Na primeira ocorre a adenilação da luciferina a partir de MgATP com a formação de um composto anidro entre o ácido carboxílico e a AMP e a liberação de pirofosfato (VIVIANI, 2002, UGAROVA e BROVKO ,2002). Esta etapa da catálise assemelha-se à ativação de aminoácidos pelas tRNAs sintetases e de ácidos graxos pelas acil-CoA ligases (McELROY et al, 1967; WOOD, 1995).

(II) Na segunda etapa ocorre a oxigenação do adenilato de luciferina com a formação de um intermediário peroxídico instável cuja clivagem libera

dióxido de carbono e oxiluciferina em estado excitado singleto cujo decaimento para o estado fundamental ocorre com a emissão de fótons na região verde-vermelha do espectro (McELROY e DeLUCA, 1978).

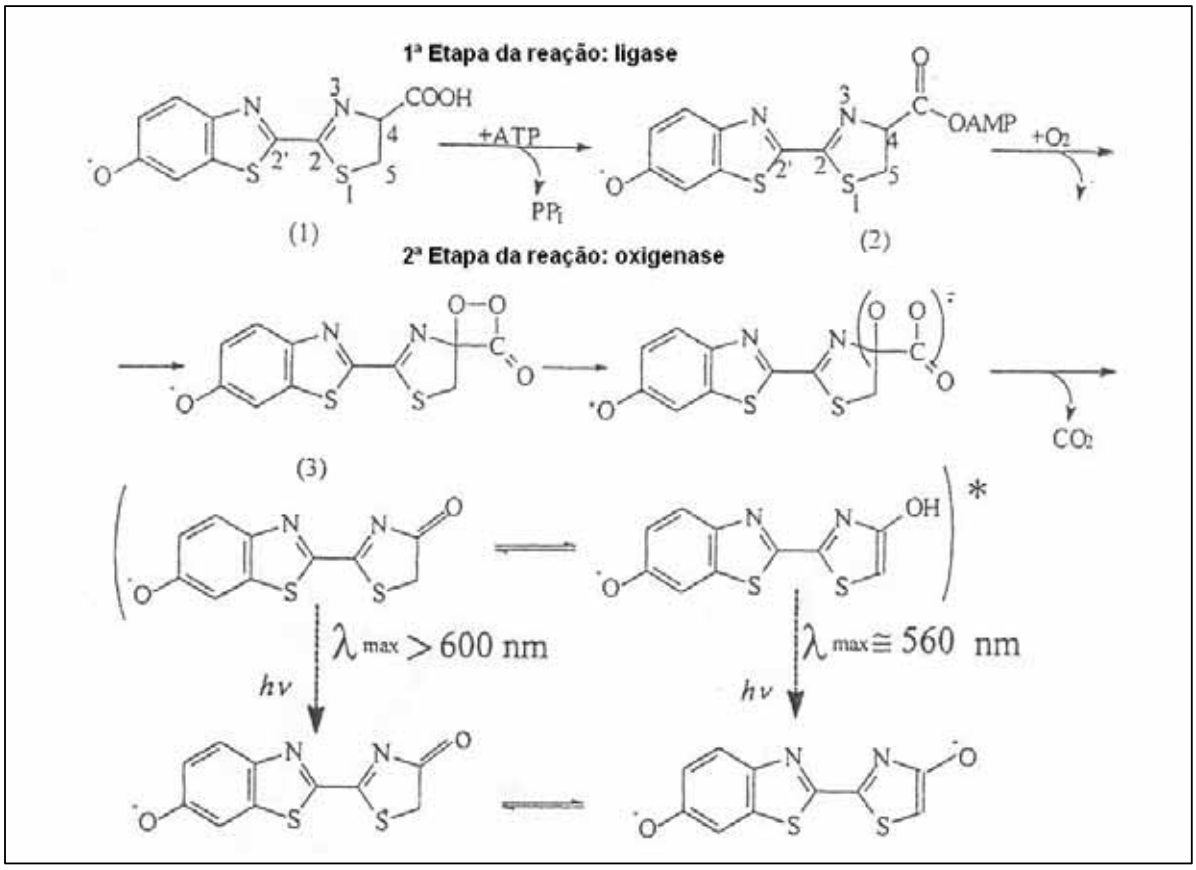


Figura 2 – Reação bioluminescente catalisada pelas luciferases de besouros (UGAROVA e BROVKO, 2002)

As espécies excitadas singlete são geradas após a clivagem do anel dioxetanônico, por meio do mecanismo conhecido por Quimiluminescência Induzida Quimicamente por Troca de Elétrons (CIEEL) (SCHULSTER et al , 1979). Neste mecanismo ocorre a ativação por transferência intramolecular de um elétron da parte heterocíclica da molécula para o anel dioxietanônico (WILSON, 1995). Após a quebra da ligação C-C, e a liberação de dióxido de carbono, ocorre a formação de um par iônico em curto intervalo de tempo. As

cargas dos dois radicais iônicos aniquilam-se em um processo que envolve a formação da oxiluciferina para um estado excitado singlete cujo decaimento para o estado fundamental resulta em fluorescência com alto rendimento quântico (WILSON, 1995).

A sequência primária de diversas luciferases de besouros é conhecida, o que possibilitou o estudo da relação entre estrutura, função e cores da bioluminescência (ALIPOUR et al 2004; DEVINE et al 1993; De WET et al 1985; LEE, K.S., 2001; LI, YE et al, 1997; OHMIYA et al, 1995; SALA-NEWBY et al, 1996,TATSUMI et al, 1989; VIVIANI et al, 1999a; VIVIANI et al, 1999b; WOOD et al, 1989).

5 Mecanismos para a emissão das cores na bioluminescência

Um dos aspectos que mais intrigam os pesquisadores e tem sido objeto de estudos é o mecanismo subjacente à diversidade das cores emitidas por coleópteros bioluminescentes.

As luciferases de coleópteros dividem-se em dois grupos funcionais quanto à sensibilidade de seus espectros de emissão às variações do pH:

a) as pH-sensitivas (lampirídeos) cujo espectro de emissão sofre deslocamento para o vermelho em pH ácidos, na presença de metais pesados e aumento de temperatura (VIVIANI , BECHARA, 1995);

b) as pH-insensitivas (fengodídeos e elaterídeos) ,que não sofrem alteração do pH nas condições acima citadas (VIVIANI, BECHARA, 1995).

Originalmente, três mecanismos foram propostos para explicar a variação de cores emitidas por estas enzimas:

(I) Efeitos não-específicos do sítio ativo, onde variações de polaridade e o efeito solvente do sítio de ligação da oxiluciferina afetariam os espectros de emissão. Este mecanismo baseia-se em observações do espectro de fluorescência da luciferina e análogos que são afetados pela natureza do solvente (DeLUCA, 1969). Em solventes não polares, o espectro é deslocado para o azul, enquanto em solventes polares há um deslocamento para o vermelho, com uma variação no deslocamento de até 40 nm. Porém, este

mecanismo por si só não é suficiente para explicar a variação de cores observadas nas espécies emissoras de luz verde-amarela e vermelha (WHITE et al., 1971).

(II) Efeitos específicos de resíduos básicos no sítio ativo. O primeiro mecanismo proposto foi a tautomerização da oxiluciferina na presença de resíduos básicos assistindo a abstração de proton C5 da oxiluciferina excitada (Fig. 2). Este mecanismo é baseado em dados espectroscópicos com a oxiluciferina e análogos, que explicaria a alteração da cor do verde para o vermelho em pH ácido (WHITE et al.,1971) . Neste caso, a espécie emissora de luz verde-amarela seria o fenolato na forma enólica, enquanto a emissora de luz vermelha seria o fenolato na sua forma cetônica (WHITE et al., 1971). Um resíduo básico localizado no sito ativo da luciferase assistiria a tautomerização da oxiluciferina.

Entretanto esta hipótese da tautomerização foi recentemente descreditada em estudos com adenilato de dimetiloxiluciferina. Em reações catalisadas pelas luciferases de *Photinus pyralis* e *Pyrophorus plagiophthalamus* com adenilato de D-dimetiluciferina (D-DiMe-LH2-AMP) onde tautomerização é impedida pelos dois grupos metila, foi observada a emissão de luz na região verde (λ_{max} ~ 560 nm), o que mostra que a forma cetônica pode emitir numa faixa mais ampla do espectro (BRANCHINI et al., 2004).

(III) Outro mecanismo proposto é que a luciferase faz a modulação das cores através da geometria do sítio-ativo, que determina duas conformações da oxiluciferina no estado excitado. Essas conformações resultariam na rotação da ligação C2-C2' em torno dos anéis tiazólicos. Com ângulo diedro Φ = 90 ° a oxiluciferina teria menor energia, produzindo desta forma luz vermelha. Com ângulos diedros menores que 90° a energia aumentaria, produzindo luz deslocada para o azul (McCAPRA et al, 1994). Entretanto esta hipótese carece de evidências experimentais (VIVIANI, 2002). De fato, a resolução estrutural da luciferase do lampirídeo japonês *Luciola cruciata* (tipo selvagem e o mutante Ser286Asn) complexadas com análogo do adenilato de luciferina, DLSA (5'-O-[N-(dehidroluciferil)-sulfamoil]), mostra que apesar do tipo selvagem emitir em λ_{max}=560 nm e o mutante em λ_{max}= 613 nm, os

anéis tiazólicos em torno da ligação C2-C2' apresentam-se sempre no mesmo plano (NAKATSU et al., 2006).

Estudos mais recentes sugerem que ambos os efeitos não-específicos e específicos do sítio ativo das luciferases determinem os espectros de bioluminescência (BRANCHINI et al., 2004; ORLOVA et al., 2003). Um modelo mais atualizado do efeito não-específico do sítio-ativo consiste na hipótese da polarizabilidade orientada (UGAROVA, BROVKO, 2004) que trata o emissor como um dipolo em um meio de constante dielétrica constante. Logo após a excitação o emissor está em equilíbrio instável com as moléculas do solvente. Neste momento, a diferença de energia entre os estados fundamental e excitado é máxima e a emissão ocorre em pequenos comprimentos de onda. Devido ao relaxamento das moléculas do solvente em torno da espécie emissora, há dissipação de energia e a emissão ocorre em comprimentos de onda maiores, com deslocamento para o vermelho (Figura 3).

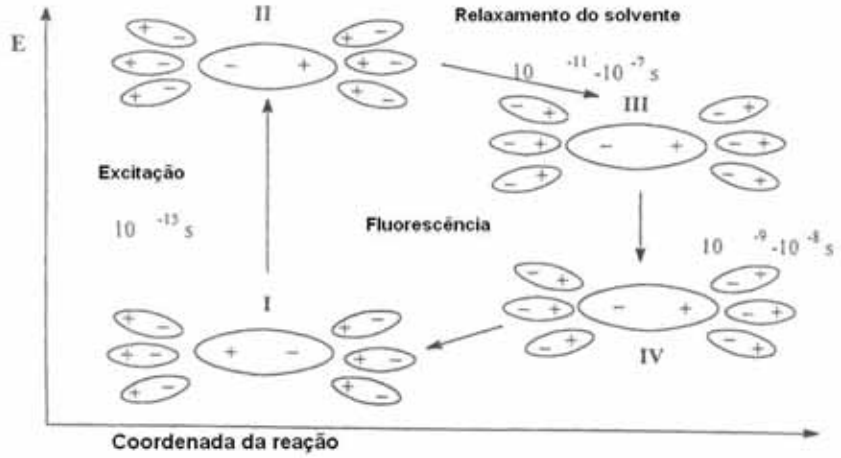


Figura 3 – Hipótese da polarizabilidade orientada mostrando o diagrama dos níveis de energia (E) de excitação e emissão da molécula e sua interação com as moléculas do solvente

Os deslocamentos nos espectros de emissão são resultantes da capacidade de reorientação das moléculas de solvente em torno da molécula excitada, (UGAROVA, BROVKO, 2002). A propriedade que responde por

esta reorientação chama-se orientação de polarizabilidade, Δf, que é dada pela equação 1 (UGAROVA, BROVKO, 2002).

$$\Delta f = \frac{(\varepsilon - 1)}{(2\varepsilon + 1)} - \frac{(n^2 - 1)}{(2n^2 + 1)} \quad (1)$$

Onde ε é a constante dielétrica e η é o índice de refração

Em um ambiente apolar não há interação entre os resíduos do sítio ativo e a oxiluciferina excitada, a energia entre os estados fundamental e excitado é máxima e a emissão ocorre em comprimentos de onda curtos. O mesmo resultado é verificado em ambiente de baixa orientação de polarizabilidade e rigidez do sítio ativo, a despeito de interações entre emissor e resíduos vizinhos (UGAROVA, BROVKO, 2002). Por outro lado, se a orientação de polarizabilidade for alta, há uma rápida interação entre o emissor e o ambiente, resultando em dissipação de energia e no deslocamento do espectro para comprimentos de onda maiores (UGAROVA, BROVKO, 2002).

De acordo com Ugarova e Brovko, esta teoria explicaria o deslocamento espectral em virtude de mutações em resíduos situados longe do sítio ativo, porém de alguma forma em contato com resíduos diretamente envolvidos em interações com o substrato (UGAROVA, BROVKO, 2002).

Outro modelo recente propõe que a modulação das cores pode ser causada pelo deslocamento de carga entre os anéis tiazínicos devido à polarização entre o grupo fenol (fenolato) do carbono C-6' e o grupo cetônico (enol) do carbono C-4 da oxiluciferina excitada (BRANCHINI et al., 2004)..

Estudos teóricos sugerem que a determinação das cores da bioluminescência deve-se à polarização dos grupos fenolato e ceto-enol, que seriam controlados pelo microambiente da luciferase (ORLOVA et al., 2004).

Outros estudos propõem que o espectro de bioluminescência das luciferases de vaga-lumes é uma superposição de três espécies emissoras: a forma cetônica (λ_{max} = 618 nm) , a forma enólica (λ_{max} = 618 nm) e o íon enolato (λ_{max} = 556 nm) (UGAROVA et al., 2005).

Mais recentemente, foi publicado um trabalho no qual são apresentadas fortes evidências experimentais que sugerem um compromisso entre a basicidade de resíduos próximos do grupo fenolato e a polaridade do microambiente como fatores que podem explicar a ampla gama de cores da bioluminescência desde o verde até o vermelho (HIRANO et al. 2009).

6 Rendimento Quântico das Luciferases

O rendimento quântico das reações bioluminescentes (Φ_{BL}), que corresponde ao número de fótons emitidos por molécula de luciferina oxidada, é muito elevado. Ele é determinado pela fração de moléculas que reagem (Φ_Q), a fração de moléculas produto geradas no estado eletronicamente excitado (Φ_{EX}) , e a fração de moléculas produto eletronicamente excitadas que se desativam por fluorescência(Φ_{FL}) (equação 2) .

$$\Phi_{BL} = \Phi_Q . \Phi_{EX} . \Phi_{FL} \quad (2)$$

No caso da luciferase de *Photinus pyralis*, Seliger e McElroy (1964) verificaram há dois possíveis espectros de emissão *in vitro* da bioluminescência de vaga-lumes: uma banda verde-amarela em pH neutro e alcalino e uma banda de emissão vermelha em pH ácido. De acordo com estes autores, a banda de emissão verde-amarela é idêntica ao espectro de emissão *in vivo* e ocorre com rendimento quântico de 0,88, enquanto a banda de emissão no vermelho possui rendimento quântico em torno de 0,4. Entretanto, recentemente Ando et al. (2008) mediram novamente o rendimento quântico para a bioluminescência da luciferase de vaga-lumes e chegaram um valor de 0,4. De acordo com estes estudos, o espectro de bioluminescência apresenta 3 bandas, uma na região do verde-amarelo que muda com o pH, e duas na região do vermelho que não mudam com o pH.

7 Luciferases: Estrutura e Função

A estrutura tridimensional da luciferase do lampirídeo norte-americano *Photinus pyralis* foi resolvida a 2 Å por difração de raios-X na ausência de substrato, apresentando um grande domínio N-terminal (resíduos 1 a 436) conectado ao domínio C-terminal por um *loop* flexível (436-440).

O domínio N-terminal consiste de três subdomínios: um barril β antiparalelo (subdomínio C) e duas folhas β flanqueadas por hélices α formando uma estrutura αβαβα (subdomínios A e B). O domínio C-terminal é composto de uma estrutura α+β (Figura 4). As superfícies do N-terminal e C-terminal formam um sulco onde vários resíduos conservados são encontrados (CONTI *et al*, 1996) (Figura 5).

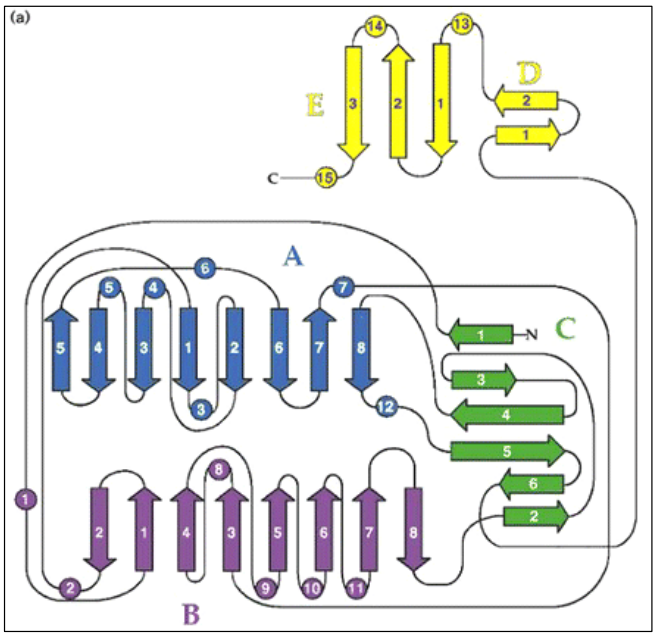


Figura 4 – Diagrama Topológico da Luciferase de *Photinus pyralis* (CONTI et al., 1996)

Figura 5 – Estrutura tridimensional da luciferase de *Photinus pyralis* resolvida na ausência de substratos, mostrando os três subdomínios do N-terminal (subdomínio A em azul, subdomínio B em magenta e subdomínio C em vede) e o subdomínio C (em amarelo).

O sítio ativo é localizado na interface entre os dois grandes domínios, com o domínio C-terminal alterando sua posição em relação ao resto da molécula em função da presença ou não de substratos ligados no sítio de ligação (CONTI et al., 1996).

Durante a catálise há uma mudança conformacional e os domínios N e C-terminal aproximam-se protegendo o sítio ativo do solvente, propiciando um ambiente para a reação bioluminescente (CONTI et al., 1996).

A estrutura resolvida do domínio de adenilação da fenilalanina da gramicidina sintetase de *Bacillus brevis* na presença de fenilalanina e AMP (PheA) apresenta uma rotação do domínio C-terminal em 90° em relação ao da estrutura da luciferase de *P.pyralis* sem o substrato (CONTI et al, 1996).

A estrutura resolvida da enzima 2,3-Dihidroxibenzoato-AMP ligase (DhBE) na presença e na ausência do substrato 2,3-dihidrobenzoato (DHB) apresenta a mesma conformação do C-terminal verificada na PheA (JUERGEN J. MAY et al, 2002).

A estrutura da acetil-CoA sintetase complexada com Coenzima A e ATPmostra a rotação do domínio C-teminal em cerca de 140° em relação a PheA e DhbE , sugerindo que estas enzimas adotem diferentes conformações durante as etapas da catálise (GULICK et al..2003).

Mais recentemente, a estrutura tridimensional da luciferase do lampirídeo japonês *Lucíola cruciata* foi resolvida na presença de Mg-ATP , oxiluciferina e AMP e do análogo do intermediário adenilato de luciferina, DLSA (NAKATSU et al , 2006).

A estrutura da luciferase da *Luciola cruciata* complexada com DLSA mostra um sítio hidrofóbico, consistindo da hélice α8 (resíduos 248-260), fitas β12 (286-289), β13 (313-316), β14 (339-342), β15 (351-353) e o *loop* compreendendo os resíduos 343-350. A entrada do bolsão é bloqueada pela adenosina (NAKATSU et al, 2006) (Figura 5).

