

## DIVULGAÇÃO

### VAGALUMES: DA QUÍMICA À BIOTECNOLOGIA

Etelvino J. H. Bechara

Instituto de Química - USP - Cx.P. 20780 - 01498-970 - São Paulo - SP

Recebido em 31/8/93; cópia revisada em 12/1/94

This article shortly presents a broad view of coleoptera bioluminescence, emphasizing recent advances on the luciferase structure, the factors governing the emission color and luciferase applications in bioengineering.

**Keywords:** bioluminescence, firefly, Lampyridae, Elateridae, Phengodidae, luciferase cloning, luciferin.

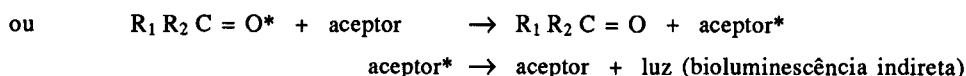
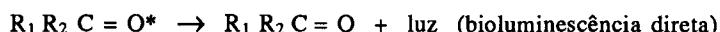
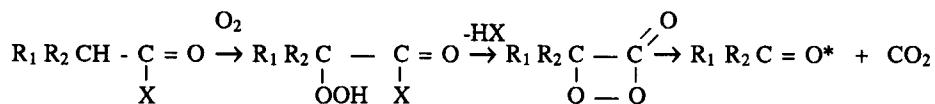
A bioluminescência - emissão de luz fria, visível, por bactérias, fungos, algas e animais - é um fenômeno mais frequente no ambiente marinho<sup>1,2</sup>. No reino animal, são conhecidas espécies bioluminescentes nos filos Cnidaria (hidrozoários, sifozoários e antozoários), Ctenophora, Mollusca (gastropodes, bivalves e cefalópodes), Annelida (poliquetos e oligoquetos), Arthropoda (insetos, crustáceos e miríapodes), Echinodermata (crinóides, holotúrias, asteróides e ophiuros) e Chordata (urocordados e peixes); não são conhecidas plantas, nem anfíbios, répteis, aves ou mamíferos bioluminescentes. Em geral, a bioluminescência atende a funções de predação, camuflagem, atração e corte sexual e agrupamento.

Quimicamente, a bioluminescência se explica pela oxidação de um substrato (luciferina) por oxigênio molecular ou peróxido de hidrogênio, catalisada por uma enzima (luciferase), dando um produto (oxiluciferina) no estado eletronicamente excitado, o qual é desativado pela emissão de luz<sup>2,3</sup>. A luz, portanto, resulta da conversão de energia química em fótons. Na maioria dos organismos luminescentes, a emissão luminosa origina-se diretamente da oxiluciferina no estado excitado singlete (estado fluorescente); em outros casos (ex., o celenterado *Aequorea*) o produto excitado transfere a energia eletrônica para um acceptor fluorescente, que em seguida emite luz (bioluminescência indireta). O rendimento quântico da bioluminescência ( $n^o$  de fótons emitidos/ $n^o$  de moléculas de substrato consumidas) é relativamente alto: 10% em bactérias a 90% nos vagalumes. A grande diversidade química das luciferinas (mais de trinta) nos organismos bioluminescentes sugere que, na ausência de ancestral molecular comum, o fenômeno surgiu de forma descontínua durante a evolução<sup>3</sup>. Na maioria dos casos, entretanto, a luciferina tem uma particularidade estrutural comum: a presença de um átomo de hidrogênio em posição alfa a uma carbonila. Este grupo alfa-metílico sofre inserção de  $O_2$  produzindo, consecutivamente, um alfa-hidoperóxido e um intermediário dioxetânico, cuja termólise dá a oxiluciferina

