



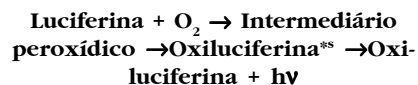
LUCIFERASES DE VAGALUMES

ESTRUTURA, FUNÇÃO E APLICAÇÃO EM BIOANÁLISE E BIOIMAGEMAMENTO

I. INTRODUÇÃO

A bioluminescência é a emissão de luz fria e visível por organismos vivos. Ela ocorre entre as bactérias, fungos, algas, celenterados, moluscos, artrópodes, anelídeos, equinodermas e peixes; (Herring, 1987). A bioluminescência é um tipo especial de quimioluminescência, biologicamente funcional, catalizada por enzimas, resultante de oxidações altamente exer-

gônicas nas quais a energia é liberada preferencialmente na forma de luz. Qualquer célula viva produz quimioluminescência ultrafraca, como subproduto do metabolismo oxidativo, aparentemente sem função biológica (Lee, 1989). Na bioluminescência a emissão de luz é visível, assumindo importantes funções comunicativas intra- e inter-específicas, dentre as quais destacam-se a atração sexual, defesa, camuflagem e atração de presas. Basicamente uma reação bioluminescente envolve a oxidação por oxigênio de compostos genericamente conhecidos por luciferinas. Estas reações são catalisadas por enzimas denominadas de luciferases. O sistema bioluminescente de fungos é o único no qual a luminescência aparentemente não é catalisada por enzimas (Wilson and Hastings, 1998). Durante a oxigenação das luciferinas, são formados intermediários peroxídicos altamente instáveis e ricos em energia, cuja clivagem térmica gera produtos carbonílicos, um dos quais no estado excitado singlete que se desativa emitindo fluorescência (Wilson, 1995). Os rendimentos quânticos de bioluminescência (número de fótons emitidos por molécula de luciferina oxidada) são em geral elevados devido aos sítios ativos das luciferases que catalisam eficientemente a oxidação das luciferinas e fornecem microambientes altamente protetivos para o produto excitado, evitando que este se desative por outros processos não-radiativos. As luciferases constituem portanto casos especiais de oxigenases otimizadas para a emissão de luz.



Biodiversidade de insetos bioluminescentes.

A bioluminescência ocorre predominantemente no ambiente marinho. No ambiente terrestre, a bioluminescência é encontrada principalmente na classe dos insetos, que é a mais rica em espécies

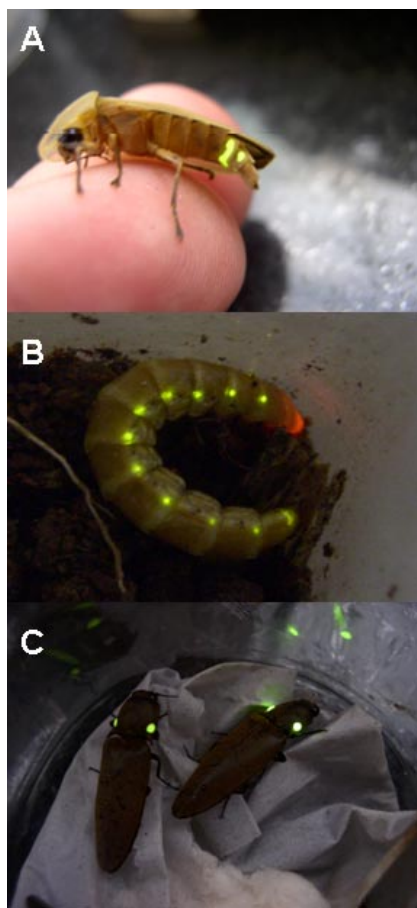


Figura 1. Besouros bioluminescentes da fauna brasileira: (A) vagalume lampirídeo; (B) larva trenzinho (Phengodidae) e (C) vagalume elaterídeo (Fotos V.Viviani)

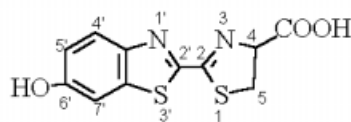
Vadim R. Viviani - Prof. Dr.
Prof. Adjunto - Bioquímica
Laboratório de Bioluminescência e
Biotecnologia-UNISO
Universidade Federal de São Carlos
Campus de Sorocaba, SP, Brasil
viviani@ufscar.br
bioluxgen@hotmail.com

bioluminescentes. A bioluminescência é encontrada em *ca* de 2000 espécies nas ordens Diptera, Collembola e principalmente Coleoptera (Lloyd, 1983). Na ordem Collembola foram descritas espécies luminescentes nos generos *Li-pura* e *Neanura*, entretanto as funções biológicas e a natureza química da bioluminescência permanecem completamente obscuras (Harvey, 1952). Os fulgorídeos, da ordem Homoptera, também foram incluídos, entretanto a presença de luminescência própria neste grupo ainda é incerta (Lloyd, 1978). Recentemente espécies luminescentes foram descritas em Blattodea (Zompro and Fritzsche, 1999).

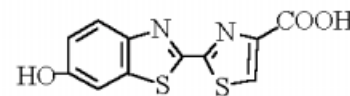
Entre os coleópteros, a superfamília Elateroidea inclui as principais famílias de insetos luminescentes (Lawrence and Newton, 1995): Lampyridae, Phengodidae, Homalidae, Telegeusidae, Elateridae. As famílias mais numerosas em espécies luminescentes são Lampyridae, Elateridae e Phengodidae (Lloyd, 1978) (Fig.1). Foram descobertas também espécies bioluminescentes na família Staphylinidae (Costa et al., 1986).

Lampyridae. A família Lampyridae inclui os vagalumes propriamente chamados, com *ca* de 1800 espécies descritas no mundo e possivelmente o mesmo número ainda para ser descrito na região Neotropical (Lloyd, 1971). Os lampirídeos são coletivamente conhecidos por vagalumes e na fase adulta emitem luz pela região ventral dos últimos segmentos abdominais por meio de lampejos para finalidade de atração sexual (Lloyd, 1978). As larvas também são luminescentes. A função da luminescência na fase larval é ainda controversa, possivelmente estando associada a defesa (aposematismo, alarme e distração; Sivinsky, 1981).

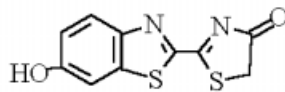
Elateridae. A família dos elaterídeos inclui *ca* de 9000 espécies descritas, das quais apenas *ca* de 200, pertencentes as subfamílias Agrypininae e Campyloxeninae possuem espécies luminescentes (Costa et al., 1988). Na fase adulta as lanternas estão localizadas na forma de duas vesículas ovaladas sobre o protórax que emitem luz contínua na região do verde, e uma lanterna abdominal que é ativada somente durante o voo, que também emite luz contínua, mas em geral de cromaticidade deslocada para o vermelho em relação as lanternas torácicas (Bechara, 1988). A luminescência nesta família também está associada com a atração sexual, entretanto o sistema de comunicação é aparentemente mais simples do que nos lampirídeos (Lloyd, 1971), mas permanece pouco estudado. As lanternas torácicas também podem ter importante função defensiva.



D-luciferin



Dehydroluciferin



Oxyluciferin

Figura 2. Luciferina e seus produtos de oxidação

Phengodidae. Os fengodídeos constituem uma família pequena, com *ca* de 170 espécies descritas, a maioria se não todas luminescente. No Brasil foram descritas 50 espécies dentro da subfamília Phengodinae, a maioria dentro da tribo Mastinocerini, mas um número maior de espécies ainda está para ser descrito. Anteriormente descobrimos 3 espécies novas de fengodídeos (Wittmer, 1993, 1996) na região Central do Brasil. Nesta última tribo os machos adultos possuem luminescência na forma de lanternas puntiformes laterais nos segmentos abdominais e torácicos, enquanto que as fêmeas e larvas possuem pares de lanternas puntiformes laterais ao longo do corpo inteiro, e uma ou duas lanternas cefálicas que emitem luz na faixa do verde-amarelado ao vermelho (Viviani and Bechara, 1993, 1997) (Fig. 1). A larva trezinho de Phrixotrix, além de apresentar lanternas verde ao longo do corpo, são as únicas a apresentarem bioluminescência vermelha.

A Bioquímica da bioluminescência dos vagalumes

O sistema luciferina-luciferase de coleópteros é um dos sistemas bioluminescentes mais conhecidos. A primeira luciferina e luciferase de insetos a serem purificadas foram as do lampirídeo norte-americano *Photinus pyralis* (Green & McElroy, 1956; Bitler & McElroy, 1957). O progresso alcançado na elucidação das propriedades do sistema luciferina-luciferase de coleópteros se deve principalmente ao estudo do sistema desta espécie, abundante nos EUA. A luciferina de lampirídeos é um composto benzotiazólico (Fig. 2) de peso molecular 280 Da. Foi sintetizada pela primeira vez por White e colaboradores (1961, 1963), juntamente com a desidroluciferina (Fig. 2), seu produto de autooxidação. As luciferinas de outras es-

pécies de lampirídeos, bem como as dos elaterídeos (Colecopolo et al., 1986) e fengodídeos (Viviani and Bechara, 1993) são essencialmente idênticas.