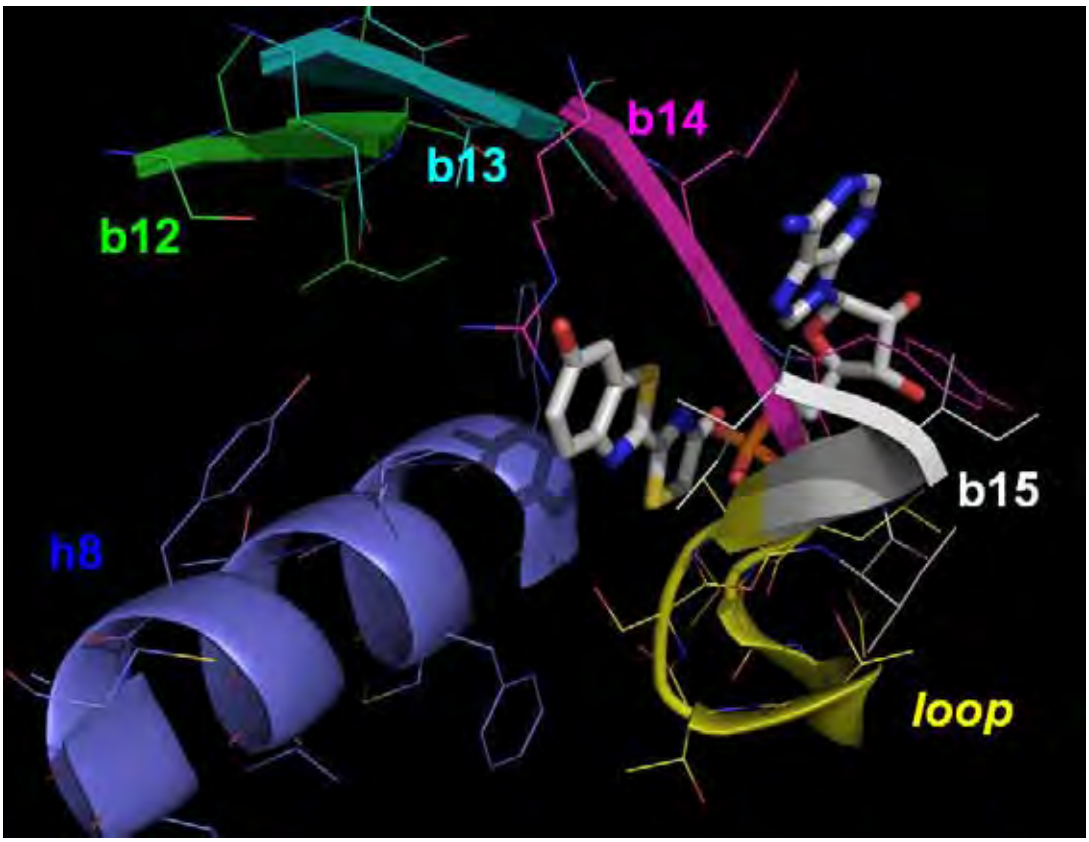


Figura 5 – Bolsão hidrofóbico da luciferase de *Luciola cruciata*

As estruturas resolvidas na presença de Mg-ATP, DLSA e oxluciferina-AMP mimetizam as três etapas do processo catalítico, chamando atenção para alterações conformacionais das cadeias laterais de resíduos importantes na região do sítio ativo (NAKATSU et al., 2006).

Na estrutura resolvida com DLSA, o sítio-ativo da luciferase apresenta-se numa conformação mais fechada. Nesta conformação a fita β12 aproxima-se do sítio de ligação da oxiluciferina, com o Cα e a cadeia lateral da Ile288 mais próxima do anel benzotiazólico (NAKATSU et al., 2006).

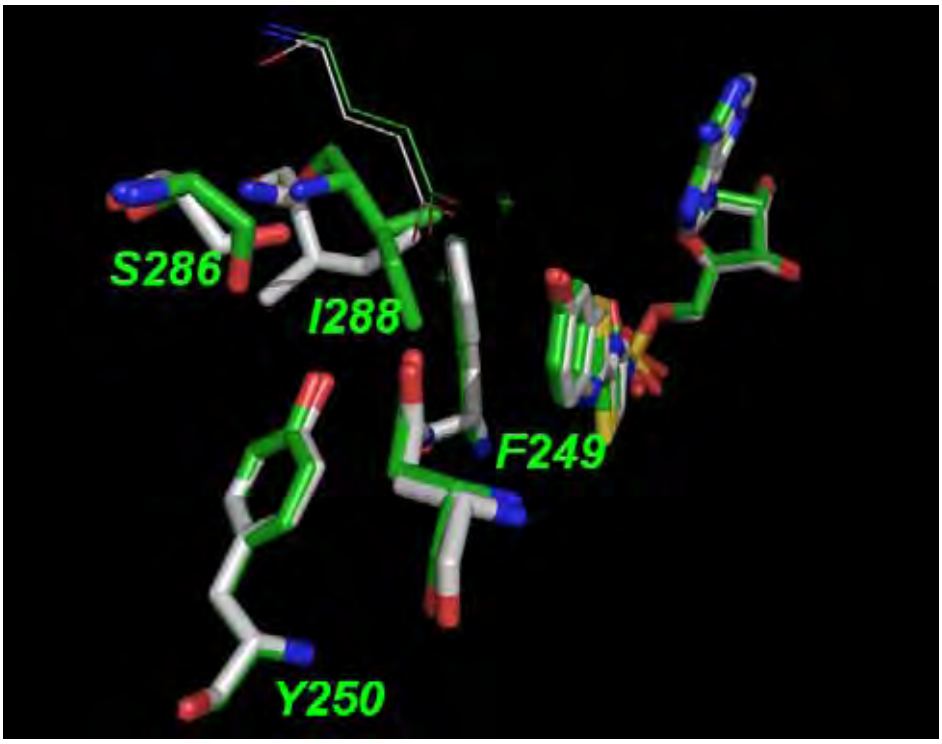


Figura 6 - Superposição das estruturas da luciferase de *Luciola cruciata*: (verde), conformação fechada na presença de DLSA e (branco) conformação aberta na presença de oxiluciferina e AMP.

Este movimento parece ser facilitado por uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo as cadeias laterais dos resíduos S286, E313, Y257 e N231 (NAKATSU et al..,2006) que estabilizam a conformação.

Estas mudanças conformacionais são acompanhadas de uma rotação da cadeia lateral da F249 em direção ao anel benzotiazólico da DLSA, resultando na forma fechada do sítio ativo com o intermediário empacotado entre as cadeias laterais da I288, F249, A350 e G341.

Comparando as estruturas resolvidas do tipo selvagem, na presença de AMP e oxiluciferina, e do mutante S286N (na presença de DLSA), que apresenta espectro de emissão deslocado para o vermelho (λ_{Max} = 613 nm),

verifica-se que em ambas o sítio ativo é mais aberto e, portanto, menos hidrofóbico (NAKATSU et al, 2006).

Dois modelos para o sítio de ligação da luciferina na luciferase de *Photinus pyralis* foram propostos (BRANCHINI et al., 1998 e SANDALOVA, UGAROVA, 1999). Segundo estes modelos fazem parte do sítio ativo os resíduos R220, 246HHGF249, 317GGA319, 342YGLTE346, A350 e I353 (numeração seqüencial da luciferase de *Luciola cruciata*).

Nosso grupo de pesquisa tem utilizado como modelos para estudo da relação entre estrutura-função as luciferases pH-sensitivas *Macrolampis spp* (λ_{max}= 569 nm) e *Cratomorphus distinctus* (λ_{max} = 548 nm) e as pH-insensitivas *Pyrearinus termitilluminans* (λ_{max} = 534 nm), *Phrixotrix viviani* (λ_{max} = 546 nm) e *Phrixotrix hirtus* (λ_{max} = 623 nm) que foram clonadas, expressas e purificadas ou parcialmente purificadas em nossos laboratórios (VIVIANI et al., 1999a, 1999b, 2004,2005).

Através de mutagênese sítio dirigida e estudos de modelagem molecular, nosso grupo mostrou que algumas substituições importantes que afetam as cores da bioluminescência estão localizadas em um *loop* localizado entre os resíduos 225-237 (numeração seqüencial da luciferase de *Luciola cruciata*) (VIVIANI et al., 2007).

Este *loop* conecta a hélice-α do subdomínio A que contém o resíduo R218, considerado um dos resíduos componentes do sítio ativo, e o subdomínio B que é composto de resíduos importantes do sítio ativo que afetam a atividade bioluminescente (VIVIANI et al, 2008).

As substituições nas posições 229, 230 e 231 (seqüência da *Luciola cruciata*) foram responsáveis por deslocamentos para o vermelho em ambos os grupos de luciferases, sugerindo sua participação em interações instáveis (VIVIANI et al., 2008).

Na luciferase de *Macrolampis* a substituição Y229F resultou em um mutante cujo espectro apresentou deslocamento temporal do vermelho para o verde. Durante este intervalo de tempo a intensidade da banda no vermelho diminuiu enquanto a banda verde-amarela permaneceu praticamente inalterada (VIVIANI et al, 2008).

Um deslocamento temporal similar ocorreu com a substituição Y229A na luciferase de *Phrixotrix viviani*, porém esta mutação não afetou a luciferase vermelha de *Phrixotrix hirtus* (VIVIANI et al., 2008).

Na luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* a substituição V229F resultou no maior deslocamento para o vermelho já verificado em uma luciferase pH-sensitiva (de λ_{max} = 590 para λ_{max} = 534 nm) (VIVIANI et al., 2008).

Entre as luciferases pH-sensitivas e pH-insensitivas verifica-se que as primeiras possuem a região do sítio de ligação da oxiluciferina mais flexível devido a uma rede de ligações de hidrogênio e pontes salinas nas quais destacam-se os resíduos N231 e G248. Nas luciferases pH-insensitivas o resíduo N231 é substituído por T231 e o resíduo G248 é substituído pelo resíduo A248.

A luciferase recombinante de *Pyrearinus termitilluminans* é a que apresenta espectro mais deslocado para o azul entre as luciferases de coleópteros (VIVIANI et al., 1999), e portanto constitui um modelo importante para o estudo da relação entre estrutura e espectros de emissão.

8 Origem da bioluminescência e evolução molecular

Uma questão que sempre intrigou os pesquisadores foi a origem evolutiva da bioluminescência. Embora o mecanismo básico envolva a oxigenação de compostos genericamente conhecidos por luciferina e sua oxigenação, a natureza química destas moléculas varia entre os organismos vivos, indicando que a bioluminescência teve várias origens independentes durante a evolução (HASTINGS, 1995).

Apesar de serem classificadas funcionalmente como oxigenases, as luciferases não apresentam homologia com as oxigenases clássicas, sugerindo que a função de oxigenase das luciferases tenha sido aperfeiçoada após o aparecimento do fenótipo bioluminescente (REES et al, 1998).

Nos coleópteros as luciferases provavelmente originaram-se a partir de AMP-ligases (SCHROEDER, 1989; SUZUKI et al, 1990; TOH, 1990;

SCHOELTEN et al, 1991; VIVIANI, 2002) com alguma função metabólica por duplicação gênica.

Enzimas tipo-luciferases com capacidade de emitir quimiluminescência fraca na presença de luciferina e ATP foram encontradas em larvas de besouros não-luminescentes de *Tenebrio molitor* e em larvas de coleópteros (VIVIANI, BECHARA, 1996). Recentemente uma destas enzimas tipo-luciferase foi clonada pelo nosso grupo, mostrando ser de fato uma AMP-ligase, de função ainda desconhecida, que divergiu muito cedo das luciferases de besouros (Viviani et al., 2009).

Têm-se sugerido que a luciferase primitiva deveria apresentar um rendimento luminoso maior do que o encontrado em enzimas tipo-luciferases encontradas em outros besouros (VIVIANI, 2008).

Experimentos recentes com a albumina de soro bovina (BSA), que possui sítios hidrofóbicos para compostos aromáticos, aumentaram o rendimento de quimiluminescência vermelha na presença do adenilato de luciferina em meio aquoso (VIVIANI, OHMIYA, 2006).

A estrutura das luciferases, após seleção com base na luminescência, evoluiu para otimização da emissão de luz de diferentes cores, para diversas finalidades (VIVIANI, 2008).

9 Aplicações biotecnológicas das luciferases

O sistema luciferina-luciferase tem sido utilizado como reagente bioanalítico. Após a purificação da primeira luciferina e luciferase de vaga-lumes na década de 50, a quantificação de ATP tem sido utilizada para monitoramento de biomassa (SCHRAM, Witzenburg, 1989), avaliação de contaminação microbiológica de alimentos, bebidas, águas e fluidos biológicos (STANLEY, 1989; LUNDIN et al., 1989), avaliação da viabilidade celular (COMHAIRE et al., 1989), ensaios enzimáticos envolvendo formação e consumo de ATP, entre outros.

A clonagem do gene da luciferase de vaga-lumes tornou possível o seu uso como marcador altamente sensível da expressão gênica em células e tecidos (GOULD, SUBRAMANI, 1988; NAYLOR, 2000).

Com o desenvolvimento de equipamentos de fotodetecção e imageamento mais sensíveis, os genes das luciferases têm sido empregados para marcar e visualizar *in vivo* em tempo real de células e tecidos (VIVIANI , OHMIYA, 2006). Têm sido utilizados como marcadores sensíveis de células cancerígenas, auxiliando no estudo dos processos de metástases e no desenvolvimento de novas terapias.

Os genes de luciferases que estavam sendo utilizados codificavam enzimas que emitiam apenas na região verde-amarelo do espectro o que limitava suas aplicações, uma vez que muitos tecidos biológicos são opacos nesta região (VIVIANI, 2008).

Com a clonagem da luciferase emissora de luz vermelha e de luciferases modificadas geneticamente a partir da espécie brasileira, a gama de aplicações foi ampliada com o uso destas enzimas para monitorar uma série de eventos em células de mamíferos (NAKAJIMA et al., 2004; VIVIANI, OHMIYA, 2006).

A luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* devido à sua estabilidade e cinética começou a ser utilizada como importante marcador bioluminescente para imageamento de células e tecidos (Akiyoshi et al., 2009).

A luciferase de *Macrolampis,* em virtude de seu espectro bimodal e sua sensibilidade às variações de pH, possui alto potencial como biosensor intracelular sensível ao pH.

Nosso laboratório está desenvolvendo biosensores bioluminescentes para bioprospecção e análise de contaminação ambiental, fazendo uso das luciferases clonadas e desenvolvidas por nosso grupo (VIVIANI, 2008).

II Justificativa

Até recentemente, apenas as luciferases de lampirídeos norte-americanos e europeus eram alvo de estudo em pesquisa básica e para fins analíticos.

As luciferases do elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans*, e dos fengodídeos *Phrixotrix hirtus* e *P. viviani* por emitirem cores que variam do verde-azulado ao vermelho, e por serem pH-insensitivas constituem modelos únicos para o estudo da relação entre estrutura e função (espectros de bioluminescência e sensibilidade ao pH). Assim sendo, a purificação e caracterização físico-química destas constituem um passo importante para melhor compreender a relação entre estrutura e função.

III Objetivos

O objetivo principal deste projeto foi expressar e purificar as luciferases recombinantes de *Pyrearinus termitilluminans*, *Phrixotrix hirtus* e *Phrixotrix viviani* e fazer um estudo comparativo das propriedades de seus sítios ativos, através de medidas cinéticas de K_M para os substratos, constantes de decaimento, constantes catalíticas, medidas de polaridade do sítio ativo com sondas fluorescentes. Por meio da comparação destas propriedades e da modelagem molecular destas luciferases pretende-se melhor entender a relação entre estrutura destas luciferases, e espectros de bioluminescência.

IV MATERIAIS

1 cDNAs das luciferases de *Pyrearinus termitilluminans* , *Phrixotrix hirtus* e *Phrixotrix viviani*

O cDNA da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* foi subclonado a partir do plasmídeo pBluescript, previamente clonado (Viviani et al., 1999), em sítio PstI do vetor de expressão pProHtA (Invitrogen)

Os cDNAs das luciferases de *Phrixotrix hirtus* e *Phrixotrix viviani* foram subclonados a partir dos plasmídeo pBluescript nos vetores de expressão pCa24N (VIVIANI et al,1999, VIVIANI et al, 2006).

2 Equipamentos: Sistema de eletroforese Mini-Protean II (Biorad); Luminômetro TD3000III com fotomultiplicadora 1P28 (Japão); Câmara de fotodetecção CCD Light Capture I (ATTO, Tokyo); Espectrofluorímetro Hitachi F4500, Espectrofotômetro (Analítica), Centrífuga (Eppendorf 5417R).

3 Reagentes e tampões

Dosagem de proteína total por Bradford: Foi utilizado o *kit* Reagente corante concentrado da BioAgency.

Expressão heteróloga de proteína: Luria Broth (10g/L Triptona, 5g/L Extrato de levedura, 10g/L NaCl) (USB - EUA); LB-ágar (20 g/L Agar bacteriológico, 20 g/L Luria Broth) (USB - EUA); Ampicilina (Fisher - EUA); Tetraciclina (Amresco – EUA); IPTG (Fermentas - EUA);

Purificação: Fosfato Monobásico de Sódio (Synth - Brasil); Fosfato Bibásico de Sódio (Synth - Brasil); TRIS (hidroximetil aminometano) (Promega - EUA); Cloreto de Sódio (Synth - Brasil); 2-β-mercaptoetanol (Biorad - EUA); DTT – ditiotreitol (Amresco - EUA); EDTA - Ácido etilenodiamino tetracético (Ambresco - EUA).;Resina de níquel-agarose (Qiagen); Triton X-100 (USB - EUA); Complete - Coquetel anti-protease EDTA-Free (Roche - Alemanha); Cloreto de Magnésio (Synth – Brasil); Glicerol (Promega - EUA); Cloreto de Potássio (Synth - Brasil); Imidazol (Vetec – Brasil) ; Membrana para diálise (20 μm) (Sigma-Aldrich - EUA);

Eletroforese de Proteínas: Padrão de Massa Molecular (pré-corado com banda destacada em 68.8 kDa) (Invitrogen); dodecil sulfato de sodio SDS (Amresco - EUA); Glicina (Promega - EUA); Acrilamida Bis-Acrilamida (Promega - EUA); Temed (N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina) (Biorad- EUA); Persulfato de Amônio (Biorad – EUA); Comassie Brillant Blue (Biorad -EUA); Ensaio de Proteína Bradford (BioAgency); Metanol (Synth - Brasil); Etanol (Synth - Brasil); Ácido Acético Glacial (Synth - Brasil); Azul de Bromofenol (Biorad – EUA); Kit de detecção para Western-blotting (ECL-Amersham-GE Healthcare); Anticorpo primário Anti-Histag ; Anticorpo primário Anti-*Pyrearinus termitilluminans*; Membrana de nitrocelulose Hybond^{TM} ECL (Amersham-GE Healthcare);

Ensaios de Bioluminescência e Caracterização: Luciferase comercial de *Photinus Pyralis* (14.9 mg/ml – Promega - EUA); Sal de sodio de D-Luciferina (Promega- EUA); Sulfato de Magnésio (Synth - Brasil);Adenosina Trifosfato (ATP) (Sigma-Aldrich- EUA) ;Tween 20 (USB - EUA); 1,8 -ANS (Ácido sulfônico 8-anilino-1-naftaleno) (Sigma-Aldrich); 2,6-TNS (Ácido sulfônico 6-*p*-toluidino-2-naftaleno) (Sigma-Aldrich – EUA); Tampão Citrato; Tampão CAPS (ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfônico – USB – EUA.

V METODOLOGIA

Tampões utilizados para purificação por cromatografia de afinidade

Solução Estoque anti-protease: 1 tablete de Complete EDTA-Free para 1,5 ml de água mili-Q;

Tampão de Extração (A): 50 mM fosfato (pH 7.5); 300 mM NaCl ; 500 μL de solução estoque do coquetel anti-protease (Volume final: 20 ml); **Tampão B**: 50 mM tampão fosfato (pH 7.5); 300 mM NaCl; 5 mM ATP; 10 mM KCl; 20 mM $MgCl_2$; 100 μL da solução estoque do coquetel I anti-protease; (Volume final: 20 ml); **Tampão C:** 50 mM tampão fosfato (pH 7.5); 300 mM NaCl; 100 μL da solução estoque do coquetel anti-protease (Volume final: 20 ml);

Tampões de Eluição (E): 50 mM tampão fosfato (pH 7.5); 300 mM NaCl; 100 μL coquetel anti-protease; **E1**: tampão E mais 50mM imidazol (Volume

final: 20 ml); **E2**: tampão E mais 100 mM imidazol (Volume final: 20 ml); **E3**: tampão E mais 150 mM imidazol (Volume final: 20 ml); **E4** : tampão E mais 250 mM imidazol (Volume final. 20 ml) ; **E5** : tampão E mais 500 mM imidazol (Volume final: 20 ml);

Protocolo modificado para purificação da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans*

Em virtude da menor pureza da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* utilizando-se o protocolo original de purificação para as luciferases do *Phrixotrix* (VIVIANI et al., 2006), foi feita uma modificação deste, conforme descrito abaixo.