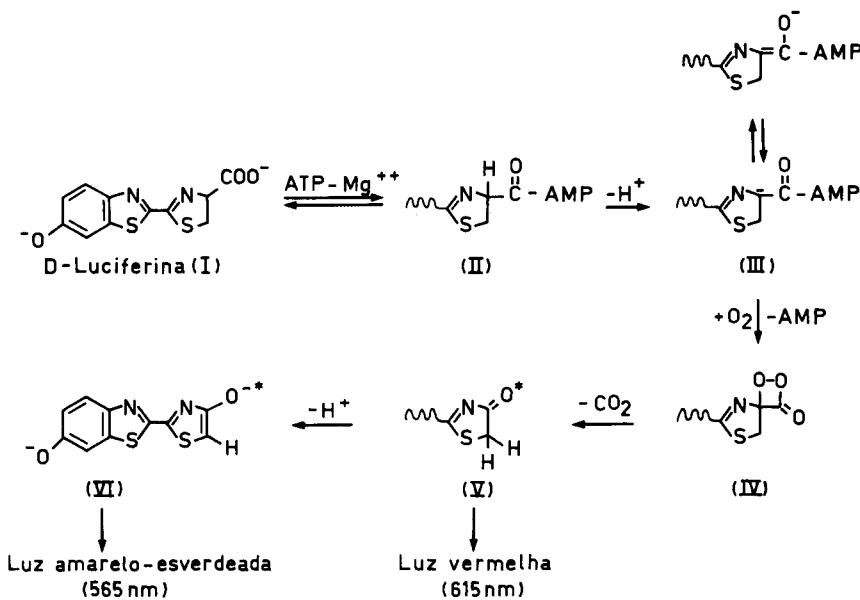
eletronicamente excitada ( $R_1R_2C=O^*$  no Esquema 1).

Na superfície terrestre, os insetos constituem o grupo mais numeroso em espécies luminescentes. É sabido que neles a emissão luminosa é controlada neurologicamente: os fotóferos, com fotócitos ricos em mitocôndrias (fonte de ATP), têm muitos terminais de nervos e traqueolas, que controlam a entrada de oxigênio<sup>1,2</sup>. Na fase larval, a luz pode servir para a predação e defesa e quando adultos, para atração e corte sexual<sup>5,6</sup>. A ordem Coleoptera contém as famílias mais abundantes de insetos luminescentes: Lampyridae (vagalumes, lucernas ou pirlampões; "fireflies"), Elateridae (tec-tecs ou tucos; "click-beetles") e Phengodidae (trenzinhos ou bondinhos; "railroad worms"). Os primeiros são os mais numerosos (dois milhares de espécies já identificadas) e habitam regiões temperadas e tropicais. A segunda família, menos numerosa (cerca de três centenas luminescentes), ocorre principalmente nos tropicais e a terceira, mais rara (menos de duas centenas), encontrada nas Américas (20% no Brasil, segundo Zaragoza<sup>7</sup>). Recentemente, nosso grupo descobriu, perto do Parque Nacional das Emas (GO), uma espécie nova de fengodídeo, denominada por Wittmer<sup>8</sup> de *Phrixothrix vivianii*; duas outras espécies estão sendo descritas: *Euryopa laurae* e *E. clarindae*. Uma espécie luminescente da família Staphylinidae, tida até então como não-luminescente, também foi descoberta por membros de nosso grupo<sup>9</sup>.

A luciferina de *Photinus pyralis* (Lampyridae), isolada, identificada e sintetizada por White et al.<sup>10</sup>, é a mesma em todas as famílias apesar de as cores da bioluminescência serem tão variadas, do verde (548 nm em *Photuris* sp., Lampyridae)<sup>11</sup> ao vermelho (620 nm no *Phrixothrix vivianii*, Phengodidae)<sup>12</sup>. Tem natureza benzotiazólica e é biosintetizada a partir de cisteína<sup>13</sup>. A luciferase, uma lipoproteína peroxisomal de PM ~100 kDa<sup>14</sup>, tem duas subunidades: a catalítica tem PM ~ 62 kDa e um centro ativo para luciferina e ATP e a outra, um sítio alostérico para ATP. A reação que catalisa está mostrada no Esquema 2.