A luciferase de vagalumes catalisa a oxidação da luciferina por oxigênio, ativada por MgATP. São enzimas bifuncionais. Na primeira etapa da catálise enzimática, a luciferase atua como adenosil-transferase, adenilando a luciferina a partir de ATP e liberando pirofosfato (Fig.3). Esta etapa é essencialmente semelhante a reação de ativação de ácidos graxos e outros ácidos carboxílicos aromáticos catalizado pelas acyl CoA:sintetases (DeLuca and McElroy, 1978), com as quais compartilham elevado grau de homologia (Wood, 1995). Em seguida a luciferase atua como oxigenase, removendo o próton do carbono alfa a carbonila, tornando-o suscetível ao ataque por oxigênio molecular, com a produção do intermediário dióxetânico (Fig.4; Wannalund, 1978), cuja clivagem produz dióxido de carbono e oxiluciferina excitada. De acordo com DeLuca & McElroy (1974), a abstração do próton 4 do anel tiazínico constitui a etapa limitante da reação catalisada pela luciferase.

Origem dos sistemas bioluminescentes de insetos. Uma das questões mais intrigantes concernentes a bioluminescência é como este processo pode ter se originado ao longo da evolução. Embora o mecanismo básico de toda a bioluminescência envolva a oxigenação de uma luciferina gerando um intermediário peroxídico, a natureza química das luciferinas, luciferases e cofatores participantes difere consideravelmente de um grupo de seres vivos para outro, o que levou desde cedo à conclusão de que a bioluminescência possa ter se originado muitas vezes independentemente no decorrer da evolução (Seli-

ger & McElroy, 1965; Hastings, 1995). Em insetos, dados morfológicos e bioquímicos sugerem que pelo menos três sistemas diferentes (um em coleópteros e dois em dípteros) são encontrados (Viviani, 2002). Entretanto, a falta de estudos sobre outros grupos, sugere a existência de novos sistemas.

A origem e possível função primitiva da luciferina permanecem obscuras. Estudos de marcação isotópica sugerem que a luciferina se origina da fusão do amino-ácido cisteína com benzoquinonas. Compostos benzotiazólicos são comuns em pigmentos (Wood, 1995). A luciferina de besouros foi encontrada unicamente em espécies luminescentes, não havendo indícios em espécies não-luminescentes de famílias filogeneticamente próximas como Cantarídeas (Viviani, tese de doutorado). Foi sugerido que a luciferina de coleópteros poderia originalmente ter papel antioxidante. Entretanto, a ocorrência limitada a apenas espécies luminescentes argumenta contra esta possibilidade. É possível que a luciferina possa originalmente ter sido um intermediário da biossíntese de pigmentos (Viviani, 2008 no prelo).

AS LUCIFERASES DE COLEÓPTEROS

As luciferases de vagalumes são monômeros cataliticamente ativos de ca 60 kDa (DeWet *et al.*, 1985). A ca de 20 anos o cDNA para a luciferase do vagalume americano *Photinus pyralis* foi clonado, sequenciado e a estrutura primária da proteína foi deduzida (DeWet *et al.*, 1985). O cDNA da luciferase de *Photinus pyralis* é um fragmento de ca 1.6 kb que codifica um polipeptídeo de 550 resíduos de aminoácidos. A luciferase possui uma sequência sinalizadora Ser-Lys-Leu que a dirige após a tradução para peroxissomas, as organelas às quais está associada nos fotócitos (Gould *et al.*, 1967). Desde então, os cDNAs que codificam uma variedade de luciferases, a maioria oriundos da família Lampyridae (Tatsumi *et al.*, 1989; Kajiyama & Nakano, 1991; Devine *et al.*, 1993; Sala-Newby *et al.*, 1993; Ohmiya *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1996) foram clonados e sequenciados. As luciferases de lampírideos são polipeptídeos de 546-550 resíduos, apresentam propriedades semelhantes e preservam entre si de 67 a 94% de identidade a nível de estrutura primária (Wood, 1995). As luciferases de elaterídeos são polipeptídeos de 542-543 resíduos e compartilham entre 82-99% identidade

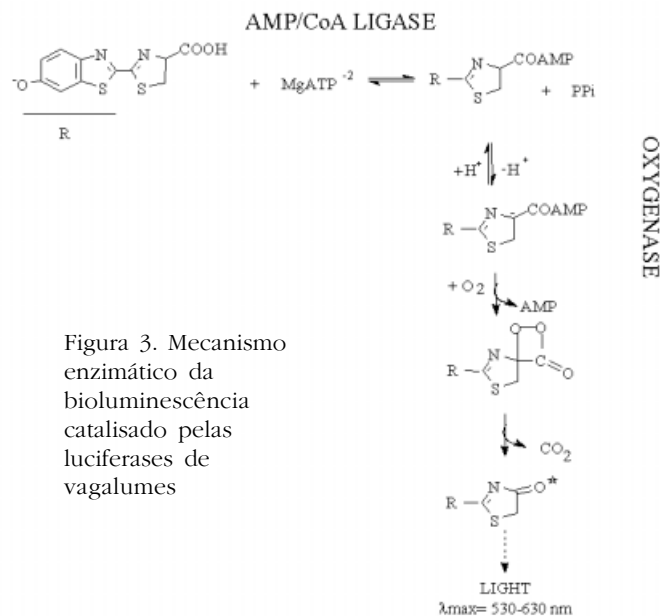


Figura 3. Mecanismo enzimático da bioluminescência catalisado pelas luciferases de vagalumes

entre si (Wood, *et al.*, 1989; Viviani *et al.*, 1999b). Nosso grupo clonou e determinou as sequências das luciferases de 3 fengodídeos (Viviani *et al.*, 1999a; Ohmiya *et al.*, 2000) (Fig.4, 5) e de um elaterídeo (Viviani *et al.*, 1999b) que emitem na faixa do verde ao vermelho. As luciferases de fengodídeos são polipeptídeos de 543-546 resíduos, apresentam 56-71% de identidade entre si (Gruber *et al.*, 1996; Viviani *et al.*, 1999a; Ohmiya *et al.*, 2000) e 46-50% de identidade com as demais luciferases de lampírideos e elaterídeos.

A analogia entre as reações de adenilação das luciferases de coleópteros e aminoacyl-tRNA sintetases e acylCoA sintetases foi desde cedo reconhecida (DeLuca and McElroy, 1968). Com o advento da biologia molecular descobriu-se que muitas das acyl CoA sintetases e outras ligases são homólogas às luciferases.

Estrutura tridimensional da luciferase de vagalumes

A estrutura tridimensional da luciferase de *Photinus pyralis* foi originalmente resolvida por cristalografia de raios X na ausência dos substratos, mostrando uma grande domínio N-terminal e uma pequeno domínio C-terminal que provavelmente se aproximam para envolver os substratos durante a catálise (Fig. 6) (Conti *et al.*, 1996). A determinação da estrutura tridimensional de outras AMP-ligases mostrou que o domínio C-terminal pode assumir diferentes graus de rotação em relação ao domínio N-terminal dependendo da enzima (May *et al.*, 2002; Gulick *et al.*, 2003). Evidências sugerem que os dois domínios assumem uma conformação similar em di-

ferentes enzimas durante a etapa de adenilação, ao passo que nas etapas subsequentes os dois domínios podem apresentar diferentes graus de rotação dependendo da enzima (Gulick *et al.*, 2003). Mais recentemente, a estrutura cristalográfica da luciferase do lampírideo japonês, *Luciola cruciata*, foi resolvida na presença do análogo DLSA e dos produtos oxiluciferina e AMP, mostrando algumas diferenças com os modelos propostos (Nakatsu *et al.*, 2006) (Fig.6).

O sítio-ativo. O sítio ativo está localizado num bolsão no interior do domínio N-terminal, que faz face para o domínio C-terminal, sendo que vários resíduos conservados se en-

contram nas interfaces destes dois domínios. Estudos de comparação de sequências, modelagem e mutagênese sítio-dirigida mostraram as regiões e resíduos do sítio de ligação do ATP (Conti *et al.*, 1997; Franks *et al.*, 1998; Branchini *et al.*, 1998; Sandalova e Ugarova, 1999). Os módulos I [(198SSGSTGLPKG207), II (340YGLTE344) e III (418LHSGD422)] são particularmente conservados nestas enzimas, sugerindo que estejam envolvidos com a função de ligação de ATP e de adenilação (Morozov and Ugarova, 1997). O módulo I, consiste em um loop altamente flexível que separa o sítio de ligação do ATP do sítio de ligação para o substrato carboxílico (May *et al.*, 2002), que é variável, e está envolvido com a liberação de pirofosfato durante a adenilação. Em algumas ligases os resíduos que correspondem à Gly315 e à Arg437 nas luciferases de vagalumes podem estar envolvidos com a adenilação. O resíduo conservado Lys 529 é importante para o posicionamento e estabilização do grupo carboxila da luciferina e dos fosfatos do ATP nas luciferases (Branchini *et al.*, 2000).

Foi especulada também a existência de um sítio de ligação para Coenzima A (CoA) na luciferase, visto que a muito tempo é sabido que o CoA afeta a cinética da reação bioluminescente (Wood, 1995). Estudos recentes mostram que a CoA é importante para remoção dos inibidores L-luciferina e desidroluciferina, e também no processo de epimerização da L-luciferina em D-luciferina, o substrato real da bioluminescência. Na estrutura tridimensional da acyl CoA sintetase, a CoA aparece localizada na superfície da proteína entre os domínios N e C-terminal, com a porção

fosfopanteteína posicionada próxima ao sítio de ligação do AMP (Gulick et al., 2003). Evidências sugerem que a ligação da CoA promova a rotação do domínio C-terminal.