Tampão de Extração (A): 50 mM tampão fosfato (pH 7.5); 300 mM NaCl;10 mM Imidazol; 20 mM β-mercaptoetanol; 10% glicerol; 1% Triton X-100; 500 μl coquetel anti-protease (Volume final: 20 ml); **Tampão B:** 50 mM tampão fosfato (pH 7.5); 300 mM NaCl; 5 mM ATP; 20 mM $MgCl_2$; 10 mM KCl; 1% Triton X-100; 100 μL coquetel anti-protease (Volume final: 20 ml); **Tampão de lavagem (W) :** 50 mM tampão fosfato (pH 7.5) ; 20 mM Imidazol; 100 μl coquetel anti-protease (Volume final: 20 ml) ; **Tampão de Eluição (E) :** 50 mM tampão fosfato pH 7.5; 250 mM Imidazol; 100 μl coquetel anti-protease (Volume final: 20 ml);

Tampão de Diálise: 50 mM tampão fosfato (pH 7.5); 1 mM EDTA; 2 mM DTT; 10 % glicerol.

Tampões e Reagentes para SDS-PAGE

Tampão de Amostra: 15 g Tris-base; 2 ml SDS a 20%; 1 ml β-mercaptoetanol; 2 ml glicerol; 10 mg azul de bromofenol; 5 ml água deionizada;

Tampão de Corrida (10X): 250 mM Tris; 2,5 M Glicina pH 8.5; 1% SDS; **Corante Coomassie Blue (100 mL):** 250 mg Comassie Blue R-250 (J.T.Baker-Canadá); 45 ml Metanol; 10 ml Ácido acético glacial;

Descorante de Gel (1L): 450 mL metanol; 100 ml de ácido acético glacial; 450 mL água mili-Q;

Gel de SDS-PAGE

Gel de Resolução (10%): 30% Acrilamida; 1.5 M Tris pH 8.8; 10% SDS (Dodecil Sulfato de Sódio); 10% Persulfato de amônio; 3 μl Temed; **Gel de Empacotamento:** Água mili-Q; 30% acrilamida; 1.0 M Tris (pH 6.8); 10% SDS; 10% Persulfato de Amônio; 2 μl Temed;

Tampões para Western Blotting

Tampão de transferência: 25 mM Tris; 192 mM Glicina; 20% Metanol; **Tampão PBS (***Phosphate Buffer Saline***):** 50 mM Na_2HPO_4; 50 mM NaH_2PO_4; 100 mM NaCl; (pH 7.5); **Solução Bloqueadora:** 5% de leite em pó desnatado; 0.1% (v/v) de Tween 20;PBS diluído 10 vezes; **Tampão de Lavagem:** Tampão PBS diluído 10 vezes; 0.1 % Tween 20;

Soluções para Detecção (Western Blotting)

Solução Reveladora: Dektol (Kodak) 1:5, água destilada; **Solução Interruptora:** 28% ácido acético (950 ml de água destilada mais 50 ml ácido acético a 28%); **Solução Fixadora:** F5 (Kodak) 1:1

1 Expressão das luciferases em bactérias

O cDNA da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* (Pte) foi subclonado no vetor pPRoHtA no sítio de restrição Pst I e transformado em células competentes de *E.coli* BL21-DE3.

Os cDNAs das luciferases de *Phrixotrix* (PxRE e PxGR) foram subclonados nos vetores pCA24N (Viviani et al., 2006)e transformados em células competentes de *E.coli* BL21-DE3.

Para transformação foram utilizados 50 μl de células competentes que foram depositadas em um tubo previamente resfriado. Em seguida foram adicionados 50 ng do vetor, deixando por 30 minutos no gelo. Após esse período, o tubo foi submetido a choque térmico a temperatura de 42°C por um período de 45 segundos e posteriormente resfriado no gelo por 2 minutos. Foram adicionados 200 μl de meio LB no tubo contendo o plasmídeo e as células competentes e submetido à agitação de 225 rpm a temperatura de 37°C por 1 hora. Após este período a mistura foi depositada em placas de Petri contendo meio LB sólido contendo o antibiótico adequado (ampicilina para a luciferase de *Pyrearinus* e tetraciclina para as luciferases de *Phroxtrixi*).

Colônias foram selecionadas e crescidas a 37 º C em 1L de meio LB suplementado com 100 µg/ml de ampicilina até OD_{600} = 0.5, sendo induzidas com 0.5 mM de IPTG durante a noite à temperatura de 20 ºC.

As células foram coletadas a 2500g por 15 minutos e o precipitado dissolvido suavemente em 10 ml de tampão **A** previamente resfriado. O volume para dissolver o precipitado bacteriano foi escolhido tomando como fator de concentração um valor 100 vezes menor do que o volume de cultura, considerando que sob condições nativas obtemos menos de 1 mg/L de proteína (recomendações “The QIAexpressionist” – Qiagen). A lise celular foi feita com choque térmico, alternando 3 vezes o congelamento em gelo seco com descongelamento à temperatura ambiente.

1.1 Medidas de luminescência *in vivo* das bactérias.

Para acompanhar a expressão da luciferase nas bactérias foram feitas, medidas *in vivo* . A atividade luminescente *in vivo* foi determinada misturando-se 90 µl da suspensão de bactéria e 10 µl de luciferina a 10 mM pH 5.0 no luminômetro.

1.2 Medidas de atividade bioluminescente *in vitro*.

A atividade bioluminescente da luciferase foi medida considerando o pico inicial expresso em milivolts. Para isto, foram utilizados 75 µL de tampão Tris 0.1 M pH 8.0, 4 µg de extrato, 10 µL de luciferina a 10 mM e 5 µL de MgATP (ATP:40mM, $MgSO_4$: 80mM). As medidas foram feitas em triplicata.

1.3 Quantificação de proteína pelo método Bradford

A quantificação da concentração da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* e das luciferases de *Phrixotrix spp*, foi feita utilizando o método Bradford.

O reagente foi preparado diluindo 1 parte do corante concentrado em 4 partes de água destilada e deionizada e filtrado para remover partículas.

Foram preparadas 5 diluições de albumina de soro bovino (BSA), variando de 0,2 a 1,0 mg/ml e feita a leitura da absorbância a 595 nm em um espectrofotômetro. Uma curva padrão foi construída e a quantificação de luciferase foi fita por interpolação com a curva padrão.

1.4 Purificação das luciferases por cromatografia de afinidade

A resina de níquel foi previamente equilibrada com tampão **A** e posteriormente misturada com o extrato bacteriano contendo luciferase e submetida à agitação moderada a 4 º C durante 45 minutos.

A mistura foi então aplicada em uma mini-coluna e lavada primeiramente com 10 mL de tampão **B** e posteriormente com 10 ml de tampão **C**. A luciferase recombinante foi eluída da resina com 1 ml dos tampões **E1** a **E5**,contendo diferentes concentrações de imidazol. Alíquotas foram separadas para medição da atividade bioluminescente e para realização de eletroforese de SDS-PAGE e western-blotting.

A amostra com maior atividade (E4) foi pipetada no saco de diálise (poro de 20μm; 15 kDa) previamente fervido em água MilliQ e pequena quantidade de EDTA e posteriormente lavada com água destilada e deionizada. O saco de diálise com a preparação da luciferase foi imerso em um litro de tampão de diálise previamente gelado e mantido durante a noite em agitação leve à 4°C.

Estas amostras foram mantidas no gelo para os ensaios de caracterização: proteína total, estimativa dos K_Ms para ATP e LH2, atividade específica e constante catalítica.

O protocolo para purificação da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* foi modificado visando à obtenção de uma fração mais pura, uma vez que as purificações feitas utilizando o protocolo original não foram eficientes para obtenção de uma banda mais pura.

Neste protocolo modificado, a resina foi previamente equilibrada no tampão **A**.(50 mM tampão fosfato (pH 7.5); 300 mM NaCl;10 mM Imidazol; 20 mM β-mercaptoetanol; 10% glicerol; 1% Triton X-100; 500 μl coquetel anti-protease) O lisado foi misturado com a resina e mantido em agitação por 45 minutos a 4°C. A mistura foi aplicada na mini-coluna e lavada uma vez com 10 ml de tampão **B** (50 mM tampão fosfato (pH 7.5); 300 mM NaCl; 5 mM ATP; 20 mM $MgCl_2$; 10 mM KCl; 1% Triton X-100; 100 μL coquetel anti-protease) A resina foi lavada duas vezes com 10 ml de tampão **W** (50 mM tampão fosfato (pH 7.5) ; 20 mM Imidazol; 100 μl coquetel anti-protease) A extração da luciferase foi feita com quatro lavagens com tampão de eluição **E** (50 mM tampão fosfato pH 7.5; 250 mM Imidazol; 100 μl coquetel anti-protease).

2 SDS-PAGE

Alíquotas das frações extraídas da coluna de afinidade (50 μl) foram misturadas em 50 μl de tampão de amostra e fervidas a 95°C durante 4 minutos.

Os géis 10% foram montados no aparato e imersos no tampão de corrida. As amostras foram aplicadas e submetidas à eletroforese (120 V) por um período de 1 hora. Os géis foram retirados e imersos em corante Comassie Blue por um período de 1 hora e posteriormente colocados em solução descorante num agitador horizontal até visualização das bandas. Foram então imersos em glicerol 5% por um período de 15 minutos e posteriormente empacotados entre duas folhas de papel celofane umedecidas com tampão descorante.

3 Western Blotting

Após submeter as amostras a eletroforese, conforme método citado no item anterior, as proteínas do gel foram eletro-transferidas (120 mV) para a membrana de nitrocelulose em tampão de transferência gelado.

Após a transferência, a membrana foi imersa na solução bloqueadora (5% de leite em pó desnatado; 0.1% (v/v) de Tween 20; PBS diluído 10 vezes) por uma hora em agitação leve à temperatura ambiente. O anticorpo primário policlonal (anti-His-Tag, anti-Pte ou anti-PXRE) com uma titulação de 1: 3000 (v/v) diluído na solução bloqueadora (5% de leite em pó desnatado; 0.1% (v/v) de Tween 20;PBS diluído 10 vezes) foi adicionado à membrana que foi incubada em agitação leve durante uma hora, à temperatura ambiente. O anticorpo primário foi removido lavando brevemente a membrana por duas vezes com tampão de lavagem (Tampão PBS diluído 10 vezes; 0.1 % Tween 20) que ficou imersa neste tampão por 15 minutos à temperatura ambiente.

O anticorpo secundário de coelho conjugado com HRP com uma titulação de 1: 5000 (v/v) diluído na solução bloqueadora foi adicionado à membrana que foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente e sob agitação leve.

O anticorpo secundário foi removido e a membrana foi tratada com tampão de lavagem seguindo o mesmo procedimento descrito para o anticorpo primário.

Para detecção das bandas de proteínas, foram misturados volumes iguais dos reagentes de detecção 1 e 2 que acompanham o kit de Western Blotting. A membrana foi retirada do tampão de lavagem e, com auxílio de uma pinça, foi levantada e o excesso de líquido drenado e logo em seguida colocada sobre um papel absorvente. Foi então transferida para uma superfície limpa onde o reagente de detecção foi pipetado sobre a membrana e incubado por um minuto. A membrana foi cuidadosamente drenada do excesso de reagente de detecção, embrulhada em um plástico transparente e colocada num cassete com filme de Raio-X. Após um período de tempo que variou de 10 a 20 minutos, o filme foi retirado do cassete e submerso na solução reveladora até o aparecimento das bandas, sendo imediatamente transferido para solução interruptora onde permaneceu por cinco minutos e finalmente para solução fixadora. Os filmes revelados foram deixados para secar a temperatura ambiente. Alternativamente, as membranas foram imageadas em câmara de fotodetecção CCD.

4 Ensaios de K_m para LH_2 e ATP

Para o ensaio do K_M para luciferina foi utilizada luciferina com concentrações finais variando de 0.01 a 1 mM, 5 μL de 40 mM ATP/80 mM $MgSO_4$, 4 μg de luciferase (Atividade específica de 53,5 x 10^{-3} mV/mg) e 75 μL de 0.1 M Tris-HCl pH 8.0.

Para o ensaio do K_m para ATP foram utilizados 5 μL de ATP com concentrações finais entre 0.03 a 4 mM , 50 mM de $MgSO_4$ (concentração final) , 1 mM de luciferina, 4 μg de extrato e 75 μL de 0.1M Tris-HCl pH 8.0.

Para cada concentração de substrato foram feitas medidas em triplicata e calculada a média das intensidades obtidas em mV.

Os valores de K_M foram calculados utilizando o gráfico de Lineweaver-Burk, tomando a intensidade inicial (I_0) como medida de V_0 (velocidade inicial). O programa Origin Versão 6 foi utilizado para a construção do gráfico.

5 Cálculo do K_D e da K_{cat}

O cálculo da constante de decaimento (K_D) foi feito utilizando a equação 3:

$$K_D = -\frac{\ln\left(I_0 / I\right)}{\Delta t} \qquad (3)$$

Onde (I_0/I), é a razão entre a intensidade máxima (mV) e a intensidade medida após um período de tempo Δt segundos (300s). Este tempo foi considerado suficiente para medição do decaimento para a luciferase de *Pyrearinus,* que possui um decaimento lento. Para a luciferase de *Phrixotrix hirtus* que apresenta um decaimento rápido, o período de tempo escolhido foi menor (em torno de 120 s)

O cálculo da constante catalítica foi feito utilizando a equação 4:

$$K_{cat} = \frac{V_{\max}}{[E]} \qquad (4)$$

A constante catalítica é definida como o número de moléculas de substrato convertidas por uma molécula de enzima por unidade de tempo. Na equação acima V_{max} é expresso em fótons por segundo e [E] a concentração de moléculas de luciferase em moles Como padrão de comparação utilizamos

a luciferase comercial pura de *Photinus pyralis*. Para expressar V_{max} em fótons/segundos.mL, consideramos a amostra com maior atividade específica (mV/mg). Para transformar mV em fótons/segundo utilizamos o padrão luminoso radioativo cedido pelo laboratório de J.W. HASTINGS conforme (HASTINGS, WEBER, 1965). A quantificação de proteína para cálculo da Kcat foi feito por densitometria utilizando o gel de SDS-PAGE e o programa CS Analyzer V.3 (Atto,Japão). A concentração de enzima foi estimada em gel de SDS-PAGE, com base na concentração de padrões de massa da luciferase comercial (1,6. 10^{-8} moles/mg), considerando 90% de pureza para as luciferases de *Pyrearinus* e de *Phrixotrix*. Para transformar a atividade em mV para fótons/segundo, medimos a intensidade luminosa do padrão radioativo (HASTINGS e WEBER, 1965) onde 1 mV correspondem a $2{,}3.10^{7}$ fótons/s, uma estimativa do decaimento radioativo da amostra ao longo dos anos, e multiplicamos pela atividade específica da amostra. Por fim, dividimos o resultado por 0,15 que é a sensibilidade espectral da fotomultiplicadora para o comprimento de onda de 534 nm, para o caso da Pte.

A eficiência catalítica das enzimas purificadas é definida como a razão entre a constante catalítica e a constante de afinidade pelo substrato (K_m/K_{cat}).

6 Determinação do pH ótimo

O pH ótimo para a luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* foi determinado a partir da atividade luminescente (75 µL de tampão 0.1 M Tris pH 8.0, 10 µl (0,4 mg/ml) de extrato, 10 µL de luciferina a 10 mM e 5 µL de MgATP - ATP:40mM, $MgSO_4$: 80mM) numa faixa de pH variando de 5 até 10.

Para isto, foram utilizados tampões para cada faixa de pH: do pH 5 ao pH 6, 0,1 M tampão citrato; do pH 6 ao pH 8, 0,1 M tampão fosfato; do pH 7.5 ao pH 8.5, tampão 0,1 M Tris e do pH 8.5 ao pH 10, 0,1 M tampão CAPS. Os valores de atividade foram normalizados nos pH de intersecção dos tampões.

7 Ensaios de termoestabilidade

Alíquotas de 100 µl da amostra purificada pós-diálise foram incubadas a 4°C e a 37°C. As atividades luminescentes (75 µL de tampão 0,1 M Tris pH

8.0, 10 µL de extrato, 10 µL de luciferina a 10 mM e 5 µL de MgATP (ATP:40mM, $MgSO_4$: 80mM).foram medidas em intervalos de 3, 5, 12, 24 e 48 horas, conforme método descrito no item 6.

8 Espectros de Fluorescência

Os espectros de fluorescência foram medidos utilizando espectrofluorímetro Hitachi F4500. Para obtenção do espectro de fluorescência do triptofano das luciferases de *Phrixotrix*, 50 µl das amostras purificadas (50 ng/µl) foram misturadas a 990 µl de tampão fosfato a 01 M (pH 7.5). A excitação foi em 280 nm com emissão na faixa de 300-450 nm.

8.1 Espectros de fluorescência com 2,6-TNS e 1,5-ANS

As luciferases de *Phrixotrix* foram tituladas com 1,5-ANS e 2,6-TNS misturando 1 µM da sonda fluorescente com 5 a 10 µM de enzima purificada em 999 µl de tampão fosfato a 50 mM, previamente filtrado (VIVIANI et al., 2006). A luciferase de *Pyrearinus* foi titulada com 2,6-TNS. Os espectros de fluorescência para o 2,6-TNS e 1,5-ANS foram obtidos com excitação a 320 nm e o espectro de emissão variando de 400 a 600 nm. Os espectros de fluorescência dos tampões e solventes foram utilizados como branco e corrigido para a sensibilidade espectral do equipamento.

Uma curva padrão do máximo de energia em função do índice de polaridade (em parênteses) foi construída utilizando os seguintes solventes: formamida (7,3), metanol (6,6), DMSO (6,5), dimetilformamida (6,4), etanol (5,2), isopropanol (4,3), acetato de etila (4,3) e éter etílico (2,9) (VIVIANI et al, 2006).

9 Espectros de Bioluminescência

Os espectros de bioluminescência também foram medidos em espectrofluorímetro Hitachi F4500, com a janela de excitação fechada, abertura da janela de emissão=20 nm e velocidade de varredura de 2400nm/min.

10 Modelagem Molecular

Foram construídos quatro modelos de nossas luciferases, as três pH-insensitivas (*Pyrearinus termitilluminans*, *Phrixotrix hirtus* e *Phrixotrix hirtus*) e a pH sensitiva *Macrolampis* sp2 que foi incluída por ser uma luciferase de lampirídeo que foi expressa e parcialmente purificada em nossos laboratórios e servir como modelo para o estudo entre estrutura, função e espectros de bioluminescência.

O programa Modeller versão 9.4, que utiliza o método das restrições espaciais (SALI e BLUNDEL, 1993) foi empregado para a construção dos modelos (SALI, 2006)

O primeiro modelo construído foi o da luciferase de *Macrolampis* nas estações gráficas do Laboratório Nacional de Luz Síncrontron com orientação do Dr. João Barbosa.

A construção dos modelos tridimensionais das luciferases de *Pyrearinus termitilluminans, Phrixotrix hirtus, Phrixotrix viviani* foram feitas em nossos laboratórios, utilizando plataformas Linux e Windows.

Como molde foi utilizado estrutura da luciferase *Luciola cruciata* (Lcr) complexada com oxiluciferina e AMP, resolvida a 1.6 Å por difração de raios X (código PDB- 2d1R) (NAKATSU, 2006).

As luciferases estudadas compartilham 42% de homologia com a luciferase de *Luciola cruciata*, até o momento a única luciferase de lampirídeo resolvida com substrato e com densidades eletrônicas nas regiões importantes da molécula, como os *loops* do sítio de ligação de ATP e o *loop* que faz conexão entre os dois grandes subdomínios da molécula

O programa Procheck (LASKOWSKI et al., 1993, MORRIS *et al*, 1992) foi utilizado para avaliar a qualidade dos modelos. Este programa extrai parâmetros estereoquímicos de estruturas com alto grau de refinamento e alta resolução que são comparados com a geometria dos resíduos do modelo.

Para visualização e elaboração das figuras dos modelos foi utilizado o programa Pymol v. 0.99 (DELANO, 2006).

O alinhamento das luciferases foi feito empregando o programa CLC Main Workbench V 4.1.2.

Os índices de hidrofobicidade (KYTE J. & DOOLITTLE R.F, 1982) foram calculados para as luciferases de *Macrolampis*, *Pyrearinus termitilluminans*, *Phrixotrix viviani* e *Phrixotrix hirtus* utilizando o programa CLC Main Workbench versão 4.1.2.

VI Resultados

1 Expressão e Purificação das luciferases de *Phrixotrix* spp e *Pyrearinus termitilluminans*

As luciferases de *Phrixotrix* e *Pyrearinus termitilluminans* foram eficientemente expressas e purificadas por cromatografia de afinidade em níquel. A Tabela 1 resume as atividades específicas do extrato bruto e das frações com maior atividade específica das luciferases de *Pyrearinus termitilluminans*, *Phrixotrix viviani* e *Phrixotrix hirtus*

As figuras 7 8 e 9 apresentam os géis de SDS-PAGE das etapas de purificação das luciferases de *Pyrearinus termitillluminans*, *Phrixotrix viviani* e *Phrixotrix hirtus* por cromatografia de afinidade,

Tabela 1 – Atividades Específicas das luciferases purificadas.