Esquema 1



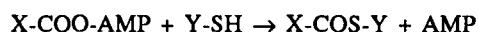
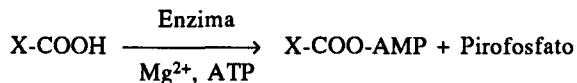
Esquema 2

Vê-se que a luciferase exibe duas atividades: a de transferase (ou ligase), catalisando a adenilação da luciferina às custas de ATP (etapa I → II), e a de dioxigenase, presidindo a inserção da molécula de oxigênio no carbânion da luciferina III. Preparado o intermediário dioxetanônico IV<sup>15</sup>, ele rapidamente se cliva (energia de ativação < 15 kcal/mol) por um mecanismo iniciado por transferência de elétron do grupo fenolato para o anel dioxetanônico (mecanismo CIEEL)<sup>16</sup> e produz a oxiluciferina excitada na forma lactâmica V. Estudos com luciferinas-modelo mostraram que esta espécie emite luz vermelha<sup>17</sup>, mas a proximidade de grupos básicos de amino ácidos no sítio ativo<sup>18</sup> pode promover abstração do próton do carbono-4 (favorecendo enolização) mais rápida que a desativação fluorescente da oxiluciferina V excitada, formando o enolato excitado VI, o qual emite na região do verde-amarelado. Cálculos por MNDO confirmaram que, de fato, a forma enólica da oxiluciferina deve ser o emissor de luz verde-amarelada<sup>19</sup>.

A clonagem do cDNA de luciferases de lampirídeos<sup>20</sup> e elaterídeos<sup>21</sup> e o sequenciamento de luciferases nativas e mutantes<sup>22</sup> revelaram fatos muitíssimo interessantes:

(1) Tal como previsto pela alta similaridade antigênica das luciferases de *P. pyralis* no estágio larval (emissão verde) e adulto (emissão alaranjada) e das lanternas toráxicas (emissão verde) e abdominal (emissão alaranjada) do elaterídeo adulto *Pyrophorus plagiophthalmus*, testadas com anticorpos da luciferase de *P. pyralis* adulto<sup>23</sup>, existe um alto grau de homologia entre todas elas: 48% entre as luciferases de lampirídeo e elaterídeo e 95 a 99% entre as luciferases do elaterídeo<sup>21</sup>. As luciferases de *P. pyralis* (norte-americana) e de outro lampirídeo, *Luciola cruciata* (japonesa) são 67% idênticas<sup>24</sup>.

(2) O isolamento e caracterização de luciferases mutantes de *Luciola cruciata* (Lampyridae), obtidas com hidroxilamina, mostrou que substituição pontual de certos amino ácidos pode alterar a cor da emissão de bioluminescência, do verde ao vermelho<sup>22</sup>. Assim, a cor verde-amarelada (562 nm) da luz emitida pela luciferase nativa é deslocada para o verde (558 nm) quando Val<sub>239</sub>→Ile, amarelo-alaranjado se Pro<sub>452</sub>→Ser, laranja se Ser<sub>286</sub>→Asn e vermelho se Gly<sub>326</sub>→Ser ou His<sub>433</sub>→Tyr.



Esquema 3

Com o abaixamento do pH de 7,8 para 6,0, o pico da emissão é deslocado para o vermelho no segundo e terceiro casos, tal como verificado para a luciferase de *P. pyralis*, mas não se altera nos outros. Isto indica que além da presença de um resíduo básico no sítio ativo para eliciar emissão verde-amarelada<sup>17</sup>, mudanças conformacionais e alterações sutis de polaridade no microambiente, onde nasce a oxiluciferina excitada, são fatores determinantes da cor.

(3) O alto grau de homologia entre a luciferase de *P. pyralis*, a ácido 4-cumárico: CoA ligase de plantas (34%)<sup>25</sup> e gramicidina S sintetase e tiocidina sintetase de bacilos<sup>26</sup>, examinado à luz das reações similares que catalisam - adenilação do substrato por ATP seguida da formação de um tioéster (Esquema 3), sugere que uma proteína ancestral das quatro enzimas já existia antes da divergência entre eucariotos e procariotos.