Estudos de modelagem (Branchini et al., 1998; Sandalova e Ugarova, 1999), mutagênese sítio-dirigida e mais recentemente a resolução da estrutura tridimensional da luciferase na presença do análogo DLSA revelou a identidade dos resíduos do sítio de ligação da luciferina (Fig.6). A fotooxidação com um análogo de luciferina e estudos de mutagênese mostraram que o peptídeo 244HHFG245 está em proximidade da luciferina (Branchini et al., 1997). Evidências indiretas também foram obtidas baseadas nas estruturas tridimensionais da fenilalanina sintetase com ATP e fenilalanina (Conti et al., 1997) e da luciferase de *Photinus pyralis* em presença do inibidor competitivo da luciferina, bromofórmio (Franks et al., 1998). Baseados nestas informações dois modelos de sítio ativo foram propostos. Estes modelos em geral concordam entre si, embora algumas diferenças importantes sejam evidentes. De acordo com um dos modelos, o resíduo Arg218 é aparentemente importante para a estabilização do fenolato da luciferina (Branchini et al., 1998), enquanto que no outro modelo, o resíduo Arg337 está mais próximo do fenolato para fazer esta interação (Sandalova e Ugarova, 1999). A resolução da estrutura tridimensional da luciferase de *Luciola cruciata* na presença de DLSA e de oxiluciferina com AMP mostrou que a isoleucina 288 está próxima do grupo fenolato do anel benzotiazólico, criando um microambiente hidrofóbico e rígido, apropriado para a emissão de luz verde (Nakatsu et al., 2006).

Determinantes estruturais dos espectros de bioluminescência

A variedade de cores da bioluminescência encontrada nos besouros é atribuível essencialmente às diferentes luciferases, desde que as luciferinas são idênticas nas três famílias. As luciferases de coleópteros elaterídeos dividem-se em dois grupos de acordo com a sensibilidade espectral ao pH (Viviani and Bechara, 1995): (I) as luciferases pH-sensíveis que incluem as luciferases de lampírideos, sofrem deslocamento batocrômico mediante abaixamento

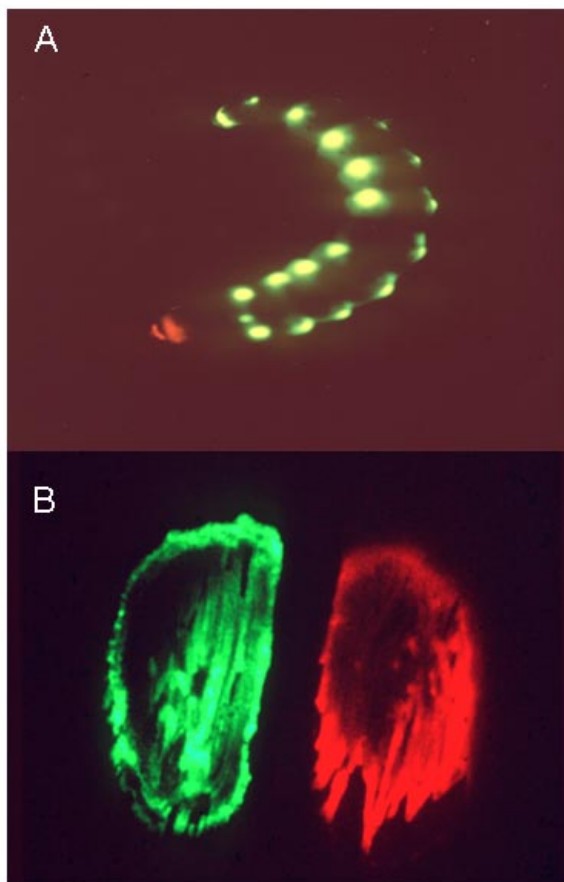


Figura 4. (Painel superior) Larva trezinho *Phrixotrix hirtus*, (Painel inferior) colônias de bactérias *E. Coli* tornadas bioluminescentes após transformação com plasmídeos contendo os cDNAs clonados das luciferases emissoras de luz verde e vermelha de *Phrixotrix*.

de pH, aumento de temperatura e concentração de cátions (Seliger and McElroy, 1964) e (II) luciferases pH-insensíveis que incluem as luciferases de fengodídeos e elaterídeos, que não sofrem deslocamento batocrômico mediante diminuição do pH, aumento da concentração de cátions de metais pesados divalentes ou aumento de temperatura (Viviani and Bechara, 1995).

Mecanismos de modulação de cores de bioluminescência. Em princípio as cores da bioluminescência são governadas a nível de sítio ativo das luciferases por tres fatores estruturais (Fig. 7): (1) efeitos não-específicos como polaridade (DeLuca, 1969) e polarização orientada do sítio ativo (Ugarova, 2000), determinada pela natureza dos resíduos que o compõem; (2) efeitos específicos de interação de resíduos ácido-básicos no sítio ativo das luciferases com a oxiluciferina (White & Branchini, 1975). O processo de tautomerização da oxiluciferina excitada na presença de resíduos básicos foi originalmente proposto (a forma cetônica emite luz

vermelha e a forma enólica emite luz verde-amarela), entretanto, recentemente experimentos com o adenilato do 5,5 dimetil-análogo da luciferina mostraram que a forma cetônica pode emitir tanto luz verde-amarela como vermelha, tornando a hipótese da tautomerização improvável (Branchini et al., 2002); (3) a rotação dos anéis tiazínicos da oxiluciferina em torno da ligação C₂-C_{2'}, que está em função da geometria do sítio ativo (McCapra et al., 1994) (Fig.6). Mais recentemente foi proposto que a delocalização de cargas na forma cetó-aniónica constitui fator determinante para os espectros de bioluminescência (Branchini et al., 2004). Estudos teóricos apoiam parcialmente esta última hipótese, sugerindo que o controle exercido pelo microambiente da luciferase no grau de polarização dos grupos fenolato e cetó-enol determina os espectros de bioluminescência (Orlova et al., 2004). Através de deconvolução espectral, Ugarova e col. (2005) sugeriu a existência de três espécies emissoras que contribuiriam nos espectros de bioluminescência das luciferases de lampírideos: (cetó-fenolato) que emitiria luz vermelha; (enol/fenolato) emissor de luz laranja e (enolato/fenolato) o emissor de luz verde. Estudos com a quimioluminescência de adenilato de luciferina em meio aquoso e na presença de soroalbumina bovina sugerem que a bioluminescência vermelha requer um microambiente menos estruturado que a bioluminescência verde (Viviani e Ohmiya, 2006).

As luciferases de lampírideos. A maioria dos estudos de estrutura e função tem utilizado principalmente as luciferases de lampírideos. A construção de quimeras entre as luciferases de lampírideos revelou que a região entre os resíduos 209-318 é determinante das cores nas luciferases de lampírideos (Ohmiya et al., 1986). Entretanto, a mutação de vários resíduos isolados ao longo da estrutura primária das luciferases de lampírideos afeta drasticamente a cor da bioluminescência, em geral resultando em mutantes vermelhos (Kajiyama & Nakano, 1991). A mutação de vários resíduos conservados do sítio-ativo, entre os quais R218, H245, T343, também teve efeitos dramáticos nos espectros de bioluminescência das luciferases de lampírideos (Branchini et al., 1998, 2000, 2003).

As luciferases pH-insensíveis. As lu-

As luciferases de fengodídeos. Nas luciferases de fengodídeos emissoras de luz verde, poucas mutações tiveram efeito dramático no espectro. A construção de quiméricas com as luciferases emissoras de luz verde e vermelha sugere que a conformação da região entre os resíduos 220 e 344 tem importante influência na cor da bioluminescência em fengodídeos (Viviani and Ohmiya, 2000). Identificamos Arg215 como um resíduo importante para a emissão de luz verde. Entretanto ainda não está claro se o papel deste resíduo está relacionado a uma estabilização do enolato que emite luz verde, como sugerido por Branchini e col (1998), ou com interações importantes para a manutenção da estrutura do sítio ativo ou os dois processos (Viviani and Ohmiya, 2000). Outro resíduo cuja substituição tem efeito dramático nos espectros das luciferases de fengodídeos emissoras de luz verde ou amarela é o resíduo T226. Foi proposto que Arg215 e Thr226 poderiam interagir direta ou indiretamente para manter uma conformação apropriada do sítio ativo para a emissão de luz verde (Viviani et. Al., 2002). Notavelmente, embora a substituição destes resíduos afete dramaticamente os espectros das luciferases verde e amarela, elas não tem efeito na luciferase vermelhas, mostrando que R215 e T226 são funcionais apenas para emissão de luz verde/amarela (Viviani et al., 2007). Estudos extensivos de mutagênese sítio-dirigida também mostraram que, com a exceção dos resíduos R215, Y224 e T226, a substituição de vários outros resíduos ao longo da estrutura primária da luciferase verde, inclusive de resíduos invariáveis do sítio-ativo, não afetam ou afetam apenas moderadamente os espectros de bioluminescência desta luciferase, enquanto nenhuma substituição até agora afetou os espectros da luciferase vermelha (Viviani et al.,

As luciferases de fengodídeos.

[illegible]

Figura 5. Sequencias de amino-ácidos das luciferases emissoras de luz vermelha (PxRE) e verde (PxGR) clonadas a partir das larvas trezinhos *Phrixotrix* spp (Viviani et al., 1999)

2006, 2007). No conjunto estes resultados sugerem que a estrutura do sítio ativo da luciferase verde seja mais estabilizada do que aquela da luciferase vermelha, e que a explicação para estas diferenças de espectros de bioluminescência esteja mais relacionada a mudanças conformacionais durante a etapa de emissão, do que na composição de resíduos do sítio-ativo.

A sensibilidade ao pH.

