TATIANA ARAUJO PEREIRA

**Purificação e Caracterização de enzimas
envolvidas na bioluminescência de fungos**

(Versão Corrigida da Tese)

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutora em Química.*

Orientador: Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

P436p Pereira, Tatiana Araujo
 Purificação e Caracterização de enzimas envolvidas
 na bioluminescência de fungos / Tatiana Araujo
 Pereira. - São Paulo, 2018.
 99 p. + noventa e nove

Tese (doutorado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.
Orientador: Stevani, Cassius Vinicius

1. Bioluminescência. 2. Bioluminescência de
fungos. 3. Luciferases. 4. Luciferase de fungos. 5.
Luciferina. I. T. II. Stevani, Cassius Vinicius,
orientador.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani e meus colegas de grupo, que me deram suporte para a execução do projeto.
- Àqueles que possibilitaram o acesso aos corpos de frutificação das espécies coletadas e estudadas: a equipe de pesquisadores da Reserva do Betary – Instituto de Pesquisa da Biodiversidade (IPBio), no município de Iporanga (SP); e ao Dr. Ismael Dantas, na região da Mata dos Cocais (PI).
- Ao Grupo de Pesquisas em Química Verde e Ambiental, que me acolheu como aluna mais de uma vez ao longo da minha vida acadêmica.
- Ao Laboratório de Quimiluminescência Orgânica, coordenado pelo Professor Josef Wilhem Badder, que disponibilizou espaço e equipamentos para os ensaios quimiluminescentes nos estágios iniciais da pesquisa.
- Aos professores Walter Terra e Clélia Ferreira, pela disponibilização do sistema para Fast Protein Liquid Chromathography (FPLC), para purificação das enzimas.
- Aos professores Frederico José Gueiros Filho e Aline Maria da Silva, por possibilitarem o uso das ultracentrífugas.
- Ao Dr. Felipe Augusto Dörr do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao aluno de mestrado do GPQVA Gabriel Martins, pelas análises por espectrometria de massas.
- Ao aluno de doutorado Marcílio Martins de Moraes – do grupo de pesquisa do Laboratório de Química de Produtos Naturais, no IQUSP – e à aluna de mestrado Patrícia Dias Santos – do grupo de pesquisas da Professora

Patrícia Sartorelli, no Departamento de Ciências Exatas e da Terra (UNIFESP-Diadema).

- Ao Professor Erick L. Bastos, do Instituto de Química da USP, pelas análises de voltametria cíclica e DFT, que contribuíram na compreensão do sistema da BL de fungos.
- Ao Professor Ilia Yampolsky e seu grupo de pesquisa, do Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioinorganic Chemistry - Russian Academy of Sciences (IBCh-RAS). Sua colaboração foi essencial para os avanços do projeto a partir de 2015.
- Ao Professor Yuichi Oba e sua equipe, na Universidade de Nagoya (Japão), pela colaboração com o estudo de métodos de extração da hispidina de fungos bioluminescentes.
- Aos familiares e amigos, pelo suporte físico e emocional.

RESUMO

Pereira, T. A. **Purificação e Caracterização de enzimas envolvidas na bioluminescência de fungos (111p)**. Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Esta tese descreve estudos realizados na tentativa de purificar e caracterizar enzimas envolvidas na BL de fungos, além de trabalhos conduzidos a fim de investigar o mecanismo da bioluminescência de fungos. Inicialmente, tentou-se isolar as duas enzimas supostamente responsáveis pela reação bioluminescente em fungos. Parâmetros de atividade ótima (pH e temperatura) e comportamento cinético foram investigados. Todavia, com a descoberta de que a luciferina fúngica é o derivado hidroxilado da hispidina (3-hidróxi hispidina), novas estratégias foram abordadas. Os esforços se concentraram na purificação da luciferase, visto que a hidroxilase não faz parte do sistema bioluminescente de fungos. Avaliação da interação da luciferase fúngica com a luciferina ou derivados dela sugeriram comportamento relativamente promíscuo da enzima. Os resultados indicaram que a reação *luciferina-luciferase* é favorecida em meio básico (pH ~8), a ~20 °C. Ensaio com $^{18}\text{O}_2$ revelaram que a inserção de oxigênio na molécula de luciferina produz um intermediário cuja descarboxilação gera a oxiluciferina. Paralelamente, a síntese da hispidina *in vitro* a partir de ácido cafeico na presença de malonil-CoA e de extrato de micélios bioluminescentes resultou na emissão de luz, confirmando que a luciferina é reciclada no processo.

Palavras-chave: bioluminescência de fungos, luciferase fúngica, luciferina fúngica, mecanismo bioluminescente de fungos.

ABSTRACT

Pereira, T. A. **Purification and Characterization of enzymes involved in fungi bioluminescence (111p)**. Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This work describes studies performed to purify and characterize enzymes responsible for the fungal bioluminescence. Also, it shows important data that contributes to understand the mechanism for bioluminescence reaction in fungi. First, we tried to isolate two enzymes suspected of being involved on fungal bioluminescence. Optimum activity parameters (pH and temperature) and kinetic behavior were investigated. However, the discovery that fungal luciferin is the hispidin derivative 3-hydroxyhispidin demanded adaptations in the project. First of all, concentrates efforts to luciferase purification was priority, since hydroxylase is not part of the bioluminescent system of fungi. Studies on the luciferase interaction with different substrates showed some promiscuity for the enzyme. The results indicated higher intensity of light from *luciferin-luciferase* reaction in alkaline solutions (pH ~ 8) at ~ 20 °C. The reaction in medium with $^{18}\text{O}_2$ revealed that insertion of oxygen into the luciferin structure produces an intermediate whose decarboxylation generates oxyluciferin. In parallel, the *in vitro* synthesis of hispidin using caffeic acid and malonyl-CoA with the mycelium extract resulted in the emission of light, confirming that luciferin is recycled in the process.

Keywords: fungal bioluminescence, fungal luciferase, fungal luciferin, fungal bioluminescent mechanism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Compostos químicos:

Proteínas:

4CL	4-Cumaril-CoA-ligase
BSA	Albumina de soro bovino
BFP	Blue Fluorescent Protein
C3H	4-Cumarato-3-hidroxilase
C4H	Cinamato hidroxilase
GFP	Green Fluorescent Protein
LBP	Luciferin Binding Protein
PAL	Fenilalanina amônia-liase
PI	Proteína Intermembranas
PKS	Policetídeo sintetase
PM	Proteínas de Membrana
YFP	Yellow Fluorescent Protein

Demais compostos químicos:

DDM	<i>N</i> -dodecil- <i>b</i> - <i>D</i> -maltosídeo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
PMSF	Fluoreto de metil-fenil-sulfonila
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio

Mecanismos e técnicas de análises químicas:

BL	Bioluminescência
BET	Back Energy Transfer
BRET	Bioluminescence Resonance Electron Transfer
CIEEL	Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence
DFT	Density Functional Theory
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEC	Ion Exclusion Column
SEC	Size Exclusion Column
QL	Quimiluminescência

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Breve histórico do estudo da Bioluminescência.....	13
1.2	Funções biológicas da BL	15
1.3	Alguns mecanismos bioluminescentes conhecidos.....	17
1.3.1	Vagalumes	17
1.3.2	Bactérias	20
1.3.3	Dinoflagelados.....	24
1.3.4	Lula Vagalume	25
1.3.5	Fungos.....	27
1.4	Luciferases e enzimas de membrana	34
1.5	Aplicações de sistemas bioluminescentes	37
2	OBJETIVOS.....	39
3	MATERIAIS.....	40
3.1	Solventes e reagentes.....	40
3.2	Equipamentos	40
4	METODOLOGIA E RESULTADOS	42
4.1	Trabalho de campo	42
4.2	Ensaio padrão de emissão de luz (ensaio quimiluminescente).....	43
4.3	Cultivo de micélios em laboratório	44
4.4	Extração e purificação parcial das enzimas	46
4.4.1	Redutase / Hidroxilase de fungos bioluminescentes	49
4.4.2	Luciferase de fungos bioluminescentes	54
4.5	Estudos de caracterização das enzimas.....	59
4.5.1	Cinética de consumo de NADPH pela hidroxilase	59
4.5.2	Determinação das massas moleculares da hidroxilase e da luciferase ..	61
4.5.3	Determinação da temperatura ótima da luciferase	63
4.5.4	Determinação do pH ótimo da luciferase.....	65
4.5.5	Especificidade da luciferase pela 3-hidróxihiispidina.....	68
4.6	Obtenção da luciferina fúngica e de seu precursor	69
4.6.1	Extração da luciferina de fungos bioluminescentes	69

4.6.2	Extratos vegetais como fonte de substrato para a BL fúngica	70
4.6.3	Extração da hispidina de fungos bioluminescentes	75
4.7	Estudos mecanísticos do sistema bioluminescente de fungos	76
4.7.1	Investigação do mecanismo da reação luciferina-luciferase	76
5	DISCUSSÃO	80
6	CONCLUSÃO	85
7	BIBLIOGRAFIA	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve histórico do estudo da Bioluminescência

Há registros sobre a observação da emissão de luz por organismos vivos em diferentes épocas e culturas. Na China, acreditava-se que a grama morta era transformada em vagalumes, e que a luz proveniente da carne morta era oriunda de um meio externo e selvagem. Na Sibéria, os Ostiaks creem que almas habitam um conjunto de grutas iluminadas fracamente por árvores mortas (Harvey, 1957).

Na antiguidade, Aristóteles (384 – 322 a.C.) e Plínio (23 – 79 d. C.) descreveram a emissão de luz por cogumelos, mas a luz emitida por madeira em decomposição não foi associada a fungos até o século XIX. Em meados do século XVII, Robert Boyle utilizou uma bomba de vácuo para demonstrar que a luminescência dendente do ar (Shimomura, 2006; Zourob *et al*, 2008). No século seguinte, Johann Albrecht e o Barão von Meindinger associaram a emissão de luz da madeira podre com a presença de água, pois notaram inibição da luminescência após secagem e umidificação dos galhos. Ambos, individualmente, observaram que o efeito era reversível e o Barão von Meindinger concluiu que “animais microscópicos” seriam os responsáveis. Em 1823, fungos foram, definitivamente, associados à emissão de luz pela madeira em decomposição (Harvey, 1957; Shimomura, 2006).

A emissão de luz não relacionada ao aumento de temperatura foi definida como “quimiluminescência” (QL), em 1888, pelo cientista alemão Eilhardt Wiedemann. Assim a luminescência e incandescência passaram a ser vistas como fenômenos distintos (Harvey, 1957; García-Campaña & Baeyens, 2001). Atualmente, a luminescência é definida como a emissão de radiação

eletromagnética, sem liberação de energia térmica, resultante da transição de um estado eletronicamente excitado para um nível de menor energia. Dependendo da forma de excitação, a luminescência pode ser classificada como QL, termoluminescência, eletroluminescência e fotoluminescência. Esta última engloba a fluorescência e a fosforescência (Harvey, 1957; Santos et al, 1993). A QL ocorre quando uma reação química gera um intermediário excitado, cujo decaimento para o estado fundamental resulta na emissão de fótons (Wilson & Hastings, 1998). A BL se resume à QL em organismos vivos, nos quais reações químicas dependentes da oxidação de um substrato (luciferina), catalisada por uma enzima (luciferase), resultam em emissão de luz.

Considera-se como marco da pesquisa moderna em bioluminescência a primeira demonstração da reação *luciferina-luciferase*, feita por Raphael Dubois em 1885 (Dubois, 1887). Ele preparou dois extratos, quente e frio, a partir dos órgãos luminosos de uma espécie indiana de besouro (*Pyrophorus noctilucus*) em solução aquosa. O primeiro era uma suspensão, cuja luminescência decresceu gradualmente até desaparecer. No extrato quente a luminescência foi imediatamente suprimida, sendo restabelecida somente após a mistura de ambos os extratos. Dubois concluiu que a emissão de luz era provocada por uma reação entre o composto termolábil presente no extrato frio (uma enzima) e o soluto termoestável do extrato quente (substrato). A enzima foi denominada *luciferase*, e seu substrato, *luciferina*.

A oxidação da luciferina gera um composto de alta energia denominado oxiluciferina, que pode, ou não, ser o responsável pela emissão de luz. Neste caso, a reação é classificada como bioluminescente direta (Figura 1, 1). Em uma reação

bioluminescente indireta há transferência de energia da oxiluciferina em seu estado excitado para uma proteína fluorescente (Figura 1, 2). Esta, por sua vez, emite luz ao sofrer decaimento para seu estado fundamental (Shimomura, 2006; Wilson & Hastings, 2013). Este fenômeno é conhecido como Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET).

Figura 1: Esquema simplificado dos mecanismos de bioluminescência direta (1) e

Até onde se sabe, todos os sistemas bioluminescentes são dependentes de oxigênio, cuja reação com a luciferina produz um peróxido, no qual a fraca ligação O-O é quebrada, formando um intermediário de alta energia (IAE), cujo decaimento para o estado fundamental resulta na emissão de luz fria visível.

1.2 Funções biológicas da BL

Embora todos os sistemas bioluminescentes conhecidos dependam da reação *luciferina-luciferase* (Figura 1), cada um deles possui suas particularidades. Dentre elas estão as distintas funções biológicas ou ecológicas que assumem, distribuindo-se em diversas espécies, famílias, filos e reinos (Harvey 1957; Shimomura 2006; Wilson & Hastings, 2013). Padrões e frequências de pulsos luminosos de vagalumes, por exemplo, variam de uma espécie para outra,

funcionando como código de comunicação entre eles. Isto possibilita a reprodução entre aqueles da mesma espécie, ou a predação, no caso de fêmeas do gênero *Photuris*. Elas são capazes de imitar os padrões de disparo luminoso de vagalumes do gênero *Photinus*, atraindo o macho que lhe servirá como refeição (Lloyd, 1971; Shimomura, 2006; Wilson & Hastings, 2013).

Também se aproveitam da BL para predação os peixes bentônicos da espécie *Lophius piscatorius* (tamboril). Eles vivem em simbiose com bactérias bioluminescentes, que lhes permitem visualizar e atrair sua presa. Enquanto alguns animais usam a BL para atrair a presa, outros emitem luz para espantar predadores. A medusa *Aequorea victoria* e o dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum*, são representantes deste grupo. Ambos usam o sistema nervoso central para controlar a emissão de luz, conforme necessidade ou por estímulo. Desse modo, com um rápido e intenso pulso luminoso, podem surpreender e confundir um possível predador (Wilson & Hastings, 2013).