Luciferase	**Atividade Específica (x 10^{-3}) (mV/mg)**	
	Extrato Bruto	Cromatografia de afinidade
Pyrearinus termitilluminans	3,4 ±0,7	53,3 ± 6,2 (fração E3)
Phrixotrix viviani	5,7 ±1,3	51,8 ± 4,0 (fração E4)
Phrixotrix hirtus	3,3 ± 1,2	37,8 ± 7,4(fração E4)

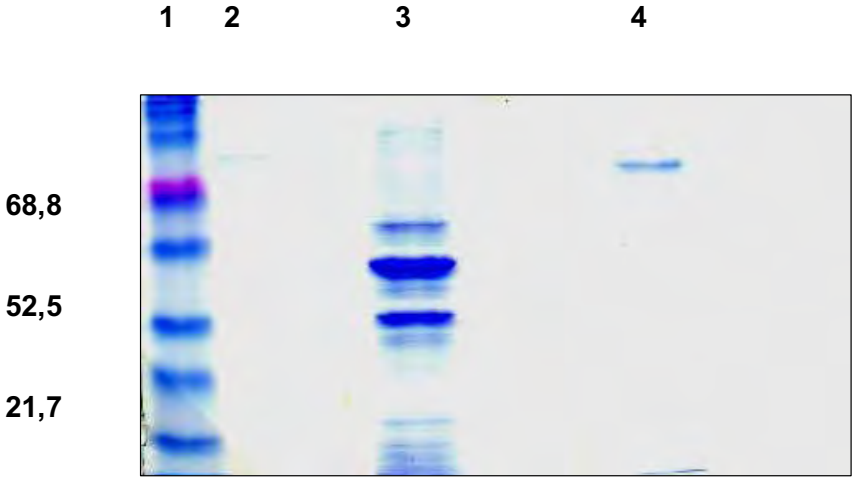


Figura 7 – Gel de SDS-PAGE 10% das etapas de purificação da *luciferase de Pyrearinus termitilluminans*: (1): Padrão de Massa Molecular; (2): BSA: 10 μg/ul; (3): Fluxo não-retido; (4): *Pyrearinus termitillluminans* eluida com 250 mM Imidazol.

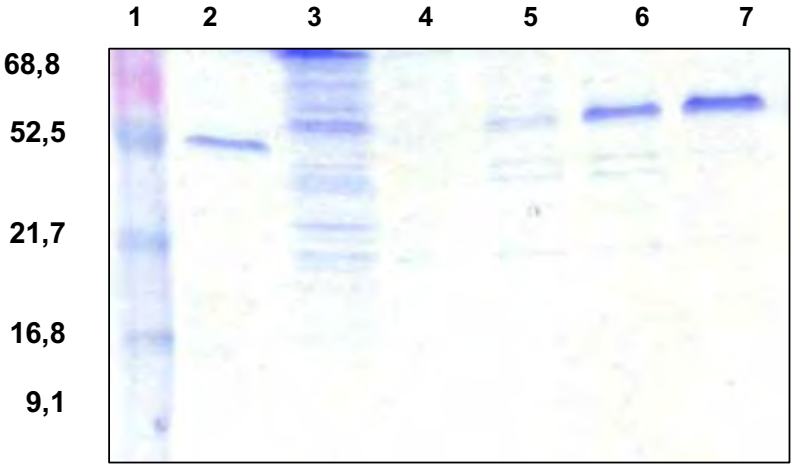


Figura 8 – Gel de SDS-PAGE 10% das etapas de Purificação da *Phrixotrix viviani* (1): Padrão de Massa Molecular. (2): *Photinus Pyralis* (62 kDa - 50 ng/μl); (3): Extrato pós-lise; (4) a 7: frações eluidas com concentrações crescentes 150 a 250 mM Imidazol.

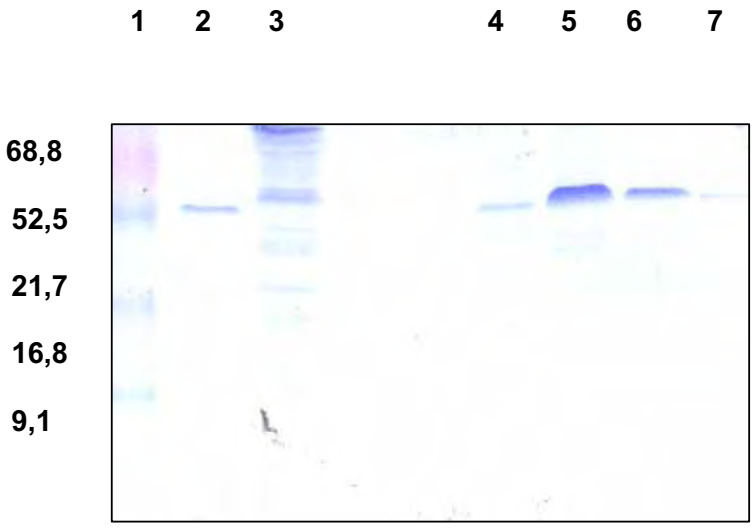


Figura 9 – Gel de SDS-PAGE das Etapas de Purificação da *Phrixotrix hirtus* - (1): Padrão de Massa Molecular. (2): *Photinus Pyralis* (62 kDa); (3): Extrato Pós-Lise; (4) a 7: frações eluidas com concentrações crescentes 150 a 250 mM Imidazol.

A figura 10 apresenta o Western-blotting testado com anticorpo anti-*Pirearinus termitilluminans*.

Figura 10 – Western-blotting sondado com anticorpo anti-. *Pirearinus termitilluminans*

Poço 1: *Photinus pyralis*; Poço 2: *Pyrearinus termitilluminans* (fração coletada com 250 mM imidazol).

A figura 11 apresenta o western-blotting da *Phrixotrix viviani* e *Phrixotrix hirtus* testado com anticorpo policlonal anti-Histag.

1 2 3 4 5 6 7

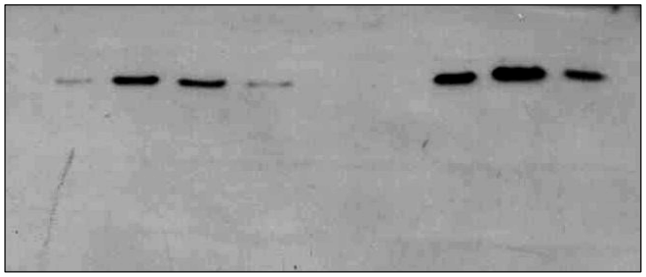


Figura 11 – Western blotting testado com anticorpo policlonal anti-histag. Poços 1 – 4 (*Phrixotrix hirtus*): Concentrações Imidazol (200 – 500 mM); Poços 5 a 7 (*Phrixotrix viviani*): Concentrações Imidazol (200 – 400 mM)

A luciferase de *Pirearinus termitilluminans* apresentou maior atividade específica que as luciferases de *Phrixotrix*. Entretanto, de acordo com a eletroforese em SDS-PAGE, a quantidade de proteína purificada foi maior para as luciferases de *Phrixotrix* do que *Pyrearinus termitilluminans*, em decorrência da maior expressão das primeiras duas no sistema pCAN (cerca de 200 μg/ml da *Phrixotrix viviani* contra 600 μg/ml da *Phrixotrix hirtus*). Estes resultados indicam que a luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* provavelmente tem uma maior constante catalítica e um rendimento quântico maior.

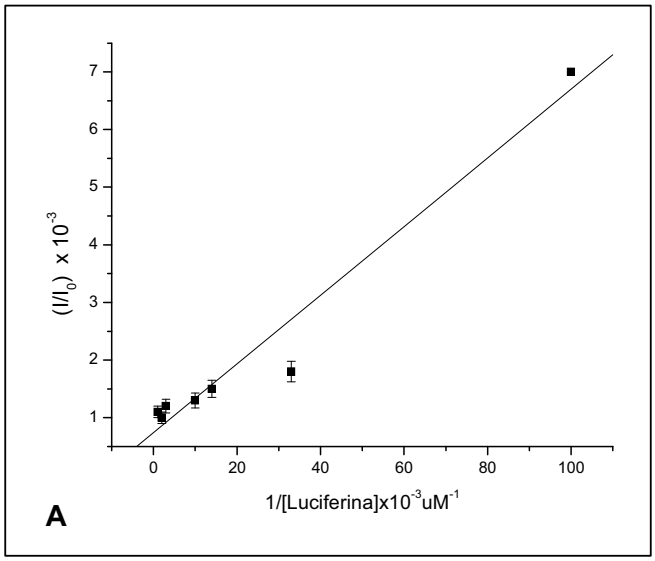
2 Determinação das propriedades físico-químicas

A Tabela 2 sumariza as propriedades físico-químicas das luciferases recombinantes de *Pyrearinus termitilluminans, Phrixotrix viviani* e *Phrixotrix hirtus,* e da luciferase de *Photinus pyralis* que foi utilizada como padrão.

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas das luciferases purificadas.

Luciferase	pH ótimo	K_{cat} x 10^{-3} (s^{-1})	LH2 K_M (μM) (μM)	LH2 K_{cat}/K_M ($s^{-1}.M^{-1}$)	ATP K_M (μM)	ATP K_{cat}/K_M ($s^{-1}.M^{-1}$)	K_D 10^{-4} (s^{-1})
Photinus pyralis	7.9	74	10	4000	250	120	240
Pyrearinus termitilluminans	8.2	7.0	80 ± 7	87	370	19	63
P. viviani	8.0	7,0	64 ± 10	31	330	6	3
P. hirtus	8.2	43	7 ± 0.7	286	130	15	200

As figuras 12-A e 12-B apresentam os gráficos de Linewaver-Burker para luciferina e ATP para a luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* (Programa Origin Versão 6.0).



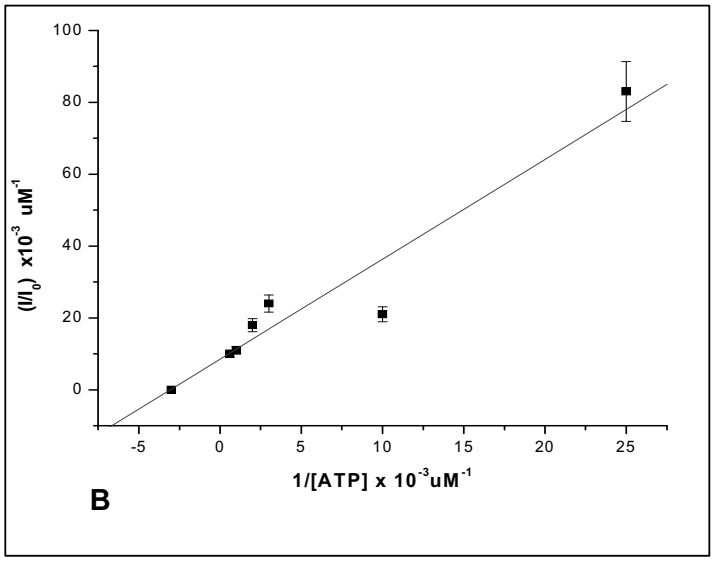


Figura 12 - Gráficos de Lineweaver-Bucker para luciferina (A) e para ATP (B) da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans*

Os K_Ms para a luciferina e ATP foram calculados para as três luciferases. Pode-se verificar que a luciferase de *Phrixotrix hirtus* apresenta o menor K_M para luciferina (VIVIANI et al, 2006), significando grande afinidade pelo substrato, enquanto as luciferases de *Pyrearinus termitilluminans* e *Phrixotrix viviani* possuem valores de K_M próximos. A luciferase de *Photinus pyralis* também apresenta também grande afinidade pela luciferina, com valor próximo ao da *Phrixotrix hirtus*.

As luciferases de *Phrixotrix viviani* e *Pyrearinus termitilluminans* apresentam valores de K_M para ATP similares, enquanto a *Phrixotrix hirtus* apresenta também maior afinidade por ATP, juntamente com a luciferase de *Photinus pyralis*.

As constantes catalíticas foram estimadas utilizando a equação 4.

As luciferases de *Pyrearinus termitilluminans* e *Phrixotrix viviani* possuem as mesmas constantes catalíticas, porém a *Pyrearinus termitilluminans* apresenta o dobro da eficiência catalítica da *Phrixotrix viviani*. Surpreendentemente, a *Phrixotrix hirtus* apresenta a maior constante catalítica e a maior eficiência catalítica de todas as luciferases estudadas (*Pyrearinus termitilluminans* e *Phrixotrix viviani*).

As constantes de decaimento foram calculadas empregando a equação 5, tomando como intervalo de tempo Δt = 300 s. As constantes de decaimento refletem o quanto as enzimas são inibidas pelo produto, e possíveis mudanças conformacionais durante as etapas catalíticas da enzima, produzindo rápido decaimento da atividade bioluminescente no caso da *Phrixotrix hirtus* ou um decaimento lento, nos casos da *Pyrearinus termitilluminans* e *Phrixotrix viviani*.

O pH ótimo das luciferases de *Phrixotrix viviani* e *Phrixotrix hirtus* foi 8 e o da *Pyrearinus termitilluminans* 8,2, enquanto o pH ótimo para a *Photinus pyralis* foi de 7.9 (Figura 13).

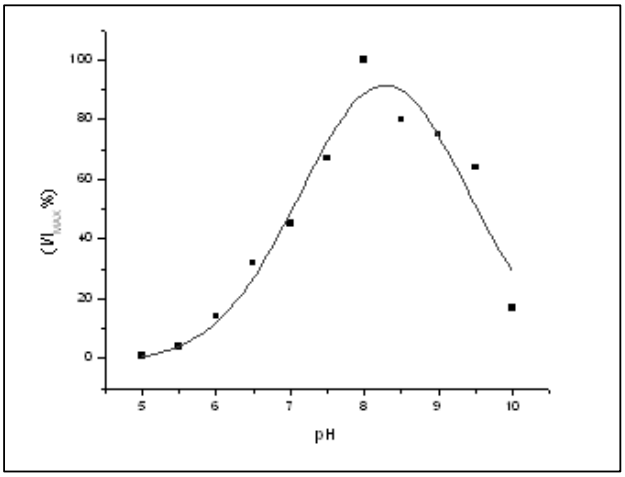


Figura 13 – Curva do efeito de pH na atividade da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans*.

2.1 Termoestabilidade

A figura 14 apresenta a termoestabilidade da *Pyrearinus termitilluminans*. Verifica-se que a luciferase é termoestável à temperatura de 4°C por um longo período, sugerindo que a esta temperatura a enzima conserva seu enovelamento correto. Amostras que foram mantidas a temperatura de -20°C com 10% de glicerol mantiveram-se ativas por um período de seis meses e exibindo a mesma cinética. A 37°C a enzima perde sua atividade nas 20 primeiras horas de incubação.

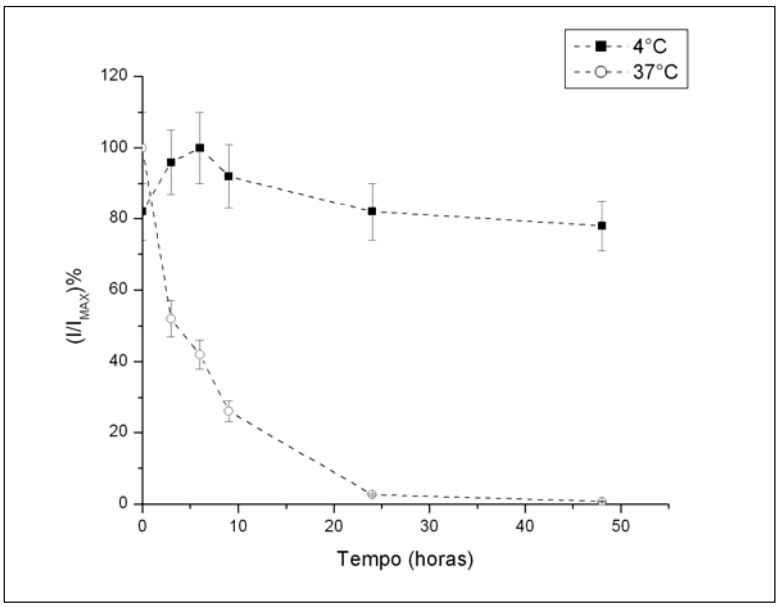


Figura 14 – Ensaios de termoestabilidade da fração purificada e dialisada da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans*

2.2 Espectros de Fluorescência

Utilizando sondas fluorescentes 1,8-ANS e 2,6-TNS DeLuca (DeLUCA, 1969) mostrou que o sítio de ligação da luciferina da luciferase de *Photinus pyralis* seria hidrofóbico, porém Ugarova e Brovko sugeriram que o sítio ativo poderia ser anfifílico (UGAROVA, BROVKO, 1999). Estas sondas são inibidores competitivos do sítio ativo da luciferase de *P.pyralis*.

Para verificar a polaridade do sítio ativo das nossas luciferases, foram medidos os picos dos espectros de fluorescência destas sondas tituladas no sítio ativo das luciferases (Tabela 3) e comparados com o valor do pico publicado para a luciferase de *Photinus pyralis*. Verifica-se que os picos de fluorescência são mais deslocados para o azul nas luciferases de *Pyrearinus termitilluminans e Phrixotrix viviani* em comparação com a luciferase de *Photinus pyralis*, indicando um sítio ativo mais apolar, enquanto a luciferase de

Phrixotrix hirtus apresenta um espectro mais deslocado para o vermelho, sugerindo um sítio ativo mais polar.

Tabela 3 – Picos dos Espectros de Fluorescência de 2,6-TNS e 1,8-ANS no sítio ativo das luciferases

Luciferase	Espectros de Fluorescência λ_{Max} (nm)		
	Triptofano	2,6 TNS	1,8 ANS
P.pyralis	334	421	471
Phrixotrix viviani	339	422	462
Phrixotrix hirtus	339	436	479
Pyrearinus termitilluminans	-	421	-

A figura 15 apresenta os espectros de fluorescência das luciferases de *Phrixotrix* tituladas com a sonda fluorescente 2,6-TNS (VIVIANI et al, 2006). Verifica-se que o espectro de fluorescência apresenta em adição ao pico principal, um "ombro" deslocado para o vermelho o que é indicativo de um sítio ativo mais exposto ao solvente.

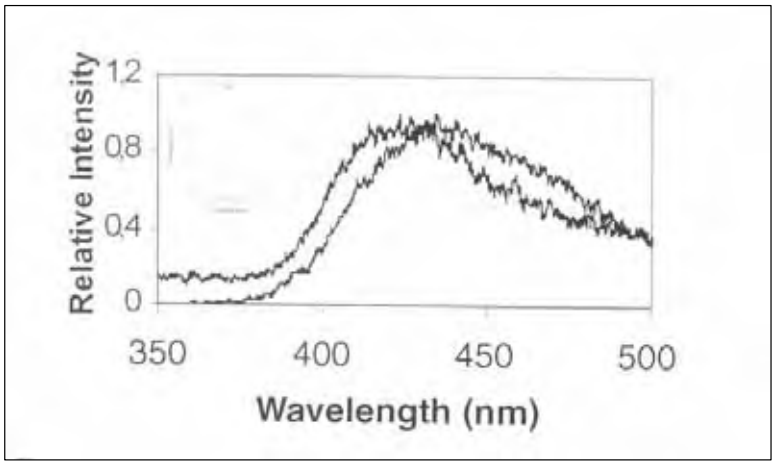


Figura 15 – Espectros de fluorescência de 2,6-toluidino-naftaleno-sulfonato titulado nas luciferases de PxGR (esquerda) e PxRE (direita) na presença de 1 μM.(VIVIANI et al. 2006)

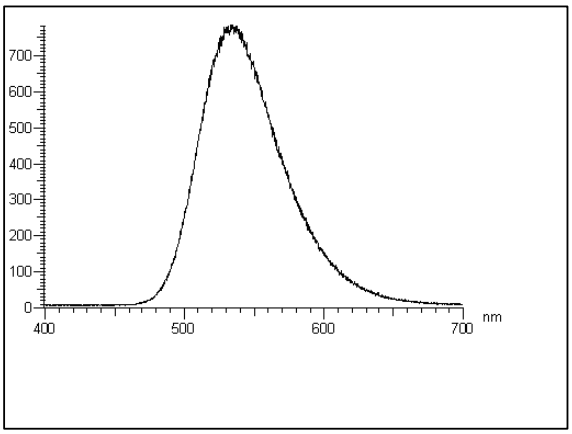
2.3 Espectros de Bioluminescência

A tabela 4 resume os espectros de bioluminescência das luciferases de *Pyrearinus termitilluminans*, *Phrixotrix viviani* e *Phrixotrix hirtus* em pH 6, 7 e 8. Como sabido, o espectro de bioluminescência da *Pyrearinus termitilluminans* é o mais deslocado para o azul na faixa entre os pH 6 e 9 (VIVIANI et al., 1999), porém acima de pH 10 foi verificado um deslocamento em 30 nm para o vermelho e um alargamento no espectro, o que restringe a definição de pH-insensitividade originalmente proposta (VIVIANI , BECHARA 1995). As figuras 16-A e 16-B mostram os espectros de bioluminescência da *Pyrearinus termitilluminans* em 0,1 M Tris pH 8 e em 0.1M CAPS pH10.