Após a clonagem de várias luciferases de fengodídeos e de elaterídeos (Viviani et al., 1999a,b; 2000), identificamos um conjunto de resíduos conservados que diferem entre as luciferases pH-dependentes e as luciferase pH-independentes, que poderiam estar envolvidos com o efeito pH (Fig. 5) (Viviani et al., 1999b). Entre estes o resíduo 226 (Thr em elaterídeos e fengodídeos e Asn nas luciferases de lampirídeos) constitui um resíduo-chave para emissão de luz verde-amarela (Viviani et al., 2001). O resíduo Gly247 em luciferases pH-dependentes e o respectivo Ala243 nas pH-independentes afetam sensivelmente a sensibilidade ao pH, provavelmente por interferirem com a flexibilidade de segmentos importantes no sítio ativo das luciferases (Viviani et al., 2002). Entretanto, até pouco tempo, nenhum resíduo transformou uma luciferase pH-insensitiva em pH-sensitiva. Nossos resul-

tados sugerem que o sítio ativo das luciferases pH-independentes é mais rígido graças a estabilização por forças hidrofóbicas gerando apenas uma espécie emissora. O sítio-ativo das luciferases de lampírideos é mais flexível e hidrofílico podendo originar duas espécies emissoras dependendo de sua conformação (Viviani et. al., 2001).

Mais recentemente, com a clonagem de duas luciferases pH-sensíveis de vagalumes brasileiros, inclusive a luciferase de *Macrolampis* que naturalmente apresenta um espectro bimodal, identificamos que a substituição E354N determina o aparecimento do ombro no vermelho no espectro (Viviani et al., 2005).

A partir de estudos de modelagem e mutagênese sítio-dirigida, começamos a identificar os resíduos que participam na determinação da sensibilidade ao pH. Identificamos uma rede de resíduos que interagem entre si por pontes de hidrogênio e pontes salinas que nas luciferases pH-sensitivas atuaria como uma comporta para o sítio-ativo (Viviani et al., 2008) (Fig.9). Em especial, verificamos que vários resíduos que afetam os espectros de emissão estão localizados no loop entre os resíduos 223-235 (Viviani et al., 2007) (Fig.8). Este loop atua como uma presilha que fixa partes do sítio de ligação da luciferina, através das ligações de hidrogênio dos re-

síduos Y227 e N229 (Fig.9). A ruptura das interações destes resíduos através de mutagênese, tem efeito dramático nos espectros de ambos os grupos de luciferases, resultando em espectros que variam temporalmente e que afetam a sensibilidade ao pH (Viviani et al., 2007). Estes resultados indicam que a mobilidade deste loop tem um papel crucial na determinação dos espectros de bioluminescência e da sensibilidade ao pH (Viviani et al., 2007). Mudanças de pH poderiam afetar a entrada de água no sítio ativo, tornando-o mais polar e deslocando o espectro de emissão para o vermelho (Viviani et al., 2007, 2008).

Origem e evolução molecular

Embora as luciferases sejam funcionalmente classificadas como oxigenases, estas enzimas não apresentam homologia indicando que as luciferases não se originaram a partir de oxigenases, como havia sido proposto originalmente (Rees et al., 1998). É mais provável que a função oxigenásica das luciferases tenha sido aperfeiçoada após a origem do fenótipo luminescente, tendo sido a bioluminescência que dirigiu a evolução de novas oxigenases e não o contrário (Rees, et al., 1998).

No caso dos coleópteros, as luciferases provavelmente se originaram a partir de uma AMP-ligase (Schroeder, 1989; Suzuki et al., 1990; Toh, 1990; Scholten et al., 1991) com alguma função metabólica por duplicação gênica (Fig.10). Enzimas tipo-luciferases com a capacidade de emitir quimioluminescência fraca na presença de luciferina e ATP foram encontradas em larvas de besou-

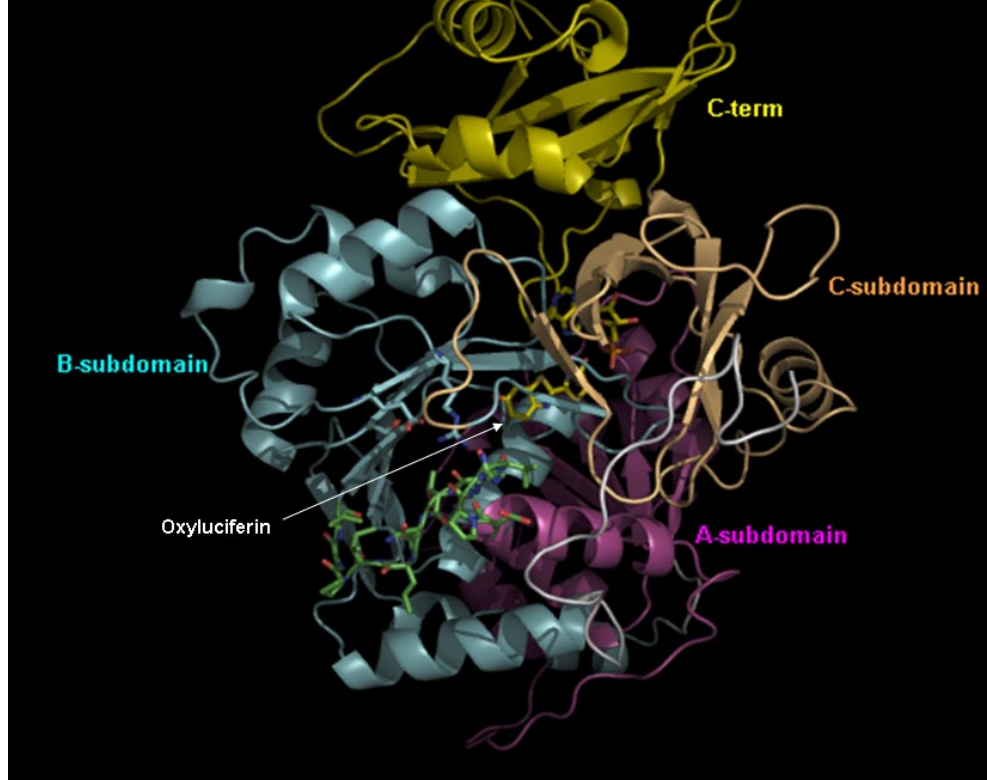


Figura 6. Estrutura tridimensional da luciferase de vagalumes, mostrando o sítio de ligação da luciferina

ros não-luminescentes de *Tenebrio molitor* e outras larvas de coleópteros (Viviani and Bechara, 1996). Estas ligases podem ser enzimas parálogas às luciferases muito semelhantes às protoluciferases que deram origem às luciferases de coleópteros. Estas ligases poderiam catalisar a formação do adenilato de luciferina, que é espontaneamente quimioluminescente em meio aquoso alcalino, embora com baixo rendimento (Seliger and McElroy, 1962). Embora o rendimento luminoso destas ligases seja muito baixo para que a lumines-

cência tenha sido selecionada com base na sua visibilidade, é possível que a luminescência da protoluciferase original fosse mais alta do que nas enzimas tipo-luciferases encontradas em outros besouros. De fato, recentemente demonstramos que proteínas como BSA, que tem sítios hidrofóbicos para compostos aromáticos, aumentam consideravelmente o rendimento de quimioluminescência vermelha do adenilato de luciferina em sistema aquoso (Viviani e Ohmiya, 2006). Alternativamente, a luminescência original poderia desempenhar algum outro papel desconhecido. Em bactérias por exemplo, evidências recentes suportam um papel importante da luminescência no processo de fotoreativação do DNA (Czys et al., 2003). Uma vez selecionada com base na luminescência, a estrutura da luciferase evoluiu para a otimização da emissão de luz de diferentes cores para diferentes finalidades.

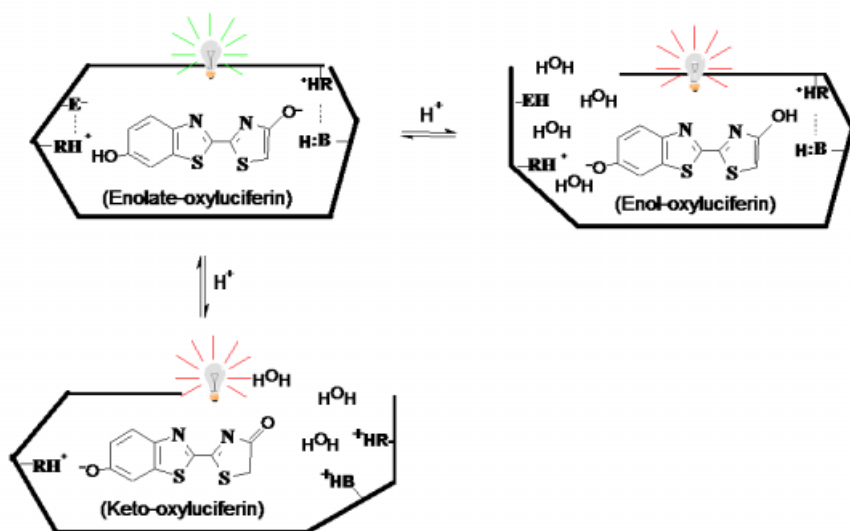


Figura 7. Mecanismos de determinação das cores de bioluminescência pelo sítio-ativo das luciferases de besouros (de acordo com V.Viviani et al., 2008)