A BL para fins reprodutivos não se limita aos vagalumes. Há indícios de que fungos bioluminescentes atraem insetos dispersores de esporos (Oliveira et al, 2015). Embora tal hipótese venha sendo cogitada desde a década de 1980 (Sivinski, 1981), a falta de evidências não eliminou a suspeita de que a BL fúngica seria simplesmente resultado da proteção antioxidante contra espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas pela respiração celular (Mendes et al., 2008). Recentemente, Oliveira e colaboradores (2015) demonstram que a BL de fungos da espécie *Neonothopanus gardneri* é controlada por ritmo circadiano, reforçando a ideia de que existe uma função biológica para a BL fúngica. Soma-se a isto os estudos de Waldenmaier, publicados no mesmo trabalho: peças de acrílico,

análogas às espécies investigadas, funcionaram como armadilhas para insetos. As armadilhas que não faziam parte do grupo controle eram equipadas com LEDs, cujo espectro de emissão era sobreponível ao da BL fúngica (~530nm). Nas peças que emitiam luz verde foram encontradas maiores quantidade de artrópodes pertencentes a, pelo menos, quatro Ordens: Coleoptera (besouros, principalmente); Diptera (moscas); Hemiptera e Hymenoptera (vespas e formigas). O grupo concluiu que a emissão de luz é uma vantagem evolutiva para fungos, no que diz respeito à atração de alguns insetos dispersores de esporos. Além disso, é importante considerar que as regiões onde o grupo trabalhou (Mata dos Cocais e Mata Atlântica) são florestas de grande porte, onde a dispersão dos esporos feita por insetos pode ser mais eficaz do que o efeito dos ventos.

A diversidade da BL não se limita às funções biológicas e aos táxons nos quais está distribuída, pois luciferase e luciferina são termos genéricos adotados para referir-se, respectivamente, à enzima e ao substrato. Suas estruturas químicas variam conforme o organismo ou sistema bioluminescente em questão, como será discutido mais detalhadamente a seguir.

1.3 Alguns mecanismos bioluminescentes conhecidos

1.3.1 Vagalumes

O sistema bioluminescente de vagalumes (Figura 2) depende de ATP e Mg^{2+} (McElroy, 1947). A emissão de luz ocorre via Chemically Induced Electron Exchange Luminescence (CIEEL): mecanismo que envolve a formação de um íon-radicalar pela transferência, intra ou intermolecular, de apenas um elétron. O grupo doador (ativador) é, geralmente, um intermediário de alta energia. Do íon-radical resultante,

produz-se um composto neutro no estado excitado, que emite luz visível ao decair para o estado fundamental (Koo & Schuster, 1978). A forma predominante da oxiluciferina de vagalumes varia conforme as condições ambientais, como pH, força iônica e aminoácidos presentes no sítio ativo da luciferase (Viviani et al, 1993). Consequentemente, tais condições influenciam o espectro de emissão observado: vermelho para a forma cetônica, amarelo para a forma enólica, e verde para o enolato (Figura 2) (Bechara & Stevani, 2017).

A luciferina de vagalumes (Figura 2) teve sua estrutura determinada por Bitler & McElroy em 1957. A elucidação da estrutura de substratos de sistemas bioluminescentes facilita os estudos relacionados ao seu mecanismo. Em um deles, Shimomura e colaboradores (1977) analisaram como o oxigênio molecular é incorporado na luciferina, e demonstraram que somente um de seus átomos está presente no CO₂ resultante da reação bioluminescente. Os pesquisadores puderam acompanhar a ocorrência da reação utilizando ¹⁸O₂ e H₂¹⁸O, analisando o dióxido de carbono produzido por espectrometria de massas.

A BL de vagalumes se dá por disparos luminosos, controlados pela disponibilidade de oxigênio para reagir com a luciferina. Os disparos são ativados quando impulsos nervosos induzem a produção de óxido nítrico (NO), que inibe a respiração mitocondrial. Como consequência, o oxigênio torna-se disponível para reagir com a luciferina, mantida em ambiente anóxico até então.(Aprille et al., 2004; Bechara & Stevani, 2017).

Figura 2: Esquema simplificado do sistema bioluminescente de vagalumes. A reação envolve uma etapa de transferência de um elétron por CIEEL intramolecular: a porção fenolato transfere elétron para a dioxetanona, induzindo a quebra da ligação O-O e a geração do íon-radical. A eliminação deste íon-radical por Back Electron Transfer (BET), produz a oxiluciferina em seu estado excitado. O espectro de emissão varia conforme a forma na qual a oxiluciferina se apresenta: enolato (verde), enol (amarela) e ceto (vermelha). Fonte: Bechara & Stevani, 2017 (Adaptado).

1.3.2 Bactérias

Vagalumes não são os únicos organismos cuja BL depende da transferência eletrônica por CIEEL. Este mecanismo também é observado no sistema bioluminescente de bactérias (Figura 3). Neste caso, entretanto, ele é intermolecular, e depende da inserção de um aldeído de cadeia longa ao peróxido derivado da luciferina bacteriana – a flavina mononucleotídeo (FMN). A redução de FMN a FMNH₂ é etapa inicial do mecanismo bioluminescente, catalisada por uma redutase dependente de NAD(P)H. A partir daí, a luciferase atua em uma série de reações que levam à formação da oxiluciferina no estado excitado e do ácido carboxílico de cadeia longa (Shimomura, 2006; Gauglitz & Vo-dinh, 2003; Tu, 2008; Waldenmaier *et al*, 2012).

Dependendo das condições do meio e da espécie de bactéria, a energia do emissor pode ser transferida para proteínas fluorescentes (Figura 3, **PF**). As mais comuns, no caso de bactérias, a Yellow Fluorescent Protein (YFP) ou a Blue Fluorescent Protein (BFP), alteram o espectro de emissão para aqueles correspondentes às cores amarela ou azul, respectivamente (Wilson & Hastings, 2013).

Seja pelo mecanismo da BL direta ou indireta, a emissão de luz por bactérias bioluminescentes ocorre de modo contínuo. Isto é possível porque na última etapa do processo a desidratação da oxiluciferina, já em seu estado fundamental, produz FMN (Figura 3).

Figura 3: Esquema simplificado do sistema bioluminescente de bactérias: a luciferase catalisa a formação do peróxido (1) e a reação deste com o aldeído de cadeia longa (R₁CHO) nas duas etapas seguintes à redução da luciferina (FMN). A clivagem da ligação O-O de (2) produz um íon radical, iniciando o mecanismo CIEEL, que culminará na geração da oxiluciferina em seu estado excitado (3). Pode haver BL indireta, se (3) transferir energia para uma proteína fluorescente (PF). Adaptado de Waldenmaier et al, 2012.

Enzimas envolvidas na BL de bactérias foram purificadas submetendo o extrato frio à precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de troca iônica e de afinidade por NAD(P)H (Jablonski & DeLuca, 1977). Ensaio conduzido com a redutase e a luciferase bacteriana mostraram que a emissão de luz só é possível se houver expressão gênica dos componentes supradescritos: as enzimas, a luciferina e o aldeído de cadeia longa. A expressão dos genes essenciais à BL nestes organismos é induzida pelo aumento de sua densidade populacional e consequente acúmulo do composto indutor, efeito conhecido como senso de presença, ou *quorum sensing* (Hastings & Greenberg, 1999; Shimomura, 2006; Wilson & Hastings, 2013). A formação da luciferase de *Aliivibrio fischeri*, por exemplo, é induzida por uma lactona (Figura 4A), a qual se difunde livremente no meio de cultura.

Figura 4: N-*acil-homoserina lactona*, auto-indutor (AI) da bactéria *A. fischeri* (A) e os dois operons contendo os genes responsáveis pela transcrição das sintetases dos componentes necessários para a emissão de luz (B). O operon regulador controla a produção da lactona e do aldeído de cadeia longa (**genes C, D e E**), além das duas subunidades da luciferase (**genes A e B**) (Tu, 2008). Ao atingir maiores concentrações no meio, o **AI** se liga à enzima reguladora que ativa a transcrição do operon e possibilita a emissão de luz (Wilson & Hastings, 2013). Adaptado de Wilson & Hastings, 2013.

Há evidências da geração de um complexo enzimático entre a redutase e a luciferase, pois o valor da constante cinética para o consumo de NADPH pela redutase, determinada espectrofotometricamente, é 100 vezes maior do que o observado pela intensidade de bioluminescência, usando as mesmas concentrações em meio com excesso de luciferase (Tu, 2008; Duane & Hastings, 1975). Além disso, os valores de ciclagem (turnover) para a redutase são significativamente superiores àqueles referentes à luciferase (Tu, 2008), o que implicaria em gastos desnecessários de NADPH e ATP devido ao excesso de FMNH₂ livre no meio, ou seja, seria energeticamente desfavorável para a célula. É necessário, então, um controle rigoroso dos níveis de FMNH₂, feito através da formação de um complexo redutase/luciferase, que estabiliza a flavina possibilitando sua transferência direta da redutase para a luciferase e evitando, assim, aumento de sua concentração livre no meio. Essa hipótese foi confirmada posteriormente, quando a produção *in vitro* de complexos redutase/luciferase de duas espécies diferentes de bactérias bioluminescentes possibilitou a transferência direta da flavina de uma enzima para outra (Jeffers et al., 2003; Tu, 2008). Além disso, a adição de FMNH₂ na mistura reacional resulta em inibição competitiva da luciferase e não-competitiva de NADPH, sem provocar qualquer efeito inibitório na transferência do produto direto. Tu (2008) trabalhou com redutases di e monoméricas, em suas formas apo e halo, com marcador fluorescente para demonstrar que a luciferase forma complexo apenas com a halo-redutase (Jeffers et al., 2002).

1.3.3 Dinoflagelados

Dinoflagelados fazem parte do plâncton marinho e são responsáveis pela maior parte da BL observada em águas superficiais. A BL desses micro-organismos é estimulada mecanicamente pela deformação das células submetidas ao estresse hidrodinâmico no fluxo da maré (Latz et al., 2008; Valiadi & Iglesias-Rodriguez, 2013). A tensão provocada no fluxo das ondas do mar serve de gatilho para iniciar a reação, controlada pela acidificação do interior de organelas contendo a luciferina, luciferase e uma Luciferin Binding Protein (LBP). Tais organelas, os cintilons, são sustentadas por vacúolos na membrana celular e permeáveis a íons H^+ . Em meio alcalino, a LBP se liga à luciferina, inibindo sua oxidação e, portanto, a emissão de luz. A liberação da luciferina e ativação da luciferase é promovida pela acidificação do meio (Figura 5) (Fogel & Hastings, 1978; Wilson & Hastings, 1998; Shimomura, 2006; Latz et al., 2008; Valiadi & Iglesias-Rodriguez, 2013).

Figura 5: Estrutura da luciferina (à esquerda) e esquema simplificado do sistema bioluminescente (à direita) de dinoflagelados. No interior dos cintilons, a acidificação do meio ativa a luciferase, que catalisa a oxidação da luciferina (LCF). Adaptado de Hastings, 2013.

Curiosamente, o produto da reação bioluminescente em dinoflagelados não é fluorescente, mas sua luciferina não oxidada fluoresce em comprimento de onda compatível com o espectro de emissão da BL (Wilson & Hastings, 1998; Valiadi & Iglesias-Rodriguez, 2013). Aliás, a estrutura da luciferina (Figura 5) é outra peculiaridade do sistema bioluminescente de dinoflagelados: não é similar às de outros organismos marinhos, nem às de insetos, bactérias ou fungos (Wilson & Hastings, 1998; Valiadi & Iglesias-Rodriguez, 2013). A reação bioluminescente de dinoflagelados é objeto de pesquisa há mais de um século, mas ainda não se conhece seu mecanismo (Wilson & Hastings, 1998; Shimomura, 2006; Latz *et al.*, 2008; Valiadi & Iglesias-Rodriguez, 2013).

1.3.4 Lula Vagalume

O sistema bioluminescente da lula vagalume *Watasenia scintillans* é ainda menos compreendido que o de dinoflagelados. Sua luciferina é um derivado dissulfonato da coelenterazina (Figura 6). Esta última atua como luciferina não só em outros moluscos, mas em peixes, crustáceos e águas-vivas (Shimomura, 2006).

A lula vagalume é o único organismo marinho bioluminescente que possui uma enzima de membrana, cuja purificação e identificação ainda não foram realizadas (Tsuji & Leisman, 1981; Tsuji, 1985; Shimomura, 2006). Contudo, há uma proposta para o mecanismo envolvido na sua BL: reação dependente de ATP e Mg^{2+} , que produz um adenilato derivado da luciferina. Embora lembre a reação da BL de vagalumes, o mecanismo distingue-se pela remoção do grupo adenilato em etapa prévia à oxidação da luciferina (Figura 6) (Tsuji, 2002).

Figura 6: Esquema simplificado do sistema bioluminescente da lula vagalume. A reação com oxigênio molecular e consequente formação do intermediário de alta energia ocorrem após a liberação do grupo adenilato. o mecanismo detalhado da oxigenação da coelenterazina dissulfonato e a estrutura do composto emissor permanecem indeterminadas. Apesar disso, análises por Differential Functional Theory (DFT) reforçaram a proposta de Tsuji, determinando a estrutura mais favorável energeticamente para um possível intermediário de alta energia da BL da *W. scintillans* (Ding & Liu, 2017). Adaptado de Tsuji, 2002.

1.3.5 Fungos

Das mais de 100.000 espécies de fungos já descritas, 71 são bioluminescentes. Todas são basidiomicetos e estão distribuídas na família Mycenaceae ou nas linhagens *Omphalotus* e *Armillaria* (Weitz, 2004; Desjardin et al., 2008; Desjardin et al., 2010). No Brasil, foram encontradas espécies na Amazônia (*Mycena lacrimans*) (Desjardin & Braga-Neto, 2007), na Mata Atlântica de São Paulo (*Gerronema viridilucens*, *Mycena asterina*, *Mycena lucentipes*) (Desjardin et al., 2005; Desjardin et al., 2007) e nos estados de Tocantins e Piauí (*Neonothopanus gardneri*) (Capelari et al., 2011).

Fungos bioluminescentes crescem em regiões tropicais ou temperadas, preferencialmente em meio neutro (Oliveira et al., 2013). A intensidade da luz que emitem depende do pH e da temperatura, bem como da quantidade de nutrientes disponíveis e do estágio de crescimento do fungo (Shimomura, 2006). Embora haja espécies bioluminescentes em qualquer estágio de crescimento, algumas emitem luz visível apenas na forma de micélio, enquanto que outras possuem somente o corpo de frutificação – ou parte deste – bioluminescente (Waldenmaier *et al.*, 2012). Apesar da diversidade de espécies, o espectro de emissão de todos os fungos bioluminescentes conhecidos possui comprimento de onda entre 520-530nm (Desjardin *et al.* 2008; Oliveira & Stevani, 2009). Soma-se a isto a ocorrência de reação quimiluminescente no intercruzamento de extratos quentes e frios de diferentes espécies de fungos bioluminescentes, sugerindo a existência de um mecanismo comum para a luminescência desses micro-organismos (Airth & Foerster, 1964; Oliveira & Stevani, 2012).