Tabela 4 – Comprimentos de onda máximos dos espectros de bioluminescência das luciferases *Photinus pyralis* (Ppy*)*. , *Pyrearinus termitilluminans* (Pte), *Phrixotrix hirtus* (PxRE) e *Phrixotrix viviani* (PxGR*)*.

Luciferase	pH 6	pH 7	pH 8	pH 10
	λ_{MAX} (nm) (meia- largura)	λ_{MAX} (nm) (meia-largura)	λ_{MAX} (nm) (meia-largura)	λ_{MAX} (nm) (meia-largura)
Ppy	610 (78)	-	562 (78)	nd
Pte	536 (78)	536	534 (73)	564
PxRE	622 (62)	622	622 (53)	nd
PxGR	548 (75)	548	548 (70)	nd

nd – Não determinado



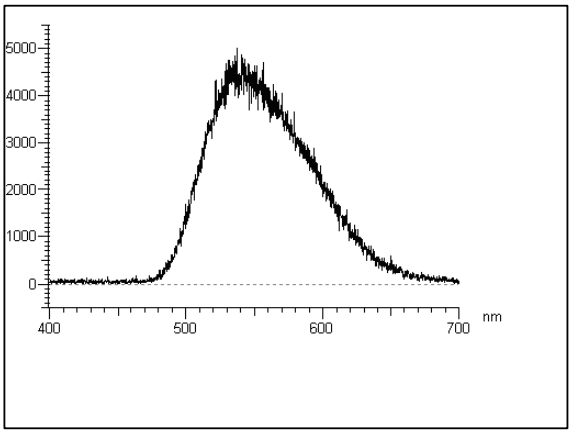


Figura 16 – Espectros de bioluminescência *in vitro* da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans*: (Painel da direita): em 0.1M Tris pH 8. (Painel da Esquerda): em 0.1 M CAPS pH 10.

3 Modelagem Molecular da Luciferase de *Pyrearinus termitilluminans*: comparação com as luciferases de *Macrolampis sp2* e *Phrixotrix*

3.1 Alinhamento das luciferases

As luciferases de *Macrolampis* sp2, *Pyrearinus termitilluminans*, *Phroxitrix hirtus* e *Phrixotrix viviani* foram alinhadas com as estruturas das luciferases de *Photinus pyralis* e *Luciola cruciata*. As Figuras 17 e 18 apresentam o alinhamento estrutural, ressaltando os resíduos conservados do sítio de ligação da oxiluciferina.

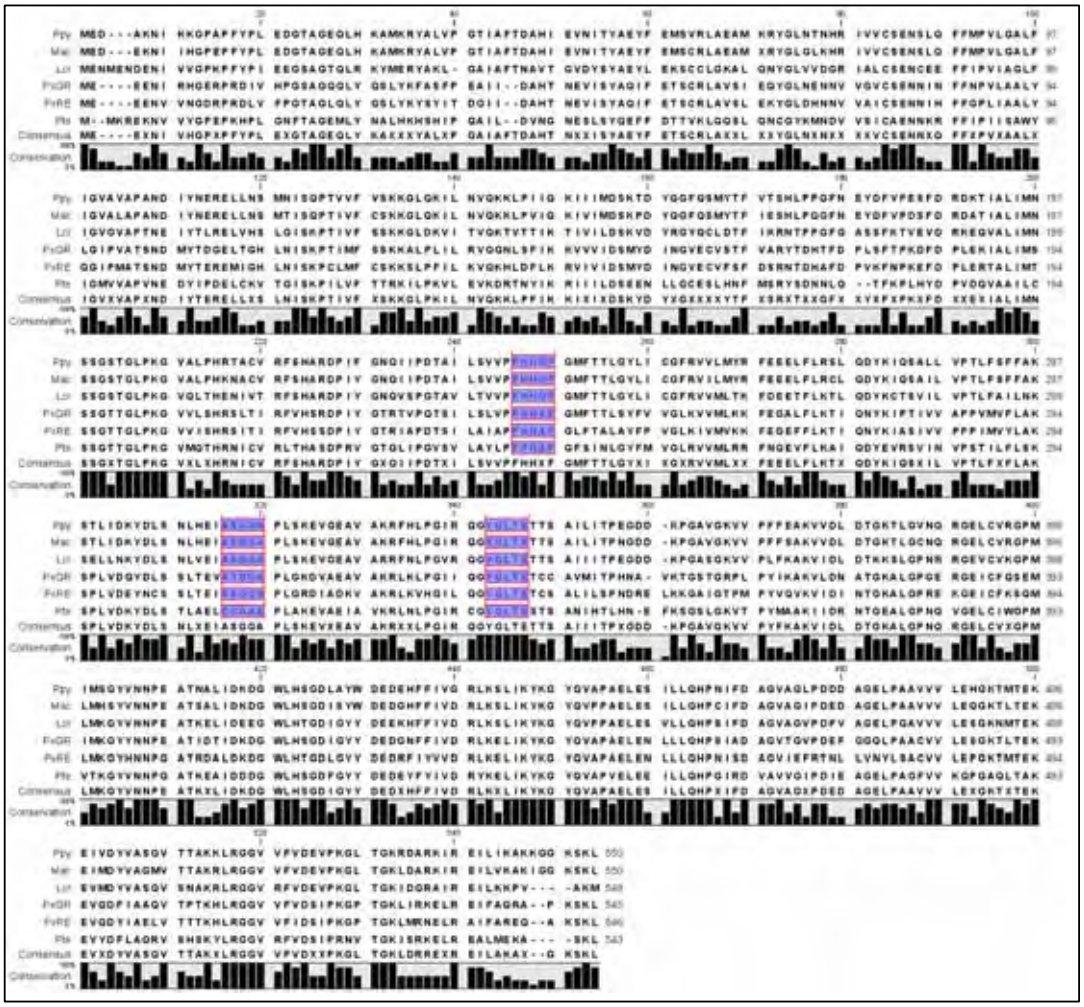


Figura 17 – Alinhamento das luciferases *Photinus pyralis*, *Macrolampis*, *Luciola cruciata*, *Phrixotrix viviani* e *Phrixotrix hirtus* e *Pyrearinus* termitilluminans mostrando em sombreado os resíduos do sítio ativo.

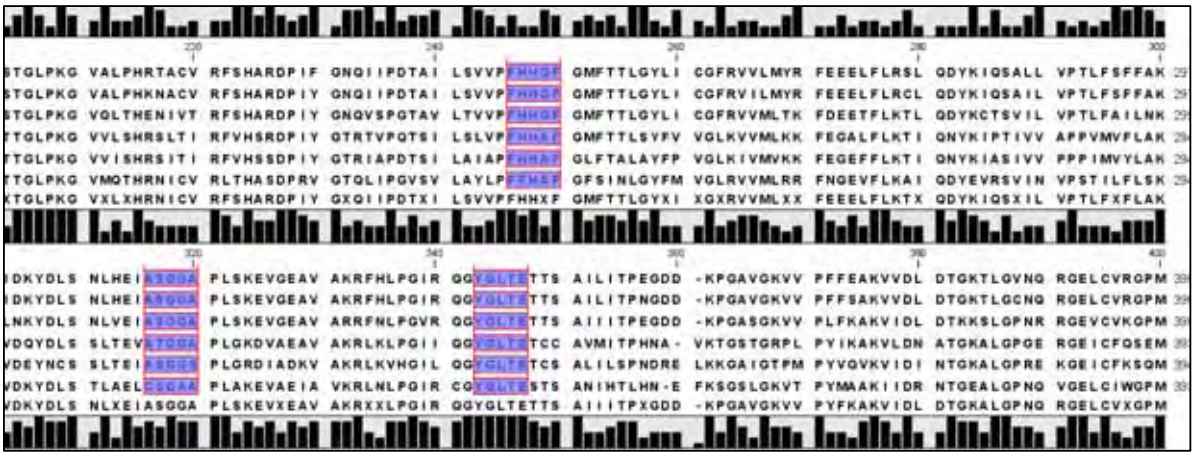


Figura 18 – Alinhamento das luciferases *Photinus pyralis*, *Macrolampis sp2*, *Luciola cruciata*, *Phrixotrix viviani e Phrixotrix hirtus* e *Pyrearinus termitilluminans*, destacando os resíduos do sítio de ligação da oxiluciferina (em azul).

3.2 Validação do Modelo da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans*

A Figura 19 apresenta o diagrama de Ramachandran (RAMACHANDRAN, SASSIEKHARAN, 1968) para o modelo da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans*.

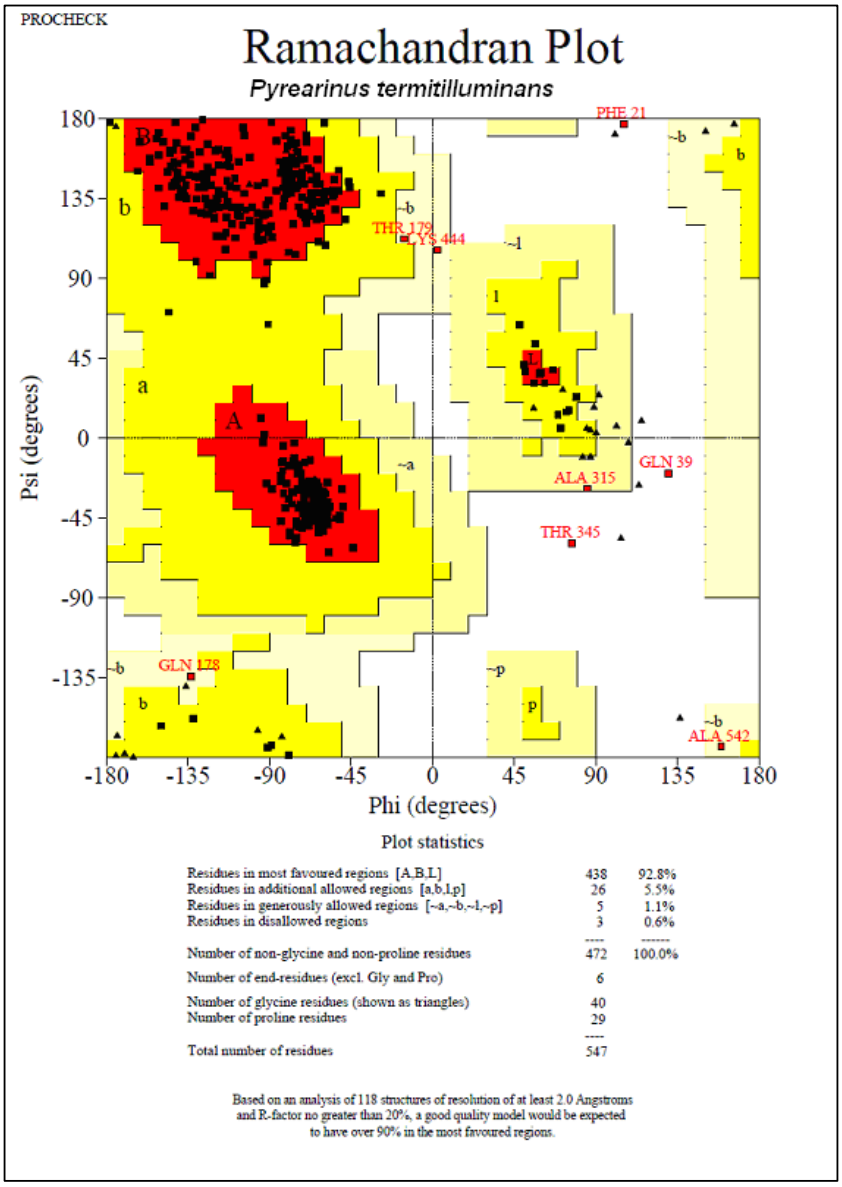


Figura 19 – Diagrama de Ramachandran para o modelo tridimensional da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans*

3.3 Padrão de Enovelamento da Luciferase de *Pyrearinus*

A construção do modelo tridimensional da luciferase de *Pyrearinus* foi baseada na estrutura do lampirídeo japonês *Luciola cruciata* na presença de oxiluciferina e AMP (NAKATSU et al., 2006), resolvida por cristalografia de raios X a 1.6 Å. A figura 20 apresenta o enovelamento da enzima destacando os três subdomínios do N-terminal, o sítio de ligação da oxiluciferina e do AMP e domínio C-terminal. As três luciferases apresentam o mesmo padrão de enovelamento da luciferase de *Photinus pyralis*, na ausência de substrato, e *Lucíola cruciata*, na presença de substrato..

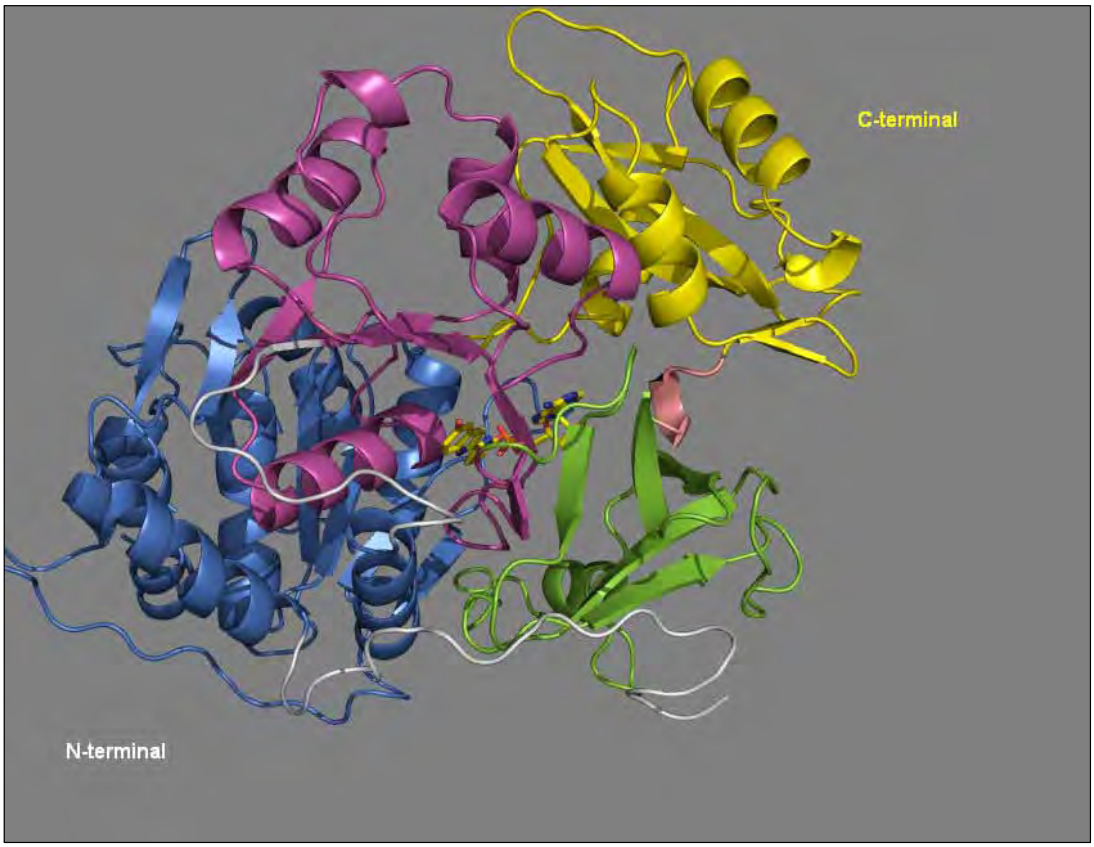


Figura 20 - Modelo tridimensional da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans.* Em destaque os subdomínios A (azul), B (magenta) e C (verde) do N-terminal. O *loop* conectando os domínios N-terminal e C-terminal (salmão) e em amarelo o domínio C-terminal. Os substratos oxiluciferina e AMP em amarelo, entre os três subdomínios do N-terminal

3.4 Sítio de Ligação de ATP do modelo tridimensional da *Pyrearinus termitilluminans*

A figura 21 mostra o sítio de ligação de ATP da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* destacando as distâncias entre os resíduos envolvidos numa rede de ligações de hidrogênio. A tabela 5 resume as distâncias entre os átomos dos resíduos que possuem contatos polares com os grupos do AMP (numeração sequencial da *Luciola cruciata*).

Os resíduos do sítio de ligação do ATP são invariantes em todas as luciferases estudadas, sendo a única exceção o resíduo 318 que é uma alanina na luciferase de *P. termitilluminans* e glicina nas luciferases de *Macrolampis* e *Phrixotrix hirtus.*

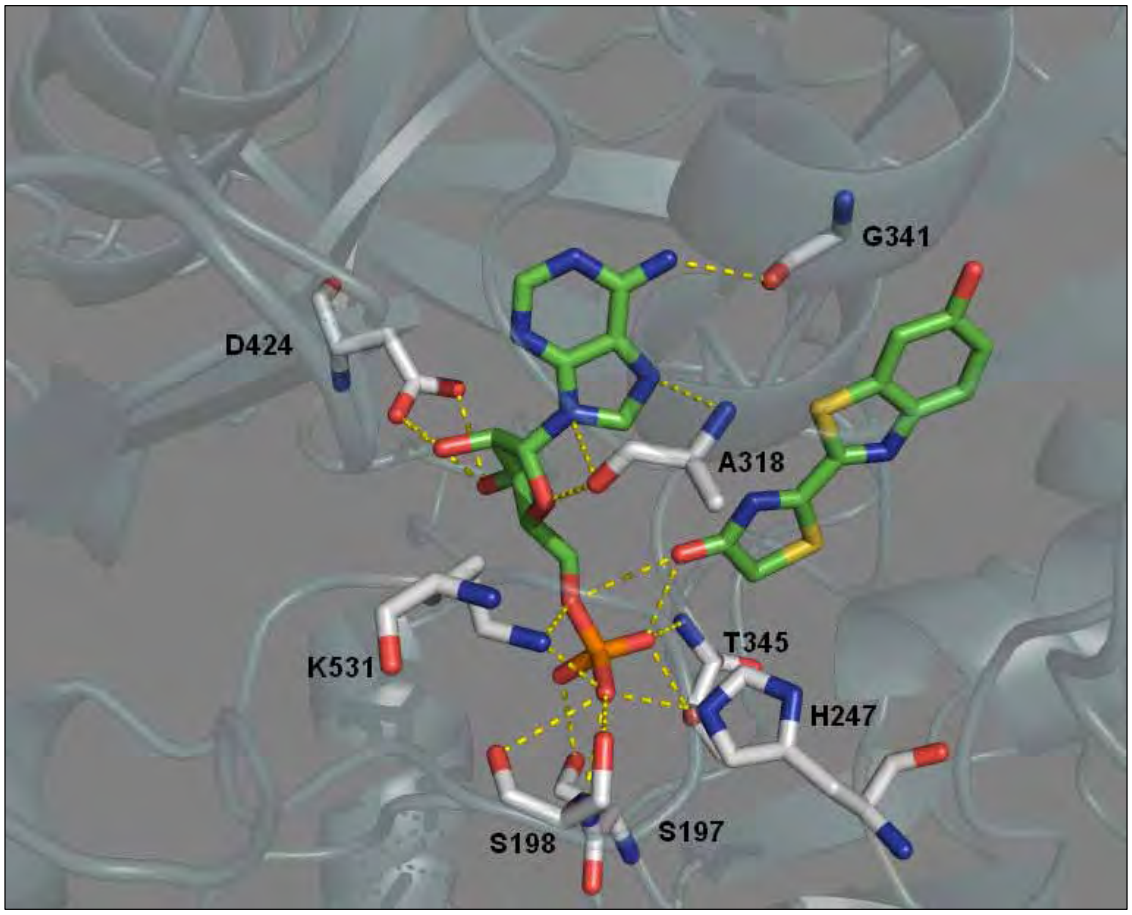


Figura 21 – Contatos polares entre os resíduos do sítio de ligação da AMP. A oxiluciferina e o AMP estão em verde e os resíduos no entorno, em branco.

Cabe aqui ressaltar que as distâncias calculadas podem não refletir a real disposição dos resíduos em relação aos átomos do substrato, devido aos movimentos das cadeias laterais em um ambiente cercado pelo solvente.