(4) O tripeptídeo Ser-Lys-Leu no terminal-C, invariante em todas as luciferases, funciona como um sinal para sua captação pós-síntese pelas peroxisomas<sup>27</sup>. Esta informação foi utilizada para, através de vetores do gene de luciferase (*luc*) de *P. pyralis* e fusão gênica, direcioná-la para peroxisomas de células de mamíferos<sup>28</sup>, mitocôndrias de leveduras<sup>29</sup>, ou mantê-la no citosol de folhas de tabaco<sup>30</sup>. No último caso, a expressão do gene da luciferase de vagalume nas folhas do tabaco transgênico, seguida de um banho com solução ligeiramente ácida de luciferina (para aumentar sua captação pelas células), tornou-as brilhantes como o vagalume.

(5) A luciferase do *P. pyralis* mostrou-se muito vantajosa como "reporter" de eventos genéticos em biologia molecular básica e bioengenharia em virtude de suas propriedades<sup>31</sup>: (i)

a unidade catalítica tem apenas uma cadeia polipeptídica que não requer modificações pós-traducionais para atividade, (ii) o ensaio de sua atividade é extremamente sensível (detecta ATP ao nível de femtomoles), 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> mais que o ensaio pela CAT ("chlorophenicol acetyltransferase"), (iii) reação rápida e substrato simples, (iv) a expressão do gene pode ser seguida sem romper as células ou tecido e (v) o uso de luciferases mutantes, que eliciam cores diferentes, possibilitaria a monitoração simultânea da expressão de proteínas diferentes.

A modificação covalente da luciferase de vagalume com um peptídeo contendo serina ("kemptide", LeuArg<sub>2</sub>AlaSerLeuGly) tornou a nova enzima passível de fosforilação por uma proteína quinase dependente de cAMP<sup>32</sup>. Esta enzima modificada, quando fosforilada, catalisa emissão de cor diferente e, por isso, é denominada uma "rainbow protein". Estes resultados abrem a perspectiva de, usando-se estas proteínas bioluminescentes modificadas quimicamente ou por engenharia genética, monitorar fosforilação de proteínas e consequentes alterações metabólicas *in vivo*.

Concluindo, a história científica da bioluminescência de insetos revela intenso trabalho de catalogação de espectros de bioluminescência das espécies conhecidas e caracterização físico-química do sistema lucifera/luciferase de lampirídeos nas décadas dos cinquenta e sessenta<sup>1</sup>; elucidação do mecanismo de quimioexcitação eletrônica, imobilização da luciferase e usos analíticos da bioluminescência nos setenta<sup>3,33</sup> e desenvolvimento da biologia molecular do gene das luciferases de lampirídeos e elaterídeos e seu uso como reporter de expressão proteica nos oitenta e noventa<sup>31</sup>. A extensa bibliografia sobre a bioluminescência de insetos, entretanto, praticamente se restringiu a algumas espécies adultas de três gêneros da família dos lampirídeos, *Photinus*, *Luciola* e *Photuris*, abundantes no hemisfério norte. Em virtude da alta diversidade de insetos luminescentes no Brasil e relativa facilidade de coleta e criação dos insetos em laboratório, com a colaboração da Dra. Cleide Costa (Museu de Zoologia da USP), nosso grupo logrou estudar nos últimos 15 anos vários aspectos bioquímicos de cerca de 13 espécies de elaterídeos (duas tribos, 5 gêneros)<sup>6</sup>, 11 espécies de fengodídeos (duas tribos, seis gêneros)<sup>12</sup> e 24 espécies de lampirídeos (9 gêneros) (submetido). Na década dos oitenta, estudamos o sistema lucifera/luciferase de elaterídeos<sup>13,34</sup>, a digestão extra-corpórea em sua fase larval<sup>35,36</sup>, o metabolismo aeróbico de larvas do elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans*<sup>37</sup> e o inquilinismo destas larvas com cupins nos cerrados do Brasil Central<sup>6</sup>. Junto com (i) as cavernas de Waitomo (Nova Zelândia), iluminadas por larvas do Diptera *Arachnocampa luminosa* distribuídas em teias construídas no teto, (ii) os cardumes do peixe-lanterna *Photoblepharon* no Mar Vermelho, cuja bioluminescência é devida a bactérias luminescentes simbiontes e (iii) a "baía fosforescente" de San Juan de Porto Rico, com altíssima densidade de dinoflagelados luminescentes<sup>1,3</sup>, os campos de cupinzeiros luminosos (com *P. termitilluminans*) do Parque Nacional das Emas (GO) e município de Costa Rica (MS) constituem os fenômenos mais grandiosos da bioluminescência. Atualmente, o grupo continua o estudo do metabolismo aeróbico das larvas de *P. termitilluminans* e dos espectros de bioluminescência *in vivo* e *in vitro* de fengodídeos e inicia a clonagem da luciferase destes últimos.