A compreensão do sistema bioluminescente de fungos revelou-se um dos maiores desafios da pesquisa em BL. Há mais de um século, esforços vêm sendo empreendidos para caracterizar a reação bioluminescente e a natureza química de seus componentes. Os pioneiros, Airth e Foerster (1962), sugeriram que a BL de fungos envolve, além da luciferase, uma redutase dependente de NAD(P)H. Em seus estudos, eles adaptaram o ensaio quimiluminescente de Dubois (1887), e observaram emissão de luz somente após misturar os extratos frio (dos micélios) e quente (dos corpos de frutificação) na presença de NADH. Ademais, ao centrifugarem o extrato frio, perceberam que ambas as fases, solúvel e insolúvel, continham substâncias termolábeis essenciais para a reação luminescente: incubaram o sobrenadante com o extrato quente na presença de NADH por 3 min, mas só observaram emissão de luz após adição do precipitado da centrifugação. Propuseram então um mecanismo bioluminescente com duas etapas (Figura 7): na primeira, o substrato (Figura 7, **L**) seria reduzido por uma redutase dependente de NAD(P)H. A luciferina reduzida (Figura 7, **LH₂**) sofreria oxidação na segunda etapa, catalisada por uma luciferase (Airth & Foerster, 1962; Airth & Foerster, 1964). Quarenta e cinco anos depois, Oliveira & Stevanin (2009) tiveram sucesso em reproduzir os resultados de Airth e Foerster, evidenciando as analogias com o sistema bioluminescente de bactérias (Figura 7). Estudos cinéticos realizados com extratos de micélios bioluminescentes apontaram para a mesma conclusão (Oliveira & Stevani, 2009).

Figura 7: Representação da proposta de Airth & Foerster para o sistema bioluminescente de fungos, comparando-o com o de bactérias. Fonte: Oliveira & Stevani 2009.

Devido ao longo período sem grandes avanços nas pesquisas desenvolvidas com BL de fungos a ideia da existência de um mecanismo bioluminescente não enzimático ganhou força entre as décadas de 1980 e 1990. Utilizando um extrato metanólico de micélios da variedade luminescente de *P. stipticus*, Shimomura (1989) isolou um sesquiterpeno que chamou de panal (Figura 8). A incubação deste composto em meio contendo sais de amônio ou aminas primárias, seguida da adição de H₂O₂ e Fe²⁺ (pH 5,0 – 8,0) resultou em reação quimiluminescente. O espectro de emissão variou entre 485 e 570nm, dependendo do surfactante utilizado

na dissolução do panal. Em fungos, o panal é encontrado na forma de dois ésteres, os quais Shimomura purificou (Figura 8, **PS-A** e **PS-B**) e classificou como precursores da luciferina fúngica (Shimomura et al., 1993). Shimomura não observou emissão de luz usando o procedimento de Airth e Foerster. Considerando os resultados que obteve, Shimomura supôs um mecanismo não enzimático envolvendo o ânion superóxido como agente oxidante (Shimomura, 2006).

Figura 8: Estrutura química do Panal e de seus derivados ésteres: PS-A e PS-B.

Mais de vinte anos depois o grupo de pesquisa do Professor Yampolsky obteve resultados que potencializaram os avanços nas pesquisas em BL de fungos. O grupo do Instituto de Bioinorgância, na Russian Academy of Sciences (IBCh-RAS) conseguiu identificar a luciferina fúngica, cuja estrutura corresponde à da molécula de 3-hidroxihispidina (Figura 9) (Purtov et al., 2015).

Figura 9: Estrutura química da luciferina fúngica e de seu precursor.

A 3-hidróxihispidina é um derivado hidroxilado da hispidina (Figura 9), um antioxidante encontrado em plantas (Veit et al., 1993; Wei et al., 2007; Nguyen et al., 2014; Tu & Tawata, 2014) e em fungos não bioluminescentes (Bu'Lock & Smith, 1961; Khushbaktova et al. 1996; Gill, 2003; Zhou & Liu, 2010; Lee & Yun, 2011). Relatos sobre a biossíntese da hispidina em fungos não bioluminescentes demonstram que ela é produzida a partir do aminoácido fenilalanina, conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 10: Representação da rota de biossíntese da hispidina no fungo não bioluminescente *Polyporus hispidus*. Adaptado de Nambudiri et al., 1974.

Determinada a estrutura da luciferina fúngica, Kaskova e colaboradores (2017) demonstraram que alguns de seus derivados sintéticos induzem reação quimiluminescente quando adicionados ao extrato enzimático de *N. gardneri*. Além de energia luminosa, os derivados sintetizados liberaram CO₂ ao sofrerem oxidação enzimática. Todos tinham sua porção catecol substituída de modo a manter as insaturações conjugadas na estrutura final, sugerindo a importância da porção lactona hidroxilada na posição C₃ (ver Figura 9) para sua interação com a luciferase. No mesmo trabalho foram publicados resultados que reforçam tal hipótese, visto que: (i) o potencial de oxidação reversível da 3-hidróxihipidina (211mV) é inferior ao da hispidina (428mV); (ii) a remoção do hidrogênio do grupo OH ligado ao C₃ da 3-hidróxihipidina gera uma espécie radicalar mais estável, comparada à estrutura resultante da eliminação de hidrogênio do grupo OH ligado ao C₄. A colaboração de grupos de pesquisa do Brasil, Japão e Rússia (ver agradecimentos) resultou na proposta de mecanismo da reação bioluminescente de fungos:

Figura 11: Esquema representativo do mecanismo bioluminescente de fungos. A hidroxilação da hispidina produz a luciferina fúngica, cuja oxidação enzimática produz um intermediário de alta energia (IEA) que se decompõe liberando CO₂ e a oxiluciferina em seu estado excitado.

1.4 Luciferasas e enzimas de membrana

Na antiguidade, enzimas de origem microbiológicas eram utilizadas em processos de fermentação destinados à fabricação de alimentos, porém, essa prática era baseada em observações empíricas, sem qualquer estudo sistemático ou fundamentos químicos (Copeland 2000). A partir do século XIX fenômenos como fermentação e digestão despertaram o interesse em investigações sobre a ação enzimática com bases mais científicas, por exemplo, na década de 1890, pesquisadores isolaram extratos de animais e plantas para obter o ingrediente ativo em sua forma pura (Dixon & Webb 1964, Copeland 2000). Com os avanços tecnológicos e científicos em meados do século XX, enzimas passaram a ser extraídas de células para serem aplicadas em produtos e processos industriais, permitindo seu comércio e aplicação em larga escala (Said & Pietro 2004).

A maioria das enzimas é encontrada em compartimentos diferentes dentro da célula, muitas delas intimamente associadas à membrana (Rehm & Reed 1987), sendo classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisa, a saber: (i) oxidoredutases; (ii) transferases; (iii) hidrolases; (iv) liases; (v) isomerases e (vi) sintetases (Prave, et al. 1987). A maior parte das oxidoredutases dependem de cofatores que atuam como doador de elétrons, possibilitando a conversão do O_2 do estado triplete para o estado singlete e, conseqüentemente, a reação deste com o substrato. Tais cofatores podem ser inorgânicos (íons metálicos), orgânicos (flavinas e nicotinamidas) ou complexos metálicos como o grupo heme. As oxidoredutases independentes de cofator, geralmente, apresentam resíduos aromáticos em seu sítio ativo e dependem do substrato para ativação do oxigênio molecular. Utilizando ou

não cofator, é comum que tais enzimas ativem o O_2 através da formação de um peróxido intermediário (Babcock & Wikstrom, 1992; Fetzner, 2002; Pazmiño et al., 2010). A dependência de cofatores, de modo geral, pode ser explicada pela limitação funcional das cadeias de aminoácidos que formam o polipeptídeo. Na maioria dos casos, a associação *cofator-enzima* se dá através de interações não covalentes, embora alguns se encontrem covalentemente ligados à cadeia de aminoácidos da molécula (Copeland, 2000; Davidson 2012).

Oxidoredutases são fundamentais na transformação de compostos intra e extracelulares, seja para a produção de energia ou para reprodução da célula (Di Gennaro, et al. 2011). Dessa maneira, tais macromoléculas estão presentes em todos os organismos vivos desempenhando diferentes atividades, tais como metabolismo, proteção contra estresse oxidativo, respiração e fermentação (Said & Pietro 2004, Dixon & Webb 1964, Di Gennaro, et al. 2011).

Em muitos organismos bioluminescentes a luciferase atua como uma oxigenase: catalisa processos de oxidação tendo oxigênio molecular comoceptor de elétrons (IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature). De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), oxigenases pertencem a uma das 22 subclasses de oxidoredutases. Dentre elas, encontram-se as mono-oxigenases: enzimas responsáveis pela inserção de um dos átomos de O_2 à estrutura do substrato. A luciferase de fungos, objeto de estudo deste trabalho, é uma proteína de membrana (PM).

Enzimas de membrana representam de 20% a 30% do genoma de vários organismos e são responsáveis pela transferência de sinais entre compartimentos extra e intracelular, função de extrema importância para processos dinâmicos, como

a homeostase, por exemplo (Fink, et al. 2012, Voet & Voet 2005). Possuem caráter hidrofóbico e tem sua estabilidade mantida pela interação com a bicamada lipídica, sendo classificadas como intrínsecas (ou integrais) e extrínsecas (ou periféricas), dependendo da forma como estão associadas à membrana. PMs intrínsecas estão fortemente ligadas aos lipídios da membrana por interações hidrofóbicas, e só podem ser isoladas por tratamentos com agentes capazes de romper a membrana ou em condições desnaturantes (White 1994). Devido à baixa polaridade de sua superfície externa, proteínas intrínsecas tendem a se agregar e precipitar em soluções aquosas, a menos que sejam dissolvidas com auxílio de surfactantes ou solventes orgânicos miscíveis com água. Algumas classes de proteínas são expostas somente em uma parte da superfície da membrana, enquanto outras, as proteínas intermembranas (PI), transpassam toda a bicamada lipídica, apesar de sempre haver uma parte exposta ao ambiente aquoso, ou seja, proteínas integrais são anfifílicas (Voet & Voet 2005). As proteínas extrínsecas podem estar associadas à superfície da membrana celular através de: (i) interações com a extremidade hidrofílica de lipídios, ou (ii) interações com superfícies de PIs por forças eletrostáticas ou ligações de hidrogênio. Ao contrário das PMs integrais, as extrínsecas são facilmente dissociadas da membrana por precipitação com sais ou alterações de pH (Voet & Voet 2005).

A porção solúvel na estrutura de PIs, comumente, possui domínios formados por β -folhas distribuídas em uma parte da estrutura quaternária, e α -hélices em outra. Para a maior parte delas, a ligação com o substrato depende de drásticas alterações na conformação. Tais propriedades de enzimas de membrana dificultam sua extração e purificação de sua forma nativa, haja vista a pouca quantidade de

material disponível na literatura: a maior parte das enzimas de membrana tiveram sua estrutura definida parcialmente. A proporção de lipídio residual na solubilização de enzimas de membrana afeta sua atividade. Por isso, a solubilização é etapa crucial no processo de purificação deste tipo de enzimas. Além disso, algumas PIs estão associadas à membrana por um domínio *N*-terminal, cuja remoção ou mutação pode afetar a atividade enzimática irreversivelmente (Luckey, 2008).

1.5 Aplicações de sistemas bioluminescentes

Análises químicas por QL e BL têm maior sensibilidade e são menos suscetíveis a problemas relacionados à turbidez da solução, quando comparadas a outras técnicas analíticas. Tais vantagens favorecem a aplicação de ambas na detecção de analitos diversos. (Bishop, 2010). Dentre as aplicações mais comuns estão o uso do sistema bioluminescente de vagalumes na determinação de ATP e da atividade de magnésio (Gauglitz & Vo-dinh, 2003); e o ensaio toxicológico Microtox[®], com a bactéria marinha *Aliivibrio fischeri* (Bulich & Isenberg, 1981). Ensaio clínico para detecção de cátions de cálcio em células vivas aplicam o mecanismo bioluminescente da água-viva *Aequorea victoria* (Shimomura, 2006; Wilson & Hastings, 1998; Wilson & Hastings, 2013). Tanto o sistema bioluminescente da água-viva, quanto o de vagalumes são utilizados em análises por BRET, induzindo a transferência de energia da oxiluciferina excitada para uma proteína fluorescente. Estudos para aplicação de fungos bioluminescentes em análises de toxicidade de cátions metálicos já foram relatados (Weitz et al., 2002, Mendes & Stevani, 2010, Mendes et al. 2010). A validação de métodos utilizando fungos teria vantagens sobre o ensaio Microtox[®] para amostras de solo, onde estes

organismos se adaptam com maior facilidade em relação às bactérias.

A BL aplicada a análises através de imagens (*Bioluminescence Imaging*) possibilita a identificação de genes responsáveis pela produção de qualquer substância, através do experimento gene repórter. A inserção do gene de uma luciferase de mecanismos bioluminescentes no código genético a ser estudado permite acompanhar a expressão do gene alvo pela intensidade de luz emitida, pois, simultaneamente, ocorrerá a expressão da luciferase (Bronstein et al., 1994; Contag et al., 1997). Por exemplo, alterações genéticas feitas no mecanismo bioluminescente de *V. hilgendorffii* provocam mudança no espectro de emissão, do azul para o vermelho. Com isso, a detecção de tumores *in situ* se torna mais eficiente, pois a luz vermelha se propaga mais através do sangue (Wilson & Hastings, 2013).

O uso de sistemas bioluminescentes. Para tanto, é essencial a compreensão de tais sistemas e de mecanismos responsáveis pela emissão de luz.

2 OBJETIVOS

A compreensão de mecanismos bioluminescentes se mostrou uma ferramenta poderosa em aplicações diversas, conforme discutido anteriormente. Paralelamente, o sistema bioluminescente de fungos vem sendo investigado desde o século XIX, sem avanços significativos. Assim, este trabalho teve como objetivo inicial a purificação e caracterização das enzimas envolvidas no sistema bioluminescente de fungos, tal qual afirma o título do projeto. As descobertas feitas a partir de 2015 demandaram reformulação das hipóteses do grupo e, consequentemente, deste projeto. O foco passou a ser, então, a purificação da luciferase e estudos de sua interação com o substrato. A tabela a seguir explicita os objetivos gerais e específicos, comparando os iniciais com suas adaptações após

201

5.

Tabela 1: Objetivos gerais e específicos: antes e depois da publicação da estrutura da luciferina de fungos bioluminescentes.

OBJETIVOS	Gerais	Específicos
Iniciais	Purificação da luciferase e redutase de fungos bioluminescentes	Caracterização da luciferase e da redutase de fungos bioluminescentes
Adaptados*	Purificação somente da luciferase de fungos bioluminescentes	Caracterização da luciferase de fungos bioluminescentes; estudo da reação <i>luciferina-luciferase</i> e avaliação da especificidade da luciferase fúngica; verificação da reciclagem da luciferina no sistema bioluminescente de fungos.

* Adaptações feitas após as descobertas de 2015.