Tabela 5 – Distância entre os átomos dos resíduos que compõe o sítio de ligação da AMP e os átomos que a compõe (Figura 21)

Resíduo	Átomo	AMP	Distância (Å)
T345	N	O1P	2.84
	Oγ1	O1P	2.69
S200	Oγ	O2P	2.77
S201	N	O3P	2.83
	O	O3P	3.35
	Oγ	O3P	2.98
H247	Nε2	O3P	2.72
K531	NZ	O3P	3.02
	NZ	O5’	3.09
A318	O	O4’ (ribose)	3.36
	N	N7 (adenosina)	3.33
G341	O	N6 (adenosina)	2.82
D424	Oδ1	O2’ (ribose)	2.62
	Oδ2	O3’ (ribose)	3.02
		O3’ (ribose)	2.93

3.5 Sítio de Ligação da Oxiluciferina

O sítio de ligação da oxiluciferina é composto das seqüências 246FHAF249, 317GAA319, 342YGLTE346 que permitem uma firme ancoragem da oxiluciferina no sítio ativo (Figura 22). Em torno destes resíduos hidrofóbicos, há um conjunto de resíduos polares e carregados: R220, H247, S286, E313, R339 e H353 (Figura 23).

A fotoxidação com um análogo de luciferina e estudos mutagênicos mostraram que o peptídeo 244HHFG245 localiza-se nas proximidades da luciferina (BRANCHINI et al., 1997).

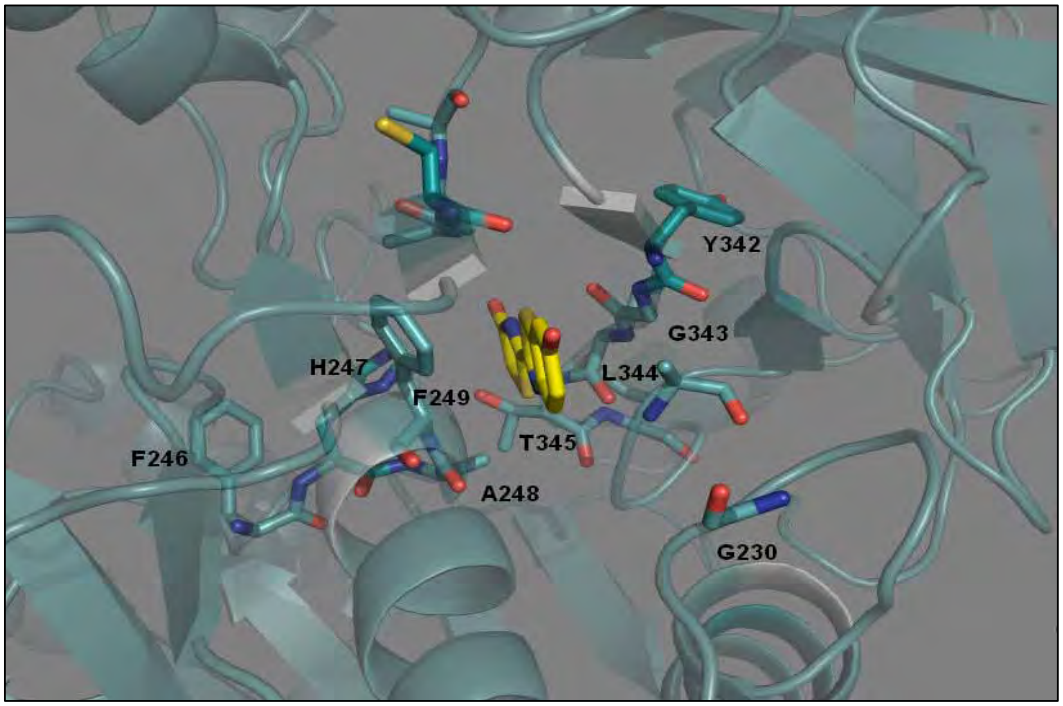


Figura 22 – Sítio de ligação da oxiluciferina no modelo da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans*

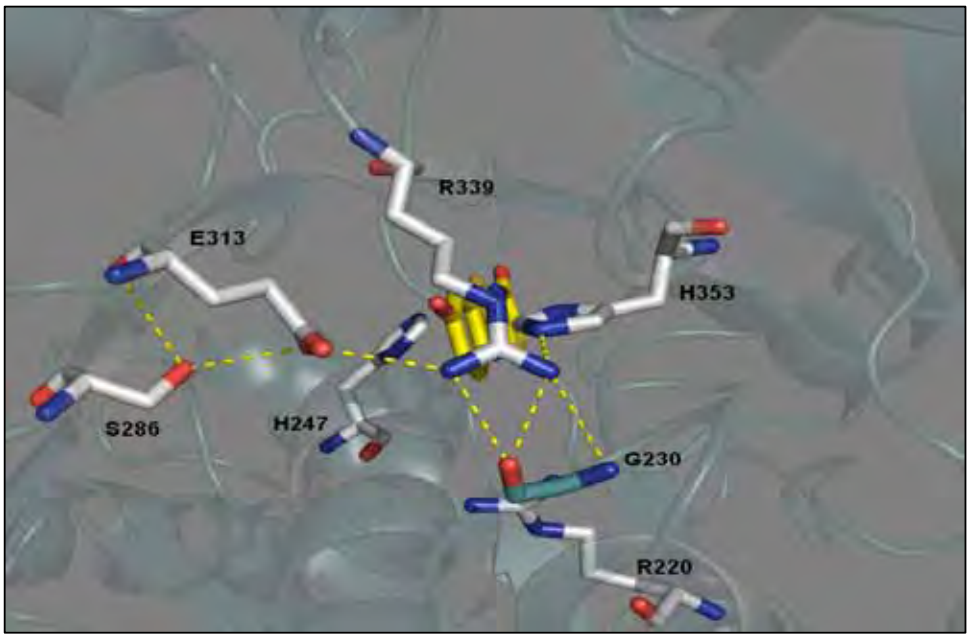


Figura 23 – Rede de pontes de hidrogênio e pontes salinas da segunda camada de resíduos responsáveis pela manutenção da conformação do sítio de ligação da oxiluciferina e sua proteção do solvente.

3.6 Comparação das estruturas das luciferases *Pyrearinus termitilluminans*, *Macrolampis*, *Phrixotrix hirtus* e *Phrixotrix viviani*

O sítio de ligação da AMP é conservado entre as luciferases em estudo, com exceção do resíduo 318. Por outro lado, o sítio de ligação da oxiluciferina apresenta algumas substituições que conferem à luciferase de *Pyrearinus* um caráter mais hidrofóbico em relação a outras luciferases. Isto é refletido nas figuras 24-A, 24-B, 25-A e 25-B, que apresentam os gráficos de hidrofobicidade compreendendo os resíduos 200-400 das luciferases de *Pyrearinus*,

Macrolampis, *Phrixotrix viviani* e *Phrixotrix hirtus*. Esta região inclui vários segmentos do sitio de ligação da luciferina. Pelos gráficos, percebe-se que a luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* é mais hidrofóbica que as demais luciferases em estudo (Figura 26).

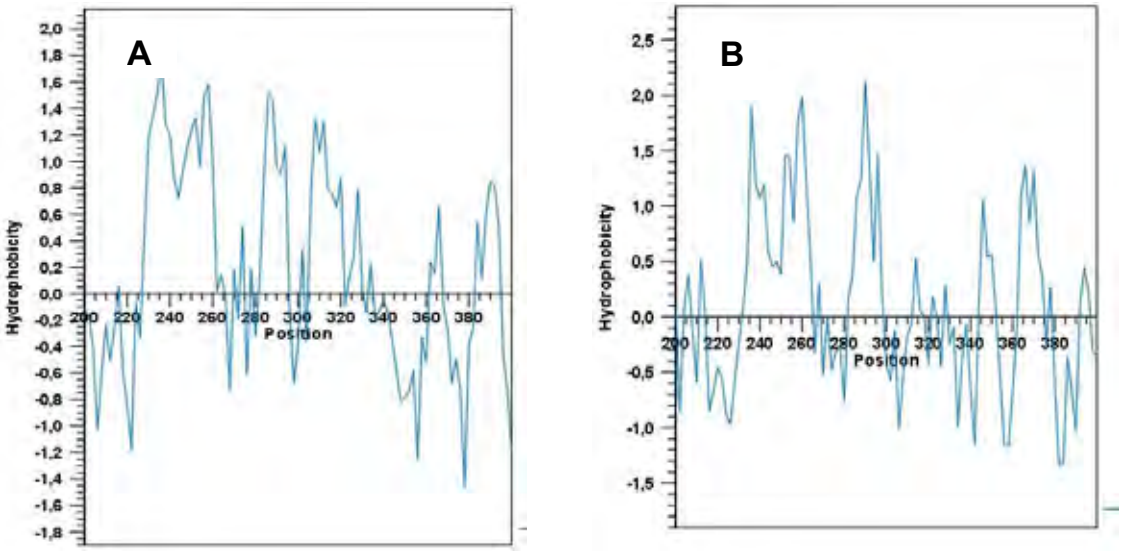


Figura 24 - Gráficos de hidrofobicidade das luciferases de *Pyrearinus termitilluminans* (24-A) e *Macrolampis* (24-B) de acordo com os índices de Kyte e Doolittle.

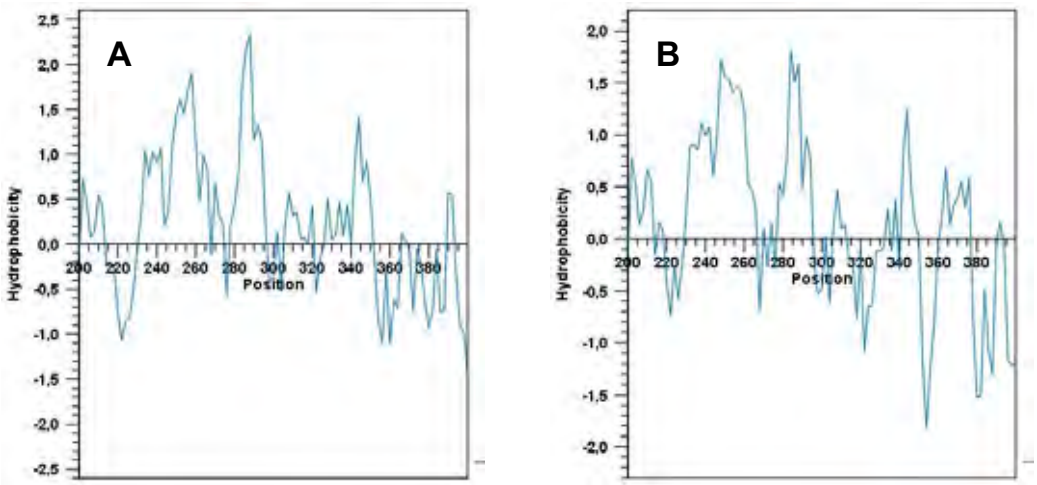


Figura 25 - Gráficos de hidrofobicidade das luciferases de *Phrixotris viviani* (25-A) e *Phrixotrix hirtus* (25-B).

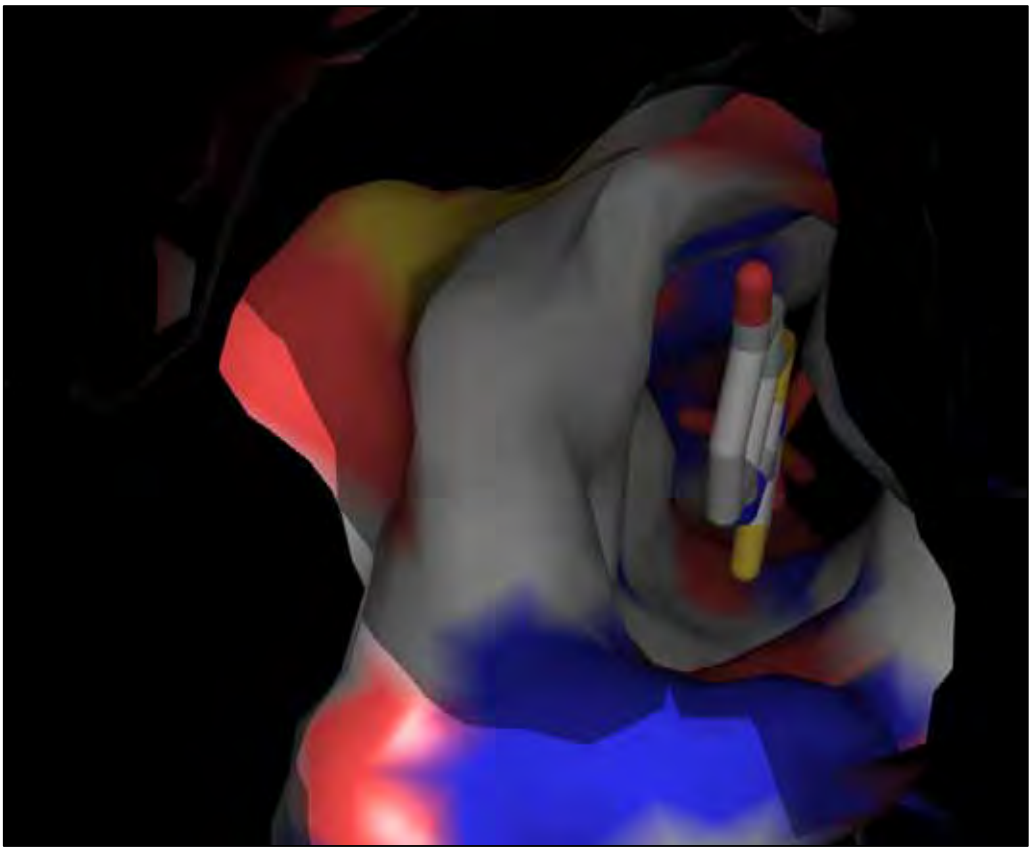


Figura 26 – Superfície hidrofóbica do sítio de ligação da oxiluciferina da luciferase de *Pyrearinus temitilluminans*. Em branco, o anel hidrofóbico da fenilalanna, em amarelo o grupo sulfidrila da cisteína 315 e em azul, o grupo guanidina da arginina 220 e em vermelho o oxigênio das carbonilas da cadeia principal. .

Como pode se verificar no alinhamento apresentado nas figuras 17 e 18 e na modelagem molecular, enquanto nas pH-sensitivas *Luciola cruciata* e *Macrolampis sp*2 o sítio de ligação da oxiluciferina possui os resíduos 246HHGF249 (numeração seqüencial da *Luciola cruciata*) , nas luciferases de *Phrixotrix* estes resíduos são 246HHAF249 e na luciferase de *Pyrearinus* 246FHAF249. Os resíduos 317GAA319 na *Pyrearinus* são substituídos por

317GGA319 na luciferase de *Macrolampis* e *Phrixotrix viviani* e por 317GGS319 na *Phrixotrix hirtus*.

O *loop* entre os resíduos 226-238 é um elemento estrutural importante nas luciferases de besouros, situa-se na superfície da molécula e conecta os dois subdomínios A e B do N-terminal que contêm resíduos importantes do sítio de ligação da oxiluciferina (VIVIANI et al. 2007). Este elemento estrutural também possui resíduos que interagem com o *loop* entre os resíduos 355 e 364 que contem elementos que afetam as cores da bioluminescência (VIVIANI et al , 2005, UGAROVA, 2002).

Na luciferase pH-sensitiva *Macrolampis* os resíduos N231, E313 e S286 são ligados por pontes de hidrogênio enquanto nas luciferases pH-insensitvas *Pyrearinus*, *Phrixotrix hirtus* e *Phrixotrix viviani* a substituição N231T diminui a formação desta rede de ligações. A hidroxila do resíduo Y229 aponta em direção oposta ao sítio de ligação da oxiluciferina nas luciferases de *Macrolampis*, *Phrixotrix viviani* e *Phrixotrix hirtus*, sendo ancorada por dois resíduos hidrofóbicos P355 e P369. Na luciferase de *Pyrearinus* estes resíduos são substituídos pelos hidrofóbicos V229, L355 e P369 As figuras 27 e 28 mostram esta região do *loop* na conformação aberta, isto é, com base na estrutura resolvida com oxiluciferina e AMP, representando a etapa após a catálise.

Outras substituições importantes ocorrem nas luciferases de *Phrixotrix* spp onde o resíduo 339 que é conservado nas luciferases de *Pyrearinus* e *Macrolampis* , é substituído por I339 (*P. hirtus*) e por L339 (*P. viviani*) (Figuras 29 e 30).

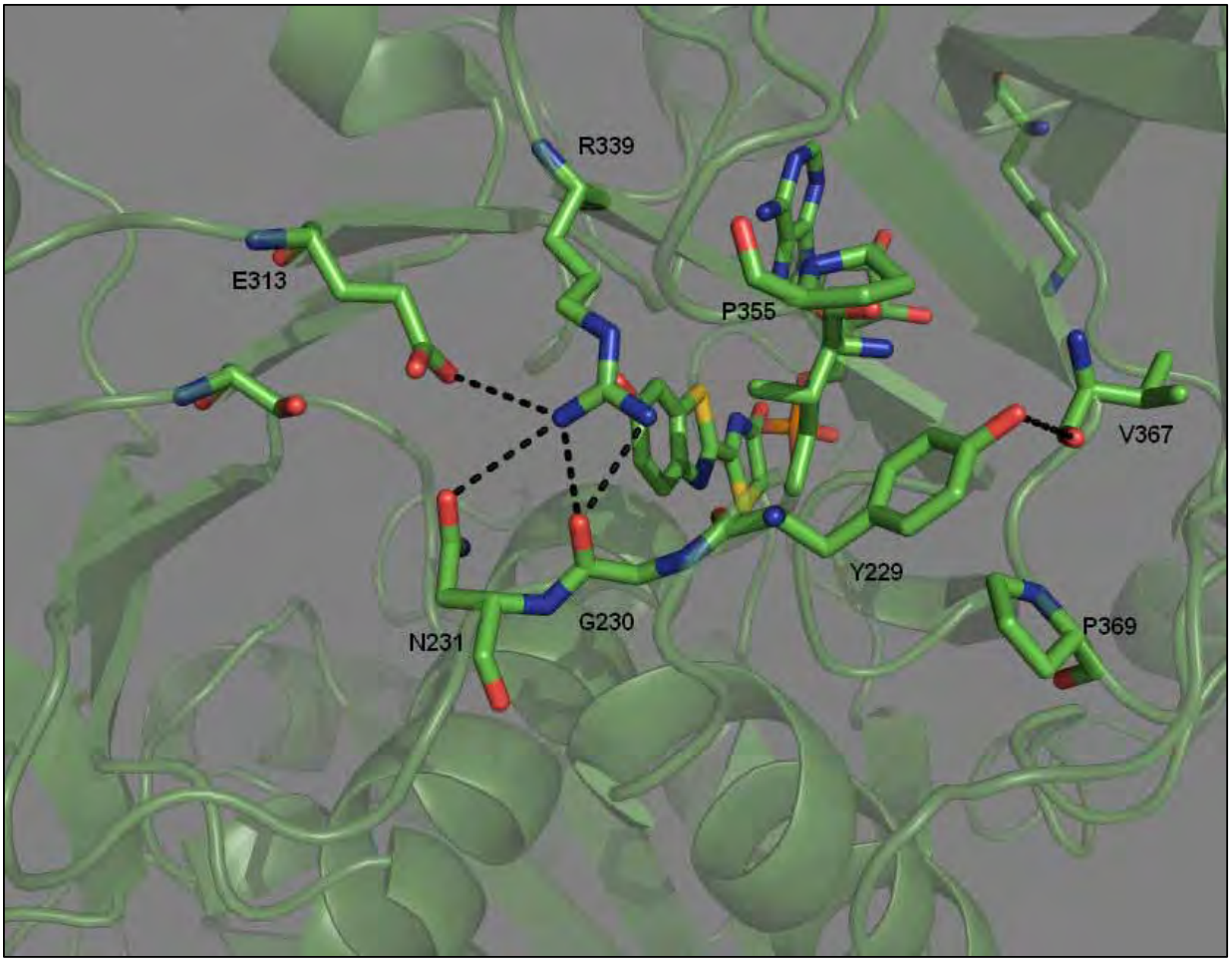


Figura 27 – Luciferase de *Macrolampis*, na conformação aberta, ressaltando ligações de hidrogênio na região que compreende os resíduos do *loop* (226-238) e os resíduos carregados do sítio de ligação da oxiluciferina