As tendências atuais de pesquisa sobre bioluminescência de insetos foram reveladas por uma busca bibliográfica no banco de dados do Chemical Abstract, realizada em junho de 1993 e cobrindo os últimos cinco anos. Os 74 trabalhos publicados sobre (lucifera + luciferase) versus (Lampyridae + Elateridae + Phengodidae) estão distribuídos entre os seguintes temas gerais: propriedades físico-químicas de luciferases (26 publicações), aplicações analíticas da bioluminescência de vagalumes, principalmente, na indústria de alimentos, medicamentos e higiene industrial e hospitalar (25 publicações; veja,

por exemplo, Stannard e Gibbs<sup>38</sup>, Kricka<sup>39</sup>, Stanley<sup>40</sup>) e biologia molecular da luciferase, (20 publicações), incluindo clonagem, sequenciamento e expressão em vírus<sup>41,42</sup>, bactérias<sup>20,26</sup>, animais<sup>43-45</sup> e plantas<sup>30</sup>.

## AGRADECIMENTOS

Nossos projetos de pesquisa sobre insetos luminescentes têm sido financiados pela FAPESP (São Paulo), CNPq (Brasília), Sub-programa de Química e Engenharia Química do PADCT (FINEP, Rio de Janeiro), Fundação Volkswagen (Hannover, Alemanha) e GTZ (Eschborn, Alemanha). O Dr. Pio Colepicolo Neto (Instituto de Química da USP) e o doutorando Vadim Viviani, bolsista da FAPESP, são responsáveis pela produção da quase totalidade de nossos dados sobre elaterídeos e fengodídeos, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

- Herring, P., Ed.; Bioluminescence in Action; Academic Press: New York, 1978.
- Hastings, J. W.; Morin, J. G.; In Neural and Integrative Animal Physiology; C. L. Prosser, Ed.; Wiley-Liss Inc.: New York, 1991; 131.
- Campbell, A. K.; Chemiluminescence ; VCH Publishers: New York, 1988.
- Hastings, J. W.; *J. Molec. Evol.* (1983), **19**, 309.
- Lall, A. B.; Seliger, H. H.; Biggley, W. H.; Lloyd, J. E.; *Science* (1980), **210**, 560.
- Bechara, E. J. H.; In Advances in Oxygenated Processes; A.L. Baumstark, Ed.; Vol. 1; JAI Press Inc.: London, 1988; 123.
- Zaragoza, S. C.; *An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México Ser. Zool.* (1984), **55**, 307.
- Wittmer, W.; *Mitt. Entom. Gesellschaft Basel* (1993), **42**, 130.
- Costa, C.; Vanin, S. A.; Colepicolo Neto, P.; *Revta Bras. Ent.* (1986), **30**, 101.
- White, E. H.; McCapra, F.; Field, G. F.; *J. Am. Chem. Soc.* (1963), **85**, 337.
- Biggley, W. H.; Lloyd, J. E.; Seliger, H. H.; *J. Gen. Physiol.* (1967), **50**, 1681.
- Viviani, V. R.; Bechara, E. J. H.; *Photochem. Photobiol.* (1994), **58**, 615.
- Colepicolo Neto, P.; Pagni, D.; Bechara, E. J. H.; *Comp. Biochem. Physiol.* (1988), **91**, 143.
- Ugarova, N. N.; Dulhovich, A. F.; Shvets, S. V.; Philippova, N. Y.; Berezin, I. V.; *Biochim. Biophys. Acta* (1987), **921**, 465.
- Shimomura, O.; Goto, T.; Johnson, F. H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1977), **74**, 2799.
- Koo, J. -K.; Schmidt, S. P.; Schuster, G. B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1978), **75**, 30.
- White, E. H.; Roswell, D.F.; *Photochem. Photobiol.* (1991), **53**, 131.
- White, E. H.; Branchini, B. R.; *J. Am. Chem. Soc.* (1975), **97**, 1243.
- Fukushima, K.; *J. Mol. Struc. (Theochem)* (1991), **235**, 11.
- De Wet, J. R.; Wood, K. V.; Helinski, D. R.; DeLuca, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985), **82**, 7870.
- Wood, K. V.; Lam, Y. A.; Seliger, H. H.; McElroy, W. D.; *Science* (1989), **244**, 700.
- Kajiyama, N.; Nakano, E.; *Protein Eng.* (1991), **4**, 691.
- Wienhausen, G.; DeLuca, M.; *Photochem. Photobiol.* (1985), **42**, 609.
- Tatsumi, H.; Masuda, T.; Kajiyama, N.; Nakano, E.; *J. Biolum. Chemilum.* (1989), **3**, 75.
- Schröder, J.; *Nucl. Acids Res.* (1989), **17**, 460.
- Toh, H.; *Protein Seq. Data Anal.* (1990), **3**, 517.