3 MATERIAIS

3.1 Solventes e reagentes

Etanol P. A. 99,8%, ácido acético glacial, hidróxido de sódio, ácido clorídrico 32 %, diidrogenofosfato de potássio 99%, tiosulfato de sódio pentaidratado, cloreto de potássio e cloreto de cálcio diidratado foram adquiridos da Merck. Monoidrogenofosfato e diidrogenofosfato de sódio anidros 99%, sal dissódico EDTA, b-mercaptoetanol 98%, sulfato de amônio 99%, albumina extraída de soro bovino (BSA) 98%, sal dissódico de NADH 98%, azul de Coomassie, Tris-HCl 99%, persulfato de amônio 98%, *N,N,N',N'*-tetrametiletilenodiamina (TEMED) 99%, glicerol 99%, glicina 99%, azul de bromofenol (sal sódico), dodecilsulfato de sódio (SDS) 98,5%, Trizma base 99,9%, inibidores de proteases aspártica (pepstatina) e de cisteína-proteases (E-64), coquetel de inibidores de protease, ditioneitol (DTT) e dodecilmaltosídeo (DDM) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Formaldeído 40% (m/v) foi adquirido da Carlo Erba reagentes, ácido cítrico P. A., da Casa Americana, nitrato de prata, da Quimex e metanol P. A., da Synth. Inibidor de serina-protease fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF) 99%, da Fluka Biochemical, extrato de levedura da Oxoid e ágar da AgarGel, Celite™ 545 (20–100 µm), da Merck. A água utilizada nos experimentos foi purificada em um aparelho Milli-Q Direct 16 da Millipore.

3.2 Equipamentos

Para soluções que deveriam ser filtradas fez-se uso de membranas Durapore (diâmetro do poro 0,45 µm), da Millipore. Espectros de UV-vis foram registrados em

um leitor multimodo Tecan infinite[®] M200 ou em um NP80 Nanophotometer da Implen. A intensidade de luz emitida pelas amostras foi registrada em um luminômetro Single Tube Sirius, da Berthold Detection Systems. Os micélios usados para preparação do extrato frio foram homogeneizados em um RW 20 labmixer IKA[®]. Centrifugações foram feitas em centrífuga 5804R da Eppendorf ou, quando necessário, ultracentrífuga Himac CP 80b da Hitachi, ou Beckman L8-80M. Análises por espectrometria de massas foram acompanhadas em um MicrOTOF-QII da Bruker Daltonics, acoplado a um HPLC da Shimadzu Prominence. Dessalinização das soluções contendo as enzimas foi feita em coluna dessalinizante (5 mL) Zeba[™] desalt spin (Sigma-Aldrich). O fracionamento por cromatografia por afinidade foi conduzido em colunas de 1 mL cromatográficas componentes do PIKSI(R) Mimetic Test Kit (Sigma-Aldrich): a Mimetic[™] YELLOW 1 e a Mimetic[™] RED3 A6XL 0013. Cromatografia de exclusão por tamanho foi conduzida em uma coluna sephadex 200 (3mL), e colunas de troca iônica HighTrap Q-sepharose e DEAE-sepharose (1 mL) da GE Healthcare foram testadas no processo de purificação das enzimas. Quando necessário, um FPLC AKTA da GE Healthcare foi utilizado para auxiliar o fracionamento de amostras de proteínas por cromatografia.

Para eletroforese em gel utilizou-se cuba eletroforética MiniPROTEAN[®] Tetra Cell, fonte Power PAC[™] HC e padrões Precision Plus Protein[™] Kaleidoscop Standard da BioRad, um sistema Amersham ECL Gel Box com gel pré-moldado, ambos da GE Healthcare. Durante a revelação do gel, foi usada também uma mesa de agitação IKA[®] MS3 digital ou um ImageQuant LAS 4000 Mini da GE.

4 METODOLOGIA E RESULTADOS

4.1 Trabalho de campo

Durante as noites de lua nova, em fevereiro de 2012 e janeiro de 2013, foram coletados corpos de frutificação de fungos bioluminescentes em duas regiões brasileiras: Mata Atlântica (São Paulo) e Mata dos Cocais (Piauí). O calor e umidade mais elevados no verão propiciam o crescimento dos fungos, e a coleta em noites de lua nova evita que a luz do luar atrapalhe a visualização da bioluminescência fúngica. Lanternas eram utilizadas somente para fazer reconhecimento da área à frente antes de passar por ela e, eventualmente, galhos secos serviam de vara guia, evitando quedas.

Na Mata dos Cocais, especificamente no município de Altos (Piauí), coletaram-se cogumelos da espécie *Neonothopanus gardneri*, chamada pelos locais de Flor de Coco. Este fungo cresce na base de palmeiras nativas da região, e seu corpo de frutificação é um dos maiores do mundo, dentre as espécies bioluminescentes. Parte dos cogumelos coletados foram liofilizados e usados em tentativas de extração e purificação da enzima: nenhuma delas bem-sucedida. Os demais foram secos sob pressão reduzida na presença de cloreto de cálcio para extração da luciferina. Na indisponibilidade de equipamentos e condições adequadas, os cogumelos eram secos à sombra.

Uma espécie do gênero *Mycena* foi encontrada no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR) em Iporanga, SP. Após secagem, os cogumelos foram reservados para serem classificadas em colaboração com o grupo do Prof. Dennis E. Desjardin, da San Francisco State University, São Francisco, CA, EUA.

4.2 Ensaio padrão de emissão de luz (ensaio quimiluminescente)

Este ensaio é baseado na proposta feita por Dubois em 1887 para verificar a emissão de luz gerada enzimaticamente pela reação luciferina/luciferase. A reação clássica se dá através da mistura de dois extratos: um preparado sob alta temperatura contendo um fator termoestável (luciferina) e outro sob baixa temperatura contendo a enzima (luciferase). Os ensaios quimiluminescentes foram, inicialmente, realizados à temperatura ambiente com soluções preparadas a partir de 50 mL do extrato quente, 50 mL de albumina de soro bovino (BSA) 1 mg mL^{-1} , 50 mL da fração solúvel do extrato frio e 50 mL de NAD(P)H 1 mg mL^{-1} . A mistura foi incubada por 3 min, quando adicionaram-se 50 mL da fração hidrofóbica do extrato frio para iniciar a reação.

Após as adaptações dos objetivos (*ver tabela 1*), os ensaios foram feitos misturando-se solução contendo o substrato da luciferase ou seu precursor com a fração hidrofóbica do extrato frio dissolvida em solução dodecilmaltosídeo (DDM) 1,0%, na presença de BSA 1 mg mL^{-1} .

Em qualquer um dos casos, as frações obtidas foram submetidas ao ensaio quimiluminescente. A presença da enzima de interesse nas amostras era verificada pela intensidade de luz emitida (I) em função do tempo (t). A eficiência dos processos de extração e separação dos compostos de interesse foi avaliada de modo indireto pela razão entre a área da curva I vs. t e a massa total de proteínas (m) na amostra. Esta última foi determinada pelo método Bradford (Bradfordn 1976). O resultado final será denominado doravante a atividade máxima relativa (AMR) da enzima.

4.3 Cultivo de micélios em laboratório

Micélios de *N. gardneri* foram cultivados em meio de ágar não tamponado, constituído de solução aquosa com 1,0% (m/v) de melaço, 0,1% (m/v) de extrato de levedura e 2,0% (m/v) de ágar. As culturas foram incubadas em estufa climatizada a 25 °C e 80% de umidade por cerca de vinte dias, quando fez-se o cultivo em meio líquido, sob as mesmas condições, exceto pela adição de ágar. As condições do meio foram estabelecidas com base no trabalho de Ventura e colaboradores (2015). Após 10 dias de incubação, as culturas eram utilizadas para extração das enzimas.

Inicialmente, somente as culturas em meio líquido eram utilizadas na separação das enzimas. Os micélios crescidos em meio sólido eram reservados para dar início a novas culturas, visto que a remoção destes para preparação de extratos – raspagem do meio sólido – resultava em lise das células e perda de material. Para minimizar tais perdas três tipos de filtros colocados entre o meio de cultura e o inóculo com os micélios foram testados: (i) membrana de diálise; peso molecular de corte (MWCO) 12 kDa (ii) membrana filtrante de celulose reciclada, tamanho de poro 0,45 µm; (iii) membrana filtrante de fibra de vidro, tamanho de poro 0,50 µm. Todas as culturas foram extraídas, centrifugadas e fracionadas por coluna de afinidade por NAD(P)H. Após extração dos micélios, comparou-se as AMRs para a redutase¹ de fungos nas amostras mais puras oriundas das três extrações (Tabela 2). O processo de separação da enzima mostrou rendimento aceitável para prosseguir com esse método de obtenção do material de partida (Figura 12).

Tabela 2: Atividade Máxima Relativa (AMR) para a redutase do extrato frio de micélios cultivados sobre filtros de fibra de vidro, celulose e membrana de diálise.

TIPO DE FILTRO	Fibra de vidro	Celulose regenerada	Membrana de diálise
AMR (%)	0,1	0,5	100,0

Figura 12: Rendimentos das etapas de separação da redutase extraída de micélios de *N. gardneri* cultivados sobre membrana de diálise. A amostra mais pura apresenta AMR superior, indicando aumento da concentração da enzima de interesse ao longo do processo. As perdas pelo volume morto e lavagem da coluna são decorrentes do excesso de solução aplicada.

4.4 Extração e purificação parcial das enzimas

Nas extrações iniciais, quando as etapas e os reagentes mais adequados ainda estavam sendo determinados, as enzimas foram extraídas com tampão fosfato, em função do seu menor custo. À medida que o procedimento ia se tornando mais refinado, optou-se pelo uso de Trizma[®] base. Em ambos os casos o processo de separação das enzimas de interesse passava pelas etapas mostradas abaixo:

Figura 13: Esquema representando a sequência de etapas iniciais no processo de separação da hidroxilase e da luciferase de fungos bioluminescentes. A luciferase é uma enzima de membrana e, portanto, foi separada da hidroxilase na etapa de ultracentrifugação. A centrifugação inicial, mais branda, serviu para separar os resíduos celulares após a homogeneização dos micélios.

Esses procedimentos foram repetidos por diversas vezes, variando os aditivos do tampão, a fim de otimizar a purificação. O primeiro deles foi o glicerol, que por ser um osmólito modifica propriedades do solvente, influenciando no modo como este interage com as proteínas em solução (Viana *et al.*, 2005): determinou-se a AMR para cada enzima em estudo em soluções contendo entre 0,25 a 1,5 M – os controles foram soluções dos extratos frios sem adição de glicerol. Os resultados (Figura 14) mostraram que o efeito do glicerol é mais significativo para a enzima solúvel, embora a luciferase tenha apresentado comportamento análogo

Figura 14: AMR da redutase e da luciferase frente a diferentes concentrações de glicerol. O termo redutase está sendo utilizado a fim de contextualizar o leitor, e facilitar a compreensão do andamento do projeto antes e depois de 2015.

Os demais aditivos experimentados foram surfactantes: acrescentados aos tampões a serem aplicados na extração e separação da luciferase. Primeiramente, a fração insolúvel contendo esta enzima de membrana (Figura 13, **Fração 3**) foi dissolvida em solução contendo os tensoativos: DDM, Triton X-100, CTAM, SDS e Sarcosina. Todos na mesma concentração: 1,5% (Figura 15). Nessas concentrações, as soluções contendo DDM e o Triton-X foram aquelas com maior atividade para a luciferase. Nas últimas extrações realizadas, o detergente utilizado passou a ser o Triton X-100.

Figura 15: AMR para luciferase na presença de diferentes surfactantes na proporção de 1,5%. As concentrações de DDM e Triton são superiores aos valores de concentração micelar crítica (CMC) para estes surfactantes.

4.4.1 Redutase / Hidroxilase de fungos bioluminescentes

A enzima dependente de NAD(P)H era separada a partir do sobrenadante da ultracentrifugação (Figuras 13 e 16, **Fração 4**):

Figura 16: Esquema representando o processo de purificação da hidroxilase de fungos bioluminescentes.

* Nas extrações iniciais a amostra mais pura era obtida apenas por cromatografia de afinidade. Estudos posteriores foram feitos com amostras fracionadas por cromatografia de troca iônica seguida da cromatografia por afinidade a NAD(P)H, conforme será descrito a seguir.

Para tentar remover o excesso de sulfato de amônio foi usada, inicialmente, uma coluna dessalinizante (5 mL). Os resultados não foram satisfatórios, e optou-se por diálise ao longo de ~12h. O fracionamento da amostra na coluna de afinidade foi feito após incubação da solução adicionada (10 min, 4 °C) e lavagem da coluna com 1 mL do tampão de extração. Prosseguiu-se com a eluição por gradiente de força iônica (KCl 0,3-1,0 M; pH 8,0). As amostras tiveram aumento da AMR até a etapa de fracionamento por afinidade a NAD(P)H (Figura 17). Simultaneamente, a quantidade de proteínas totais diminuiu (Tabela 3), sugerindo aumento na concentração do rendimento da purificação.

Figura 17: Rendimento da estratégia inicial de purificação da hidroxilase. As frações 8 - 10 são, respectivamente, o volume morto, lavagem e eluição da coluna de afinidade por NAD(PH).

Tabela 3: Teor proteico das amostras e constantes de velocidades de pseudoprimeira ordem observadas para reação de hidroxilação da hispidina fúngica.

Amostra	Massa de proteínas totais (mg)	$k_{obs}^d (10^{-3} s^{-1})$
Controle ^a	- ^c	- ^c
Extrato inicial ^b	50,0	3,1
Fração 1	50,0	5,3
Fração 4	30,0	5,6
Fração 8	30,0	- ^c
Fração 9	30,0	- ^c
Fração 10 ^b	20,0	4,2

^a O controle consiste em 250 μ L resultante de 50 L de cada solução necessária para reação de emissão de luz no teste quimiluminescente (luciferase, luciferina, NADH e BSA) com exceção da amostra com a redutase, que foi substituída por 50 L do tampão.

^b Frações reservadas para SDS-PAGE.

^c Amostras não apresentaram intensidade de emissão de luz significativa.

^d Determinado a partir da linearização da intensidade de luz emitida por mg de proteína em função do tempo.

Amostras eluídas da coluna de afinidade foram fracionadas por eletroforese em gel (SDS-PAGE) a fim de verificar suas respectivas purezas. A revelação do gel (Figura 18) foi feita com azul brilhante de Coomassie, por uma adaptação do método de Laemmli (1970). O gel de separação e o gel de empilhamento eram compostos por, respectivamente, 12 % e 4 % (m/v) de bis-acrilamida; 0,375M de Tris-HCl (pH 8,8) e 0,125M de Tris-HCl (pH 6,8); SDS 0,1 % (v/v); 0,05 % de persulfato de amônio (m/v); TEMED 0,1 % (v/v). Extrações posteriores a 2013 foram submetidas à eletroforeses em gel pré-moldado da GE Healthcare em um sistema Amersham ECL Gel Box.

Figura 18: SDS-PAGE das amostras em uma das tentativas de purificação parcial da hidroxilase. A quantidade de proteínas presentes na amostra mais pura indicam que o rendimento da purificação ainda não

Em nova estratégia adotou-se cromatografia de troca iônica (IEC), testando dois tipos de fase estacionária: resina Q-sepharose® (de troca aniônica forte) e resina DEAE-sepharose® (de troca aniônica fraca). A coluna mais eficiente na purificação da proteína de interesse foi selecionada considerando os rendimentos das frações eluídas por: (i) gradiente de pH entre 5,8 e 9,0 e (ii) gradiente de força iônica. As amostras resultantes das duas IECs foram fracionadas em coluna de afinidade por NAD(P)H, com gradiente de salinidade KCl 0 – 2,5M. Os resultados estão ilustrados nas Figura 19 e 20.

Figura 19: Fracionamento da hidroxilase fúngica por troca iônica, por gradiente de salinidade (A) e de pH (B). A amostra mais ativa entre as duas colunas é aquela com 100% de AMR, as demais tiveram seus valores determinados pelo valor de AMR proporcional ao desta fração. A IEC por troca iônica forte se revelou a mais adequada para obtenção de frações mais puras da hidroxilase.

Figura 20: Amostras, provenientes das IECs por troca iônica forte e fraca, fracionadas por afinidade a NAD(P)H - cromatografia por afinidade. A coluna de troca iônica fraca apresentou maior perda de hidroxilase, haja vista a elevada AMR determinada para seu volume morto. Com a coluna de troca iônica forte, observa-se aumento de rendimento no processo de purificação.

4.4.2 Luciferase de fungos bioluminescentes

A separação da luciferase fúngica foi feita a partir do precipitado da ultracentrifugação (Figuras 14 e 21, **Fração 3**):

Figura 21: Esquema representando a sequência das etapas de separação da luciferase de fungos bioluminescentes.

(a) Já dissolvida em tampão de extração contendo DDM 1,5%.

(b) Fração contendo a luciferase parcialmente purificada, utilizada nos estudos de caracterização da enzima.

* Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC) e Cromatografia por afinidade (coluna de afinidade Mimetics YELLOW[®] 1 A6XL).

Após algumas tentativas de purificação, percebeu-se ineficiência na separação da hidroxilase e luciferase fúngicas, pois observava-se emissão de luz quando amostras contendo a fração solúvel da ultracentrifugação (Esquema 2, **Fração 4**) sem adição de soluções contendo a luciferase. Não foi possível aumentar a força de centrifugação, dado que a adotada (200.000 x g) já era a máxima possível para os equipamentos que estiveram disponíveis ao longo da execução deste trabalho. Então, a alternativa foi estender a centrifugação por mais 1 h. Os resultados foram insatisfatórios, pois ainda havia indícios de traços da luciferase na fração solúvel. Somente tratamento com adição de NaCl 1,0 (Figura 21, **Fração 11**), resultou em remoção mais efetiva da luciferase na fração solúvel.

A fim de ampliar o rendimento da purificação da luciferase, cromatografias de troca iônica e de exclusão por tamanho foram aplicadas. Porém, enfrentava-se o dilema da diluição da enzima *versus* o entupimento da coluna cromatográfica. Consequentemente, cromatografias foram evitadas nas extrações seguintes, exceto aquela por afinidade (YELLOW 1TM). Mesmo assim, a separação não foi eficiente, embora a fração eluída com solução mais pura (eluída com KCl 2,5M) tenha apresentado AMR muito superior às demais (Figura 22).

Figura 22: AMR de frações eluídas da coluna de afinidade, com gradiente de força iônica, no processo de purificação da luciferase fúngica. A presença da luciferase observada e quase todas as frações eluídas sugere ineficiência da coluna em separar a enzima de interesse.

Em função dos resultados publicados por Purto e colaboradores em 2015, alterou-se a estratégia de extração dos micélios de *N. gardneri*, deixando-os imerso em 2L de água deionizada por 15 h previamente à extração. A mistura passou pelas etapas ilustradas na Figura 21, utilizando Tris-HCl 50 mM como agente tamponante da solução de extração. A eluição da amostra durante a cromatografia por afinidade foi por gradiente de força iônica (KCl 0 – 2,5 M; pH 8,5). O grupo controle teve o extrato frio preparado de forma idêntica aos micélios do grupo teste, mas não ficou de molho em água. Após separação das luciferases e hidroxilases de ambos os extratos, determinou-se a AMR para soluções das enzimas extraídas do grupo teste e do grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4: Ensaios quimiluminescentes com enzimas extraídas a partir de dois grupos de micélios: um embebido em água antes da extração (Sistema A), e o outro, não (Sistema B). As enzimas extraídas de cada sistema tiveram suas AMR determinadas nos quatro ensaios quimiluminescentes: para cada ensaio foi feita uma combinação diferente, adicionando os componentes marcados (x) na tabela.

Soluções	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
Luciferase - sistema A	x		x	
Luciferase - sistema B		x		x
Hidroxilase - sistema A	x			x
Hidroxilase - sistema B		x	x	
<u>BSA</u> 1 mg mL ⁻¹	x	x	x	x
<u>NADH</u> 1 mg mL ⁻¹	x	x	x	x
Extrato de cavalinha	x	x	x	x

Figura 23: Comparação de diferentes preparos de amostra para extração da hidroxilase e da luciferase, um embebido em água deionizada antes da extração, e o outro, obtido pelas técnicas comuns do grupo. O extrato preparado com micélios previamente hidratados apresentou atividade mais elevada, mas não ultrapassa ~10x os resultados obtidos para extratos de micélios não tratados.

As amostras referentes aos Ensaios 1 e 3 possuem em comum a presença da luciferase extraída de micélios deixados de molho em água. Analogamente, os resultados para a hidroxilase extraída deste grupo teste correspondem aos das amostras utilizadas nos Ensaios 2 e 4. Os resultados indicam que o maior rendimento do sistema previamente tratado com água é fruto dos efeitos positivos sobre a luciferase.

Após a implementação das adaptações descritas, a separação da luciferase fúngica seguiu o procedimento mostrado na figura 21. A fração 15 foi submetida à eletroforese em gel de agarose (Figura 24).

Figura 24: Purificação da Luz por eletroforese em gel de agarose. A presença da enzima foi detectada pela radiação emitida após imersão de secção do gel de agarose em solução contendo equisetumpirona. O gel foi revelado através da quimiluminescência observada para alguns pontos no gel, após sua imersão em solução contendo o substrato da luciferase de fungos bioluminescentes auxiliada por um ImageQuant LAS 4000 mini da GE.

As secções do gel contendo luciferase ativa foram reservadas para análise por espectrometria de massas. O grupo visava adquirir mais informações sobre sua composição e estrutura, porém, os resultados não foram satisfatórios.

4.5 Estudos de caracterização das enzimas

4.5.1 Cinética de consumo de NADPH pela hidroxilase

Cinquenta microlitros de solução da hidroxilase fúngica parcialmente purificada foram misturados a 100 μL de uma mistura contendo a luciferina extraída de *N. gardneri* e NADPH 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A ocorrência da reação foi acompanhada pela absorbância máxima da amostra em 340 nm, com o auxílio de um espectrofotômetro UV-Vis com leitor de placas multiwell. O controle continha os mesmos componentes, nas mesmas concentrações, com adição de água pura em lugar fração contendo a enzima avaliada.

O teste com NADPH foi realizado para verificar seu consumo na suposta, até então, primeira etapa do mecanismo da bioluminescência fúngica. A intensidade máxima de absorbância da amostra contendo NADPH em meio à hidroxilase e luciferina diminuiu (Figura 25), provavelmente, devido ao consumo deste cofator durante a reação da enzima com o substrato. O consumo de NADPH é comprovado não só pelo fato de sua necessidade no ensaio quimiluminescente do extrato quente com o extrato frio, mas também pelos espectros de absorção resultantes.

Figura 25: Espectros de absorvância do NADH na presença e ausência de redutase e luciferina antes da reação e após 15min de reação. Não houve alteração na amostra contendo somente NADH, enquanto que aquela com a mistura reacional teve sua absorvância máxima diminuída consideravelmente.

A AMR para a enzima dependente de NAD(P)H possibilitou a determinação da constante cinética de pseudoprimeira ordem observada (k_{obs}) da reação, determinada através de regressão linear da curva $\ln \text{Abs}_{340}$ vs. tempo (Figura 26). O valor determinado para k_{obs} foi $2,45 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ($r^2 = 0,9944$).

Figura 26: Variação da concentração de NADH com o tempo ($\ln A_{340}$ vs. tempo) na presença (Reação) e na ausência (Controle) de H3H e luciferina. A inclinação da curva da reação foi determinada através da regressão linear, e representa o k_{obs} da reação.

4.5.2 Determinação das massas moleculares da hidroxilase e da luciferase

Solução contendo a hidroxilase parcialmente purificada (Figura 17) foi fracionada por FPLC em uma coluna cromatográfica de exclusão por tamanho submetida a uma pressão de 1,5 MPa, sob fluxo de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. O tampão de eluição ($\text{pH} = 7,0$) foi preparado com fosfato 50 mM e NaCl 150mM. O mesmo procedimento foi feito com solução contendo a luciferase parcialmente pura (Figura 21, **Fração 15**), acrescentando DDM às soluções utilizadas até que sua concentração final fosse 1 %.

Determinou-se a massa das enzimas com base no volume eluído durante o fracionamento de proteínas de tamanho conhecido (Tabela 5), ao fracioná-las pelos mesmos métodos e com a mesma coluna. Assim, calcula-se o coeficiente de partição para cada proteína (K_{av}):

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$$

Onde V_e é o volume de eluição da amostra; V_c , o volume da coluna e V_0 , o volume morto, que corresponde ao volume de eluição do padrão azul de dextrano 2000. Uma função linear de K_{av} *versus* o logaritmo decimal da massa molecular da proteína – $\log(M_r)$, tem como coeficiente angular da reta o logaritmo decimal da massa molecular da proteína de interesse.

Tabela 5: Massas moleculares das proteínas utilizadas para construção da curva de calibração com o fim de determinar a massa molecular da luciferase fúngica por SEC.

Proteína	Ovoalbumina	<u>Coanalbumina</u>	Aldolase	Ferritina
Massa Molecular (kDa)	43	75	158	440

As massas moleculares determinadas foram (72 ± 11) kDa e (82 ± 41) kDa para a hidroxilase e luciferase, respectivamente. Estes resultados foram importantes para a otimização dos processos de purificação das enzimas, pois serviram de parâmetro para dimensionar mais objetivamente ultrafiltros para centrífuga a serem utilizados no fracionamento dos extratos.

4.5.3 Determinação da temperatura ótima da luciferase

Soluções contendo a luciferase foram submetidas ao ensaio quimiluminescente em diferentes temperaturas. Inicialmente, as amostras foram preparadas a partir da 100 μ L da solução enzimática diluída 10x em tampão fosfato, pH 8,3. Cada amostra foi incubada na temperatura teste: 20, 30, 40, 50, 60 e 70 °C), mantida sob agitação em um Thermomixer da Eppendorf por 10 minutos. Alíquotas de 40 μ L da amostra teste reagiram com 10 μ L de solução de um mimético da luciferina fúngica, a 3-hidróxibisnoriangonina, na presença de DDM 0,1 %.

A 3-hidróxibisnoriangonina é derivada da bisnoriangonina, composto precursor da hipidina em uma das vias biossintéticas já ilustradas (Figura 11). Assim como a 3-hidróxihipidina é uma alfa-pirona (Figura 27), e reage com a luciferase emitindo luz da mesma forma que a luciferina.

Figura 27: Comparativo das estruturas da hispidina, da bishnorionina e de seus derivados hidroxilados.

Em teste mais refinado, a temperatura variou entre 15 e 38 °C, tendo o valor da temperatura medido através de um termômetro digital imerso em uma solução pura do tampão fosfato utilizado, mas sob condições idênticas às das amostras. Este ensaio foi feito em triplicata, e o controle de cada amostra foi preparado substituindo a solução enzimática por tampão. A quantidade de luciferase dissolvida foi determinada pelo método de Bradford.

Maiores atividades relativas da luciferase fúngica são observadas a cerca de 21 °C (Figura 28).

Figura 28: AMR da luciferase fúngica, frente à mudança de temperatura. O pico da curva (x_c) refere-se ao valor máximo de AMR da luciferase nas temperaturas sob as quais os ensaios foram conduzidos. A maior AMR observada para a luciferase foi a $\sim 20^\circ\text{C}$.

4.5.4 Determinação do pH ótimo da luciferase

Para determinar o pH ótimo da luciferase, ensaios quimiluminescentes foram feitos com 10 μL de soluções da enzima pura adicionados a 90 μL da solução tampão a ser testada, variando os seguintes tampões e faixas de pH:

Tabela 6: Tampões utilizados na determinação do pH ótimo da luciferase.

Faixa de pH	5,0 – 6,0	6,0 – 7,0	7,0 – 8,0	8,0 – 9,0	9,0 – 11,0
Tampões	Citrato, Acetato, MES e PIPES.	Fosfato, MES e PIPES.	Fosfato, Tris-HCl e HEPES.	Fosfato, Tris-HCl e TAPS.	Tris-HCl, carbonato, CHES e CAPS.

A mistura, com volume total de 100 μL , foi incubada por 5 min a 20 °C. Em seguida, alíquota de 50 μL da amostra contendo a luciferase, acrescida de 30 μL do tampão a ser avaliado e 10 μL de solução do surfactante Triton X-100 0,2 %, reagiu com 10 μL de solução de 3-hidróxibisnoriangonina. Os ensaios foram feitos em triplicata, e os controles continham todos os componentes das amostras, exceto pela luciferase.

A luciferase de fungos só apresentou atividade significativa em meios com pH entre 6,0 e 9,0. Maiores AMRs para a luciferase fúngica são observadas em pH próximo de 8,0 (Figura 29).

Figura 29: AMR da luciferase fúngica, frente à mudança de pH. O pico da curva (x_c) corresponde ao valor da máxima AMR observada para a luciferase nos diferentes pHs das soluções testes.

A variação do tipo de tamponante não resultou em diferenças significativas na atividade da luciferase (Figura 30).

Figura 30: Estudo comparativo do efeito de diferentes espécies tamponantes, nas mesmas faixas de pH. O comportamento da luciferase variou muito de uma amostra para outra, ainda que dissolvida na mesma solução tampão.

4.5.5 Especificidade da luciferase pela 3-hidróxihipidina

Ensaio quimiluminescente (que serão descritos mais detalhadamente no item 4.6.3) trouxeram questionamento sobre a especificidade da luciferase fúngica pela 3-hidróxihipidina. Em função disto, a fração 15 (Figura 21) contendo a luciferase foi tratada com $\text{CaCl}_{2(\text{aq})}$ 10 mM. Após incubação (30 min, 4 °C), a mistura

foi fracionada por centrifugação (30.000 x g, 30 min, 4 °C). O precipitado foi dissolvido em tampão de extração e submetido a ensaios quimiluminescentes com extratos quentes contendo derivados da 3-hidróxihipidina, obtidos através de extratos vegetais (descritos no item 4.6.3). Não foi constatada atividade relevante para a luciferase até que se acrescentasse solução de β -glicosidase à mistura (Figura 31).

Figura 31: Ensaio quimiluminescente com solução contendo equisetumpirona em adicionada à luciferase parcialmente purificada após precipitação com CaCl_2 , antes e após adição de β -glicosidase. A ocorrência da reação quimiluminescente foi observada imediatamente após a adição de β -glicosidase (~600s), sugerindo que a luciferase reagiu com a 3-hidróxihipidina produzida pela eliminação dos grupos glicosilados da equisetumpirona.

4.6 Obtenção da luciferina fúngica e de seu precursor

4.6.1 Extração da luciferina de fungos bioluminescentes

Corpos de frutificação da espécie *N. gardneri*, previamente secos, foram congelados em nitrogênio líquido antes de serem triturados. O pó obtido foi homogeneizado com agente filtrante: Celite® 545 em proporção 3:2 (m/m) e a mistura foi extraída sob alta pressão (1500 psi) e temperatura (80 °C) por 15 min. Os

extratos foram preparados em um extrator ASE300 Dionex, no qual a fração eluente consistia em uma mistura de HCOOH/H₂O 0,025 % contendo β -mercaptoetanol 20 mM ou DTT 5 mM. A solução resultante era reservada para os ensaios quimiluminescentes com as enzimas.

4.6.2 Extratos vegetais como fonte de substrato para a BL fúngica

Depois de 2015, avanços nas pesquisas sobre a luciferina de fungos bioluminescentes levaram o grupo a adotar novas estratégias de obtenção do substrato. Com base no trabalho de Veit e colaboradores (1993) utilizou-se estróbilos da planta *Equisetum hyemale* (cavalinha) para obter a 3-hidróxihiispidina. Os estróbilos foram secos, congelados e triturados antes de serem homogeneizados com o solvente na presença de um agente antioxidante adequado: β -mercaptoetanol, 20 mM ou ditioneitol (DTT), 5 mM. O sistema foi agitado (600 RPM, 80 °C) por 30 min, e, em seguida, submetido à evaporação parcial ou total do solvente – metanol, etanol, solução de ácido fórmico 0,025 % ou acetona. Evaporação parcial resultou na mistura reservada para ensaios quimiluminescentes.

O extrato metanólico da cavalinha apresentou intensidade de luz emitida superior àquela do extrato de cogumelos secos, além de fornecer um dado inédito: o extrato contendo a luciferase parcialmente purificada reage diretamente com o extrato quente sem a adição de NAD(P)H (Figura 32).

Figura 32: Comparação dos extratos metanólicos da cavalinha e do cogumelo (Amostras I e II, respectivamente) após sua mistura com uma solução contendo a hidroxilase, a luciferase, BSA e NAD(P)H. A amostra III refere-se à reação do extrato da cavalinha com a luciferase sem adição da hidroxilase e NAD(P)H.

Com o intuito de identificar a substância responsável pela reação direta com a luciferase, extratos metanólicos da raiz e estróbilos da cavalinha, assim como de corpos de frutificação de *N. gardneri* foram fracionados por HPLC, acoplado a um espectrômetro de massas. As amostras coletadas foram misturadas a soluções contendo a luciferase parcialmente purificada (Figura 21, **Fração 15**), acompanhando a ocorrência da reação pela intensidade máxima de luz emitida no período de 3min (Tabela 7). Os resultados indicam que três substâncias reagem com a luciferase: uma delas, a própria luciferina fúngica. As são dois de seus derivados: a 3-hidroxihipidina-3'-glicosídeo (Figura 33, **equisetumpirona**) e a 3-hidroxihipidina-3',4'-diglicosídeo (Figura 33, **equisetumpirona glicosilada**).

Tabela 7: Compostos obtidos a partir do fracionamento de extratos do estróbilo e da raiz da cavalinha.

Órgão da planta extraído	Composto presente na fração ativa	m/z no modo negativo $[M-H]^-$	Intensidade máxima de luz emitida em 3 min (10^3 RLU s^{-1})	
			Extrato bruto ^a	Extrato fracionado ^b
Raiz	3-hidroxihipidina	261,040	4,0	0,0
	Equisetumpirona	423,093	6,0	2,0
	Equisetumpirona glicosilada	585,145	14,0	6,0
Estróbilo	3-hidroxihipidina	261,040	14,0	0,0
	Equisetumpirona	423,093	2,0	1,0
	Equisetumpirona glicosilada	585,145	30,0	14,0

Hispidina: $R^1 = H$; $R^2 = OH$;

3-Hidroxihipidina: $R^1 = R^2 = OH$;

Equisetumpirona: $R^1 = O\text{-Glicosídeo}$, $R^2 = OH$;

Equisetumpirona glicosilada: $R^1 = R^2 = O\text{-Glicosídeo}$.

Figura 33: Representação das estruturas da hispidina e de seus derivados.

O extrato metanólico da raiz não apresentou concentração mensurável de 3-hidroxihipidina, e as demais substâncias estavam presentes em proporções análogas às aquelas observadas para o extrato do estróbilo (Figura 34). Todos os compostos que apresentaram atividade frente às enzimas estavam em quantidades significativamente superiores nos estróbilos. Os extratos foram mantidos a $\sim 4^{\circ}\text{C}$ para inibir a oxidação da luciferina. Desse modo, as soluções permaneceram ativas para os ensaios quimiluminescentes por mais de um mês. As amostras com maior estabilidade do soluto correspondiam às aquelas preparadas em acetona. Portanto, os extratos quentes posteriores foram preparados com este solvente e estróbilos de cavalinha.

Figura 34: Cromatograma dos extratos do estróbilo e da raiz da cavalinha. A luciferina não estava presente em concentração mensurável pelo equipamento utilizado. As demais substâncias, em especial a equisetumpirona glicosilada, estavam em concentração significativamente superior no extrato do estróbilo.

utros extratos vegetais foram testados em colaboração com o aluno de doutorado Marcílio Martins de Moraes, do Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais no IQUSP, e com a aluna de doutorado Patrícia Dias Santos, do grupo de pesquisa da Prof. Patrícia Sartorelli (UNIFESP-Diadema). Os grupos de pesquisa em produtos naturais estavam trabalhando com plantas do gênero Piperaceae (*Piper tuberculatum*, *P. nigrum*, *P. aduncum*, *P. auritum* e *P. richardfolium*) e da espécie *Allophylus edulis*. Para este projeto era interessante avaliar fontes mais ricas na luciferina de fungos, e há relatos sobre a presença da hispidina e seus derivados em variadas espécies vegetais (Nguyen, et al. 2014). Logo, o procedimento de extração aplicado à *E. hyemale* foi repetido para estas espécies. As frações solúveis obtidas foram submetidas a ensaios quimiluminescentes com dois controles: (i) sem adição de substrato (controle negativo) a soluções contendo luciferase e BSA – para manter a estabilidade da enzima em solução; (ii) as mesmas soluções misturadas à 3-hidroxihipidina em vez do extrato vegetal (controle positivo). Ao menos metade das plantas utilizadas não apresentou indícios da presença de hispidina ou derivados, mas é possível que sua concentração nessas espécies seja insuficiente para emissão de luz mensurável. Mesmo os extratos com maiores atividades para a luciferina (Figura 35) apresentaram resultados muito aquém daqueles obtidos para a cavalinha.

Figura 35: Comparativo das AMRs para luciferase frente aos extratos de diferentes espécies vegetais. A presença da luciferina nos extratos vegetais é confirmada pela observação de luz emitida após a mistura destes com solução contendo a luciferase extraída de *N. gardneri*.

4.6.3 Extração da hispidina de fungos bioluminescentes

Esta parte foi desenvolvida em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Yuichi Oba (Universidade de Nagoya, Japão). Cerca de 3,0 g de micélio e 3,0 g de corpos de frutificação da espécie *N. gardneri*, após congelamento em nitrogênio líquido, foram triturados e homogeneizados com tampão fosfato 100 mM (pH 7,5), contendo EDTA 5 mM e β -mercaptoetanol 20 mM. Adicionalmente, o método de extração da luciferina descrito no item 4.6.1 foi usado para obter a hispidina a partir de 3,0 g de micélios e 3,1 g de corpos de frutificação do fungo *N. gardneri*. Os quatro extratos foram acidificados com 500 μ L de HCl 12 mol L⁻¹, até pH = 3,0. Depois de homogeneizadas, as misturas foram centrifugadas (17400 $\times$ g, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante de cada amostra foi extraído duas vezes com 40 mL de acetato de

etila. O solvente foi, então, evaporado sob pressão reduzida, a 40 °C. O resíduo foi dissolvido em 300 µL de acetato de etila para facilitar sua transferência para um Eppendorf, onde o solvente foi volatilizado passando um fluxo de N_{2(g)} pela solução. A presença de hispidina foi analisada via LC-MS Agilent 6460 Triplo Quadrupolo, em modo de ionização positivo. A eluição foi feita com gradiente de lipofilicidade da fase móvel, promovido pela variação de 20 a 80 % de acetonitrila em uma mistura desta com solução aquosa de ácido fórmico 0,2 %. Os resultados (Tabela 8) sugerem que a quantidade de hispidina obtida depende do método de extração e da etapa de crescimento do fungo.

*Tabela 8: Quantificação de hispidina em extratos de fungos bioluminescentes da espécie *N. gardneri*.*

Estágio de crescimento do fungo	Método de extração	Concentração de hispidina (pmol g⁻¹)*
Micélios	Manual	26
	ASE	117
Corpos de frutificação	Manual	335
	ASE	1224

4.7 Estudos mecanísticos do sistema bioluminescente de fungos

4.7.1 Investigação do mecanismo da reação luciferina-luciferase

Elucidada a estrutura da luciferina fúngica (3-hidroxihipidina), trabalhamos em colaboração com o grupo de pesquisas do Prof. Yampolsky para elucidar a estrutura da oxiluciferina e o mecanismo de emissão de luz. Da parte que coube ao projeto aqui discutido foram confirmadas a proposta de Yampolsky (Kaskov et al., 2017) para a oxiluciferina e verificada a formação da 3-hidróxihipidina a partir da 3-hidróxibisnoriangonina em meio a extratos de fungos da espécie *N. gardneri*.

A obtenção da oxiluciferina *in situ* foi conseguida através da reação por 15 minutos da 3-hidróxibisnoriangonina com extrato da luciferase parcialmente purificada a partir da precipitação da **Fração 14** (Figura 21) com CaCl_2 . A reação foi interrompida com adição de HCl 1,0 M, e os componentes insolúveis foram separados por centrifugação antes do fracionamento por cromatografia líquida de alta performance (HPLC, Shiumadzu). Análises foram feitas por um espectrômetro de massas (MicrOTOF-QII, Bruker Daltonics). Em ensaios subsequentes, a fim de contribuir para a proposta da reação *luciferina-luciferase* em fungos bioluminescentes, solução de 3-hidróxibisnoriangonina reagiu com extrato de micélios de *N. gardneri* contendo a luciferase na presença de $^{18}\text{O}_2$. As soluções a serem utilizadas no experimento foram borbulhadas com $\text{N}_{2(\text{g})}$ por alguns minutos, a fim de remover $^{16}\text{O}_{2(\text{aq})}$. Em seguida, misturou-se 50 μL da solução de 3-hidroxibisnoriangonina com 500 μL da solução contendo a luciferase. O volume final de 1 mL foi obtido pelo acréscimo da mesma solução tampão utilizada durante a extração e separação da enzima. Feito isto, borbulhou-se $^{18}\text{O}_2$ na mistura, da qual 100 μL foram separados para determinação da intensidade de luz emitida no período de 2 h. Neste intervalo de tempo, 200 μL da mistura reacional foram coletados após 0, 25, 45, 60, 105 e 120 min. Cada alíquota recebeu 200 μL de HCl para interromper a reação. Sólidos foram removidos por com auxílio de um ultrafiltro com corte de peso molecular 3000 Da. A fração solúvel passou por fracionamento e análise em um HPLC-PDA-ESI-MS. Os resultados (Figura 36) evidenciaram a presença de 3-hidróxihipidina na solução. Os espectros de massa indicaram que a oxidação da 3-hidróxibisnoriangonina produz um composto cuja massa difere daquela da luciferina em 12 unidades átomos de carbono.

Figura 36: Absorbância máxima em 375 nm (A_{375nm}) observada para a reação enzimática e para a oxiluciferina sintética (A) e seus respectivos espectros de massas (B). Fonte: Kaskov et al., 2017. A compatibilidade entre os espectros de absorvância observados em 12.2 min para as soluções analisadas sugerem que a estrutura da oxiluciferina corresponde àquela sintetizada pelo grupo do Professor Yampolsky, sendo gerada pela eliminação de um carbono da molécula de 3-hidróxi-hispidina. Esta hipótese é reforçada pela correspondência entre os espectros bio e quimiluminescente das mesmas soluções, conforme discutido por Kaskov et al., 2017.

A detecção de 3-hidróxi-hispidina na reação com $^{18}O_2$, aponta para sua formação *in situ*. Curiosamente, Nambudiri e colaboradores (1974) descreveram a produção de hispidina *in vitro* via hidroxilação da bisnoriangonina, catalisada por extrato micelial de *Polyporus hispidus* (Figura 11). Além disso, Kaskova e colaboradores (2017) notaram que a oxiluciferina se decompõe em ácido cafeico e ácido pirúvico. Por isso, 20 μ L do extrato frio (Figura 14, **Fração 1**) de fungos da espécie *N. gardineri* foram acrescentados às seguintes soluções: 40 μ L de tampão

de extração, 10 μL de ácido cafeico 40 mM, 5 μL de malonil co-A 20 mM, 10 μL de ATP 10 mM. A reação foi iniciada com acréscimo de 50 μL de NADPH 1 mg mL^{-1} , e acompanhada pela emissão de luz registrada em um luminômetro Sirius da Berthold.

A observação de crescente intensidade de luz emitida pela reação (Figura 37) comprovou a presença de 3-hidróxihispidina na solução, possível somente se houvesse hispidina no sistema. Sua formação, provavelmente, foi viabilizada pela conversão do ácido cafeico em cafeil-CoA, e é forte indício de que fungos bioluminescentes produzem hispidina através da mesma via biossintética observada para fungos que não emitem luz visível. Presume-se que ATP e Malonil-CoA atuaram na produção da hispidina. Esta sofreu hidroxilação catalisada pela hidroxilase dependente de NADH, após adição do extrato micelial de *N. gardneri*.

Figura 37: Intensidade relativa da luz emitida na ausência (Controle) e presença (Reação) de ATP e NADH.

5 DISCUSSÃO

Ao longo dos três primeiros anos deste projeto de doutorado, os esforços foram focados na purificação das enzimas consideradas essenciais ao sistema bioluminescente de fungos. Nesse sentido, as primeiras extrações foram feitas com base em trabalhos anteriores (Oliveira & Stevani, 2009). A escolha do inibidor de protease mais adequado, sem o conhecimento da estrutura das enzimas de interesse, demandaria muito investimento de tempo e dinheiro, que poderia ser evitado por abordagens de estratégias mais eficientes de purificação. Por isso, optou-se pelo uso de um coquetel de inibidores de proteases, até que o processo de purificação das enzimas estivesse bem estabelecido. Além disso, a fim de mitigar a possível ação de proteases contendo cátions metálicos como cofatores, adicionou-se aos tampões utilizados EDTA 15 mM.

A princípio as culturas de *N. gardneri* eram preparadas em meio líquido, e as quantidades de extrato frio obtido a partir delas era suficiente para ensaios iniciais. Contudo, diluições decorrentes do aumento de etapas na separação das enzimas demandaram aumento da quantidade de material de partida. O uso de membranas de diálise aderidas ao meio antes da inoculação da cultura facilitou a remoção dos micélios sem induzir a lise das células antes da adição do tampão de extração, minimizando as perdas de material proteico. Os resultados obtidos nas primeiras extrações mostraram aumento da AMR no decorrer do fracionamento do extrato enzimático, indicaram aumento do rendimento da purificação. Porém, as soluções mais puras obtidas tinham volume máximo de 2,0 mL: muito inferior ao necessário para ensaios mais reprodutivos a partir do mesmo extrato. Algumas alterações e

adaptações no procedimento trouxeram melhorias: o uso de glicerol e DDM, por exemplo, mas os avanços foram tímidos. A luciferase, em especial, por se uma enzima de membrana, apresentou maiores dificuldades de obtenção: perdia atividade rapidamente, após ser removida de seu ambiente hidrofóbico. Era comum a acentuada diminuição da intensidade de luz emitida por amostras oriundas do extrato ao longo do processo, ainda que as soluções fossem mantidas a baixas temperaturas. Outro contratempo proveniente da hidrofobicidade da luciferase era o fracionamento por cromatografias: soluções concentradas de DDM provocavam perda de atividade enzimática, mas aquelas com baixo teor de surfactante não eram capazes de dissolver o precipitado contendo o material de membrana, impossibilitando a separação da mistura por cromatografia. DDM nas proporções entre 1 e 2 % (m/v) mostrou maior eficiência. Mesmo assim, pouco tempo após a adição de detergente à amostra, a AMR para a luciferase diminuía rapidamente. Isto limitou a quantidade de ensaios possíveis a partir de uma mesma amostra, mesmo recorrendo à diminuição de temperatura.

Mesmo sem as enzimas puras prosseguiu-se com tentativas de caracterização do que se pensava ser a redutase fúngica, avaliando a velocidade de consumo do cofator NADPH. Se considerarmos a hipótese de que a redução da luciferina fúngica seria a etapa rápida do processo as cinéticas de pseudoprimeira ordem forneceram um valor baixo e pouco coerente de k_{obs} .

A determinação das massas moleculares da hidroxilase e da luciferase contribuiu para a otimização dos processos de purificação destas enzimas, pois serviram de parâmetro para dimensionar mais objetivamente ultrafiltros para centrífuga a serem utilizados no fracionamento dos extratos. Contudo, após

publicação do trabalho de Purto e colaboradores (2015) não foram realizados outros ensaios com a hidroxilase, e os valores encontrados foram colocados em cheque. De acordo com os pesquisadores, as massas dessas proteínas são inferiores aos valores mencionados na descrição dos resultados. Isto não descarta a possibilidade de haver aglomerados (dímeros, por exemplo) contendo a enzima ainda em sua forma ativa, só confirma que a solução obtida era impura.

As condições de temperatura e pH ótimos da luciferase fúngica independe do meio tamponante. A luciferase de fungos só apresentou atividade em meios com pH entre 6,0 e 9,0. Isto era esperado, visto que em extremos de pH eleva-se a probabilidade de desnaturação irreversível das enzimas. É interessante notar que o pH da solução eluente da coluna de afinidade utilizada na separação da luciferase fúngica é próximo ao valor encontrado para seu pH ótimo. Ao mesmo tempo, a enzima não perde afinidade pela fase estacionária em solução neutra (usada durante a lavagem da coluna). Então, é possível que a conformação da luciferase seja alterada pelo aumento de pH, possibilitando a sua ligação com a luciferina. Contudo, os resultados obtidos até agora não são suficientes para compreensão desta relação.

Resultados mais satisfatórios vieram após 2015, quando Purto e colaboradores publicaram um artigo descrevendo a estrutura da luciferina fúngica. O aumento do rendimento na extração e separação da luciferase decorrente da hidratação dos micélios permitiu extratos mais puros e concentrados da luciferase. Ademais, a descoberta de uma fonte mais rica de substrato (a cavalinha) garantiu a observação expressiva intensidade de luz emitida, mesmo em soluções mais diluídas da enzima de interesse. Dessa maneira, a separação da luciferase por

cromatografias de afinidade e de exclusão por tamanho foram possíveis.

A ocorrência da reação quimiluminescente do extrato da cavalinha com a luciferase fúngica sem a necessidade da hidroxilase ou do NADPH minimizou a quantidade de material necessário para os ensaios. Além disso, o tempo despendido (48 h) na obtenção de soluções parcialmente puras foi reduzido pela metade. Esta descoberta, somada à presença da hispidina e da luciferina em fungos não bioluminescentes (Nambudiri et al., 1974; Purto et al., 2015) sugerem que a hidroxilase não faz parte do sistema bioluminescente de fungos, embora seja essencial para a formação da 3-hidróxihispidina. Portanto, a purificação desta enzima foi deixada em segundo plano, priorizando estudos sobre a luciferase e sua interação com a luciferina. O extrato quente da cavalinha tinha maior quantidade de substrato em relação aos corpos de frutificação, pois os derivados da hispidina eram convertidos em luciferina pela remoção dos grupos glicosídeos. As evidências de tal fenômeno estão descritas no item **4.7.1, Figura 37**. Folhas de outras espécies vegetais extraídas não apresentaram o mesmo teor de 3-hidróxihispidina. Assim como ocorre para o gênero *Equisetum*, é provável que nas demais plantas a hispidina e seus derivados se concentrem mais em um tecido específico. Contudo, seria necessário conduzir ensaios quimiluminescentes com extratos de diferentes partes das plantas, o que não foi o foco deste trabalho.

A despeito das dificuldades em isolar a hidroxilase e luciferase fúngicas, estudos feitos em 2016 contribuíram para os avanços na elucidação do mecanismo da BL de fungos. A emissão de luz oriunda da oxidação enzimática da 3-hidróxibisnoriangonina e a detecção da 3-hidróxihispidina nas soluções submetidas aos ensaios com $^{18}\text{O}_2$, apontam para a formação *in situ* da luciferina fúngica. A

reação com oxigênio molecular junto à diferença de massa entre a luciferina e oxiluciferina (12 u) são coerentes com a proposta de descarboxilação de um intermediário na reação bioluminescente. Este mecanismo era esperado, haja vista as reações descritas para outros sistemas bioluminescentes. Além do mais, a indução *in vitro* da síntese de hispidina a partir de ácido cafeico com soluções contendo ATP, NADH e malonil-CoA demonstrou que a luciferina é reciclada no sistema bioluminescente de fungos, fomentando a emissão contínua de luz. Este dado vai ao encontro dos estudos Kaskova et al. (2017), que detectaram hidrólise da oxiluciferina, originando ácido cafeico e ácido pirúvico.

6 CONCLUSÃO

Diferente do que se acreditou por décadas, o sistema bioluminescente de fungos não é análogo ao de bactérias. A reação bioluminescente, nestes organismos, independe de uma redutase, e a hidroxilase fúngica não atua na reação quimiluminescente. Assim, o que era tido como a primeira etapa do mecanismo investigado é somente uma das fases da biossíntese da luciferina fúngica. A reprodução de resultados que sugeriam a hipótese de um mecanismo dependente de uma redutase (2009) levou o grupo a prosseguir com inúmeras tentativas de purificação desta enzima, sem sucesso. Além do mais, a proposta de um mecanismo não enzimático (Shimomura, 2006) não foi convincente, pois os estudos foram feitos em meio fortemente oxidante e não havia evidências de que o Panal era a luciferina de fungos.

O fato da luciferase ser uma enzima de membrana dificultou ainda mais sua obtenção na forma ativa. A ausência de dados sobre transcriptomas e genomas limitou os estudos para clonagem dos genes: uma das pesquisas do grupo, conduzida pelo aluno Hans Waldenmaier (Waldenmaier, 2016). O trabalho de Waldenmaier foi feito em paralelo com este, a fim de potencializar os rendimentos da separação da luciferase. O que não ocorreu, apesar dos esforços. Ainda assim, houve progressos na obtenção da luciferase em maiores concentrações, o que possibilitou alguns ensaios para sua caracterização e os experimentos que contribuíram para a elucidação do mecanismo da BL fúngica. O mecanismo proposto indica que a luciferase fúngica é uma oxigenase, assim como as luciferases de vários outros sistemas bioluminescentes. Ainda não há evidências de

que ela depende de um cofator. Logo, é possível que seu sítio ativo possua resíduos de aminoácidos aromáticos, conforme discutido no item **1.4** para oxigenases independentes de cofator.

A oxidação da luciferina é favorecida em ambiente hidrofóbico e alcalino e a liberação de ácido cafeico decorrente da descarboxilação da oxiluciferina, permite a reciclagem da hispidina. Isto esclarece a razão pela qual fungos emitem luz constantemente. Adicionalmente, o mecanismo proposto por Kaskova et al. (2017) não afeta negativamente a respiração celular. Ao contrário, além da função ecológica de atrair dispersores de esporos, a produção de oxiluciferina pode contribuir para a proteção contra EROs.

A melhor compreensão da BL fúngica favorece o desenvolvimento de novas aplicações de sistemas bioluminescentes a diversos fins. A alta sensibilidade de análises por QL, associada ao sistema bioluminescente de fungos pode ampliar as pesquisas em diferentes áreas do conhecimento, dada a importância de micro-organismos saprófitos para a agricultura e a indústria alimentícia. Além do mais, sabendo que a hispidina está presente em plantas e fungos, é possível o desdobramento de novos projetos voltados para estudos mecanísticos destes organismos.

Apesar dos poucos avanços relativos ao processo de purificação das enzimas, este projeto trouxe informações de extrema relevância para a compreensão do sistema bioluminescente de fungos.

7 BIBLIOGRAFIA

- AIRTH, R L & FOERSTER, G E. The isolation of catalytic components required for cell free fungal bioluminescence. Arch. Bioch. & Biophys. 97:567-573 (1962).
- AIRTH, R L & FOERSTER, G E. Enzymes associated with bioluminescence in *Panus stypticus* luminescens and *Panus stypticus* non-luminescens. J Bacteriol. 88:1372-1379 (1964).
- ALEXOPOULOS, C J, *et al.* Introductory Mycology. 4th ed. New York: John Wiley & Sons (1996).
- ANOUAR, E H *et al.* Antioxidant activity of hispidin oligomers from medicinal fungi: a DFT study. Molecules. 19:3489:3507 (2014).
- APRILLE, J R *et al.* Role of Nitric Oxide and Mitochondria in Control of Firefly Flash. Integr Comp Biol. 44:213-219 (2004).
- BABCOCK, G T & WIKSTROM, M. Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. Nature. 356: 301-309.
- BECHARA, E J H & STEVANI, C V Brazilian bioluminescent beetles: reflections on catching glimpses of light in the Atlantic Forest and Cerrado. An Acad Bras Sci. (2017).
- BISHOP, M L, *et al.* Clinical chemistry: techniques, principles, correlations. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins (2010).
- BITLER, B & MCELROY, WD. Preparation and properties of crystalline firefly luciferin. ABB. 72:358-368 (1957).
- BRADFORD, M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-54 (1976).
- BRONSTEIN, I *et al.* Chemiluminescent and Bioluminescent Report Gene Assay.

Anal Biochem. 219:169-181 (1994).

BULICH, A A & ISENBERG, D L. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity. ISA Trans. 20:29-33 (1981).

BU'LOCK, J D & SMITH, H G. A fungus pigment of novel type and the nature of fungus "lignin". Experientia. 17:553-554 (1961).

CAPELARI, M *et al.* Neonothopanus gardneri: a new combination for a bioluminescent agaric from Brazil. Mycologia. 103:1433-1440 (2011).

CLIPSON, N & GLEESON, D B. Fungal Biogeochemistry: A Central Role in the Environmental Fate of Lead. Curr biol. 22:R82-R84 (2012).

CONTI, E, *et al.* Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. Structure. 4:287-298 (1996).

CONTAG, C H *et al.* Visualizing Gene Expression in Living Mammals Using a Bioluminescent Reporter. Photochem & Photobiol. 66:523 – 531 (1997).

COPELAND, R A, Enzymes: a Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis. New York: Wiley-VCH. 2nd edition. (2000).

DAVIDSON, V L. Generation of protein-derived redox cofactors by posttranslational modification. Mol BioSyst, 7 (1), 29-37 (2012).

DELUCA, M & MCELROY, W D. Purification and properties of firefly luciferase. Methods in Enzymol. 57:3-15 (1978).

DESJARDIN, D E *et al.* A new bioluminescent agaric from São Paulo, Brazil. Fungal diversity. 18:9-14 (2005).

DESJARDIN, D E & BRAGA-NETO, R Mycena lacrimans, a rare species from Amazonia, is bioluminescent. Edinb J Bot. 64:275-281 (2007).

DESJARDIN, D E *et al.* Bioluminescent Mycena species from São Paulo, Brazil.

Mycologia. 99:317-331 (2007).

DESJARDIN, D E *et al.* Fungi bioluminescence revisited. Photochem Photobiol Sci. 7:170-182 (2008).

DESJARDIN, D E *et al.* Luminescent *Mycena*: new and noteworthy species. Mycologia. 102:459-477 (2010).

DI GENNARO, P; BARGNA, A & SELLO, G. Microbial enzymes for aromatic compound hydroxylation. App Microbiol Biotechnol, 90 (6), 1817-1827 (2011).

DIXON, M & WEBB, E C. Enzymes. New York: Academic Press. 2nd ed. (1964).

DUANE, W & HASTINGS, J W. Flavin mononucleotide reductase of luminous bacteria. Mol Cell Biochem. 6:53-64 (1975).

DUBOIS, R. Note sur la fonction photogénique chez le *Pholas dactylus*. C R Séanc Soc Biol Fr. 39:564-566 (1887).

FINK, A *et al.* Transmembrane domains interactions within the membrane milieu: Principles, advances and challenges. BBA-Biomembranes, 1818 (4), 974-983 (2012).

FOGEL, M & HASTINGS, J W. Bioluminescence: mechanism and mode of control of scintillon activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 69:690-3 (1972).

FRANCESCATO, L N D *et al.* Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC-ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. Talanta. 105:192-203 (2013).

GADD, G M. Interactions of fungip with toxic metals. New Phytol. 124:25-60 (1993).

GARCÍA-CAMPAÑA, A M & BAEYENS, W R G. Chemiluminescence in Analytical Chemistry. 1st ed. USA, Marcel Dekker (2001).

GAUGLITZ, G & VO-DINH, T. Handbook of spectroscopy. 1st ed. Weinheim: Wiley – VHC (2003).

- GILL, M. Pigments of fungi (Macromycetes). Nat Prod Rep. 20:615-639 (2003).
- HASTINGS, J W & GREENBERG, E P. Quorum sensing: The explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria. J Bacteriol. 181:2667-2668 (1999).
- HARVEY, E N. A History of Luminescence from the earliest times until 1900. 1st ed. Philadelphia: The American philosophical society (1957).
- INGOLD, C T & HUDSON, H J. The biology of Fungi. 6th ed. New York: Chapman & Hall (1993).
- JABLONSKI, E & DELUCA, M. Purification and properties of the NADH and NADPH specific FMN oxidoreductases from *Beneckea harveyi*. Biochem. 16:2932-2936 (1977).
- JEFFERS, E C; NICHOLS, J C & TU, S C. Complex formation between *Vibrio harvey*, luciferase and monomeric NADPH:FMN oxidoreductase. Biochem. 42:529-534 (2003).
- KASKOVA Z M *et al.* Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. Science Advances. 3 (2017).
- KHUSHBAKTOVA, Z A *et al.* Isolation of hispidin from walnut-tree fungus and its antioxidant activity. Chemistry of Natural Compounds. 32:34-37 (1996).
- KOO, J A; SCHIMDT, S P & SCHUSTER, G B. Bioluminescence of firefly: key steps in the formation of the electronically excited state for model systems. PNAS. 75:30-33 (1978).
- LAEMMLI, U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685 (1970).
- LATZ, M I *et al.* Bioluminescent response of individual dinoflagellate cells to

- hydrodynamic stress measured with millisecond resolution in a microfluidic device. J Exper Biol. 211:2865-2875 (2008).
- LEE, I K & YUN, B S. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* ssp., and their medicinal importance. The Journal of Antibiotics. 64:349-359 (2011).
- LLOYD, J E. Bioluminescent communication in insects. Annual Rev. of Entomol. p. 97-122 (1971).
- LOW, J C & TU, S C. Energy Transfer Evidence for In Vitro and In Vivo Complexes of *Vibrio harveyi* Flavin Reductase P and Luciferase. Photochem & Photobiol. 77:446-452 (2003).
- LUCKEY, M. Membrane Structural Biology: with biochemical and biophysical foundations. 1st ed. New York: Cambridge University Press (2008).
- MADIGAN, M T *et al.* Microbiologia de Brock. 10th ed. São Paulo: Pearson & Prentice-Hall (2004).
- MENDES, L F *et al.* Influence of culture conditions on mycelial growth and bioluminescence of *Gerronema viridilucens*. FEMS Microbiol. Letters. 282:132-139 (2008).
- MENDES, L F & STEVANI, C V. Evaluation of metal toxicity by a modified method based on the fungus *Gerronema viridilucens* bioluminescence in agar medium. Environ Toxicol Chem. 29:320-6 (2010).
- MCELROY, W D. The Energy Source for Bioluminescence in an Isolated System. Proc Natl Acad Sci. 33:342-345 (1947).
- NAMBUDIRI, A M D; VANCE, C P & TOWERS, G H N. Styrylpyrone biosynthesis in *Polyporus hispidus*: II. Enzymic hydroxylation of *p*-coumaric acid and bis-

noryangonin. Bioch. Et Biophys. Acta. 343:148-155 (1974).

NGUYEN, B C Q; TAIRA, N & TAWATA, S. Several herbal compounds in Okinawa plants directly inhibit the oncogenic/aging kinase PAK1. Drug Discovery & Therapeutics. 8:238-244 (2014).

OLIVEIRA, A G & STEVANI, C V. The enzymatic nature of fungal bioluminescence. Photochem Photobiol Sci. 8:1416-1421, 2009.

OLIVEIRA, A G *et al.* Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. Photochem Photobiol Sci. 11:848-852, 2012.

OLIVEIRA, A G *et al.* Circadian Control Sheds Light on Fungal Bioluminescence. Current Biology. 25:964-968 (2015).

PARK, IH *et al.* An antioxidant hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*. Arch Pharm Res. 27:615-618 (2004).

PAZMIÑO, D E T *et al.* Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. J. Biotech. 146: 9-24 (2010).

PERRIN, P W & TOWERS, G H N. Hispidin biosynthesis in cultures of *Polyporus hispidus*. Phytochem. 12:589-592 (1972).

PRAVE, P *et al.* Fundamentals of biotechnology Weinheim:VCH Verlagsgesellschaft.1st ed. (1987).

PURTOV, K V *et al.* The chemical basis of fungal bioluminescence. Angew Chem. 127:8242-8246 (2015).

REHM, H J & REED, G. Biotechnology. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.1st ed. (1987).

SAID, S & PIETRO, R C L R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa.1^a ed. (2004)

- SANDERS, I R. Mycorrhizal Symbiosis. By S. E. SMITH and D. J. READ. New Phytologist. 137:563-568 (1997).
- SANTOS, R M S; SANTOS, M F & COSTA, M F D. Quimioluminescência e Bioluminescência. Quim. Nova. 16:200-209 (1993).
- SHIMOMURA, O; GOTO, T & JOHNSON, F H. Source of oxygen in the CO₂ produced in the bioluminescent oxidation of firefly luciferin. Proc Natl Acad Sci. USA 74:2799-2802 (1977).
- SHIMOMURA, O; MUSICKI, B & KISHI, Y. Semi-synthetic aequorins with improved sensitivity to Ca²⁺ ions. Biochem. J. 261: 913-920 (1989).
- SHIMOMURA, O; KISHI, Y & INOUE, S. The relative rate of aequorin regeneration from apoaequorin and coelenterazine analogues. Biochem. J. 296: 549-551 (1993).
- SHIMOMURA, O. Bioluminescence: chemical principle and methods. 1st ed. Singapore: World Scientific (2006).
- SILVÉRIO, S C *et al.* Interference of some aqueous two-phase system phase-forming components in protein determination by the Bradford method. Anal Bioche. 421:719-724 (2012).
- SIVINSKI, J. Arthropods Attracted to Luminous Fungi. Psyche. 88:383-390 (1981).
- STAJICH, J E *et al.* The Fungi. Current Biology. 19: R840-R845 (2009).
- TRABULSI, L R. Microbiologia. 5^a ed. São Paulo: Atheneu (2008).
- TSUJI, F I. & LEISMAN, G B. K⁺/Na⁺-triggered bioluminescence in the oceanic squid *Symplectoteuthis oualaniensis*. Proc Natl Acad Sci. 78:6719-6723 (1981).
- TSUJI, F I. ATP-dependent bioluminescence in the firefly squid, *Watasenia scintillans*. Proc Natl Acad Sci. 82:4629-4632 (1985).
- TSUJI, F I. Bioluminescence reaction catalyzed by membrane-bound luciferase in the

“firefly squid,” *Watasenia scintillans*. BBA. 1546: 189-187 (2002).

TU, P T B & TAWATA, S. Anti-obesity effects of hispidin and *Alpinia zerumbet* bioactives in 3T3-L1 adipocytes. Molecules. 19:16656-16671 (2014).

TU, S C. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases. Photochem Photobiol Sci. 7:183-188 (2008).

VALIADI, M & IGLESIAS-RODRIGUEZ, D. Understanding Bioluminescence in Dinoflagellates-How Far Have We Come? *Microorganisms*. 1: 3-25 (2013).

VANCE, C P *et al.* Styrylpyrone biosynthesis of pigment and enzyme formation: I. Action spectrum and photoregulation of pigment and enzyme formation. BBA. 334:138-147 (1974).

VEIT, M *et al.* Equisetumpyrone: a styrylpyrone glucoside in gametophytes of *Equisetum arvense*. Phytochem. 32:1029-1032 (1993).

VENTURA, F F; SILVA, F T P & STEVANI, C V. História do fungo bioluminescente flor de coco (*Neonothopanus gardneri*) e efeitos das condições de cultura sobre a emissão de luz. Rev. Virtual de Química., 7:41-45 (2015).

VIANA, Y A; GARROTE FILHO, M S & PENHA-SILVA, N. Estabilização de proteínas por osmólitos. Bioscience Journal. 21:83-88 (2005).

VIVIANI, V R *et al.* The luciferin binding site residues C/T311 (S314) influence the bioluminescence color of beetle luciferases main-chain interaction with oxyluciferin phenolate. Biochem. 52:19-27 (2013).

VOET, D & VOET, J G. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons. 3rd ed. (2005).

WALDENMAIER, H E; OLIVEIRA, A G & STEVANI, C V. Thoughts on the diversity of convergent evolution of bioluminescence on earth. Int J Astrobiol. 11:335-343 (2012).

WALDENMAIER, H E. Bioluminescência fúngica: papel ecológico, purificação e

clonagem de enzimas. 146p. Tese de Doutorado em Ciências Bioquímicas – Instituto de Química da USP. São Paulo, 21/12/2016.

WEI, H A *et al.* Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxidative burst in polymorphonuclear neutrophils by caffeic acid and hispidin derivatives isolated from sword brake fern (*Pteris ensiformis* Burm.). J Agric Food Chem. 55:10579-10584 (2007).

WEITZ, H J *et al.* The effect of culture conditions on the mycelial growth and luminescence of natural bioluminescent fungi. FEMS Microbiol Letters. 202:165-170 (2001).

WEITZ, H J *et al.* Development of a novel, bioluminescence-based, fungal bioassay for toxicity testing. Environ Microbiol. 4:422-9 (2002).

WEITZ, H J. Naturally bioluminescent fungi. Mycologist. 18:4-5 (2004).

WHITE, S H. Membrane protein structure: experimental approaches. New York: Oxford University Press. 1st ed. (.1994).

WILSON, T & HASTINGS, J W. Bioluminescence. Annual Review Cell Dev Biology. 14:197-230 (1998).

WILSON, T & HASTINGS, J W. Bioluminescence: Living Lights, Lights for Living. 1st ed. England: Harvard University Press (2013).

ZHOU, Z Y & LIU, J K. Pigments of fungi (macromycetes). Nat Prod Rep. 20:615 (2010).

ZOUROB, M; ELWARY, S & TURNER, A P F. Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and mycrosystems. 1st ed., New Delhi (India), Springer-Verlag New York (2008).

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Tatiana Araujo Pereira

Local e data de nascimento: Nova Iguaçu - RJ, 07/06/1984.

EDUCAÇÃO

Ensino médio completo em 2000: Escola Estadual Francisco Antunes Filho.

Ensino Superior completo em 2009: Bacharel em Química Ambiental pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Mestrado stricto sensu completo em 2012: Mestre em ciências químicas pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Desenho Técnico completo, em 2002 e Técnico em Edificações completo em 2004:
SENAI Orlando Laviero Ferraiuolo

OCUPAÇÃO

Doutoranda no laboratório de bioluminescência de fungos (LBF).

Agência de fomento: CAPES

Vigência da bolsa: mar/2012 - mar/2016.

PUBLICAÇÕES

1. Pereira, T A, Cassio, F L, Bazito, R C. Novos Tensoativos para Dióxido de Carbono Supercrítico. In: *XXIV Semana da Química do IQ-USP, 2007, São Paulo. XXIV Semana da Química do IQ-USP*. São Paulo, 2007.
2. Cassio, F L, Pereira, T A, Bazito, R C. Novos tensoativos perfluorados à base de açúcar para fluidos supercríticos. In: *30ª. Reunião Anual da SBQ (Sociedade Brasileira de Química), 2007, Águas de Lindóia. Anais da 30ª. Reunião Anual da SBQ (Sociedade Brasileira de Química), 2007*.
3. Pereira, T A, Cassio, F L, Bazito, R C. Novos Tensoativos para Dióxido de Carbono Supercrítico. In: *15º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2007, São Carlos. 15º. SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2007*.
4. Pereira, T A, Bazito, R C, Cassio, F L, Goes, L F. Tensoativos Peracetilados em CO₂ Supercrítico: Síntese e Solubilidade. In: *32ª. Reunião Anual da SBQ (Sociedade Brasileira de Química), 2009, Fortaleza. Anais da 32ª. Reunião Anual da SBQ (Sociedade Brasileira de Química), 2009*.
5. Pereira, T A, Espósito, B P, Hernandez, R B. Danos bioquímicos e neuronais promovidos por diferentes espécies de Mn(III). In: *34ª. Reunião Anual da SBQ (Sociedade Brasileira de Química), 2011, Florianópolis. Anais da 34ª. Reunião Anual da SBQ (Sociedade Brasileira de Química), 2007*.
6. Pereira, T A, Da Silva, G E, Hernandez, R B, Forti, F L, Espósito, B P. Antitumor activity of Mn(III) complexes in combination with phototherapy and antioxidant therapy. *Biometals*, 2013, 26(3): 439 - 446.
7. Stevani, C V, Oliveira, A G, Mendes, L F, Ventura, F F, Waldenmaier, H E,

- Carvalho R P, Pereira, T A. Current Status of Research on Fungal Bioluminescence: Biochemistry and Prospects for Ecotoxicological Application. *Photochem. Photobiol.*, 2013, 89: 1318 - 1326.
8. Pereira, T A, Waldenmaier, H E, Oliveira, A G, Stevani, C V. Isolation of an enzyme involved in fungal bioluminescence. In: *18th ISBC (International Symposium of Bioluminescence and Chemiluminescence)*, 2014, Uppsala, Suécia.
 9. Kaskova, Z M, Dörr, F A, Petushkov, V N, Purtov, K V, Tsarkova, A S, Rodionova, N S, Mineev, K S, Guglya, E B, Kotlobay, A, Baleeva, N S, Baranov, M S, Arseniev, A S, Gitelson, J I, Lukyanov, S, Suzuki, Y, Kanie, S, Pinto, E, Di Mascio, P, Waldenmaier, H E, Pereira, T A, Carvalho, R P, Oliveira, A G, Oba, Y, Bastos, E L, Stevani, C V, Yampolsky I V. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. *Sci. Adv.*, 2017, 3(4): e1602847.
 10. Y. Oba, Suzuki, Y, Martins, G N R, Carvalho, R P, Pereira, T A, Waldenmaier, H E, Kanie, S, Naito, M, Oliveira, A G, Dörr, F A, Pinto, E, Yampolsky, I V, Stevani, C V. Identification of hispidin as a bioluminescent active compound and its recycling biosynthesis in luminous fungal fruiting bodies. *Photochem. Photobiol. Sci.* no prelo (2017).