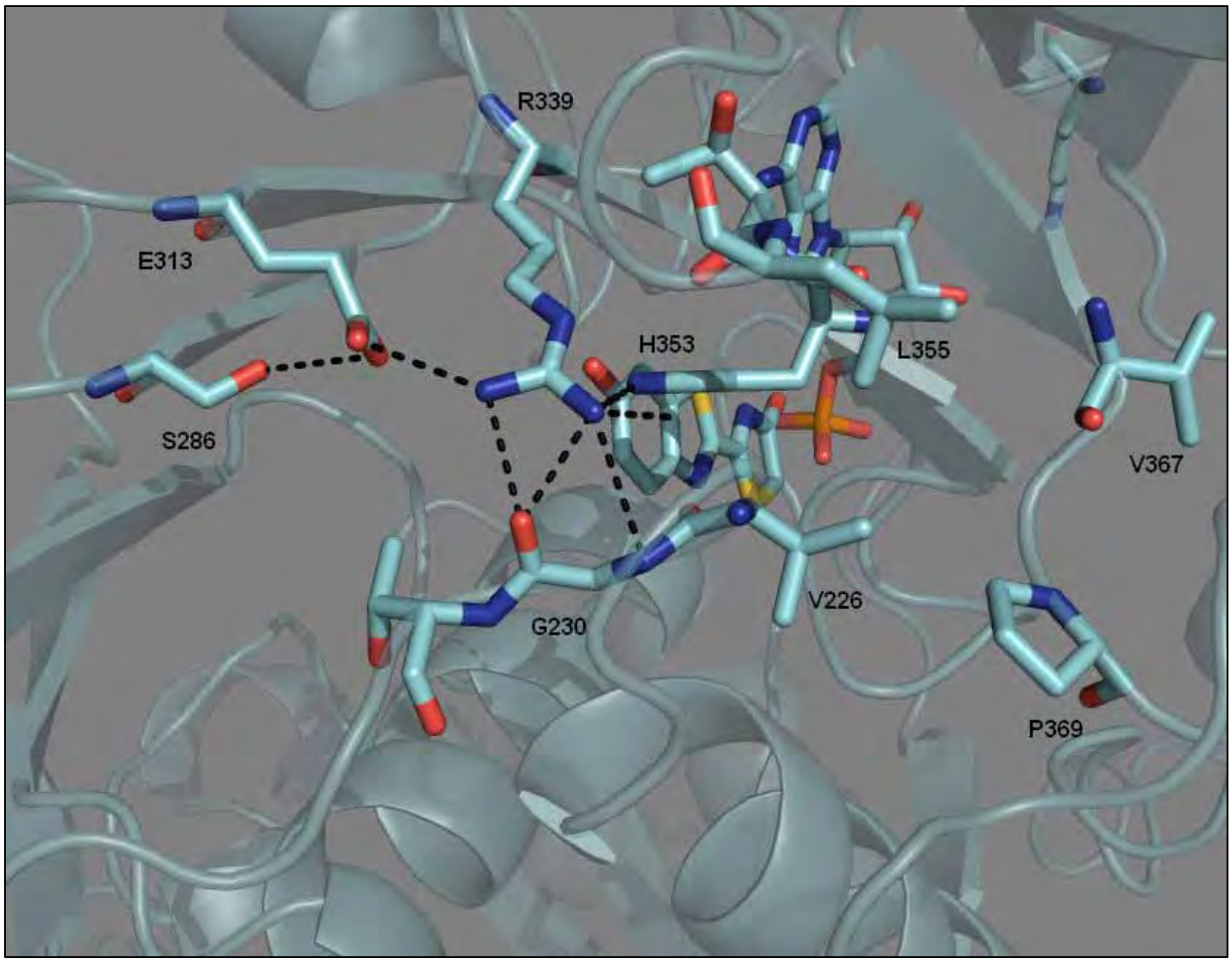


Figura 28 – Luciferase de *Pyrearinus*, na conformação aberta, ressaltando ligações de hidrogênio na região que compreende os resíduos do *loop* e os resíduos carregados do sítio de ligação da oxiluciferina.

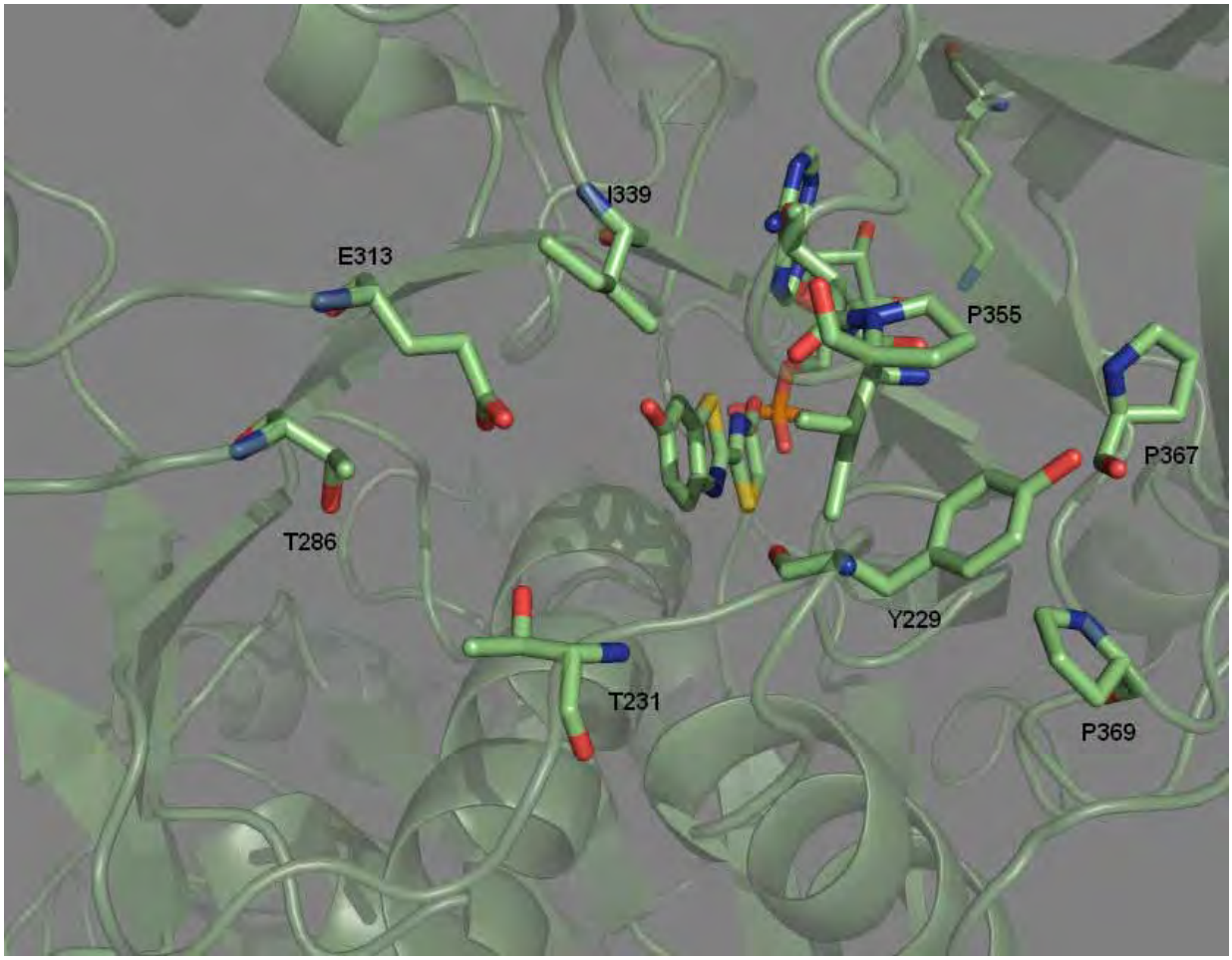


Figura 29 - Luciferase de *Phrixotrix viviani,* na conformação aberta. A ausência da rede de ligações de hidrogênio na região que compreende os resíduos do *loop* e as substituições hidrofóbicas R339(I339) no entorno do sítio de ligação da oxiluciferina.

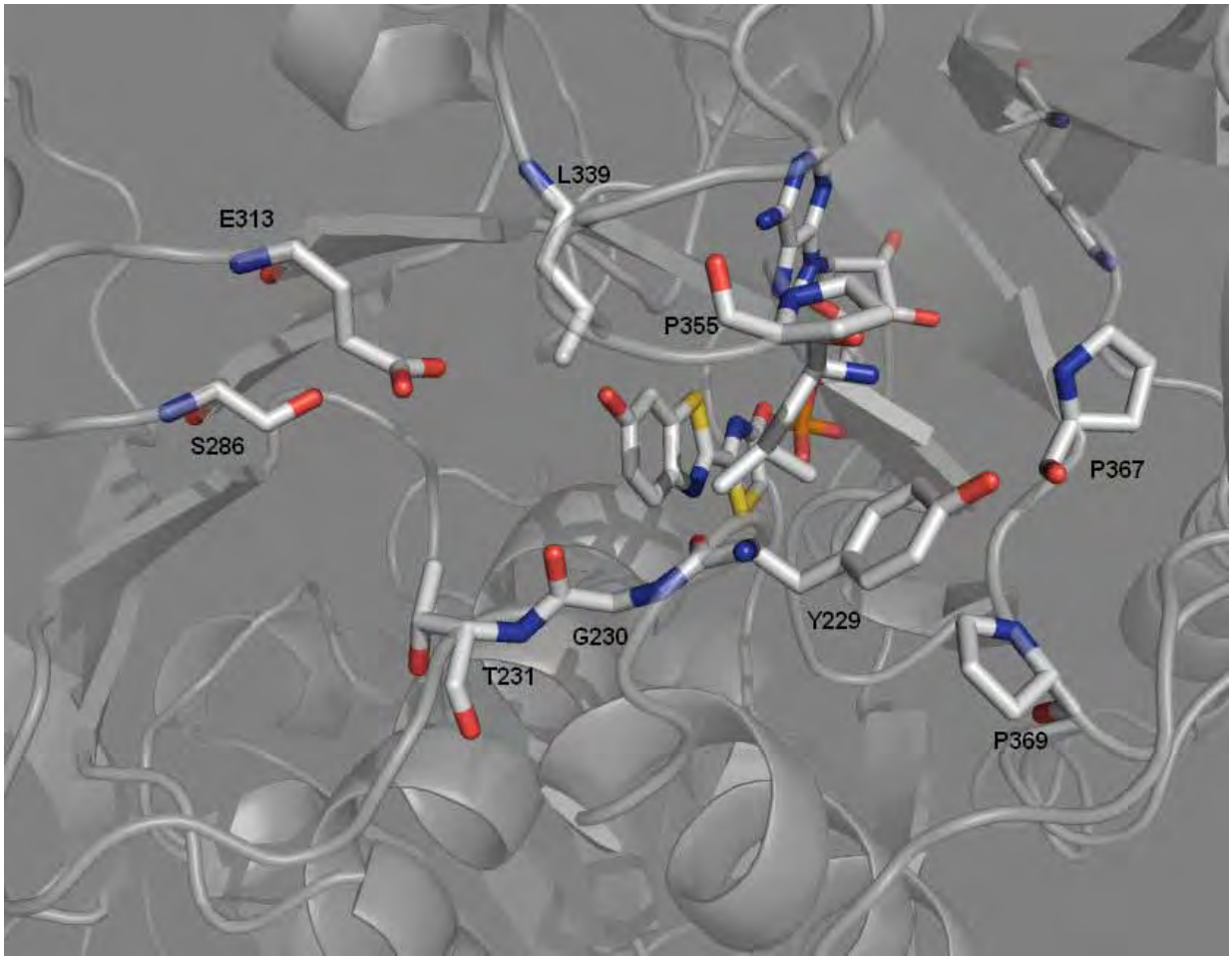


Figura 30 - Luciferase de *Phrixotrix hirtus,* na conformação aberta. A ausência da rede de ligações de hidrogênio na região que compreende os resíduos do *loop* e as substituições hidrofóbicas R339(L339) no entorno do sítio de ligação da oxiluciferina.

VI Discussão

Entre as luciferases de besouros, a luciferase do lampirídeo *Photinus pyralis* é a que tem sido mais investigada (DeLUCA, McELROY, 1978, WOOD, 1995). Além desta luciferase, somente umas poucas outras luciferases, todas elas oriundas de lampirídeos e, portanto pH-sensitivas, foram purificadas e caracterizadas como, por exemplo, as luciferases de *Luciola mingrelica*, *Luciola lateralis* e *Luciola cruciata* (UGAROVA, 1989, KAJIYAMA et al, 1992).

Neste trabalho, relata-se a expressão e purificação de três novas luciferases, todas elas pH-insensitivas, oriundas de um elaterídeo (*Pyrearinus termitilluminans*) e dois fengodídeos (*Phrixotrix hirtus e Phrixotrix viviani*). Estas luciferases foram anteriormente clonadas e constituem modelos importantes para a compreensão da relação entre estrutura e espectros de bioluminescência, porque emitem nos dois extremos do espectro (λ_{MAX} = 534nm; λ_{MAX} = 546 nm e λ_{MAX}= 622 nm) (VIVIANI et al, 1999a; VIVIANI et al, 1999b).

Apesar destas luciferases já terem sido expressas em níveis suficientes para caracterização funcional (VIVIANI et al., 1999a, 1999b, VIVIANI, OHMIYA, 2000, VIVIANI et al., 2001, 2002, 2006) elas ainda não haviam sido expressas em níveis adequados para uma purificação eficiente. Neste trabalho relata-se a expressão e a purificação destas luciferases por cromatografia de afinidade e sua caracterização físico-química. De acordo com estes estudos, as luciferases de *Phrixotrix* foram expressas em maior quantidade (.600 – 400 .ug/L cultura) em relação a luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* (200 ug/L cultura), provavelmente devido a maior eficiência de expressão do sistema BL21/PCAN do que no sistema BL21/PproHt. Tentativas de purificação destas luciferases com métodos adicionais, como precipitação em sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica foram feitas, entretanto, a cromatografia de afinidade com níquel foi a técnica mais eficiente utilizada até o momento. Com as luciferases purificadas desta forma, foi possível fazer uma primeira caracterização físico-química.

As luciferases do elaterídeo *Pyrearinus* termitilluminans e do fengodídeo *Phrixotrix viviani,* que emitem luz na região do verde, tem K_Ms para luciferina mais altos, indicando baixa afinidade pelo substrato e, possivelmente, também

pelo produto, sugerindo que este seja removido mais facilmente do sítio ativo, explicando a cinética mais sustentada da luminescência. Além disto, não se pode deixar de considerar que estas cinéticas lentas também podem estar associadas a uma mudança conformacional do domínio C-terminal. Estudos com Acil CoA ligases mostram claramente que o domínio C-terminal está envolvido com mudanças conformacionais em relação ao domínio N-terminal durante a catálise (GULICK et al, 2003). A rotação em 90^0 permitiria a abertura do sítio-ativo, facilitando a saída dos produtos (GULICK et al, 2003.) A rotação do C-terminal é sabidamente promovida pela Coenzima A em várias ligases, e é sabido que esta apresenta um forte efeito estimulador da luminescência nas luciferases (McELROY e DeLUCA, 1978), provavelmente por auxiliar na remoção dos inibidores competitivos adenilato de desidroluciferina e adenilato de L-luciferina (NAKAMURA et al, 2005), além de poder promover mudança rotacional do C-terminal. Na luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix hirtus*, por outro lado, a cinética com rápido decaimento sugere que o sítio ativo permaneça inibido ou então fechado, resultando em um rápido decaimento da atividade luminescente.

O K_M para luciferina na *Pyrearinus termitilluminans* é maior do que nas luciferases de *Phrixotrix*, enquanto o K_M para ATP é semelhante nas luciferases de *Pyrearinus termitilluminans* e *Phrixotrix viviani* e maior do que na *Phrixotrix hirtus*. Esses valores indicam que a luciferase de *Phrixotrix hirtus* possui maior afinidade por LH_2 e por ATP do que nas luciferases *Phrixotrix viviani* e *Pyrearinus termitilluminans*. Isto poderia explicar a cinética mais rápida, na medida em que uma alta afinidade pelo substrato também pode indicar alta afinidade pelo produto, que tem estrutura semelhante (Fig.1), inibindo competitivamente o sítio ativo desta luciferase. Vale a pena mencionar que a luciferase do lampirídeo *Photinus pyralis* também tem um K_M muito baixo para luciferina e uma cinética rápida, suportando nossa alegação.

As constantes catalíticas das luciferases de *Pyrearinus termitilluminans* e *Phrixotrix viviani* são idênticas, porém menores do que na *Phrixotrix hirtus* e da luciferase de *Photinus pyralis*. Isto pode sugerir que a *Pyrearinus termitilluminans* e *Phrixotrix viviani* têm um rendimento quântico de bioluminescência mais baixo do que as luciferases *Phrixotrix hirtus* e *Photinus pyralis.*

A eficiência catalítica relativa para a luciferina na luciferase de *Phrixotrix hirtus* é quase 10 vezes maior do que na luciferase de *Phrixotrix viviani* e quase 4 vezes maior do que na *Pyrearinus termitilluminans*, indicando que esta enzima é catalicamente mais eficiente.

A alta eficiência catalítica da luciferase de *Phrixotrix hirtus* pode sugerir uma adaptação desta luciferase para emitir mais fótons na região do vermelho, o que seria adaptativamente desejável uma vez que a maioria dos organismos possui baixa sensibilidade visual nesta faixa de comprimentos de onda (VIVIANI et al, 2006).

O pH-ótimo das luciferases de *Pyrearinus termitilluminans* e *Phrixotrix viviani* é em torno de 8 enquanto na *Phrixotrix hirtus* é 8,2, ambos ligeiramente superiores ao pH ótimo da luciferase de *Photinus pyralis*.

O espectro de bioluminescência da *Pyrearinus termitilluminans* é o mais deslocado para o azul de todas as luciferases de besouros (534 nm) (VIVIANI et al., 1999) e é pH-insensitiva entre os pH 6-9. Porém observamos que acima do pH 10 o espectro sofre um notável deslocamento batocrômico de 30 nm e alargamento da banda, o que poderia ser explicado pela existência da interação de um resíduo muito básico, com pKa em torno de 9 e 10, que poderia estar envolvido em interações específicas com a oxiluciferina ou com a manutenção de uma conformação apropriada do sitio ativo para emissão de luz verde.

A luciferase de *Pyrearinus* é mais termoestável do que as luciferases de *Phrixotrix viviani* e *Phrixotrix hirtus*. Quando conservada a temperatura de -20°C, a *Pyrearinus termitilluminans* permanece ativa por longos períodos de tempo o que foi observado em alíquotas que, após seis meses, perderam cerca de 30% de sua atividade inicial. A presença de 2 mM de DTT e 10% de glicerol contribui para manter a atividade enzimática.

A sondagem do sítio ativo com os fluoróforos 2,6-TNS e 1,8-ANS,das luciferases sugere que o sítio ativo da luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* é o mais hidrofóbico de todas as luciferases estudadas. De fato observa-se uma tendência de deslocamento dos espectros de fluorescência de TNS e ANS para o azul para as luciferases com espectros de bioluminescência mais verdes, indicando maior hidrofobicidade do sitio ativo. E quanto mais deslocados para o vermelho, mais polar é o sitio ativo.

Para entendermos melhor a relação entre estrutura e propriedades enzimáticas das luciferases de *Pyrearinus* e *Phrixotrix* spp, foi feita a modelagem molecular. Como esperado, todas estas luciferases apresentam o mesmo padrão tridimensional das luciferases de lampirídeos, com quem compartilham elevado grau de identidade. Entretanto, algumas diferenças que julgamos ser importantes podem ser observadas em nível de sítio ativo e regiões adjacentes.

Como pode ser visto pelo alinhamento das seqüências primárias e nos modelos tridimensionais, o sítio de ligação da luciferina apresenta-se mais hidrofóbico na luciferase de *Pyrearinus*, em virtude dos resíduos C315, C316 e C340 que nas luciferases de *Macrolampis* e *Phrixotrix hirtus* são A315, S316, e Q340 e A315, T316 e Q340 na *Phrixotrix viviani*. Convém ressaltar que o resíduo Q340 faz contatos polares com o Nitrogênio N6 do AMP.

Nas luciferases de *Pyrearinus* e *Macrolampis,* o *loop* (226-238) que conecta os subdomínios A e B do N-terminal contém resíduos que participam diretamente numa rede de ligações de hidrogênio que aparentemente são responsáveis pela manutenção da estrutura fechada das luciferases, protegendo o lado benzotiazólico e grupo hidroxila da luciferina do solvente.

Por outro lado, nas luciferases de *Phrixotrix* esta rede é menor devido às substituições R339 pelos resíduos L339 e L353, na luciferase de *Phrixotrix viviani*, e I339 e I353, na luciferase de *Phrixotrix hirtus* . A rede de ligações de hidrogênio entre R339, S286 e E313 por ser altamente conservada indicam sua importância para preservar a conformação do sítio ativo.