Aplicações biotecnológicas das luciferases de coleópteros

Luciferina-luciferase como reagentes bioanalíticos. Após a purificação da primeira luciferina e luciferase de vagalumes na década de 50, inúmeras aplicações envolvendo a quantificação de ATP para fins analíticos e clínicos apareceram. Entre estas aplicações destacaram-se a monitoração de biomassa (Schram et al, 1989), avaliação da contaminação microbiológica de alimentos, bebidas, águas e fluidos biológicos

pH-Insensitive	Pte (534 nm)	223	SDPRVGTQLIPGV	235	352	TLH-NEFKSGS	361
	PplGR (546 nm)	223	LDPRVGTQLIPGV	235	352	SLR-DEFKSGS	361
	PpLYG (560 nm)	223	LDPRAGTQLIPGV	235	352	SLG-DEFKSGS	361
	PpLYE (570 nm)	223	LDPEAGTQLIPGV	235	352	SLG-DEFKSGS	361
	PpLOR (593 nm)	223	LDPEAGTQLIPGV	235	352	SLG-DEFKSGS	361
pH-Sensitive	PxGR (546 nm)	223	RDPIYGTIRTVPQT	235	352	TPH-NAVKTGS	361
	Rob (555 nm)	223	KDPLFGTIRTIPPS	235	352	TPH-DDVKTS	361
	PxRE (623 nm)	223	SDPIYGTIRIADPT	235	352	SPNDRELEKGA	361
	Ppe (538 nm)	223	KDPTFGNAINPTT	235	352	TED-TDVRPGS	361
	Cdi (548 nm)	223	RDPVFGNQIIPDT	235	352	TPE-GDDKPGA	361
pH-Sensitive	Pmy (550 nm)	223	RDPVFGNQIIPDT	235	352	TPE-GDDKPGA	361
	PpY (562 nm)	223	RDPVFGNQIIPDT	235	352	TPE-GDDKPGA	361
	Msp (569 nm)	223	RDPVFGNQIIPDT	235	352	TPE-GDDKPGA	361
	Lla (562 nm)	223	RDPVFGNQVSPGT	235	352	TPE-GDDKPGA	361
	Bpa (570 nm)	223	RDPVFGNQVSPGT	235	352	TPE-GDDKPGA	361
	Lai (570 nm)	223	RDPVFGNQVSPGT	235	352	TPE-GDDKPGA	361
			** * *			*	

Figura 8. Multialinhamento da região dos loops entre os resíduos 223-235 e 352-359 das luciferases de besouros, mostrando resíduos-chave para a modulação dos espectros de bioluminescência

(Stanley, 1989; Lundin et al., 1989); avaliação da viabilidade celular (Comhaire et al., 1989); ensaio de atividades enzimáticas envolvendo o consumo ou formação de ATP; testes de citotoxicidade, entre outros. Hoje em dia existem kits específicos comercializados para estas finalidades.

DNA da luciferase como marcador de expressão gênica. A clonagem do gene da luciferase de vagalumes tornou possível toda uma nova gama de aplicações envolvendo o uso deste gene como marcador altamente sensível da expressão gênica em células e tecidos (Gould and Subramani, 1988; Naylor, 2000). O gene das luciferases de vagalumes tem sido utilizados como gene repórter em bactérias, leveduras, vege-

tais, insetos e mamíferos, em análises da função de promotores associados com desenvolvimento e controle circadiano.

DNA da luciferase como marcador para bioimageamento de células e tecidos. Mais recentemente, com o desenvolvimento de equipamentos de fotodetecção e imageamento mais sensíveis, os genes das luciferases estão sendo empregados para marcação e visualização *in vivo* em tempo real de células e tecidos (Viviani and Ohmiya, 2006). São utilizados para marcação e estudos de disseminação de microrganismos patogênicos em plantas e animais, auxiliando na rápida seleção de drogas antimicrobicas. Também estão sendo

utilizados como marcadores sensíveis de células cancerígenas, auxiliando no estudo de metastatização e no desenvolvimento de novas terapias. A bioluminescência é o único método com sensibilidade suficiente para detectar metástases em sua fase inicial. Entretanto, por ser uma técnica nova, seu uso permanece limitado a modelos animais. A derivação de genes terapêuticos também tem sido feita com marcação bioluminescente (Contag et al., 1995; 1996 and 1998).

Aplicação em biosensores. Os genes de luciferases estão sendo usados também em biosensores ambientais para detecção de bioavaliabilidade de cátions de metais pesados como mercúrio e arsênio ou agrotóxicos e outros disruptores ambientais em águas contaminadas (Tauriainen et al., 1999). Juntamente com a GFP (green fluorescent protein) e seus derivados, as luciferases estão se tornando os genes repórteres mais utilizados para estas finalidades. Uma das mais recentes aplicações na área de proteômica envolve o uso de luciferase e GFPs em ensaios BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), onde interações proteína-proteína são avaliadas pela alteração do espectro de emissão mediante transferência de energia do emissor primário (luciferase-luciferina) para a GFP.

Luciferases de espécies brasileiras ampliando a gama de aplicações. Os genes de luciferase de insetos utilizados até o recentemente codificavam somente luciferases que emitem luz na região verde-amarelada do espectro, limitando consideravelmente suas aplicações, desde que muitos tecidos biológicos são consideravelmente opacos nesta região. Com a clonagem da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix* e seus aliados produzidos por engenharia genética, a gama de aplicações foi ampliada, com o uso destas em células de mamíferos e em sistemas repórter múltiplos que utilizam simultaneamente várias luciferases emissores de diferentes comprimentos de onda para a análise simultânea de múltiplos eventos celulares (Nakajima et al., 2004; Viviani and Ohmiya, 2006). A luciferase de *Pyrearinus termitilluminans*, devido a sua estabilidade e cinética de emissão, também vem sendo utilizada como importante marcador bioluminescente para imageamento de células e tecidos. A luciferase do vagalume *Macrolampis*, devido ao espectro bimodal sensível ao pH, pode ser utilizada em biosensores intracelulares de mudanças de pH e outros fatores. Recentemente começamos a desenvolver biosensores

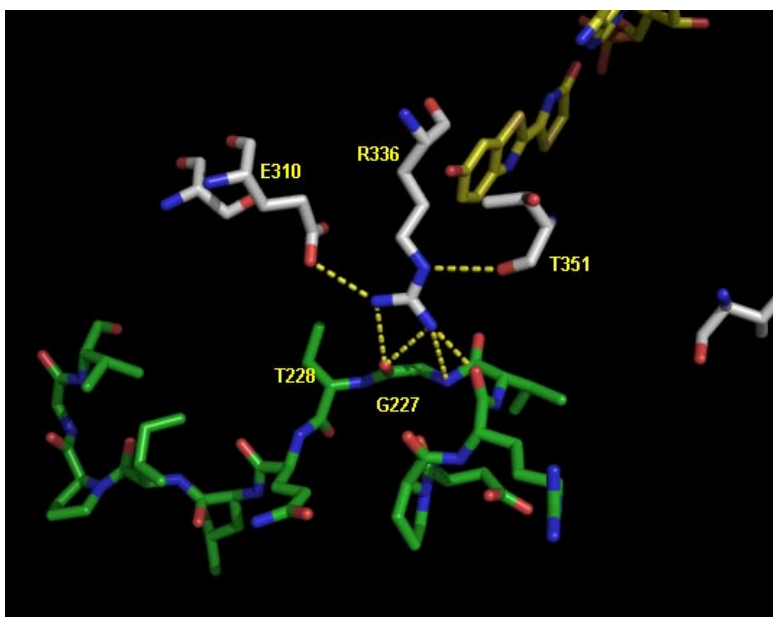


Figura 9. Rede de pontes de hidrogênio do loop entre os resíduos 223-235 e o sensor de pH em luciferase de *Phrixotrix spp* (Viviani et al., 2005)

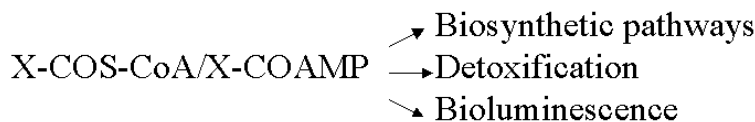


Figura 10. Reações catalizadas pelas AMP/CoA-ligasas e destino dos adenilatos e ésteres de coenzima A produzidos por estas enzimas nos organismos

bacterianos bioluminescentes para bioprospecção de drogas microbidas e agentes tóxicos. Atualmente, nosso laboratório, em cooperação com a microempresa incubada BIOLUXGEN, está desenvolvendo biosensores bioluminescentes para bioprospecção e análise de toxicidade ambiental, fazendo uso das luciferases clonadas e desenvolvidas em nosso laboratório.

Engenharia e desenvolvimento de novas luciferases. Além das novas luciferases clonadas, a engenharia destas enzimas tem amplo potencial para desenvolvimento de novas formas mais estabilizadas para uso em células de mamíferos, ou com diferentes comprimentos de onda para diferentes aplicações. A modificação do padrão de uso de códons tem sido modificado para a luciferase de *Phrixotrix*, incrementando sua expressão em células de mamíferos (Nakajima et al., 2004). Durante os

últimos anos, nosso laboratório criou um banco de luciferases com mais de 30 formas variantes, algumas das quais com propriedades espectrais desejáveis (Viviani and Ohmiya, 2006). Portanto, uma melhor compreensão sobre a relação entre estrutura e função destas luciferases é essencial para o futuro desenvolvimento de enzimas para finalidades práticas.

Agradecimentos

Este trabalho com luciferases foi financiado com recursos da FAPESP e CNPq. Aos meus colaboradores, em especial Frederico Arnoldi (UNESP), A.J. Silva Neto (UNESP), Prof. Y. Ohmiya (AIST, Osaka, Japão), J.A. Barbosa (LNLS, Campinas) que muito contribuíram para o desenvolvimento destes estudos nos últimos 5 anos. Ao laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas) por disponibilizar suas facilidades.

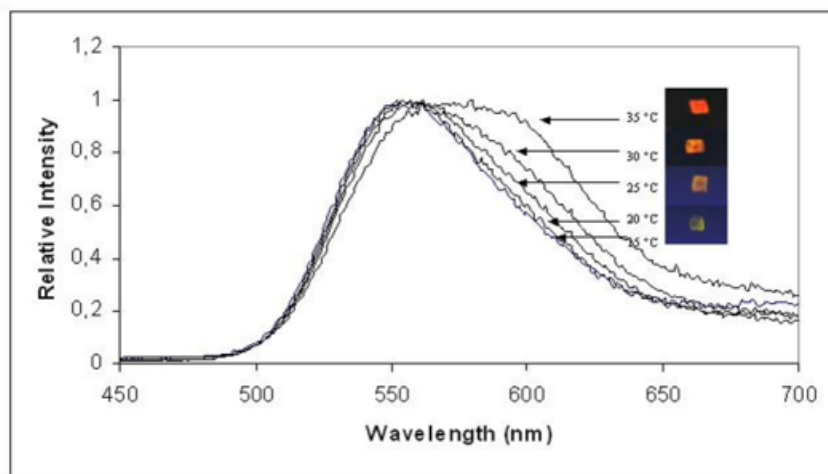


Figura 11. Efeito da temperatura nos espectro de bioluminescência de bactérias transformadas com o gene da luciferase pH-sensitiva de *Macrolampis* sp2

Referências

- Anctil, M. 1987. Neural control of luminescence. "Nervous systems in Invertebrates" (M. A. Ali ed.) pp 573-602. Plenum. New York.
- Babbitt, P. C. & G. L. Kenyon. 1992. Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: analysis of amino acid sequence identities among families of acyl:adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases. *Biochemistry* 31: 5594-5604.
- Bassot, J. M. 1974. Les cellules lumineuses de coleoptere Phengodes. *Extrait de Recherches Biologiques Contemporaines*. Imp. Vagner 4 Trim. Nancy, France.
- Bassot, J. M. 1978. Les corps noirs, cellules géantes du Diptère mycetophilide lumineux *Platyura fultoni* et leur secretion mitochondriale. *C. R. Acad. Sc. Paris* 286:623-626.
- Bechara, E. J. H. 1989. Luminescent elaterid beetles: biochemical, biological and ecological aspects. *Adv. Oxyg. Process.* 1: 123-178.
- Biggley, W. H., J. E. Lloyd and H. H. Seliger (1967) Spectral distribution of firefly light. *J. Gen. Physiol.* 50, 1681-1692.
- Bitler, B. & W.D. McElroy 1957. Preparation and properties of firefly luciferin. *Arch. Biochem. Biophys.* 72: 358-368.
- Branchini, B. R., Magyar, R. A., Marcantonio, K. M., Newberry, K. J., Stroth, J. G., Hinz, L. K. and Murtishaw, M. H. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 19359-19364.
- Branchini, B. R., R. A Magyar, M. H. Murtishaw, S. M. Anderson and M. Zimmer 1998. Site-directed mutagenesis of Histidine 245 in firefly luciferase: a proposed model of the active-site: *Biochemistry* 37: 15311-15319
- Branchini B. R., Magyar R. A., Murtishaw M. H. and Portier N. C. (2001) The role of active site residue arginine 218 in firefly bioluminescence. *Biochemistry* 40: 2410-2418.
- Branchini B. R., Murtishaw M. H., Magyar R. A. and Anderson S. M. (2000) The role of lysine 529, a conserved residue of the acyl-adenylate-forming enzyme superfamily, in firefly luciferase. *Biochemistry* 39: 5433-5440.
- 139 Branchini B. R., Murtishaw M. H., Magyar R. A., Portier N. C., Ruggiero M. C. and Stroth J. G. (2002) Yellow-green and red firefly bioluminescence from

- 5,5-dimethyloxyluciferin. *JACS* **124**: 2112-2113.
- Branchini, B. R., T. L. Southworth, R. A. Magyar, S. A. Gonzalez, M. C. Ruggiero and J. G. Stroh (2004) An alternative mechanism of bioluminescence color determination in firefly luciferase. *Biochemistry* **43**, 7255-7262.
- Buck, J. B. 1946. The anatomy and physiology of the light organs of fireflies. *Ann. New York Acad. Sci.* **49**: 397-482.
- Cadenas, E. 1985. Oxidative stress and formation of excited species. "Oxidative stress" (Helmut Sies ed.) Academic Press. New York.
- Campbell, A. K. 1988. Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine. Ellis Horwood Series, New York.
- Case, J. F. and G. Strause 1978. Neurally controlled luminescent systems. "Bioluminescence in Action" (P. J. Herring ed) pp331-366. Academic Press. New York.
- Cilento, G. & W. Adam. 1988. Photochemistry and photobiology without light. *Photochem. Photobiol.* **48**: 361-368.
- Colepiccolo N. P., C. Costa, and 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. Monseigneur and 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.
- Contag, C. H., Spilman, S. D., Contag, P. R., Oshiro M., Eames B., Dennery P., Stevenson D. H. and D. A. Benaron. 1997. Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochem. Photobiol.* **66**: 523-531.
- Contag, H. C., Contag P., Spilman S. D., Stevenson D. K. and Benaron D. A. 1996. Photonic measurement of infectious disease and gene regulation. In "OSA TOPS on Biomedical Optical spectroscopy and Diagnostics" (E. Sevick-Muraca and D. Benaron eds.) vol.3.
- Contag, P. R., Olomu, N., Stevenson D. K. and C. H. Contag. 1998. Bioluminescent indicators in living mammals. *Nature Med.* **4**: 245-247.
- Conti, E., N. P. Franks and P. Brick (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**: 287-298.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A, and Brick, P. (1997) *EMBO J.* **16**, 4174-4183.
- Costa, C. (1975) Systematics and evolution of the tribes Pyrophorini and Heligmini with description of Campyloxeninae, a new subfamily. *Papeis Avul. Zool. Sao Paulo.* **26**, 49-190.
- Costa, C., S. A. Vanin and S. A. Cesari-Chen 1988. Larvas de Coleoptera do Brasil. Museu de Zoologia (Universidade de São Paulo), São Paulo
- Costa C., S. A. Vanin, S. A. Casari and V. R. Viviani. (1999). Larvae of Neotropical Coleoptera. XXVII. *Phrixotbrix birtus* Olivier, 1909, Descriptions of immatures, adult male and larviform female, and bionomics data (Phengodini, Phengodidae, Coleoptera). *Ilberingia.* **86**: 9-28.
- Czyz A., K. Plata and G. Wegrzyn 2003. Stimulation of DNA repair as an evolutionary drive for bacterial luminescence. *Luminescence* **18**: 140-144.
- DeLuca, M. 1969. Hydrophobic nature of the active site of firefly luciferase. *Biochemistry* **8**: 160-166.
- DeLuca, M. and W. W. McElroy. 1974. Kinetics of firefly luciferase catalyzed reactions. *Biochemistry* **13**: 921-925.
- De Wet, J. R., K. V. Wood, D. R. Helinsky and M. DeLuca (1985) Cloning of firefly luciferase cDNA and expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7870-7873.
- DeWet, J. R., K. V. Wood, M. DeLuca, D. R. Helinsky and S. Subramani. 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 725-737.
- Devine, J. H., G. D. Kutuzova, V. A. Green, N. N. Ugarova and T. O Baldwin. 1993. Luciferase from the east European firefly *Luciola mingrelica* cloning and nucleotide sequence of cDNA, overexpression in *E. coli* and purification of the enzyme. *Biochem. Biophys. Acta* **1173**: 121-132.
- Etchegaray, A., R. F. Dieckmann, P. C. Engel, G. Turner and H. von Doren 1998. *Biochem. Molec. Biol. Intern.* **44**: 235-243.
- Franks N. P., Jenkins A., Conti E., Lieb W. R. and Brick P. (1998) Structural Basis for the Initiation of firefly luciferase by a general anesthetic. *Biophys. J.* **75**: 2205-2211.
- Fulton, B. B. 1941. A luminous fly larva with spider traits. *Ann. Ent. Soc. Am.* **34**: 289-302.
- Ghirandella, H. 1998. The anatomy of light production: the fine structure of the firefly lantern. Microscopic anatomy of invertebrates. **11**:363-381.
- Gatenby, J. B. 1959. Notes on the New Zeland glowworm *Bolitophila luminosa* (*Arachnocampa luminosa*). *Trans. R. Soc. N. Z.* **88**: 149-156.
- Gould, S. J., Keller G. A. and S. Subramani. 1987. Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J. Cell. Biol.* **107**: 897-905.
- Gould, S. J. and S. Subramani. 1988. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal. Biochem.* **175**: 5-13.
- Green, A. A. & W. D. McElroy 1956. Crystalline firefly luciferase. *Biochim. Biophys. Acta.* **170**-176.
- Gruber, M. G., Kutuzova, G. D. and Wood, K. V. (1996) In *Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons*. Proc. 9th International Symposium (Edited by J. W. Hastings, L. J. Kricka and P. E. Stanley), pp. 244-247. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Gulick A. M., Starai A. J., Horswill A. R., Homick K. M. And J. C. Escalante-Semerena 2003. The 1.75 Å crystal structure of acetyl CoA Synthetase Bound to Adenosine-5'-pyrophosphate and Coenzyme A. *Biochemistry* **42**: 2866-2873.
- Haneda, Y. 1955. Luminous organisms of Japan and the Far East. In "The Luminescence of Biological Systems" (F. H. Johnson ed.) pp 355-386. *Am. Ass. Adv. Science.* Washington DC.
- Hanna, C. H., T. A. Hopkins and J.

- Buck 1976. Peroxisomes of firefly luciferase. *J. Ultrastr. Res.* 57: 150-162.
- Hannah, R. R., D. R. McCaslin and K. W. Wood. 1999. Evidence for molecular aggregation of beetle luciferases. Proceedings of the 10th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. Bologna-Italy.
- Harvey, E. N. 1952. Bioluminescence. Academic Press. New York.
- Hastings, W. J. 1983. Biological diversity, chemical mechanisms and evolutionary origins of bioluminescence. *J. Mol. Evol.* 19: 309-321.
- Hastings, J. W. 1995. Bioluminescence: similar chemistries but many different evolutionary origins. *Photochem. Photobiol.* 62: 599-600.
- Herring, P. 1987. Systematic distribution of bioluminescence in living organisms. *J. Biolum. Chemilum.* 1: 147-163.
- Johnson, G. & J. S. Garvey. 1977. Improved methods for separation and purification by affinity chromatography. *J. Immunol. Methods* 15: 29-37.
- Kajiyama, N. & E. Nakano 1991. Isolation and characterization of mutants of firefly luciferase which produce different colors of light. *Prot. Engin.* 4: 691-693.
- Kajiyama, N., T. Masuda, H. Tatsumi & E. Nakano 1992. Purification and characterization of luciferases from fireflies *Luciola cruciata* and *L. lateralis*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1120: 228-232.
- Laemli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of T4 bacteriophage. *Nature* 227: 680-685.
- Lall, B. A., H. H. Seliger, W. H. Biggley & J. E. Lloyd 1980 Ecology of colors of firefly bioluminescence. *Science* 210: 560-562.
- Lall, A. B., E. J. H. Bechara, D. S. F. Ventura, J. Souza, P. Colepicolo-Neto, V. R. Viviani 1999. Spectral Tuning Between Visual Spectral Sensitivity and Bioluminescence Emission Spectrum in Click-beetle *Pyrophorus punctatissimus* (Coleoptera: Elateridae). *J. Insect. Physiol.*
- Latz, I. M., P. J. Herring and J. F. Case. 1984. Far red bioluminescence from two deep-sea fishes. *Science.* 225: 512-514.
- Lawrence, J. F. and A. F. Newton. 1995. Families and subfamilies of Coleoptera pp. 779-913 (with selected genera notes, references and data on family names). In J. Pakaluk and Stanislaw Adam Slipinsky [eds], Biology, Phylogeny and Classification of Coleoptera. Muzeum I Instytut Zoologii PAN, Wanszawa, Poland.
- Lee, J. 1976. Bioluminescence of the Australian glow-worm *Arachnocampa luminosa*. *Photochem. Photobiol.* 24: 279-285.
- Lee, J. 1989. Bioluminescence. In "The Science of Photobiology" (K. C. Smith ed.) Plenum Press. New York.
- Li Ye, L. M. Buck, H. J. Scaeffler and F. R. Leach (1997) Cloning and sequencing of a cDNA for firefly luciferase from *Photuris pennsylvanica*. *Biochim. Biophys. Acta* 1339, 39-52.
- Lloyd, J. E. 1971. Bioluminescent communication in insects. *Am. Rev. Entom.* 16: 97-122.
- Lloyd, J. E. 1978. Insect bioluminescence. In Bioluminescence in action. Academic Press. New York.
- Lloyd, J. E. 1983. Bioluminescence and communication in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 131-160.
- Lloyd, J. E. 1993. Where are the lighting bugs. *Fireflyer Companion* 1.
- Lundin, A., H. Hallander, A. Kallner, U. K. Lundin and E. Osterberg 1989. Bacteriuria testing by the ATP method as an integral part in the diagnosis and therapy of urinary tract infection (UTI). *J. Biolum. Chemilum.* 4: 381-389.
- Mamaev, S.V., Laikhter, A. L., Arslan, T. and Hecht, S.M. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7243-7244.
- McCapra, F., D. J. Gilfoyle, D. W. Young, N. J. Church & P. Spencer 1994. The chemical origin of colour differences in beetle bioluminescence. Em *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamental and Applied Aspects* (Ed. A. k. Campbell, L. J. Kricka & P. E. Stanley), pp. 387-391. John Wiley and Sons, Chichester.
- May J. J., Kessler N., Marahiel M. A and M. T. Stubbs 2002. Crystal structure of Dhbe, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 12120-12125.
- McDermott, F. A. 1964. The taxonomy of Lampyridae. *Trans. Am. Entomol. Soc.* 90: 1-72.
- McElroy, W. D., M. DeLuca & J. Travis. 1967. Molecular uniformity in biological catalysis. *Science* 157: 150-157.
- McElroy, W. D. & M. DeLuca 1978. Chemistry of firefly bioluminescence. Em *Bioluminescence in Action*. (P. Herring ed.) pp 109-127. Academic Press. New York.
- Nakajima, Y, Kimura T., Suzuki C. And Y. Ohmiya (2004) Improved expression of novel red- and green-emitting luciferases of Phrixotrix railroadworms in mammalian cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 948-951.
- Nakajima, Y., Ikeda M., Kimura T., Honma S., Ohmiya Y. And K. Honma (2004) Bidirectional role of orphan nuclear receptor ROR α in clock gene transcriptions demonstrated by a novel reporter assay system. *FEBS Lett.* 565: 122-126.
- Nakatsu, T., Ichiyama, S., Hiratake J., Saldanha, A., Kobashi N., Sakata K. and Kato H. (2006) Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature* 440: 372-376.
- Naylor L. H. (1999) Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochem. Pharm.* 58:749-757.
- Ohmiya, Y., N. 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*. *Photochem. Photobiol.* 62: 309-313.
- Ohmiya, Y., T. Hirano and M. Ohashi 1996. The structural origin of color differences in the bioluminescence of firefly luciferases. *FEBS Lett.* 384: 83-86.
- Ohmiya, Y., M. Sumiya, V. R. Viviani and N. Ohba 2000. Comparative aspects of a luciferase molecule from the Japanese luminous beetle, *Ragophthalmus ohbai*. *Sci. Report Yokosuka City Museum.* 47: 31-38.
- Orlova, G., J. D. Goddard and L. Y. Brovko (2003) Theoretical study of the amazing firefly bioluminescence: the formation and structure of the light emitters. *JACS* 125, 6962-6971.
- Redford, K. H. (1982) Prey attraction as a possible function of bioluminescence in the larvae of *Pyrearinus ter-*

- mitilluminans* (Coleoptera:Elateridae). *Revta. Bras. Zool.* **1**, 31-34.
- Rees, J. F., B. Wergifosse, O. Noiset, M. Dubuisson, B. Janssens and E. M. Tompson. 1998. The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools. *J. Exp. Biol.* **201**:1211-1221.
- Rhodes, W. C. & W. D. McElroy, 1958. The synthesis and function of luciferyl-adenylate and oxyluciferyl-adenylate. *J. Biol. Chem.* **233**: 1528-1537.
- Rice B. W., Cable M. D. and Nelson M. B. (2001) In vivo imaging of light-emitting probes. *J. Biomed. Optics* **6**: 432-440.
- Sala-Newby, G. B., C. M. Thomson and A. K. Campbell (1996) Sequence and biochemical similarities between the luciferases of the glow-worm *Lampyrus noctiluca* and the firefly *Photinus pyralis*. *Biochem. J.* **313**, 761-767.
- Sala-Newby G. B., Kendall J. M., Jones H. E., Taylor K. M., Badminton M. N., Llewellyn D. H. and Campbell A. K. (1999) Bioluminescent and chemiluminescent indicators for molecular signalling and function in living cells. In: Fluorescent and luminescent probes for biological activity, Watson W.T. (ed), pp 251-271, Academic Press, London.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis 1989. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor.
- Sandalova T. P. and Ugarova N. N. (1999) Model of the active site of firefly luciferase. *Biochemistry (Moscow)* **64**:962-967.
- Seliger, H. H. & W. D. McElroy. 1964. The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species-specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**: 75-81.
- Seliger, H. H. & W. D. McElroy 1965. Bioluminescence-Enzyme catalyzed chemiluminescence. Em *Light: Physical and Biological Action*. (H. H. Seliger & W. D. McElroy ed.) pp 169-198. Academic Press. New York.
- Seliger, H.H. 1975. The origin of bioluminescence. *Photochem. Photobiol.* **21**: 355-361.
- Scholten, J. D., K. H. Chang, P. C. Babbitt, H. Charest, M. Sylvestre & D. D. Mariano. 1991. Novel enzymic hydrolytic dehalogenation of a chlorinated aromatic. *Science* **253**. 182-185.
- Schroeder, S. 1989. Protein sequence homology between plant-4-coumarate:CoA ligase and firefly luciferase. *Nucl. Acid Res.* **17**: 460.
- Shimomura, O. F. H. Johnson and Y. Haneda. 1966. Observations on the biochemistry of luminescence in the New Zeland glowworm *Arachnocampa luminosa*. "Bioluminescence in Progress" (F. H. Johnson and Y. Haneda eds.). Princeton-NJ.
- Sivinsky, J. 1981. The nature and possible functions of luminescence in Coleoptera larvae. *Coleopt. Bull.* **35**: 167-179.
- Stanley, P. E. 1989. A review of the bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology. *J. Biolum. Chemilum.* **4**: 375-380.
- Strause, L. G. and M. DeLuca. 1981. Characteristics of luciferases from a variety of firefly species: Evidence for the presence of luciferase isozymes. *Insect Biochem.* **11**: 417-422.
- Sumiya, M., V. R. Viviani, N. Ohba and Y. Ohmiya (1999) Cloning and expression of a luciferase from the japanese luminous beetle *Ragophthalmus obbai*. Proceedings of the 10th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. Bologna-Italy
- Suzuki, H., Y. Kawarabashi, J. Kondo, T. Abe, K. Nishikawa, S. Kimura, T. Hashimoto & 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 and E. Nakano. 1989. Luciferase cDNA from japanese firefly *Luciola cruciata*: cloning, structure and expression in *E. coli*. *J. Biolum. Chemilum.* **3**: 75-78.
- Tatsumi, H. N. Kajiyama & E. Nakano 1992. Molecular cloning and expression in *E. coli* of a cDNA encoding luciferase of a firefly *Luciola lateralis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1131**: 161-165.
- Tautoriainen, S., M. Virta, W. Chang and M. Karpi 1999. Measurement of firefly luciferase reporter gene activity from cells and lysates using *Escherichia coli* arsenite and mercury sensors. *Anal. Biochem.* **272**: 191-198.
- Tiemann, D. 1970. Nature's toy train, the railroad worm. *Natl. Geogr.* **56**-67.
- Timmins G. S., Robb F. J., Wilmot C. M., Jackson S. K. and Swartz H. M. (2000) Firefly flashing is controlled by gating oxygen to light-emitting cells. *J. Exp. Biol.* **204**: 2795-2801.
- Trimmer B. A., Aprille J. R., Dudzinski D. M., Lagace C. J., Lewis S. M., Michel T., Qazi S. and Zayas R. M. (2001) Nitric oxide and the control of firefly flashing. *Science* **292**: 2486-2488.
- Toh, H. 1990. N-terminal halves of gramicidin S synthetase and tyrocidine synthetase 1 as novel members of firefly luciferase family. *Prot. Seq. Data Anal.* **3**: 517-521.
- Towbin, H. T., T. Staehelin & J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets-procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- Trimmer B. A., Aprille J. R., Dudzinski D. M., Lagace C. J., Lewis S. M., Michel T., Qazi S. and Zayas R. M. (2001) Nitric oxide and the control of firefly flashing. *Science* **292**: 2486-2488.
- Ueda, H., H. Yamanouchi, A. Kitayama, K. Inoue, T. Hirano, E. Suzuki, T. Nagamune and Y. Ohmiya (1996) His-433 as a key residue for the color difference in firefly luciferase *Hotaria parvula*. In *Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons*. Proc. 9th International Symposium (Edited by J. W. Hastings, L. J. Kricka and P. E. Stanley), pp. 216-219. John Wiley & Sons, Chichester, UK
- Ugarova, N. N. and T. P. Sandalova. 1999. Firefly luciferase: from the structure to the functions. Proceedings of the 10th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. Bologna-Italy.
- Ugarova N. N. And L. Y. Brovko 2002. Protein structure and bioluminescence spectra for firefly bioluminescence. *Lu-minescence* **17**: 321-330.
- Ugarova, N. N., Maloshenok, L. G., Uporow, I. V. and Kosharov, M. I. (2005) Bioluminescence spectra of native and mutant firefly luciferases as a function of pH. *Biochemistry (Moscow)* **70**: 1262-1267.
- Viviani, V. (1989) Descrição dos estágios imaturos e dados biológicos de *Aspisoma* sp (Coleoptera: Lampyridae).

- Rev. Bras. Entom. 33: 359-366.
- Viviani, V. and E. J. H. Bechara. 1993. Biophysical and biochemical aspects of phengodid bioluminescence. *Photochem. Photobiol.* 58: 615-622.
- Viviani, V. R. and 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. *Photochem. Photobiol.* 62: 490-495.
- Viviani, V. and E. J. H. Bechara (1996). Larval *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) fat body extracts catalyze D-luciferin and ATP-dependent chemiluminescence. A luciferase-like enzyme. *Photochem. Photobiol.* 63: 713-718.
- Viviani, V. R. and E. J. H. Bechara (1997). Bioluminescence and biological aspects of Brazilian railroadworms (Coleoptera: Phengodidae). *Ann. Am. Soc. Entom.* 90 (3): 389-393.
- Viviani, V. R., E. J. H. Bechara and Y. Ohmiya. 1999a. Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worm luciferases: Relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38: 8271-8279.
- Viviani, V. R., G. O. Perez, A. C. R. Silva, E. J. H. Bechara and F. R. Reinach (1999)b. Molecular Cloning and Characterization of cDNA for Larval *Pyrearinus termitilluminans* luciferase. *Photochem. Photobiol.* 70: 254-260.
- Viviani V. R. and Ohmiya Y. (2000) Bioluminescence color determinants of Phrixothrix railroadworm luciferases: chimeric luciferases, site-directed mutagenesis of Arg215 and guanidine effect. *Photochem. Photobiol.* 72: 267-271.
- Viviani V. R., Uchida A., Suenaga N., Ryufuku M. and Ohmiya Y. (2001) T226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 280:1286-1291.
- Viviani V. R. (2001) Fireflies (Coleoptera: Lampyridae) from Southeastern Brazil: Habitats, Life History, and bioluminescence. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 129-145.
- Viviani V. R., Hastings J. W. and T. Wilson (2002) Two bioluminescent Diptera: the North American *Orfelia fultoni* and the Australian *Arachnocampa fla-*
- va*. Similar niche, different bioluminescent systems. *Photochem. Photobiol.* 75: 22-27.
- Viviani V. R., Uchida A., Viviani W. And Ohmiya Y. (2002) The structural determination of bioluminescence colors in railroad worm and other pH-insensitive luciferases. XII International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. (Cambridge, UK).
- Viviani V. R., Uchida A., Viviani W. And Ohmiya Y. (2002) The structural role and interactions of Ala 243(G247), R215 and T226(N230) on bioluminescence spectra and pH-sensitivity determination in railroad worm, click beetle and firefly luciferases. *Photochem. Photobiol.* 75: 538-544.
- Viviani V. R. 2002. The origin, diversity and structure function relationships in insect luciferases. *CMLS.* 59: 1833-1850.
- Viviani, V. R., Ohelmeyer T. L., Arnoldi G. C. And M. R. Brochetto-Braga (2005) A new firefly luciferase with bimodal spectrum: structural determinants of spectral sensitivity in firefly luciferases. *Photochem. Photobiol.* (in press).
- Viviani, V. R., Arnoldi F. C., Brochetto-Braga, M. R. and Y. Ohmiya (2004) Cloning and characterization of the cDNA for the Brazilian *Cratomorphus distinctus* larval firefly luciferase: Similarities with the European *Lampyrus noctiluca* and Asiatic *Pyrocoelia* luciferases. *Comp. Biochem. Physiol.*, 139: 151-156.
- Viviani, V. R., Silva-Neto, A. J. and Y. Ohmiya (2004) The influence of the region between residues 220-344 and beyond on Phrixothrix railroadworm luciferases green and red bioluminescence. *Prot. Engineer. Design and Selection* 17: 113-117.
- Viviani V. R. and 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* (in press)
- Wannalund, J., M. DeLuca, K. Stempel & P. D. Boyer 1978. Use of ¹⁴C-carboxyl-luciferin in determining the mechanism of the firefly luciferase catalyzed reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81: 987-992.
- White, E. H., E. Rapaport, T. A. Hopkins and H. H. Seliger. 1969. Chemi- and bioluminescence of firefly luciferin. *J. Am. Chem. Soc.* 91: 2178-2180.
- White, E. H. and B. Branchini. 1975. Modification of firefly luciferase with a luciferin analog. A red light producing enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* 97: 1243-1245.
- White, E. H. and D. F. Roswell. 1991. Analogs and derivatives of firefly oxyluciferin, the light emitter in firefly bioluminescence. *Photochem. Photobiol.* 53: 131-136.
- White, E. H., F. McCapra, G. Field & W. D. McElroy. 1961 The structure and synthesis of firefly luciferin. *J. Am. Chem. Soc.* 83: 2402-2403.
- Wienhausen, G. & M. DeLuca. 1985. Luciferases from different species of fireflies are antigenically similar. *Photochem. Photobiol.* 42: 609-611.
- Wilson, T. 1995. Comments on the mechanisms of chemi- and bioluminescence. *Photochem. Photobiol.* 62:601-606.
- Wilson, T. and J. W. Hastings. 1998. Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 197-230.
- Wittmer, 1976. Arbeiten zu einer revision der familie Phengodidae. *Ent. Amb. Mus. Georg. Frey.* 27: 415-524.
- Wood, K. V., Y. A. Lam, H. H. Seliger and W. D. McElroy. 1989. Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors. *Science.* 244: 700-702.
- Wood, K. W. 1990. Luc genes: introduction of colour into bioluminescence assays. *J. Biolum. Chemilum.* 5: 107-114.
- Wood, K. W. 1993. Evolution of bioluminescence in insects. Proceedings of the VII International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (A. A. Szalay, L. J. Kricka and P. Stanley eds.). J. Wiley & Sons. New York.
- Wood, K. V. 1995. The Chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence. *Photochem. Photobiol.* 62: 662-673.
- Zako T., Ayabe K., Aburatani T., Kamiya N., Kitayama A., Ueda H. and Nagamune T. (2003) Luminescence and substrate binding activities of firefly luciferase N-terminal domain. *Biochem. Biophys. Acta* 1649, 183-189.
- Zompro O. and Fritzsche I. (1999) *Lucihormetica fenestrata* n.gen., n.sp., the first record of luminescence in an orthopteric insect (Dyctyoptera:Blaberidae: Blaberinae: Brachyolini). *Amazoniana* 15: 211-219.