27. Gould, S. J.; Subramani, S.; *Anal. Biochem.* (1988), **175**, 5.
28. Keller, G., A; Gould, S.; DeLuca, M.; Subramani, S.; *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1987), **84**, 3264.
29. Aflalo, C.; *Biochemistry* (1990), **29**, 4758.
30. Barnes, W. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1990), **87**, 9183.
31. Wood, K. V. *J. Biolum. Chemilum.* (1990), **5**, 107.
32. Jenkins, T. M.; Sala-Newby, G.; Campbell, A. K.; *Biochem. Soc. Trans.* (1990), **18**, 463.
33. DeLuca, M., Ed.; Bioluminescence and Chemiluminescence. Methods in Enzymol. Vol. LXVII; Academic Press: New York, 1978.
34. Colepicolo Neto, P.; Costa, C.; Bechara, E. J. H.; *Insect Biochem.* (1986), **16**, 803.
35. Colepicolo Neto, P.; Bechara, E. J. H.; Ferreira, C.; Terra, W. R.; *Insect Biochem.* (1986), **16**, 811.
36. Colepicolo Neto, P.; Bechara, E. J. H.; Ferreira, C.; Terra, W. R.; *Comp. Biochem. Physiol.* (1987), **87B**, 755.
37. Colepicolo Neto, P.; Bechara, E. J. H.; Costa, C.; *Insect Biochem.* (1986), **16**, 381.
38. Stannard, C. J.; Gibbs, P. A.; *J. Biolum. Chemilum.* (1986), **1**, 3.
39. Kricka, L. J.; *Anal. Biochem.* (1988), **175**, 14.
40. Stanley, P.; *J. Biolum. Chemilum.* (1992), **7**, 255.
41. Rodriguez, J. F.; Rodriguez, D.; Rodriguez, J. -R.; McGowan, E. B.; Esteban, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988), **85**, 1667.
42. Reil, H.; Hauser, H.; *Biochim. Biophys. Acta* (1990), **1050**, 288.
43. De Wet, J. R.; Wood, K. V.; DeLuca, M.; Helinski, D. R.; Subramani, S.; *Mol. Cell. Biol.* (1987), **7**, 725.
44. Jha, P. K.; Nakhai, B.; Sridhar, P.; Talwar, G. P.; Hasnain, S. E.; *FEBS Lett.* (1990), **274**, 23.
45. Sala-Newby, G.; Campbell, A. K.; *FEBS Lett.* (1992), **307**, 241.

Publicação Financiada pela FAPESP