Em conjunto, os dados de fluorescência das sondas TNS no sitio ativo das luciferases e de modelagem indicam que o sitio de ligação da luciferina é mais hidrofóbico na luciferase de *Pyrearinus*, que é aquela com o espectro de bioluminescência mais deslocado para o azul. Além disto, parece existir uma tendência de deslocamento para o azul dos espectros de fluorescência das sondas TNS e ANS nas luciferases emissoras de bioluminescência verde, ao passo que a luciferase vermelha tem o sitio mais polar. Estes resultados suportam a hipótese da polaridade e polarizabilidade orientada (UGAROVA e BROVKO, 2002) do sítio ativo na modulação das cores de bioluminescência, embora, ainda não possamos excluir outras possibilidades. É interessante

notar que os mecanismos mais recentes propostos para modular as cores de bioluminescência também envolvem a polarização do grupo fenolato (ORLOVA et al, 2003, BRANCHINI et al, 2004). Além disto, fortes evidências experimentais por Hirano et al. (2009) suportam a importância da basicidade e polaridade do microambiente em torno do grupo fenólico na modulação dos espectros de bioluminescência em diferentes luciferases.

VII Conclusões

Neste trabalho, as luciferases recombinantes de *Pyrearinus termitilluminans* e de *Phrixotrix hirtus e P. viviani* foram expressas eficientemente e purificadas pela primeira vez por cromatografia de afinidade em níquel. Com estas preparações de luciferases, foram determinadas as suas propriedades físico-químicas como: os K_Ms para ATP e luciferina; pH ótimo; Kcat e medidos os espectros de bioluminescência em diferentes pHs. Foi também sondada a polaridade do sitio de ligação da luciferina destas luciferases com as sondas fluorescentes 2,6-TNS e 1,5-ANS e feita a modelagem molecular para melhor entendermos a relação existente entre estrutura, função e propriedades destas luciferases. Verificamos que a luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* possui afinidade para ATP semelhante a outras luciferases, enquanto a afinidade pela luciferina foi semelhante com aquela da luciferase emissora de luz verde de *Phrixotrix viviani*, porém menor que a luciferase emissora de luz vermelha de *P.hirtus*. Estes dados apontam a existência de uma possível relação entre baixa afinidade pela luciferina e mudanças conformacionais nas luciferases pH-insensitivas emissoras de luz verde. De acordo com os estudos de fluorescência de TNS e modelagem molecular, o sitio de ligação da luciferina na luciferase de *Pyrearinus termitilluminans* é o mais apolar de todas as luciferases estudadas, enquanto aquele da luciferase emissora de luz vermelha é o mais polar, o que é coerente com a hipótese do efeito da polaridade e polarizabilidade orientada como mecanismo atuante na determinação dos espectros de bioluminescência. Além disto, a luciferase de *Pyrearinus* apresenta uma ótima estabilidade térmica e

cinética de bioluminescência sustentada, o que a torna apropriada para aplicações em bioimageamento de células in vivo.

VIII Perspectivas

1. O protocolo estabelecido de expressão e purificação das luciferases de *Pyrearinus termitilluminans* e *Phrixotrix* spp poderá ser utilizado para purificação de outras luciferases e seus mutantes para posterior caracterização físico-química.
2. Este protocolo poderá ser aprimorado para expressão massiva e purificação destas luciferases para determinação das respectivas estruturas tridimensionais por cristalografia de raios X e técnicas de espalhamento a baixo ângulo (SAX) e discroísmo circular, um projeto que será realizado no LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrontron – Campinas).
3. A modelagem molecular destas luciferases permitiu identificar algumas substituições importantes no sítio ativo destas luciferases, como as cisteínas C315 e C316 de ligação da oxiluciferina na luciferase de *Pyrearinus termitilluminans*. A mutagênese sítio-dirigida destes resíduos está sendo realizada para determinar sua função.
4. Finalmente, as luciferases de *Phrixotrix* e *Pyrearinus termitilluminans* já estão sendo empregadas em estudos de imageamento de células de mamíferos e prometem uma grande gama de novas aplicações bioanalíticas. Uma melhor compreensão da relação entre estrutura e função nestas enzimas poderá ajudar a desenvolver formas otimizadas para suas aplicações biotecnológicas.

IX Referências

Akiyoshi, Ryutaro, Suzuki, Hirobumi, 2009. **The measurement of cytosolic ATP during apoptosis: bioluminescence imaging at the single cell level**. Proceedings of the 15th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. Light emission: Biology and Scientific Applications. Pp. 339-342. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.

Alipour, B.S., S. Hosseikani, M. Nikkhah, H. Naderi-Manesh, M.J. Chaichi e S.K. Osaloo. 2004. **Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA enconding the luciferase from the glow-worm, Lampyris turkestanicus.** Biochem. Biophys. Res. Commum. 325: 215-222..

Ando, Yoriko, Niwa, Kazuki, Yamada, Nobuyuki, Enomoto, Toshiteru, Irie, Tsutomu, Kubota, Hidehiro, Ohmiya, Yoshihiro, Akyama, Hidefumi.2008 **Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission.** Nature Photonics, vol. 2, Issue 1: 44-47.

Andrew M. Gulick, Vicent J. Starai, Alexander R. Horswill, Kristen M. Homick, Jorge C. Escalante-Semerena. 2003. **The 1.75 Å Crystal Structure of Acetyl-CoA Synthetase Bound to Adenosine – 5'-propylphosphate and Coenzyme A**. Biochemistry, 42, 2866-2873.

Bechara, E.J.H. 1989 **Luminescent elaterid beetles: biochemical, biological and ecological aspects**. Adv. Oxygen. Process. 1, 123-178

Bowie L.J., Irwin R., Loken M., DeLuca M. e Brand. L. 1973. **Excited-state proton transfer and themechanism of action of firefly luciferase**. Biochemistry, 12: 1582-1587.

Branchini, B.R., Magyar, R.A., Murtishaw, M.H., Anderson, S.M., Zimmer, M. 1998. **Site-directed mutagenesis of Histidine 245 in firefly luciferase: a proposed model of the active site.** Biochemistry, 37:15311-15319.

. Branchini, B.R., Tara L. Southworth, Martha H. Murtiashaw, Rachelle A. Magyar, Susan A. Gonzales, Maria C. Rugiero, Justin G. Stroh. 2004. **An Alternative Mechanism of Bioluminescence Color Determination in Firefly Luciferase**. Biochemistry, 43: 7255-7262.

Bitler, B. e W.D. McElroy, 1957. **Preparation and properties of firefly luciferin.** Arch. Bioch. Biophys. 72: 358-368.

Colepicolo N. O., C. Costa e E.J. H. Bechara. 1986. **Brazilian species of elaterid luminescent beetles. Luciferin identification and bioluminescence spectra**. Insect Biochem. 16: 803-810.

Comhaire, F.H., L. Vermeulen, L. Monsieur e A. Hinting. 1989. **Determination of adenosine triphosphate in human semen to estimate the fertilizing potential and to quantify sperm antibodies**. J. Biolum. Chemilum. 4:399-405.

Conti, E., N.P. Franks e Peter Brick. 1996. **Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes.** Structure 4 n° 3.

Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A., Brick, P. 1997. **Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal byosinthesis of Gramidicin S.** EMBO J. 16. 4174-4183.

DeLano Scientific LIc, 2006. Palo Alto, California (EUA).

DeLuca, M. e W.W. McElroy, 1974. **Kinetics of firefly luciferase catalyzed reactions.** Biochemistry. 13: 921-925.

DeLuca, M. 1969. **Hydrophobic nature of the active site of firefly luciferase**. Biochemistry. 13: 921-925.

Devine, J.H., G.D. Kutuzova, V.A., Green, N.N. Ugarova e T.O. Baldwin. 1993. **Luciferase from the East European firefly Luciola mingrelica> Cloning and nucleotide of cDNA, overexpression in E.coli and purification of the enzyme.** Biochem. Biophys. Acta. 1173: 121-132

DeWet, J.R., K.V., Wood, D.R. Helinsky e M. DeLuca. 1985. **Cloning of firefly cDNA and expression of active luciferase in *Escherichia coli***. PNAS, 82: 7870=7873.

Fukushima K. 1991. **Information on the chemiluminescence mechanism of the firefly luciferina from MNDO molecular orbitals calculations.** *J.* Mol. Structure. 235: 11-14.

Gandelman O.A., Brovko L.Y., Ugarova N.N., Chikishev Y. e Skurimov A.P. 1993. **Oxyluciferin fluorescence is a model of native bioluminescence in the luciferase-luciferin system.** J. Photochem. Photobiol. *B*. 19:187-191.

Gould, S.J., Keller G.A. e S. Subramani. 1967. **Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase.** J. Cell. Biology. 107: 897-905.

Gould, S.J. e S. Subramani. 1988. **Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology.** Anal. Biochem. 175: 5-13.

Green, A.A. and W.D. McElroy. 1956. **Crystalline firefly luciferase.** Biochem. Biophys. Acta. 170-176.

Gruber, M.G., Kutuzova, G.D.1996. **Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Protons.** Proc. 9th International Symposium. Pp 244-247. John Wiley & Sons. Chichester, UK.

Hastings, J.W., Weber, Gregorio. 1965. **A low intensity permanent liquid light standard activated by radioactivity.** Photochemistry and Photobiology. 4: 1049-1050.

Herring, P.J. 1987. **Systematic distribution of bioluminescence in living organisms.** J. Biolumin. Chemilumin. 1: 147-163.

Hirano, T., Hasumi, Y., Ohtsuka, K., Maki, Shojiro, Niwa, Haruk, Yamaji, Minoru e Hashizume, Daisuke. 2009 **Spectroscopic studies of the light-color modulation mechanism of firefly (beetle) bioluminescence.** J.Am. Chem. Soc. 131(6):2385-2396.

Jüergen J. May, Nadine Kessler, Mohamed A. Marahiel, Milton T. Stubbs. 2002. **Crystal Structure of DHbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases**. PNAS. 99: 12120-12125.

Kajiyama N., Masuda T., Tatsumi H. e Nakano E. 1992. **Purification and characterization of luciferases from fireflies *Luciola cruciata* and *L. lateralis***. Biochem. Biophys. Acta. 1120: 228-232.

Kyte J. e Doolittle R.F. 1982. **A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein**. J. Mol. Biol. 157: 105.

Lakowicz, J.R. 2006. **Principles of fluorescence spectroscopy.** Springer, New York.

Lee, K.S., H.J.Park, J.S.Bae, T.W. Goo, I. Kim, H.D. Sohn e B.R. Jin. 2001. **Molecular cloning and expression of a cDNA enconding the luciferase from the firefly *Pyrocoellia rufa*.** J. Biotechnol. 91: 9-10.

Lemuel J. Bowie, Richard Irwin, Michael Loken, Mardele DeLuca e Ludwig Brand. 1973. **Excited-State proton transfer and the mechanism of action of firefly luciferase**. Biochemistry, 12: 1852-1857.

Li, Ye., L. M. Buck, H.J. Scaeffer and F.R. Leach. 1997. **Cloning and sequencing of a cDNA for firefly luciferase from *Photuris pensylvanica*.** Biochim. Biophys. Acta 1339: 39-52

Lloyd, J.E. 1978. **Insect bioluminescence in action.** Academic Press, New York.

Lundin, A., H. Hallander, A. Kallner, U. K. Lundin e E. Osterberg. 1989. **Bacteriuria testing by ATP method as an integral part in the diagnosis and therapy of urinary tract infection (UTI).** J. Biolumin. Chemilum. 4: 381-389.

McCapra F., Gilfoyle D.J., Young D.W., Church N.J., Spencer P. 1994. **The chemical origin of colour differences in beetle bioluminescence.** Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamentals and Applied Aspects. Campbell A.K., Kricka L.J., Stanley P.E. Wiley. 387-391.

McElroy, W.D. 1968. **Crystalline Firefly Luciferase.** Methods in Enzymology. Vol. 4. Academic Press. N. York.

McElroy, W.D., M. DeLuca. 1978. **Chemistry of firefly bioluminescence.** Bioluminescence in Action. 99: 109-127. Academic Press, New York.

Morris A.L., MacArthur M.W., Hutchinson E.G. e Thorton J.M. 1992. **Stereochemical quality of protein structure coordinates**. Proteins, 12: 345-364.

Morton R.A., Hopkins T.A. e Seliger H.H. 1969. **The spectroscopic properties of firefly luciferina and related compounds: an approach to product emission.** Biochemistry 8: 1598-1607.

Nakajima, Y. , Ikeda M., Kimura T., Honma S., Ohmiya Y. e K. Honma. 2004. **Bidirectional role of orphan nuclear receptor RORα in clock gene transcriptions demonstrated by a novel reporter assay system.** FEBS. Letters. 565: 122-126.

Nakamura M., Maki S., Amano Y. Ohkita Y.,Niwa K., Hirano T., Ohmiya Y., Niwa H. 2005. **Firefly luciferase exhibits bimodal action depending on the luciferin chirality**. Biochem. Biophys. Res. Com. 331(2): 471-5.

Nakatsu, T., Ichivama, S. Hiratake J., , Saldanha A. , Kobashi N. Sakata, K. Sakata e Hiroaki Kato. 2006. **Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence.** Nature. Vol. 440: 16.

Naylor L.H. 1999. **Reporter gene technology: the future looks bright.** Biochem. Pharm. 58: 749-757.

Ugarova, N.N., Brovko, L.Y. 2002. **Protein structure and bioluminescent spectra for firefly bioluminescence.** Luminescence. 17: 321-330.

Ohmiya, Y.., Ohba, H., Toh, F.I. Tsuji. 1995. **Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the luciferase from the Japanese fireflies *Pyrocoelia miyako* and *Hotaria parvula***. Photochemistry Photobiology, 62: 309-313.

Rees, J.F., B. Wergifosse, O. Noiset, M., Dubuisson, B. Janssens e E.M. Thompson. 1998. **The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools.** J. Exp. Biol. 201:1211-1221.

Orlova, G., Goddard, J.D. e Brovko, L.Y. 2003. **Theoretical study of the amazing firefly bioluminescence: the formation and structure of the light emitters.** J. Am. Chem. Soc. 125: 6962-6971.

Ramachandran, G.N.; Sassiekharan, V.; 1968. **Conformation of polypeptides and proteins**; Adv. Prot.Chem. 28:283-437, 1968

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

Sandalova, T.P., Ugarova, N.N. 1999. **Model of the active site of firefly luciferase.** Biochemistry 8: 160-166.

Seliger, H.H. e W.D. McElroy. 1964. **The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species-specificity.** PNAS. 52: 75-81.

Schram E., Weyens-van Witzenburg A. 1989. **Improved ATP methodology for biomass assays.** J. Biolumin. Chemilumin. 4(1): 390-8.

Schroeder, S. 1989. **Protein sequence homology between plant-4-coumarate: CoA ligase and firefly luciferase.** Nucl. Acid Res. 17:460.

Shulster, G.B. 1979. **Chemiluminescence of organic peroxides. Conversion of ground-state reactants to excited-states products by the chemically initiated electron-exchange luminescence mechanism.** Acc. Chem. Res. 12: 366-373.

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

Suzuki H., Y. Kawarabashi, J. Kondo, T. Abe, K. Nishikawa, S. Kimura, T. Hashimoto e T. Yamamoto. 1990. **Structure and regulation of rat long chain fatty acyl-CoA synthetase.** J. Biol. Chem. 265: 8681-8685.

Tatsumi, H., T. Masuda, N. Kajiyama e M. DeLuca. 1989. **Cloning of firefly luciferase cDNA and expression of active luciferase in Escherichia coli.** PNAS. 82: 7870-7873

Thèrèse Wilson. 1995. **Comments on the mechanisms of chemi and bioluminescence.** Photochemistry and Photobiology. Vol. 62 n° 4: 601-606.

Toh, H. 1990. **N-terminal halves of gramidicin S synthetase and tyrocidine synthetase 1 as novel members of firefly luciferase family.** Prot. Seq. Data Ana*l.* 3: 517-521.

Ugarova N.N. 1989. **Luciferase of *Luciola mingrelica* fireflies: kinetics and regulation mechanism**. J. Biolum. Chemilum. 4: 406-418.

Ugarova N.N., L. Y. Brovko. 2002. **Protein structure and bioluminescent spectra for firefly bioluminescence.** Luminescence. 17: 321-330.

Ugarova, N.N., Maloshenok, I. G., Uporov, I.V., Koksharov, M.I., 2005. **Bioluminescence Spectra of Native and Mutant Firefly Luciferases as a Function of pH**. Biochemistry (Moscou). 70: 1262-1267.

Viviani, V e E.J.H. Bechara. 1993. **Biophysical and biochemical aspects of phengodid bioluminescence.** Photochem. Photobiol. 58: 615-622.

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

Viviani , V.R. e E.J.H. Bechara. 1997. **Bioluminescence and biological aspects of Brazilian railroadworms (Coleoptera:Phengodidade).** Ann. Am. Soc. Entom. 90(3): 389-393.

Viviani, V.R., Silva, A.C.R., Perez, G.L.O., Santelli, R.V., Bechara, E.J.H., Reenact, F.C. 1999a. **Cloning and molecular characterization of the cDNA for the Brazilian larval click-beetle *Pyrearinus termitilluminans* luciferase.** Photochemistry and Photobiology. 70(2): 254-260.

Viviani, B.R., Bechara, E.J.H. e Omhiya, Y. 1999b. **Cloning, sequence analysis and expression of active *Phrixotrix* railroad-worms luciferases: relationships between bioluminescence spectra and primary structures.** Biochemistry 38: 8271-8279.

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

Viviani, B.R., Arnoldi, F.G.C., Brochetto-Braga, M. e Ohmiya, Y. 2004. **Cloning and characterization of the cDNA for the Brazilian *Cratomorphus distinctus* larval firefly luciferase: similarities with European *Lampyris noctiluca* and Asiatic *Pyrocoelia* luciferases.** Comp. Biochem. Physiol. *B*. 138: 151-156.

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

Viviani, V.R., Arnoldi F.G.C., A.J.S. Neto, F.G.T. Ogawa, A.T.I. Ohelmeyer, Y. Omiya. 2006. **Active-site properties of *Phrixotrix* railroad-worm green and red bioluminescence-eliciting luciferases.** J. Biochemistry. 140: 467-474.

Viviani, V.R. e Ohmiya, Y. 2006**. Bovine serum albumin displays luciferase-like activity in presence of luciferyl-adenylate: insights on the origin of protoluciferase activity and bioluminescence colors.** Luminescence.21 (4):262-7.

Viviani, V.R., Silva Neto, Antonio J., Arnoldi, Frederico G.C., Barbosa, João A.R.G., Ohmiya, Yoshihiro. 2008. **The influence of the loop between residues 223-235 in beetle luciferase bioluminescence spectra: a solvent gate for the active site of pH-sensitive luciferases.** Photochemistry and Photobiology. 84: 138-144(7).

Viviani, V.R. 2008. **Luciferases de vaga-lumes: estrutura, função e aplicação em bioanálise e bioimageamento**. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento n° 37.

Viviani, V.R., R.A.Prado, F.C.G.Arnoldi e F.C. Abdalla, 2009. **An ancestral luciferase in the Malphighi tubules of a non-bioluminescent beetle!** Photochemical & Photobiological Sciences. 8: 57-61.

White E.H., Rapaport E., Seliger H.H., Hopkins T.A. 1971. **The chemi-and bioluminescence of firefly luciferina: an efficient chemical production of electronically excited states.** Bioorg. Chem. 1: 92-122.

White E.H., Branchini B. 1975. **Modification of firefly luciferase with a luciferina analog: a red light producing enzyme.** J. Am. Chem. Soc. 97: 1243-1245.

White E.H., Roswell D.F. **Analogs and derivatives of firefly oxyluciferin, the light emitter in firefly bioluminescence.** Photochemistry and Photobiology. 53: 131-136.

Wilson T. e Hastings, J.W. 1998. **Bioluminescence**. Annual Review of Cellular and Developmental Biology. 14: 197-230.

Wilson, Thérèse 1995. **Comments on the Mechanisms of Chemi- and Bioluminescence**. Photochemistry and Photobiology. Vol. 62. N° 4: 601-606.

Wood, K.V., Y.A. Lam, Seliger e W.D. McElroy. 1989. **Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors.** Science. 244: 700-702.

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

X Anexos

Artigos Publicados

1. The influence of the region between residues 220 and 344 and beyond in *Phrixotrix* railroad worm luciferases green and red bioluminescence;

2. Active-Site Properties of *Phrixotrix* Railroad Worm Green and Red Bioluminescence-Eliciting Luciferases;

3. The influence of the Loop between Residues 223-235 in Beetle Luciferase Bioluminescence Spectra: A Solvent Gate for the Active Site of pH-Sensitive Luciferases;

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo