
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ASPECTOS EVOLUTIVOS DA BIOLUMINESCÊNCIA DE
ELATEROIDEA (COLEOPTERA) DO BRASIL**

FREDERICO GONZALEZ COLOMBO ARNOLDI

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

Fevereiro - 2009

Frederico Gonzalez Colombo Arnoldi

ASPECTOS EVOLUTIVOS DA BIOLUMINESCÊNCIA DE
ELATEROIDEA (COLEOPTERA) DO BRASIL

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

Orientador: Dr. Vadim R. Viviani

Rio Claro

2009

“Não existem mapas confiáveis para territórios inexplorados”

Bill Gates

À minha mãe

Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP), pela auxílio financeiro.

Ao Departamento de Biologia e ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UNESP de Rio Claro, SP, pela infra-estrutura disponibilizada.

Ao Prof. Dr. Vadim R. Viviani pela orientação científica, conhecimento, laboratório e recursos disponibilizados.

Ao Prof. Dr. Yoshihiro Ohmiya, por disponibilizar seu laboratório e recursos para determinação do genoma mitocondrial de *Pyrophorus divergens*.

À profa. Dra. Marcia Regina Brochetto Braga, por disponibilizar seu laboratório e equipamentos.

Aos companheiros de laboratórios, Antônio Joaquim da Silva Neto, Rogilene Prado, Florisbela Ogawa e alunos de iniciação científica, pelo auxílio durante os experimentos de bancada e pela convivência agradável.

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina por ceder parte de seu espaço para a redação da tese.

À minha namorada Daniela M. Leme, minha mãe Marlene Arnoldi, e minhas irmãs pelo apoio e paciência.

Aos companheiros da pós-graduação pelo ambiente agradável e estimulante.

Aos funcionários do Restaurante Universitário e Biblioteca pelos serviços prestados sempre com profissionalismo.

E à todos aqueles que contribuíram para o desenvolvimento das tecnologias utilizadas nesse trabalho.

RESUMO

A partir dos coleópteros luminescentes, mais de 20 luciferases já foram clonadas e seqüenciadas. Dessas, a maioria é de lampirídeos das regiões Neártica e Paleártica, quatro de elaterídeos jamaicanos e uma de um fengodídeo asiático. Apenas outras cinco são oriundas da América do Sul, o continente mais rico em espécies de coleópteros luminescentes e o provável berço evolutivo de Lampyridae, a família com maior número de coleópteros luminescentes. Espécies desta região apresentam a maior variedade de cores de bioluminescência. No presente trabalho clonamos e seqüenciamos luciferases dos gêneros *Brasilocerus* sp., *Phrixothrix* sp. e *Taximastinocerus* sp., da família Phengodidae. Com base na análise filogenética dessas luciferases e outras já publicadas, concluímos que as luciferases das lanternas laterais e cefálicas são codificadas por genes parálogos, e propusemos um modelo para a evolução das cores da bioluminescência nessa família. Também determinamos o genoma mitocondrial de *Pyrophorus divergens*, membro da família Elateridae. A partir desse genoma e outros já publicados, analisamos a evolução da bioluminescência na superfamília Elateroidea *sensu* Lawrence e Newton (1995) e concluímos que essa pode ter surgido três vezes independentemente nesse grupo.

ABSTRACT

From luminescent Coleopteran's, more than 20 luciferases have already been cloned and sequenced. Among them, most part is from lampyrids of Nearctic and Palearctic regions, four are from Jamaican elaterids and one is from Asiatic phengodids. Just five are from South American species, the richest continent in luminescent Coleopteran's and, probably, the evolutionary cradle of Lampyridae. Species from this region display the greatest range of bioluminescence colors. At the present work, we cloned and sequenced luciferases from the genera *Brasilocerus* sp., *Phrixothrix* sp. and *Taximastinocerus* sp., from Phengodidae family. Based on the phylogenetic analysis of these genes and other already published, we concluded that head and lateral lantern luciferases are coded by paralogous genes, and we also proposed a model for bioluminescence color evolution in this family. We also sequenced the mitochondrial genome of *Pyrophorus divergens*, an Elateridae member. Based on this genome and other already published, we analysed the evolutionary history of bioluminescence in Elateroidea superfamily *sensu* Lawrence e Newton (1995) and concluded that it could have appeared three times independently in this group.

Sumário

I. INTRODUÇÃO.....	8
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1. Bioluminescência.....	10
2.2. Bioluminescência em Coleoptera.....	11
2.3. Luciferases: Estrutura e função.....	14
2.3.1. Mecanismo de produção da luz.....	14
2.3.2. Estrutura tridimensional da luciferase de <i>Luciola cruciata</i>	15
2.3.3. A origem das diferentes cores.....	17
2.3.4. Outros aspectos.....	20
2.4. Origem da atividade luminescente das luciferases de Elateroidea.....	23
2.5. Evolução da Bioluminescência em Elateroidea (Coleoptera).....	25
2.6. Análises filogenéticas.....	28
2.6.1. Os métodos de análise filogenética.....	28
2.6.2. Medidas de suporte estatístico.....	32
III. OBJETIVOS.....	34
IV. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	35
V. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
5.1. Métodos Gerais.....	36
5.1.1. Coleta de Insetos.....	36
5.1.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	36
5.1.3. Eletroforese em gel de agarose.....	37
5.1.4. Purificação de DNA.....	37
5.1.5. Clonagem de DNA.....	37
5.1.6. Transformação de bactérias.....	38
5.1.7. Extração de DNA plasmidial.....	39
5.2. Clonagem de Luciferases.....	39
5.2.1. Extração de RNA total de coleópteros luminescentes.....	39
5.2.2. Isolamento do RNAm.....	39
5.2.3. Construção da Biblioteca de cDNA.....	40
5.2.4. Isolamento dos cDNAs que codificam luciferases por PCR.....	40
5.2.5. Seqüenciamento de DNA.....	41
5.2.6. Subclonagem para expressão das luciferases de Phengodidae.....	41
5.2.7. Screening do clones de luciferase em vetores de expressão.....	42
5.2.8. Expressão heteróloga das luciferases.....	42
5.2.9. Purificação das luciferases recombinantes.....	43
5.2.10. SDS-Page.....	44
5.2.11. Western Blotting.....	44

5.2.12. Determinação da atividade luminescente.....	45
5.2.13. Análise filogenética das Luciferases.....	45
5.3. Genoma mitocondrial de <i>Pyrophorus divergens</i>	46
5.3.1. Extração de DNA genômico e mitocondrial.....	46
5.3.2. Amplificação dos genes mitocondriais 16S e COII.....	47
5.3.3. Amplificação do genoma mitocondrial.....	47
5.3.4. Clonagem dos fragmentos do genoma mitocondrial.....	48
5.3.5. Seqüenciamento do genoma mitocondrial.....	48
5.3.6. Montagem do genoma mitocondrial.....	49
5.3.7. Alinhamento e análise das seqüências.....	49
5.3.8. Busca e montagem de RNA transportadores.....	49
5.3.9. Análises filogenéticas.....	50
VI. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
6.1. Clonagem, expressão e análise evolutiva das Luciferases.....	51
6.1.1. Luciferase do corpo de <i>Phrixothrix hirtus</i>	51
6.1.2 Luciferase do corpo de <i>Brasilocerus</i> sp.....	53
6.1.3. Luciferase do corpo de <i>Taximastinocerus</i> sp.....	56
6.1.4. Análise evolutiva das novas luciferases.....	58
6.1.5. Subclonagem, expressão e purificação das luciferases do corpo de <i>P. hirtus</i> e <i>Brasilocerus</i> sp.....	66
6.2. Genoma mitocondrial de <i>Pyrophorus divergens</i>	69
6.2.1. Estrutura do genoma mitocondrial.....	69
6.2.2. Análise filogenética do genoma mitocondrial	75
VII. CONCLUSÕES FINAIS.....	80
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	82
IX. ANEXOS.....	96
9.1. Artigo publicado relativo aos dados do genoma mitocondrial de <i>Pyrophorus divergens</i>	97
9.2. Artigo em fase de publicação relativo aos dados das luciferases de Phengodidae.....	107
9.3. Resumo de outros artigos publicados em colaborações durante o período de doutoramento.....	126

I. Introdução

A Bioluminescência é um fenômeno com ocorrência nos mais diversos grupos taxonômicos, como em Bactérias, Dinoflagelados, Celenterados, Anelídeos, Moluscos, Ctenóforos, Crustáceos, Insetos, Equinodermos, Urocordados e Peixes (HASTINGS, 1983). A classe dos insetos é indubitavelmente a mais rica em espécies bioluminescentes terrestres, sendo estas encontradas entre os dípteros, colêmbolos e principalmente entre os coleópteros (HERRING, 1978; VIVIANI, 2002).

Entre os coleópteros, a bioluminescência é encontrada na superfamília Elateroidea, que é composta pelas famílias Lampyridae, Phengodidae, Homalidae, Telegeusidae, Elateridae e Trixagidae. No território brasileiro encontra-se a maior biodiversidade de espécies luminescentes no globo, com cerca de 23% das espécies descritas e representantes das 3 maiores famílias bioluminescentes de coleópteros (COSTA, 2000) - Lampyridae, Phengodidae, Elateridae -, que permanecem quase inexplorados quanto a estudos filogenéticos com bases moleculares.

Na bioluminescência de Coleópteros, as luciferases são as enzimas centrais do processo de emissão de luz a partir de luciferina, ATP e O₂. Elas catalizam a reação de emissão de luz em dois passos: 1) adenilação do grupo carboxila da D-luciferina (substrato benzotiazólico), em uma reação semelhante àquelas catalisadas pelas AMP-ligases, causando a ativação do substrato com o consumo de ATP; 2)

oxidação do adenilato de luciferina, atuando como uma oxigenase, formando CO₂ e um intermediário peroxídico de alta energia, que decai para o estado fundamental emitindo luz. A luz emitida varia de espécie para espécie e até mesmo entre as diferentes regiões do corpo de um mesmo animal (McELROY et al., 1967; WOOD, 1995; VIVIANI et al., 1999).

A evolução da bioluminescência em Coleoptera e de suas luciferases vêm sendo estudadas por alguns grupos pelo mundo. Entretanto, vários pontos ainda permanecem obscuros, entre eles, a evolução da bioluminescência em Phengodidae, especificamente na tribo Mastinocerini (Coleoptera:Phengodidae), um grupo exclusivamente Sul Americano, e o aparecimento dessa bioluminescência nas diferentes famílias.

Além de curiosidade científica, a clonagem de novas luciferases, assim como o conhecimento de sua evolução, geram bases mais sólidas para o entendimento de algumas características com interesse biotecnológico dessas enzimas como, por exemplo, a sensibilidade ao pH e os mecanismos de modulação da cor emitida (VIVIANI, 2008).

II.Revisão Bibliográfica

2.1. Bioluminescência

A bioluminescência é o processo de emissão de luz fria visível por organismos vivos e ocorre em várias taxa, entre eles: Bactérias, Fungos, Dinoflagelados, Celenterados, Anelídeos, Moluscos, Ctenóforos, Crustáceos, Insetos, Equinodermos, Urocordados e Peixes (HASTINGS, 1983).

A classe dos insetos é indubitavelmente a mais rica em espécies bioluminescentes terrestres, sendo estas encontradas entre os dípteros, colêmbolos e principalmente entre os coleópteros (HERRING, 1978; VIVIANI, 2002), e ainda duvidosamente encontrada em homópteros (HARVEY, 1952; LLOYD, 1971)

Quatro funções biológicas principais foram sugeridas para o fenômeno da bioluminescência: iluminação, defesa, comunicação sexual e atração de presas (LLOYD, 1978; HASTINGS, 1991).

Estudos na área evidenciaram que tanto as enzimas, genericamente chamadas de luciferases, como os substratos, genericamente chamados de luciferinas, têm composições e estruturas diferentes em diferentes taxa (HASTING, 1983; HADDOCK, 2006). Em alguns organismos existem ainda proteínas acessórias no processo de emissão de luz como, por exemplo, as "green fluorescent proteins" ou GFPs (WILSON e HASTINGS, 1998). Somando esses fatores à descontinuidade

filogenética existente entre os grupos bioluminescentes, acredita-se que a bioluminescência tenha surgido, independentemente, até 30 (HASTING, 1983) ou 40 vezes (HADDOCK, 2006) no curso da evolução, e ao menos três vezes entre os insetos (VIVIANI, 2002).

Alguns estudos mais antigos sugeriram que a bioluminescência surgiu acidentalmente como um mecanismo de proteção contra a ação tóxica do oxigênio, que tinha concentração crescente na atmosfera devido ao surgimento da fotossíntese (SELIGER e McELROY, 1965). Hipóteses posteriores propuseram que as luciferases surgiram durante os primórdios de vida na terra a partir de oxigenases de função mista, envolvidas no processo de oxidação de compostos aromáticos insaturados (SELIGER, 1975; SELIGER, 1987). A visão mais moderna sugere que a maioria das luciferases não surgiu das oxigenases e sim que a característica bioluminescente direcionou a evolução das novas funções oxigenásicas (WOOD, 1995; HASTINGS e WOOD, 2000).

No caso da bioluminescência de Coleoptera, é muito provável que as luciferases tenham evoluído por duplicação gênica a partir de uma acil-CoA ligase que tinha outra função (WOOD, 1995).

2.2. Bioluminescência em Coleoptera

Entre os coleópteros, a bioluminescência é encontrada na superfamília Elateroidea, que é composta pelas famílias Lampyridae, Phengodidae, Homalidae, Telegeusidae, Elateridae e Trixagidae (LAWRENCE e NEWTON, 1995).

A família Elateridae é a maior família dentro de Elateroidea, incluindo aproximadamente 400 gêneros e 9000 espécies. Desses, a maior parte é não luminescente, sendo os membros bioluminescentes encontrados apenas na

subfamília Agrypinae. A taxonomia, incluindo o número de subfamílias e as relações de parentesco entre elas são ainda muito discutidas (COSTA, 1975; COSTA, 1979; COSTA et al., 1988; SAGEGAMI-OBA et al., 2007a).

Luciferases de membros dos gêneros *Pyrophorus* (STOLZ et al., 2003) e *Pyrearinus* (VIVIANI et al., 1999b) já foram clonadas.

A última revisão sistemática da família Lampyridae foi feita por McDermott (1964). Lawrence e Newton (1995) incluíram a antiga superfamília Cantharoidea (Lampyridae, Cantharidae, Lycidae, Phengodidae, Homalisidae, Telegeusidae) em Elateroidea, e removeram a subfamília Rhagophthalminae de Lampyridae, incluindo-a em Phengodidae. A família Lampyridae apresenta cerca de 100 gêneros e 2.000 espécies distribuídas pelo mundo. Segundo Lloyd (1978), a América do Sul é o provável berço evolutivo da família. No Brasil ocorrem cerca de 31 gêneros e 350 espécies descritas (COSTA et al., 1988).

Somente alguns estudos bionômicos e morfológicos foram realizados com os gêneros Sul Americanos de lampirídeos *Aspisoma*, *Cratomorphus*, *Bicellonychia* (COSTA et al, 1988; VIVIANI, 1989; VIVIANI, 2001).

Os primeiros trabalhos enfocando as prováveis relações filogenéticas em lampirídeos com base em seqüências moleculares foram desenvolvidos a partir de genes mitocondriais (SUZUKI et al., 2002; CHOI et al.,2003; BAE et al, 2004), entretanto, com reduzido número de espécies e restritos às regiões asiáticas. Recentemente, Stanger-Hall et al. (2007) publicaram trabalho sobre as relações filogenéticas de membros Norte Americanos de Lampyridae. Alguns trabalhos recentes (SAGEGAMI-OBA et al., 2007; BOCAKOVA et al., 2007), com principal enfoque na evolução da bioluminescência, neotenia e aposematismo em Coleoptera, também vêm auxiliando na elucidação das relações filogenéticas dentro de

Lampyridae, entretanto, nenhum estudo com espécies brasileiras representativas foi ainda realizado.

O genoma mitocondrial da espécie japonesa *Pyrocoelia rufa* (Lampyridae) foi determinado e caracterizado. Apresenta 17.739 pb, composição (13 genes codificando proteínas mitocondriais, 22 genes de tRNA, 2 subunidades de rRNA), distribuição e orientação gênica idênticas ao DNAm de *Drosophila yakuba*. A análise filogenética desse genoma com o de outros insetos suporta a monofilia dos grupos Endopyterigota, Mecoptera, Diptera, Lepidoptera e Coleoptera (BAE et al., 2004).

Várias luciferases de diferentes regiões do planeta oriundas de membros de diferentes gêneros e subfamílias da família Lampyridae já foram clonadas (FRAGA, 2008).

A família Phengodidae, outra que apresenta coleópteros bioluminescentes, contém cerca de 35 gêneros e 200 espécies; no Brasil ocorrem aproximadamente 11 gêneros e 49 espécies (WITTMER, 1976). Essa inclui as subfamílias Phengodinae (Americana) e Rhagophthalminae (Asiática). Dentro de Phengodinae existem duas tribos: Phengodini e Mastinocerini.

As larvas e fêmeas larviformes de Phengodidae apresentam 11 pares de lanternas em seu corpo, enquanto os machos adultos podem ou não apresentar lanternas, dependendo do grupo (VIVIANI e BECHARA, 1997). As larvas e fêmeas larviformes da tribo Mastinocerini, além de apresentarem onze pares lanternas no corpo emitindo cores na região do verde/amarelo, apresentam um par de lanternas na cabeça emitindo luz com cores deslocadas para o vermelho, sendo as espécies de *Phrixothrix* um caso particular por emitirem a única bioluminescência naturalmente na região do vermelho (VIVIANI e BECHARA, 1997).

A larva e a fêmea adulta de *Phrixothrix hirtus* emitem luz amarela ($\lambda_{\text{máx}} = 574$ nm) através dos onze pares de lanternas localizadas dorso-lateralmente ao longo do corpo, e luz vermelha ($\lambda_{\text{máx}} = 628$ nm) pelas lanternas cefálicas (VIVIANI e BECHARA, 1997). Em *Phrixothrix viviani*, elas emitem luz verde pelas lanternas laterais ($\lambda_{\text{máx}} = 542$ nm) e vermelha pelas lanternas da cabeça ($\lambda_{\text{máx}} = 620$ nm). As luciferases da cabeça de *P. hirtus* ($\lambda_{\text{máx}} = 628$ nm) e das lanternas laterais de *P. viviani* ($\lambda_{\text{máx}} = 542$ nm) foram clonadas e seqüenciadas, apresentando 71% de identidade (VIVIANI et al., 1999), entretanto as duas isoenzimas de uma mesma espécie ainda não foram isoladas.

Li et al. (2007) clonaram e seqüenciaram o genoma mitocondrial de duas espécies bioluminescentes de Rhagophthalminae: *Rhagophthalmus ohbai* e *R. lufengensis*. Como esperado, na análise filogenética com todas as proteínas mitocondriais, essas espécies foram agrupadas com o também bioluminescente *Pyrocoelia rufa* (Lampyridae), outro membro de Elateroidea, enquanto os demais Coleoptera com genoma mitocondrial determinado, que pertencem a Cucujiformia, ficaram agrupados em outro ramo.

2.3. Luciferases: Estrutura e função

2.3.1. Mecanismo de produção da luz

Na bioluminescência, as luciferases são as enzimas centrais do processo de emissão de luz a partir de luciferina, ATP e O₂. No caso dos coleópteros elateróides, as luciferases catalisam dois passos principais: 1) adenilação do grupo carboxila da D-luciferina, em uma reação semelhante àquelas catalisadas pelas AMP-ligases, causando a ativação do substrato com o consumo de ATP; 2) oxidação do adenilato de luciferina, atuando como uma oxigenase, formando um composto intermediário

peroxídico de alta energia que decai para seu nível de energia fundamental emitindo luz e CO_2 (Figura 2.1). A luz é emitida com grande eficiência e seus comprimentos de ondas variam de espécie para espécie e até mesmo entre as diferentes lanternas do corpo de um mesmo animal (McELROY et al., 1967; WOOD, 1995; VIVIANI et al., 1999).

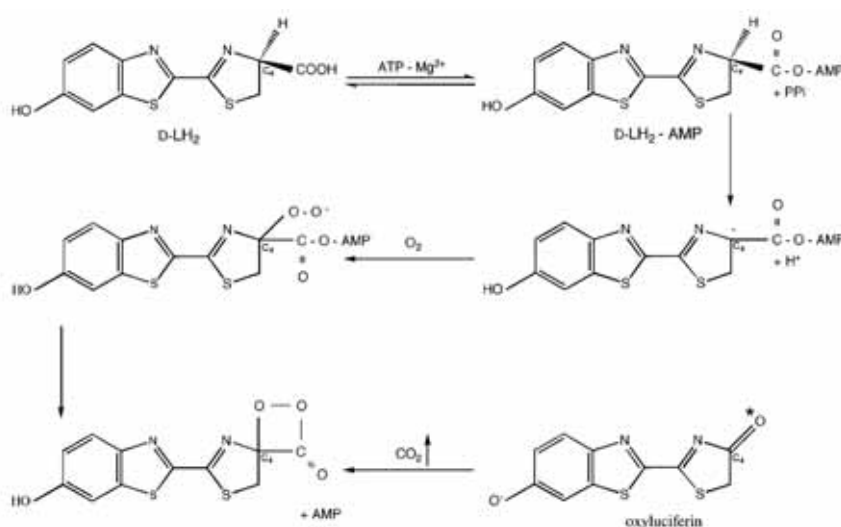


Figura 2.1. Etapas da reação de emissão de luz na bioluminescência em Elateroidea. Figura extraída de Fraga (2008).

2.3.2. Estrutura tridimensional da luciferase de *Luciola cruciata*

Nakatsu et al. (2006) determinaram a estrutura tridimensional da luciferase do vaga-lume *Luciola cruciata* – LcrLuc(WT) - complexadas com um análogo do adenilato de luciferina, 5'-O-[N-(desidroluciferil)-sulfamoil]adenosina (DLSA), com MgATP e com Oxiluciferina e AMP (figura 2.2). Também foi determinada a estrutura do mutante S286N complexada com DLSA. O que se verificou é que a conformação da luciferase selvagem complexada com DLSA é ligeiramente diferente daquelas estruturas de luciferases previamente publicadas (1LCI e 1BA3), e muito semelhante àquelas de peptídeo sintetases não ribossomais como, por exemplo, Fenilalanina

sintetase (PheA) em complexo com substrato e Dihidroxibenzoato-AMP ligase (Dhbe) com ou sem seu substrato.



Figura 2.2. Estrutura da luciferase de *Luciola cruciata* (PDB 2D1R) complexada com oxiluciferina e AMP. Seta indica o posicionamento da oxiluciferina no interior hidrofóbico da enzima.

Na estrutura LcrLuc(WT)-DLSA, o análogo do adenilato de luciferina está localizada em uma região hidrofóbica composta pelos seguintes resíduos de aminoácidos: $\alpha 8$ (248-260), $\beta 12$ (286-289), $\beta 13$ (313-316), $\beta 14$ (339-342), $\beta 15$ (351-353) e um loop (343-350), enquanto a entrada da região é bloqueada pela porção adenosina do DLSA. A porção benzotiazólica do DLSA está em contato com as cadeias laterais da Phe249, Thr253, Ile288, Ala350 e com a cadeia principal das regiões $\beta 13$ e $\beta 14$. Uma molécula de água está ligada por uma ponte de hidrogênio com o nitrogênio N3' do DLSA (2.83Å) e ao oxigênio gama da Ser349 (2.7Å).

Os autores enfatizam uma alteração conformacional onde, na estrutura da

LcrLuc(WT)-DLSA, a porção β 12 está muito mais próxima do sítio ativo da luciferina do que nas demais estruturas, principalmente o Carbono α da Ile288, que está 1.5Å mais próximo. Os autores sugerem que essa diferença deve ser devida a uma alteração na rede de pontes de hidrogênio envolvendo a cadeia lateral da Ser286, onde no complexo LcrLuc(WT)-AMP-oxiluciferina a cadeia lateral de Ser286 faz uma ponte de hidrogênio com Glu313, enquanto na estrutura da LcrLuc(WT)-DLSA essa ponte de hidrogênio não está presente. No lugar dessa, a Ser286 do complexo LcrLuc(WT)-DLSA forma pontes de hidrogênio com Tyr257 e Asn231 via uma molécula de água; uma rotação de 6° da cadeia lateral da Phe249 em direção ao DLSA também ocorre, gerando uma forma mais fechada do sítio ativo. Nessa conformação, o anel benzotiazólico está firmemente estabilizado dentro desse bolsão hidrofóbico, com as cadeias laterais de Ile288 e Phe249 de um lado, e a cadeia lateral de Ala350 e a cadeia principal da Gly341 de outro. Essas observações sugerem que a enzima selvagem sofre uma alteração conformacional durante a catálise, gerando, através do movimento da cadeia lateral da Ile228, um sítio ativo extremamente hidrofóbico para o estado excitado da luciferina, resultando em emissão de luz na região do verde.

No mesmo trabalho, os autores também publicaram a estrutura do mutante Ser286Asn complexado com DLSA. Esse mutante, segundo os autores, não apresenta a alteração conformacional que gera a forma mais fechada do sítio ativo e emite luminescência na região do vermelho.

2.3.3. A origem das diferentes cores

A relação entre estrutura da luciferase e a cor da luminescência é uma dos tópicos mais discutidos atualmente na literatura especializada. As principais bases

para essa discussão vêm de estudos da comparação de luciferases que emitem cores distintas, construção de quimeras e mutagênese sítio-dirigida (VIVIANI, 2002).

Vários modelos tentam explicar a origem das diferentes cores produzidas pelas diferentes luciferases. Entre eles, podemos citar (1) a presença de resíduos básicos no sítio ativo, determinando os tautômeros emissores da oxiluciferina (WHITE et al., 1969); (2) a polaridade do sítio ativo (DeLUCA, 1969); (3) o ângulo de rotação dos anéis da oxiluciferina (McCAPRA et al., 1994).

O modelo de White et al. (1969) propõe que os tautômeros cetona e enolato da oxiluciferina emitem diferentes comprimentos de onda, aproximadamente $\lambda_{\text{máx}} = 620\text{nm}$ e $\lambda_{\text{máx}} = 550\text{-}570\text{nm}$, respectivamente. Segundo esse modelo, as diferentes cores da bioluminescência são o resultado de diferentes proporções dessas duas formas emissoras.

Ugarova et al. (2005) propuseram uma atualização desse modelo baseando-se em medições do espectro de emissão da luciferase selvagem de *Luciola mingrelica* e seu mutante His433Tyr em diferentes pH. De acordo com esse estudo, o modelo de White et al. (1969) não é suficiente para explicar os dados obtidos nos experimentos. A adição de mais uma forma emissora ao modelo, a forma enol protonada, completaria o modelo de White e explicaria 99% de todos os espectros emitidos pelo selvagem e mutante His433Tyr de *L. mingrelica*. Segundo esse novo modelo, a cor da bioluminescência seria determinada por diferentes proporções dos tautômeros cetona, enol e enolato, que devem emitir comprimentos de onda de $\lambda_{\text{máx}} = 618\text{nm}$, $\lambda_{\text{máx}} = 587\text{nm}$ e $\lambda_{\text{máx}} = 556\text{nm}$, respectivamente.

Branchini et al. (2002) verificaram que a reação com 5,5-dimetil-oxiluciferina - que não deve sofrer tautomerização, permanecendo apenas na forma cetônica - é capaz de emitir luz tanto na região do verde-amarelo quanto na região do vermelho

e que, portanto, o modelo de White et al. (1969) não explica as diferentes cores emitidas. Pelo contrário, os autores acreditam que esses dados suportam o modelo proposto por McCapra et al. (1994), onde a determinação da cor da luz emitida é resultado da rotação dos anéis da oxiluciferina. Com os anéis em ângulo de 90°C, a emissão ocorre na região do vermelho, enquanto com esses no mesmo plano, a emissão ocorre na região do verde-amarelo.

Suportando o modelo da polaridade do sítio ativo determinar a cor da bioluminescência (DeLUCA, 1969), pode-se citar, entre outros, os trabalhos de Orlova et al. (2003), Viviani et al. (2006) e Tafreshi et al. (2007).

Viviani et al. (2006) analisaram o sítio ativo das luciferases do corpo de *Phrixothrix viviani* e da cabeça de *P. hirtus*, emissoras de luz na região do verde e vermelho respectivamente. Por estudos de fluorescência do sítio ativo, os autores observaram que a luciferase de *P. hirtus* (vermelha) tem sítio ativo mais polar do que a luciferase de *P. viviani* (verde). Como os resíduos que devem interagir com o substrato e a luciferina são idênticos em ambas, é sugerido no trabalho que a diferença provavelmente decorre das substituições C311T, I334L, I348L e C344S, localizadas no lado benzotiazólico do sítio ativo. Além da menor hidrofobicidade, essas substituições geram um sítio ativo mais apertado na luciferase de *P. hirtus*, o que pode explicar o menor Km para luciferina nessa.

Tafreshi et al. (2007), através da inserção de uma Arginina na posição 356 - presente apenas na luciferase vermelha de *P. hirtus* - da luciferase de *Lampyris turkestanicus*, conseguiram um mutante com emissão de luz bimodal e máximo de emissão em $\lambda_{\text{máx}} = 616$ nm. Esse mutante ainda apresentou maior resistência a temperaturas mais elevadas, com temperatura ótima em 34°C, enquanto a mesma luciferase selvagem apresenta temperatura ótima em 24°C. Os autores acreditam

que ambas as alterações, emissão na região do vermelho e aumento na temperatura ótima, sejam produtos de uma nova interação iônica entre a Arg334 e o Glu354. Segundo eles, essa nova interação deve estabilizar a estrutura terciária da enzima sob variações de temperatura e aumentar a exposição do sítio ativo ao solvente.

De acordo com cálculos teóricos baseados na estrutura da oxiluciferina, Orlova et al. (2003) sugerem que o grau de polarização dos grupos fenol e ceto/enol, em função do microambiente do sítio ativo, determinam os espectros de bioluminescência.

Por outro lado, Branchini et al. (2004), através de mutagênese sítio dirigida, demonstrou a importância e a participação dos resíduos R218, H245, G246, T343 e K529 no sítio ativo da luciferase de *P. pyralis*. Com base nesses resultados, propuseram um mecanismo alternativo de modulação da cor da bioluminescência de coleópteros. Esse novo modelo propõe que as luciferases modulam a cor da bioluminescência através do controle da ressonância do ânion cetônico do estado excitado da oxiluciferina.

2.3.4. Outros aspectos

Independentemente de determinar qual modelo melhor explica as diferentes cores emitidas, outros estudos, utilizando mutações pontuais, vêm analisando o papel de diferentes resíduos na sensibilidade ao pH e à temperatura, funcionamento da enzima e mesmo na emissão de diferentes cores.

Estudos de Withe et al. (1996) e Kitayama (2003) haviam apontado para a importância do resíduo 354 na sensibilidade à temperatura e ao pH. Viviani et al. (2005) clonaram a luciferase de *Macrolampis sp2.*, que apresenta um espectro bimodal com máximo de emissão em $\lambda = 569\text{nm}$ e um ombro na região do vermelho.

Mutagêneses sítio dirigidas mostraram que a substituição natural E354N de *Macrolampis* sp2. é a responsável por esse ombro na região do vermelho. O autores acreditam que a ponte salina entre E354 e H310, presente na luciferase de *P. pyralis* e ausente em *Macrolampis* sp2., possa explicar esses resultados. Possivelmente, a ausência dessa interação poderia liberar o loop 352TPEGDDKP358 e permitir a entrada de água no sítio ativo ou, simplesmente, deixar o subdomínio B da luciferase mais afastado do sítio ativo, resultando em emissão de luz vermelha.

Nesse mesmo artigo, os autores ainda apontaram para a importância da interação entre R337 e E311 na determinação da cor, onde o mutante E311A apresentou deslocamento do pico de emissão para o vermelho.

No que se trata ao funcionamento dessas enzimas, através da deleção do domínio C-terminal, Zako et al. (2003) demonstraram que o domínio N-terminal (1 - 437 aa) da luciferase de *P. pyralis* deve conter o sítio de ligação tanto do ATP quanto da D-Luciferina, já que na presença desses, a luciferase excisada de seu domínio C-terminal, apesar de ter sua atividade significativamente reduzida, apresenta emissão de luz com comprimento de onda ao redor de $\lambda_{\text{máx}}=620\text{nm}$, independente do pH. Essa emissão não é estabilizada por Coenzima A (CoA). Um ponto interessante desse estudo é que esse mutante necessita de um longo tempo (alguns minutos) até que sua emissão atinja seu máximo, em contraste com a luciferase selvagem, onde menos de um segundo é necessário.

Mais recentemente, Ayabe et al. (2005), tentando esclarecer esses resultados, monitoraram a quantidade de adenilato de luciferina e a intensidade luminescente em diferentes reações. Os autores verificaram que o maior tempo necessário para que a luminescência do domínio N-terminal atinja seu máximo é proporcional a concentração de adenilato de luciferina no meio, e que o domínio C-terminal não é

essencial para a atividade adenilásica da enzima. Entretanto, concluem os autores, esse domínio deve ser importante na estabilização do intermediário adenilato de luciferina dentro da luciferase, impedindo sua liberação para o meio, garantindo alta eficiência da oxidação e, conseqüentemente, da emissão de luz.

Fujii et al. 2007, através de mutagêneses randômica e sítio dirigida, conseguiram mutantes da luciferase de *Photinus pyralis* (Ile423Leu, Aps436Gly, Leu530Arg) com atividade luminescente até 12.5 vezes maior que a da enzima selvagem, apenas com pequena alteração do pico de emissão (552nm). Os resíduos Ile423, Asp436 e Leu530, localizados ou no loop de ligação entre os domínios C e N terminais ou na interface entre ambos os domínios, foram os que se destacaram no aumento da emissão. Os resultados mostraram que a mutação de Ile423 por resíduos mais hidrofóbicos resultaram em aumento da atividade luminescente. As mutações na posição Asp436 por resíduos de aminoácidos com cadeias laterais pequenas resultaram em um aumento na atividade, enquanto por aqueles com cadeias laterais maiores resultaram em decréscimos na atividade. Os mutantes na posição Leu530 com resíduos positivamente carregados também aumentaram a atividade. Segundo os autores, essa enzima mutante deve ser capaz de detectar até 10^{-18} mols de ATP, equivalente a quantidade de ATP em um única célula bacteriana.

Viviani et al. (2007), através de estudos de mutagêneses sítio dirigida, obtiveram evidências de que o loop 223-235 pode funcionar como um ponto de entrada para solvente no sítio ativo da luciferase. Segundo os autores, os resíduos desse loop, principalmente 227(Y/F/V)G(N/T)229, são importantes na determinação da cor da luminescência emitida e à sensibilidade ao pH. O mecanismo proposto é de que nas pH sensitivas esse loop é estabilizado por forcas hidrofóbicas, uma lábil rede de pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas do resíduo 230, que

poderiam ser desestabilizadas ou enfraquecidas por mudanças de pH ou temperatura. Já nas luciferases pH insensitivas, esse loop tem maior estabilidade por interações hidrofóbicas mais fortes e um melhor empacotamento dos resíduos, conferindo maior estabilidade às mudanças de pH ou temperatura.

2.4. Origem da atividade luminescente das luciferases de Elateroidea

As luciferases de Coleópteros são classificadas como acil-CoA sintetases. A evolução delas é ainda objeto de especulações, entretanto, em 1967, McElroy et al. apontaram para as similaridades nos mecanismos funcionais da luciferase de *Photinus pyralis* e as aminoacil-tRNA sintetases e acil-CoA sintetases de ácidos graxos. Décadas depois, com as primeiras clonagens de cDNAs de luciferases (De WET et al., 1985; MASUDA et al., 1989), verificou-se a similaridade dessas com a família das AMP-ligases, que incluem, entre outras, as 4-coumarato CoA ligases de plantas e as acil-CoA sintetases de ácidos graxos (SCROEDER, 1989; SUZUKI et al., 1990; SCHOLTEN et al., 1991; FUJINO e YAMANOTO, 1992). Vários outros dados vêm suportando esse próximo parentesco entre luciferases e acil-CoA sintetases.

Viviani e Bechara (1996) identificaram uma enzima fracamente luminescente nos extratos do corpo gorduroso da larva de *Tenebrio molitor*, um coleóptero não luminescente, entretanto, a natureza dessa enzima ainda não está esclarecida.

Oba et al. (2003) verificaram que as luciferases de vaga-lume são enzimas bifuncionais, isto é, tanto produzem luz como podem sintetizar acil-CoA de cadeias médias e longas. Alguns ácidos graxos insaturados são catalisados com grande eficiência, sendo o ácido araquidônico o de maior atividade (98%).

Com a determinação do genoma da mosca da fruta, observou-se uma semelhança de 41% entre a luciferase de *P. pyralis* e o produto do gene CG6178 de *D. melanogaster* (VIVIANI, 2002). Oba et al. (2004) isolaram e caracterizaram bioquimicamente esse gene, revelando semelhanças de propriedades com as luciferases, incluindo especificidade ao ATP, dependência ao pH e temperatura ótima. Embora tenha apresentado inúmeras semelhanças, esse produto gênico não apresentou atividade luminescente com D-Luciferina. Desde então, outras seqüências oriundas de projetos genomas vêm apresentando similaridade com as luciferases.

Ainda suportando essa hipótese, Oba et al. (2006b) clonaram dois genes evolutivamente próximos, porém parálogos, das luciferases de Coleoptera em *Luciola cruciata*. Esses genes apresentaram atividade de acil-CoA sintetases, entretanto, não apresentaram atividade luminescente. Logo em seguida, seguindo a mesma metodologia, Oba et al. (2006a) também clonaram genes, provavelmente parálogos, em *Tenebrio molitor*, um besouro não luminescente e filogeneticamente distante dos coleópteros luminescentes. As três seqüências isoladas apresentaram tamanhos semelhantes as luciferases (526, 544 e 545 resíduos de comprimento) e significativa similaridade com a luciferase de *Photinus pyralis* (34 - 43%). Duas delas, as mais similares, ainda apresentaram a seqüência endereço de peroxissomos (SKL), como as luciferases. Nenhum desses clones revelou atividade luminescente com D-luciferina, mas apresentaram atividade de acil-CoA sintetases. Mais recentemente, Oba et al. (2008) clonaram genes homólogos, dessa vez provavelmente ortólogos, de luciferases em *Agrypnus binodulus*, um elaterídeo não luminescente. Embora tenham apresentado maior similaridade (55%) e proximidade evolutiva com as luciferases de elaterídeos do que essas últimas apresentam com

as luciferases de Lampírideos, a expressão heteróloga desse gene em *E. coli* só apresentou atividade de acil-CoA sintetase, não apresentando atividade luminescente.

Com a intenção de melhor compreender a origem química da atividade luminescente, Viviani e Ohmiya (2006) estudaram a quimioluminescência do adenilato de luciferina. Os autores observaram que embora a quimioluminescência vermelha ($\lambda_{\text{máx}} = 636\text{nm}$) do adenilato de luciferina em meio aquoso seja muito fraca, essa é intensificada por três ordens de magnitude quando em presença de soroalbumina bovina (BSA), além de ter seu máximo de emissão deslocado um pouco para o azul ($\lambda_{\text{máx}} = 622\text{nm}$). A BSA, entretanto, é incapaz de catalizar a reação a partir de D-luciferina e ATP. Segundo os autores, os sítios de ligação aos substratos da BSA são porções hidrofóbicas capazes de acomodar anéis aromáticos, podendo assim estabilizar a luciferina. Essas características devem permitir a ligação do adenilato de luciferina a um ambiente mais hidrofóbico, explicando o efeito intensificador da quimioluminescência. Com base na hipótese de que a emissão de luz vermelha necessita de um meio menos estruturado do que a emissão de luz verde, o surgimento da bioluminescência deve ter ocorrido, segundo os autores, a partir de uma seqüência de passos na qual a emissão de luz vermelha tenha sido o primeiro deles.

2.5. Evolução da Bioluminescência em Elateroidea (Coleoptera)

Dentro da superfamília Elateroidea, quatro famílias certamente apresentam membros bioluminescentes: Lampyridae, Elateridae, Homalidae e Phengodidae (LAWRENCE e NEWTON, 1995). Embora os mecanismos de produção da luz sejam os mesmos em todos os Coleópteros (VIVIANI, 2002), provavelmente esses

mecanismos tenham surgido independentemente durante a evolução desses grupos (BRANHAM e WENZEL, 2003; ARNOLDI et al., 2007; BOCAKOVA et al., 2007; SAGEGAMI-OBA et al., 2007b).

Sagegami-Oba et al. (2007a), através do marcador nuclear 28S, deram forte suporte à hipótese de independência da bioluminescência da família Elateridae em relação a de outros Elateroidea.

Em extensivo estudo filogenético baseado nos genes nucleares 18S e 28S e mitocondriais COX1 e 16S de 112 espécies de coleópteros, Bocakova et al. (2007) indicaram que bioluminescência em Coleópteros pode ter surgido até 4 vezes independentemente, excluindo-se ainda o relato de Costa et al. (1986) da presença de bioluminescência no gênero *Xantholinus* da família Staphylinidae. Segundo esses autores, a distância e descontinuidade filogenética entre (Phengodinae + Rhagophthalminae) e Lampyridae indicam a independência da bioluminescência desses dois grupos, tendo então surgido duas vezes independentemente dentro de Cantharoidea *sensu* Crowson (1972). Os resultados desse trabalho ainda suportam o conceito de Elateroidea *sensu* Lawrence e Newton (1995), não encontrando razões para considerar Elateroidea e Cantharoidea, *sensu* Crowson (1972), como diferentes grupos taxonômicos. Outro ponto importante desse trabalho para a elucidação da evolução da bioluminescência em coleópteros é que, embora tenham utilizado diferentes métodos para o alinhamento de seqüências e para a construção das topologias filogenéticas, sempre Rhagophthalminae e Phengodinae foram observados como grupo monofilético, não justificando a separação da bioluminescência desses grupos como proposto por Branham e Wenzel (2003).

A conclusão da independência da bioluminescência dos clados Phengodinae + Rhagophthalminae e Lampyridae concorda com os resultados obtidos por Arnoldi

et al. (2007), que, utilizando todos os genes mitocondriais, observaram, por meio dos métodos de parcimônia e *neighbor-joining*, que os genomas mitocondriais de *Pyrophorus divergens* (Elateridae) e *Rhagophthalmus ohbai* (Rhagophthalminae) são mais próximos filogeneticamente do que com o de *Pyrocoelia rufa* (Lampyridae), o que também sugere a independência da bioluminescência desses dois grupos.

Por outro lado, Sagegami-Oba et al. (2007b), apesar de também terem, a partir do gene ribossomal nuclear 18S, obtido topologias onde Phengodidae e Lampyridae são relativamente distantes filogeneticamente, e essa última ser mais próxima de outros coleópteros não-luminescentes, os autores preferem a hipótese de Crowson (1972) de que a bioluminescência em Lampyridae e Phengodidae sejam herdadas de um mesmo ancestral. A presença de famílias não luminescentes internas ao grupo seria explicada por uma posterior perda dessa característica. Os autores ainda concordam com Branham e Wenzel (2003) em que a perda da bioluminescência nesses coleópteros tenha sido compensada por outras formas de aposematismos como, por exemplo, cores vibrantes, odores e sabores desagradáveis.

Apesar de algumas discordâncias, os trabalhos de Sagegami-Oba et al. (2007b) e Bocakova et al. (2007) suportam o estreito parentesco entre Phengodinae e Rhagophthalminae que, apesar de grandes semelhanças morfológicas e comportamentais e a similaridade entre a seqüência primária de suas luciferases, foi questionado por alguns autores (BRANHAM e WENZEL 2003).

Viviani et al. (2008b), através de imagens com câmera CCD, relataram luminescência com emissão contínua e de baixa intensidade (visível apenas aos olhos acostumados a escuridão) por todo o corpo de larvas de *Aspisma lineatum* e *Cratomorphus* sp.. Análises histológicas mostraram que essa emissão é oriunda do

corpo gorduroso. Os autores acreditam que essa emissão difusa pode ser um vestígio de estágios primitivos, precedentes a formação das lanternas, que devem ter surgido pela concentração dessa emissão nas regiões de menor pigmentação e esclerotização da larva, onde a emissão é mais eficiente.

2.6. Análises filogenéticas

A filogenética é o ramo que tenta reconstruir a história evolutiva de qualquer unidade que se modifique ao longo do tempo, sejam espécies, populações, seqüências gênicas, freqüências alélicas, linguagens, caracteres fenotípicos ou qualquer outro, a partir de uma matriz de dados.

As idéias filogenéticas são indissociáveis das idéias evolutivas e, portanto, surgiram simultaneamente com o pensamento evolutivo, formalizado e compilado por Charles Darwin em 1859 no seu livro “Origem das Espécies”.

Entretanto, a filogenética só foi encarada e desenvolvida como método na segunda metade do século XX com os trabalhos de Edwards e Cavalli-Sforza (1963, 1964) e Willi Hennig (1950, 1966) (FELSENSTEIN, 2004). Desde então, técnicas moleculares e computacionais fizeram esse ramo crescer espantosamente, a ponto de estimativas apontarem para um número superior a 3.000 artigos publicados sobre métodos de inferência filogenética (FELSENSTEIN, 2004).

2.6.1. Os métodos de análise filogenética

Os principais métodos podem ser divididos de acordo com a maneira com que utilizam os dados - distância ou caracteres discretos - ou com a maneira como constroem a topologia filogenética - algorítmicos ou de otimização de critério (PAGE e HOLMES, 1998).

Os métodos de distância foram introduzidos por Cavalli-Sforza e Edwards (1967) e por Fitch e Margoliash (1967), influenciados pelos algoritmos de agrupamento de Sokal e Sneath (1963). De maneira geral, pelos métodos de distância constrói-se uma matriz com medidas de distância entre cada par de espécies e então submete-se essa a um procedimento de construção de topologias filogenéticas. Os métodos de caracteres discretos utilizam cada posição da matriz de dados – no caso de dados moleculares, cada posição no alinhamento - na construção da topologia (PAGE e HOLMES, 1998).

Os métodos algorítmicos, como o próprio nome já diz, utilizam uma seqüência determinada de passos até terminar a construção da topologia, tendo a vantagem de serem métodos rápidos e, na maioria dos casos, gerarem uma única árvore. Já os métodos de otimização de critério escolhem entre todas as possíveis topologias aquela que melhor satisfaz o critério determinado (PAGE e HOLMES, 1998).

Os métodos mais populares podem ser divididos conforme a tabela 2.1.

Tabela 2.1. Classificação dos métodos de reconstrução filogenético

	<i>Distância</i>	<i>Caracteres Discretos</i>
<i>Algoritmos de Agrupamento</i>	UPGMA (SOKAL e MICHENER, 1958), Neighbor joining (SAITOU e NEI, 1987)	
<i>Otimização de Critério</i>	Mínimos Quadrados (CAVALLIS-SFORZA e EDWARDS,1967; FITCH e MARGOLIASH,1967) Evolução Mínima (RZHETSKY e NEI, 1993)	Máxima Parcimônia (EDWARDS e CAVALLI-SFORZA, 1963) Máxima Verossimilhança (EDWARDS e CAVALLI-SFORZA, 1964)

O método de mínimos quadrados (CAVALLI-SFORZA e EDWARDS,1967; FITCH e MARGOLIASH,1967) é um dos mais bem justificados estatisticamente. A

idéia fundamental é que temos uma matriz de distâncias observadas (D_{ij}) e qualquer topologia, através dos comprimentos dos ramos, nos leva a um conjunto de distância preditas (d_{ij}). A partir dessas podemos ter uma medida de discrepância (Q) entre as distâncias observadas e preditas, que no método de Mínimos Quadrados é dada por:

$$Q = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n W_{ij} (D_{ij} - d_{ij})^2$$

onde W_{ij} é um peso que difere entre as diferentes propostas do método de Mínimos Quadrados, como listado na tabela 2.2.

Tabela 2.2. Valores sugeridos de W_{ij}

Método	Valor de W_{ij}
Cavalli-Sforza e Edwards, 1967	1
Fitch e Margoliash, 1967	$1/D_{ij}^2$

A melhor topologia, segundo esse método, é aquela que minimiza o valor de Q .

Já o método de Evolução Mínima (RZHETSKY e NEI, 1993) utiliza como critério a somatória do comprimento de todos os ramos, sendo a mais adequada aquela que apresente o menor valor.

Entre os métodos algorítmicos de distância, o primeiro a ser criado e considerado por muitos um método fenético e não filogenético, o UPGMA (SOKAL e MICHENER, 1958) exige, como pré-requisito, que as taxas de evolução entre os taxa analisados sejam constantes, e tem como resultado uma topologia ultramétrica, isto é, a soma de todos os ramos entre um táxon e a raiz é sempre a mesma. De maneira geral o método segue o seguinte algoritmo:

1. Ache i e j que tenha a menor distância da Matriz (D_{ij})
2. Crie um novo grupo (ij) que contenha $n(ij) = n_i + n_j$ membros.
3. Conecte i e j à árvore em um novo ramo. Dê aos ramos o comprimento $D_{ij}/2$.
4. Compute a distância do novo ramo, agora tratado como OTU, com todas as demais OTUs (K) por:

$$D(ij),K = (n_i/n_i+n_j)D_{ik} + (n_j/n_i+n_j)D_{jk}$$

5. Apague as OTU's i e j da matriz de distância e adicione o grupo (ij)
6. Se só houver uma única OTU na matriz, finalize o processo. Caso contrário, volte a passo 1.

O método de *Neighbor-joining* (SAITOU e NEI, 1987) é outro método algorítmico de distância. Esse não assume que as taxas de evolução são iguais e é uma aproximação algorítmica do método de Evolução Mínima, e tem sua consistência já provada matematicamente (GASCUEL e STEEL, 2006). O algoritmo desse método é o que se segue:

1. Para cada OTU calcular: $u_i = \sum_{j \neq i}^n D_{ij} / (n-2)$

2. Escolha i e j que resulte no menor valor de $D_{ij} - u_i - u_j$
3. Junte i e j . Compute o comprimento dos ramos por:

$$v_i = \frac{1}{2} D_{ij} + \frac{1}{2} (u_i - u_j)$$

$$v_j = \frac{1}{2} D_{ij} + \frac{1}{2} (u_j - u_i)$$

4. Compute a distância do novo nó com as demais OTU's (K) por:

$$D(ij),k = (D_{ik} + D_{jk} - D_{ij})/2$$

5. Remova as OTUS i e j da matriz e adicione o nó (ij), tratado agora como OTU.
6. Se existem mais de 2 OTU's na matriz de distância volte para o passo 1, caso contrário conecte ambos e calcule o comprimento do ramo.

A Máxima Parcimônia é um dos métodos de otimização de critério que usa caracteres discretos, embora só utilize os caracteres parcimoniosamente informativos, isto é, apenas sinapomorfias. Existem inúmeras variações do método de Máxima Parcimônia, entretanto, todos assumem que a melhor topologia é aquela que necessita um menor número de passos para explicar a matriz de dados. Todas as variações podem ser computadas utilizando-se o algoritmo de Sankoff (1975).

O método de máxima verossimilhança define como ótima a topologia que apresente a maior probabilidade de ter gerado os dados observados. Dado um modelo evolutivo, calcula-se a probabilidade de todas as possíveis topologias terem gerado a matriz de dados, conforme a fórmula

$$L = \text{Prob}(D|T) = \prod_{i=1}^m \text{Prob}(D_{(i)}|T)$$

onde $D_{(i)}$ são os caracteres da coluna i do alinhamento de m colunas, e T é a topologia (FELSENSTEIN, 2004).

Aquela topologia que apresentar maior verossimilhança (L) é a escolhida. Esse método, além de partir dos pressupostos de que a evolução dos diferentes caracteres é independente e que a evolução nas diferentes linhagens também é independente (como a máxima parcimônia também assume), exige um modelo de evolução.

2.6.2. Medidas de suporte estatístico

O teste mais frequentemente utilizado para testar o grau de confiabilidade dos ramos das topologias é o teste de *Bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). Nesse teste, inicia-se com a matriz de dados original e cria-se outra matriz de mesmo tamanho, substituindo-se ao acaso certas colunas por outras da própria matriz, ou, de outra

maneira, cria-se a nova matriz a partir da pesagem aleatória de cada coluna da matriz original de forma que a soma dos pesos de todas as colunas dessa nova matriz seja igual ao número de colunas da matriz original. A partir dessa nova matriz constrói-se uma nova topologia. Repete-se esse procedimento várias vezes, de forma a gerar um banco de pseudo-réplicas. Feito isso, constrói-se uma árvore consenso de todas as pseudo-réplicas, e a frequência de aparecimento de cada nó nas diferentes pseudo-réplicas é tido como seu valor de suporte.

Muito parecido com o teste de bootstrap é o *Jackknife* (EFRON, 1979). Esse método também gera um banco de pseudo-réplicas e depois constrói uma topologia consenso dessas. A diferença reside na maneira como são criadas as novas matrizes. Ao invés de criar matrizes com substituições aleatórias como no teste de bootstrap, o *Jackknife* extrai aleatoriamente uma fração das colunas totais, por exemplo 50%.

Hillis e Bull (1993), a partir de simulações, propuseram o valor de *bootstrap* de 70% como limiar de significância. Já Li (1997) propõe o valor de 95%.

Uma outra estratégia de inferir a confiabilidade dos ramos foi proposta por Chen et al. (2003). Nessa, os autores defendem que é preferível aceitar um mesmo clado que é inferido várias vezes por diferentes conjuntos de dados, mesmo com baixos valores de *bootstrap*, do que clados com altos valores de *bootstrap* inferidos a partir de um único conjunto de dados.

Schneider (2003) propõe uma interpretação conjunta das propostas de Li (1997), Hillis e Bull (1993) e Chen et al. (1993). Nessa proposta, considera-se como robustos valores iguais ou maiores que 95%, independente da repetibilidade, moderado (94-70%) ou fraco (51-69%), se repetidos com mais de um marcador.

III. OBJETIVOS

Este trabalho visou clonar, seqüenciar e comparar evolutivamente seqüências de novas luciferase de Phengodidae (Coleoptera) e do genoma mitocondrial de *Pyrophorus divergens* (Elateridae:Coleoptera), com a finalidade de estudar a evolução da bioluminescência em Elateroidea, e mais detalhadamente em Phengodidae.

IV. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Com exceção dos estudos realizados com as luciferases de *Phrixothrix* por Viviani et al., muito pouco se sabe sobre a evolução das luciferases e da bioluminescência na família Phengodidae. A clonagem e o seqüenciamento de outras luciferases desse grupo taxonômico, assim como um estudo comparativo delas, apresenta-se como importante abordagem para melhor compreender essa evolução. Paralelamente, a evolução da bioluminescência nas três maiores famílias de coleópteros bioluminescentes ainda desafia muitos pesquisadores.

Além de curiosidade científica, a clonagem de novas luciferases, assim como o conhecimento de sua evolução, geram bases mais sólidas para o entendimento de algumas características funcionais com interesse biotecnológico. Um conhecimento preciso sobre as mutações naturais que causaram alteração da cor emitida sem comprometer sua eficiência (diferentemente do que normalmente se observa em novas construções por engenharia genética onde normalmente perde-se eficiência) pode auxiliar no desenvolvimento de luciferases emitindo eficientemente qualquer cor. Da mesma forma, com esses estudos, é possível melhor compreender a aquisição de outras características (sensibilidade a pH, temperatura, etc.), auxiliando o desenvolvimento de sistemas luminescentes adequados a diferentes propósitos.

V. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Métodos Gerais

5.1.1. Coleta de Insetos

As coletas de insetos foram realizadas na região de Corumbataí (SP), Fazenda Santana (Distrito de Sousas – Campinas, SP – 22° 44' 45" S, 47° 06' 33" W) e na Estação Biológica de Boracéia (Salesópolis, SP – 23° 38' S, 45° 52' W) utilizando-se de puçás, coletando as larvas e adultos estacionados na vegetação e no solo durante à noite. Quando utilizados para síntese de cDNA, os insetos foram congelados vivos na temperatura de -80°C. Quando utilizados para extração de DNA genômico e mitocondrial, foram estocados em etanol 100%. As espécies utilizadas no presente trabalho encontram-se listadas na tabela 5.1.

Tabela 5.1. Espécies utilizadas no presente trabalho e respectivos locais de coleta

Espécie	Local de Coleta
<i>Brasilocerus</i> sp.	Boracéia, SP
<i>Phrixothrix hirtus</i>	Boracéia, SP
<i>Taximastinocerus</i> sp.	Corumbataí, SP
<i>Pyrophorus divergens</i>	Campinas, SP

5.1.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o kit “PCR Master Mix” (Promega). Como reação padrão, utilizou-se o protocolo sugerido pela fornecedora com reação composta por 12,5 µl de “Master Mix” (contendo dNTPs, tampão, Taq

Polimerase e intensificadores), 1 μ L de cada *primer* na concentração inicial de 10 μ M, 0.1-2.5 μ L de DNA template, completando com água ultrapura auto-clavada para 25 μ L. O programa padrão de termociclagem realizado foi conforme segue: 95°C por 2 mins; 25 ciclos de 94°C por 30 segs, 45-55°C por 30 segs, 72°C por 45-120 segs; extensão final em 72°C por 15 minutos. A quantidade de DNA, temperatura de anelamento e tempo de extensão foram modificados conforme a aplicação específica da PCR.

5.1.3. Eletroforese em gel de agarose

A verificação dos resultados de PCRs, purificação dos mesmos, digestões e extrações plasmidiais, entre outros, foram feitos por eletroforese em gel de agarose 1% (peso/volume) em tampão TAE 0,5x (Tris-acetato 20 mM, EDTA 0.5 mM) em 100 volts por 25 minutos e revelação por fluorescência do brometo de etídio.

5.1.4. Purificação de DNA

Foram utilizados kits “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System”, da Promega, conforme protocolo sugerido pela empresa. Recortou-se as bandas de interesse do gel de agarose quando observado mais de uma banda. Foram diretamente purificados a partir da reação de PCR quando observado uma banda única. O método do kit se baseia na adsorção seletiva de DNA em membrana de sílica na presença de agentes caotrópicos. A membrana com o DNA adsorvido é então lavada com etanol e o DNA eluído em água ultrapura auto-clavada.

5.1.5. Clonagem de DNA

Os produtos de PCR amplificados com Taq DNA polimerase foram clonados

em vetor pGEM-T easy (Promega), segundo o protocolo sugerido pelo fabricante e Sambrook et al. (1989). O método se baseia na presença de adeninas protudentes adicionadas às seqüências amplificadas com enzimas Taq DNA polimerases e um vetor tipo T de alta cópia que apresenta timinas protudentes. As timinas do vetor tendem a se associar às adeninas das seqüências amplificadas e as duas moléculas são eficientemente ligadas pela ação da enzima T4 DNA ligase, formando uma única molécula circular híbrida.

5.1.6. Transformação de bactérias

Células XI1-Blue são cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) líquido (10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl por litro de água pura, pH 7.5) e tornadas competentes com solução de CaCl_2 50 mM gelado conforme Sambrook et al. (1989). Uma solução contendo 50 μL dessas células e até 5 μL do plasmídio desejado é submetida a um choque térmico a 42°C por 42 segs, após permanecer por 30 minutos em gelo. Essa é então deixada por mais 2 mins em gelo, quando adiciona-se 400-900 μL de meio LB na temperatura de 37°C e deixa-se sob agitação por 1-1,5 horas. A cultura é então plaqueada em meio LB/Ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Quando a transformação segue o protocolo de clonagem em vetor p-GEM T, o meio é suplementado com 0.5 mM de IPTG (Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosideo) e 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosideo), permitindo selecionar visualmente os clones positivos, isto é, aqueles que apresentam inserto interrompendo o gene da β -Galactosidase do vetor e, conseqüentemente, não adquirem coloração azulada como as bactérias que apresentam o vetor sem o inserto.

5.1.7. Extração de DNA plasmidial

Mini-preparações de DNA plasmidial foram realizadas utilizando-se o kit “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System”, da Promega, de acordo com os protocolos sugeridos pela empresa e Sambrook et al. (1989). O método se baseia no cultivo de linhagens bacterianas contendo o plasmídio de interesse durante a noite em 5 ml meio de cultura LB suplementado com o antibiótico apropriado - geralmente ampicilina (50µg/ml) -. De 1,5 ml até 4,5 ml de cultura são então centrifugados para remoção do meio de cultura. As células são rompidas em condições alcalinas extremas por 5 minutos, e tem suas proteínas degradadas pela ação da proteinase K por 5 minutos. A solução é então neutralizada e ajustada para condições ótimas de adsorção do DNA à membrana de purificação. O DNA plasmidial adsorvido é lavado com etanol para a remover impurezas. O DNA, agora puro, é então eluído com água ultrapura estéril.

5.2. Clonagem de Luciferases

5.2.1. Extração de RNA total de coleópteros luminescentes

Realizada usando-se o reagente Trizol (Invitrogen) conforme o protocolo sugerido pelo fornecedor, que é baseado em Chomczynski e Sacchi (1987). Primeiramente as lanternas ou corpos inteiros são macerados em Trizol. A separação é realizada adicionando-se clorofórmio e isolando-se a fase aquosa contendo o RNA total. O RNA é então precipitado com isopropanol e lavado com etanol 75%. Após secagem, o pellet é então dissolvido em água tratada com DEPC 0.1%.

5.2.2. Isolamento do RNAm

Este procedimento foi realizado usando-se Oligo-dT látex (Qiagen) de acordo com o protocolo sugerido pela empresa e Sambrook et al. (1989). Basicamente, desnatura-se o RNA total, por meio de aquecimento da amostra, e adiciona-se a quantidade apropriada de resina de oligo-dT. O RNAm contendo cauda poli-A hibridiza com o oligotex, e é então precipitado por centrifugação, lavado e eluído da resina em tampão de eluição pré-aquecido.

5.2.3. Construção da Biblioteca de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1-5µg de RNAm isolado, usando-se o kit "Time Saver cDNA synthesis Kit" (Amersham) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. A primeira reação é feita utilizando-se *primers* oligo-dT; após a síntese da segunda fita de cDNA são ligados a ela adaptadores EcoRI/NotI. Esse cDNA (20-150ng) é inserido no vetor λZAP II (1µg), pré-digerido com *EcoR* I e desfosforilado, em uma reação de ligação na temperatura de 4°C durante a noite. A reação de ligação é empacotada usando-se "Gigapack III gold packaging extracts" (Stratagene). Essa biblioteca pode ser excisada *in vivo*, dando origem a uma "biblioteca" de plasmídios.

5.2.4. Isolamento dos cDNAs que codificam luciferases por PCR

PCRs com cDNA das lanternas e *primers* específicos (Tabela 5.2), desenhados por meio da comparação das seqüências de *Phrixothrix* spp. clonadas por Viviani et al. (1999), foram montadas.

Tabela 5.2. *Primers* utilizados no processo de amplificação das luciferases de Phengodidae

PRIMER	SEQÜÊNCIA
P34F	5'GATCAAAATGGAAGAAGAAAAC 3'
P1734R	5' AATGAATGTATTAGGTTCTAAAA 3'

Utilizamos o kit “Master Mix” da marca Promega seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante e descrito em Materiais e Métodos 5.1.2: 12,5 µL de “Master Mix”, 1 µL de cada *primer* na concentração de 10 µM e DNA, completando com água para 25 µL.

A reação foi então submetida a um passo de 95°C por 10 minutos; 25 ciclos de 95°C por 45 segundos; 50°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos e 20 segundos; e um período de extensão final à 72°C por 15 minutos. As amostras foram re-amplificadas em reações idênticas.

Os produtos de PCR de tamanho em torno de 1.700 pb foram purificados e clonados em vetor pGEM-T easy, conforme Materiais e Métodos 5.1.4 e 5.1.5.

5.2.5. Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento foi feito pelo Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado na cidade de Campinas, através de reações terminadas com dideoxi nucleotídeos conforme protocolo sugerido pelo próprio LNLS, baseado em Sambrook et al. (1989).

5.2.6. Subclonagem para expressão das luciferases de Phengodidae

As luciferases de fengodídeos clonadas em vetor “pGEM-T easy” foram amplificadas com o *primer* “Feng_cloning” (GATTGATCACCATGGAAGAAGAAAAC) e o *primer* universal T7, em condições padrões de PCR. O *primer* “Feng_cloning” adiciona um sítio de restrição *NcoI* na transição do vetor “pGEM-T easy” para as luciferases, de maneira que as ampliações tenham um sítio *NcoI* adjacente ao códon inicial do gene da luciferase, e um sítio de clivagem *NotI* do próprio vetor “pGEM-T easy” logo após o códon terminador da enzima. Os fragmentos

amplificados, assim como os vetores pproExHta, próprios para expressão heteróloga em bactérias, foram digeridos com as enzimas *NcoI* e *NotI* (Promega) em tampão apropriado ("Buffer D" - Promega) por 3 horas à 37°C. Os fragmentos digeridos desejados foram então purificados via recorte do gel de agarose conforme Materiais e Métodos 5.1.4.

A ligação foi feita utilizando-se DNA ligase T4 da marca Takara (Tóquio, Japão) em reações durante a noite, conforme sugerido pelo protocolo da empresa. Clones contendo o plasmídeo recombinante com o gene dessas luciferases foram identificados por PCR, utilizando-se de *primers* específicos para luciferases de Phengodidae, e isolados.

5.2.7. Screening do clones de luciferase em vetor de expressão

Os clones, nos quais insertos de luciferases foram identificados nos vetores de expressão, foram cultivados em células BL21 DE3 em placas com meio de cultura LB, Ampicilina e IPTG nas concentrações finais respectivas de 100 µg /ml e 1mM à 37°C durante à noite. A expressão gênica foi induzida deixando-se essas placas na temperatura de 20°C por 8 horas. Após esse período de indução, as placas foram borrifadas com D-luciferina 1mM em tampão citrato pH 5.0 e submetidas à fotodeteção por 20 minutos em uma Camera CCD (ATTO) no nível máximo de sensibilidade.

5.2.8. Expressão heteróloga das luciferases de Phengodidae em bactérias

Clones contendo o vetor de expressão recombinante com gene das luciferases foram cultivados em 300mL de meio Luria-Bertani (LGC Biotecnologia, Brasil) na temperatura de 37°C até atingir $OD_{600} = 0.3$. As culturas tiveram a

expressão dos genes recombinantes induzidas pela adição de 0.5mM de IPTG e mantidos na temperatura de 18-20°C, sob agitação de 100 r.p.m., durante a noite.

5.2.9. Purificação das luciferases recombinantes

Os 300 ml de cultura com expressão induzida foram centrifugados na velocidade de 2500xg durante 15 min na temperatura de 4°C, com a intenção de separar as células do meio de cultura. O pelete contendo o material celular foi ressuscitado em tampão A uréia - 8M uréia, 0.1M fosfato de sódio, 10 mM Tris, 20 mM Imidazol, coquetel anti-protease livre de EDTA (Roche Applied Science), pH 7.5 – ou tampão A fosfato – 0.1M Fosfato, 250mM NaCl, mais coquetel anti-protease, pH 7.5 -. A lise celular foi realizada pelo método físico de choque térmico, congelando e descongelando a solução em gelo seco por três vezes.

O lisado foi então centrifugado em 15.000xg por 30 min na temperatura de 4°C, e o sobrenadante resultante (extrato clarificado) foi isolado e misturado com 0,5ml de resina Agarose Ni-NTA (Qiagen) – resina para cromatografia de afinidade por quelação de Níquel em ácido nitrilotriacético (NTA), onde a resina tem alta afinidade por moléculas contendo cauda poli-histidinas (6xHis-tag) -, sendo incubado sob leve agitação na temperatura de 4°C por 45 min. A solução contendo a proteína de interesse ligada à resina Agarose Ni-NTA foi então empacotada em uma coluna plástica e lavada com 10 volumes de tampão A suplementado com 20mM de 2-Mercaptoetanol, 5mM ATP e 10% Glicerol.

As luciferases contendo cauda His(6x) – adicionadas pela fusão com o vetor - foram então eluídas ou com tampão A em pH 5.9 e posteriormente pH 4.5, ou em concentrações crescentes de Imidazol (50, 100, 150, 250, 500 mM).

As frações foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE e Western Blotting.

5.2.10. SDS-Page

A análise eletroforética de proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida 10% em condições desnaturantes (SDS-Page) em protocolo semelhante a Sambrook et al. (1989).

As alíquotas das amostras protéicas foram diluídas em 3 volumes de tampão de amostra (Tris-HCl 125mM pH 6.8; 10% de glicerol; 10% de SDS; 10% de 2-mercaptoetanol; azul de bromofenol 0,02%) e desnaturadas na temperatura de 95°C durante 3 minutos.

O gel de resolução foi preparado com 1,875 ml de Tris-HCl 1M pH 8.8; 1,66 ml de Acrilamida:Bisacrilamida (30:0,8); 50µL de solução SDS 10%; 15µL de Persulfato de amônio 10%; 2,5µL de TEMED; 1,36 ml de água ultrapura. O gel de empacotamento foi preparado com 375 µL de Acrilamida:Bisacrilamida (30:0,8); 375µL Tris-HCl 1M pH 6.8; 30µL de SDS 10%; 15µL de Persulfato de amônio 10%; 2,5µL de TEMED; 2,185 mL de água ultrapura.

A corrida foi executada em tampão Tris-Glicina (25mM Tris, 250mM Glicina, 0,1% SDS) em 100 volts por aproximadamente 1 hora, utilizando-se o equipamento Mini-Protean 3 (Bio-Rad). O géis foram corados em 4 volumes de corante "Coomassie Brilliant Blue" (0,25% Coomassie Brilliant Blue, 45% metanol, 10% ácido acético glacial em água ultrapura) e descorado em solução descorante (45% metanol, 10% ácido acético glacial em água ultrapura).

5.2.11. Western Blotting

Amostras desnaturadas das purificações foram aplicadas em géis de acrilamida 10% conforme Materiais e Métodos 5.2.10, sem realizar a imersão em corante. As amostras separadas na eletroforese foram então eletro-transferidas para

membrana de nitrocelulose em tampão de transferência Tris-Glicina (25 mM, Tris, 192 mM Glicina, 20% Metanol) em 120 V por uma hora, conforme o protocolo do equipamento Mini-Protean 3 (Bio-Rad). Após a transferência, os sítios inespecíficos da membrana foram bloqueados imergindo-a em tampão de bloqueamento - tampão PBS-T (50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0.1% (v/v) de Tween 20, pH 7.4) suplementado com 5% de leite em pó desnatado - por 1 hora. Após lavagem da membrana com tampão PBS-T, as membranas foram então incubadas com anticorpos policlonais primários, induzidos contra as luciferases da cabeça de *Phrixothrix hirtus*, na concentração de 1/3000 em tampão de bloqueamento por 45 minutos sob leve agitação. Após o período de incubação, as membranas foram novamente lavadas e incubadas por 45 minutos sob leve agitação com anticorpo secundário de coelho na concentração de 1/5000. A imunodeteção foi então visualizada por quimioluminescência utilizando-se o kit "ECL Western Blotting" (GE HealthCare) seguindo o protocolo fornecido pela empresa, e com revelação feita em câmera CCD.

5.2.12. Determinação da atividade luminescente

A atividade luminescente foi medida usando um luminômetro TDIII (Tóquio, Japão) em uma reação em tampão Tris-HCl 100mM pH 8.0, 1mM de D-Luciferina, 2 mM de ATP, 4 mM MgSO₄ e suplementado com 10 µL da amostra de luciferase.

5.2.13. Análise filogenética das Luciferases

O alinhamento das seqüências foi realizado utilizando-se o programa Clustal W 1.8 (THOMPSON et al., 1994), enquanto a análise do alinhamento foi feita utilizando-se o programa MPAlign editor versão 2.2.0 (ARNOLDI, 2005)

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se o programa PAUP* 4.0b10 (SWORFFORD, 1998) usando-se os métodos de Máxima Parcimônia e *Neighbor-joining* (SAITOU e NEI, 1987). BLOSUM 62 (HENIKOFF e HENIKOFF, 1992) foi selecionada como modelo de substituição de aminoácidos.

A busca da topologia mais parcimoniosa foi realizada pelo o método de "Branch and bound". Em todas as análises, todos os caracteres foram igualmente pesados.

O suporte e a repetibilidade dos ramos foram medidos pelos valores de *bootstrap* obtidos com os parâmetros padrão do programa PAUP* e 5000 replicações que, segundo Müller (2005), são suficientes para atingir cerca de 1% de precisão em um intervalo de confiança de 95%.

Como grupo externo selecionamos os produtos gênicos CG6178 de *Drosophila melanogaster* (OBA et al., 2004a) e os parálogos de luciferases de *Tenebrio molitor* (OBA et al., 2006).

5.3. Genoma mitocondrial de *Pyrophorus divergens*

5.3.1. Extração de DNA genômico e mitocondrial

Utilizou-se o Kit "Dneasy Tissue" (Qiagen) para a extração de DNA genômico e mitocondrial. O protocolo se baseia no seguinte procedimento: Primeiramente o tecido é macerado em tampão fornecido, agitado em vórtex e as células são lisadas em condições alcalinas extremas juntamente com proteinase K*. Faz-se um tratamento com RNase A. A amostra é então aplicada em uma membrana de sílica onde o DNA genômico e mitocondrial são adsorvidos. A coluna contendo o DNA é lavada com uma solução a base de etanol, removendo contaminantes remanescentes e inibidores enzimáticos. O DNA puro é eluído da membrana em

tampão de eluição fornecido, em TE pH 8.0 ou em água.

5.3.2. Amplificação dos genes mitocondriais 16S e COII

Utilizamos os *primers* HmCO2-F(ATAGARCAATTAACMTTYCAYGAYCA) / HmCO2-R(GRTTTRTWCCRCARTCTCWGARCATTG) e Hm16sF(ATAATTTAARRTYTRAYCTGCTCAATGA) / Hm16S-R(ARAAATWACGCTGTTATCCCYAAGGTAA) desenhados a partir de seqüências e do genoma mitocondrial de *Pyrocoelia rufa* e outros disponíveis na base de dados do NCBI.

As reações foram feitas com o kit “Master Mix” da marca Promega seguindo o protocolo sugerido do fabricante descrito em Materiais e Métodos 5.1.2.

5.3.3. Amplificação do genoma mitocondrial

A partir dos fragmentos dos genes mitocondriais 16S e COXII seqüenciados e baseando-se nos genomas mitocondriais de *Pyrocoelia rufa* ([NC_003970](#)) (Lampyridae), *Anoplophora glabripennis* ([NC_008221](#)) (Cerambycidae) e *Tribolium castaneum* ([AJ312413](#)) (Tenebrionidae), desenhamos *primers* específicos e mais longos para amplificar o genoma mitocondrial de *Pyrophorus divergens* (tabela 5.3). Esse foi amplificado em 4 fragmentos correspondendo as regiões entre os genes 16S e COX2 (7 kb), COX2 e NADH5 (4.5 kb), NADH5 e 16S (6 kb) e uma região de sobreposição entre os dois últimos fragmentos (500 pb) usando-se os *primers* da tabela 5.3. As reações de amplificação foram montadas usando-se LA Taq (Takara, Tóquio, Japão), uma DNA polimerase de alta fidelidade, de acordo com o protocolo do fabricante e sob as seguintes condições: 1 min à 94°C; 5 ciclos de 30 segundos à 94°C, 30 segundos à 55°C, e 8 minutos à 68°C; 25 ciclos de 10 segundos à 98°C e 8 minutos à 68°C; e um período final de extensão de 10 minutos à 72°C.

5.3.4. Clonagem dos fragmentos do genoma mitocondrial

Os três fragmentos maiores - correspondentes as regiões entre os genes 16S e COX2, COX2 e NADH5, NADH5 e 16S - foram clonados em vetor XL-Topo (Invitrogen, EUA), conforme o protocolo sugerido pela empresa. Três clones do fragmento de 7 kb e cinco clones dos fragmentos de 6 e 4.5 kb foram isolados.

Tabela 5.3. Primers para amplificação do genoma mitocondrial de *Pyrophorus divergens*.

Primer	Seqüência
Hm_COX2-1F	ATAGARCAATTAACMTTYTTYCAYGAYCA
Hm_COX2-2R	GRTTTRTWCCRCARATCTCWGARCATTG
Hm_16S-1F	ATAATTTAARRTYTRAYCTGCTCAATGA
Hm_16S-2R	ARAAATWACGCTGTTATCCCYAAGGTAA
COX2_F1	CATGATCACGCCATGATAATCCTAGTAATAATTACC
COX2_F2	CACCTATCGTTTCCTTCTTGAAGGACAAACAATTG
COX2_R1	CCGCAGATCTCTGAGCATTGACCGAAATATATTCC
COX2_R2	TAGCCGTCCAGGATTGGCGTCAACCTTAACTCCTATTG
16S_F1	TTGCCGCGGTATTTTGACCGTGCGAAGGTAGC
16S_F2	AATGATTGGACGAGGGGACAGCTGTCTACTATTGA
16S_R1	TACGCTGTTATCCCTAAGGTAATTTTCATTAATCT
16S_R2	ATCTTCCAGTCACCCCAACCAAACACCTATTCATG
ENADH5F	GGACTAATAATCAAAAACATCATTGAAGC
SNADH5F	TCGGTCCGTTTGAGTTATTACAC
OverlapF	CAAGTTGACTAGACAAGGC
OverlapR	GGTATGATTACTGCTCTTTCTAACC

5.3.5. Seqüenciamento do genoma mitocondrial

O fragmento de sobreposição não foi clonado, apenas purificado e usado diretamente para seqüenciamento. Os clones de 7 kb, contendo a região rica em

A+T foram seqüenciados utilizando-se o kit “Deletion kit for kilo-sequencing” (Takara), enquanto os demais clones foram seqüenciados pela técnica de “primer walking”. As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando dideoxi nucleotídeos (BigDye Terminator V3.1) e um aparelho Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

5.3.6. Montagem do genoma mitocondrial

O genoma mitocondrial foi montado usando-se o pacote “Staden Package” (BONFIELD et al., 1995).

5.3.7. Alinhamento e análise das seqüências

O alinhamento das seqüências foi realizado utilizando-se o programa Clustal W 1.8 (THOMPSON et al., 1994), enquanto as análises desses alinhamentos foram feitas utilizando-se o programa MPAlign editor versão 2.2.0 (ARNOLDI, 2005). As seqüências gênicas preditas foram traduzidas com base no código genético proposto por Abascal et al. (2006).

5.3.8. Busca e montagem de RNA transportadores

Usamos o algoritmo do programa tRNAscan-SE (LOWE e EDDY, 1997). Aqueles RNAs transportadores que não foram automaticamente encontrados pelo algoritmo do programa foram encontrados e montados por comparação com outros genomas mitocondriais de Coleoptera publicados. Especialmente, o RNAt-AGN para Serina foi enovelado usando o servidor web "Kinefold" (XAYAPHOUMMINE et al., 2005).

5.3.9. Análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se o programa PAUP* 4.0b10 (SWORFFORD, 1998) usando-se os métodos de Máxima Parcimônia e *Neighbor-joining* (SAITOU e NEI, 1987). A matriz MtArt (ABASCAL et al., 2007), específica para genes mitocondriais de insetos, foi selecionada como modelo de substituição de aminoácidos.

A busca da topologia mais parcimoniosa foi realizada pelo o método de “Branch and bound”. Em todas as análises, todos os caracteres foram igualmente pesados.

O suporte e a repetibilidade dos ramos foram medidos pelos valores de bootstrap obtidos com os parâmetros padrão do programa PAUP* e 5000 replicações que, segundo Müller (2005), são suficientes para atingir por volta de 1% de precisão em um intervalo de confiança de 95%.

Como grupo externo selecionamos genomas mitocondriais de Hemiptera, que são próximos de Holometabola, porém, seguramente, grupos externos (WHITING et al., 1997; NARDI et al., 2003; KJER, 2004).

VI. Resultados e Discussões

6.1. Clonagem, expressão e análise evolutiva das Luciferases

6.1.1. Luciferase do corpo de *Phrixothrix hirtus*

Isolamos e seqüenciamos três clones positivos (contendo vetor “pGEM-T easy” com luciferase recombinante) de duas reações de PCR independentes para a luciferase do corpo de *P. hirtus*.

Utilizando o programa ORF finder (<http://www.ncbi.nih.gov/gorf/gorf.html>), verificamos que a maior janela de leitura correspondia a um fragmento de 1638 pb (545 resíduos de aminoácidos), na janela +2, onde o códon inicial (ATG) estava localizado no par de base número 8 e o códon finalizador no par de base número 1645. A seqüência de DNA e sua tradução com o código genético universal é apresentada na figura 6.1.

```

8 atggaagaagaaaacattaggcatggagagcgtcctcgtgatata
  M E E E N I R H G E R P R D I
53 gtccatcctggctcggcaggacaacaattataccaatcattgtat
  V H P G S A G Q Q L Y Q S L Y
98 aaatttgcacatcttttctgaagcaataatcgatgctcatacaaat
  K F A S F P E A I I D A H T N
143 gaagtaatatcatatgctcaaataatttgaaaccagctgccgctta
  E V I S Y A Q I F E T S C R L
188 gctgttagtatagaacaatatggcttgaatgaaaacaatgttgtg
  A V S I E Q Y G L N E N N V V
233 ggtgtatgcagtgaaaacaatataaaacttttttaactcctgtcctt
  G V C S E N N I N F F N P V L
278 gctgctttatacttaggaataaccagtagcaacatcaaatgatatg
  A A L Y L G I P V A T S N D M
323 tacacagatggagaggttaactgggtcatttgaatatatcaaaacca

```

Y T D G E L T G H L N I S K P
368 actatcatggttagttcaaagaaagcactcccgcttatttctgaga
T I M F S S K K A L P L I L R
413 gtacagcaaaatctaagtttcattaaaaaagtcgtagttatcgat
V Q Q N L S F I K K V V V I D
458 agcatgtacgacattaatggcgttgaatgcgtatctacctttggt
S M Y D I N G V E C V S T F V
503 gcacgttatactgaccacacctttgatccattgtcatttacacca
A R Y T D H T F D P L S F T P
548 aaagattttgatccccttgaaaaaatcgcattaattatgtcatca
K D F D P L E K I A L I M S S
593 tctggaacaactggattgcctaagggtgtagtactgagccataga
S G T T G L P K G V V L S H R
638 agtctaactataactttcgttcatagcagggatcccatttatggc
S L T I T F V H S R D P I Y G
683 actcgtacggttccacaacatcaattctttccttagtaccggtc
T R T V P Q T S I L S L V P F
728 catcatgcctttggaatgtttactacattatcttactttgtagta
H H A F G M F T T L S Y F V V
773 ggacttaagggtgtaatggtgaagaatttgagggcgcacttttc
G L K V V M L K K F E G A L F
818 ttaaaaaccatacagaattacaaaatcccactattgtagtggcc
L K T I Q N Y K I P T I V V A
863 cctccagttatgggtgtttttggctaaaagcccattagtcgatcaa
P P V M V F L A K S P L V D Q
908 tacgatttatcgagcttaacggaagttgctactggaggagctcct
Y D L S S L T E V A T G G A P
953 ttaggaaaagatgtcgcagaagcagtagcaaagagggtgaaatta
L G K D V A E A V A K R L K L
998 cctggaatcatacaaggatattgattaactgaaacttgctgcgct
P G I I Q G Y G L T E T C C A
1043 gtaatgattaccctcataatgctgtgaaaacagggttcaactgga
V M I T P H N A V K T G S T G
1088 agacccttgccatacattaaagctaaagtttttagatgacgctact
R P L P Y I K A K V L D D A T
1133 gggaaggcgctaggaccaggagaaagaggcgaaatatgctttaa
G K A L G P G E R G E I C F K
1178 agtgaaatgattatgaaaggatattacaacaatccggaagcaact
S E M I M K G Y Y N N P E A T
1223 attgatactattgacaaagatgggttggttcattctggagatatt
I D T I D K D G W L H S G D I
1268 ggatattacgacgaagatggaaatcttttatagttgatcgattg
G Y Y D E D G N F F I V D R L
1313 aaagaacttattaatacaagggatatcagggttgcgcctgctgaa
K E L I K Y K G Y Q V A P A E
1358 ctggaaaatctgcttttacaacatccaagtattgctgatgcggggt
L E N L L L Q H P S I A D A G
1403 gttactggagttccggacgaatgtgctggacaattacctgctgct

```

V T G V P D E F A G Q L P A A
1448 tgtgttgtgtagaatctggcaagacgctgactgaaaaggaagtt
C V V L E S G K T L T E K E V
1493 caagatatttattgcagcacaagtcactccaacaaagcatcttcga
Q D F I A A Q V T P T K H L R
1538 ggcggtgctcgtattttagacagtagtattccgaaaggccctactgga
G G V V F V D S I P K G P T G
1583 aaactcatcagaaaggagctccgagaaatatttgcccagcgagca
K L I R K E L R E I F A Q R A
1628 ccaaaatcaaaattataa 1645
P K S K L *

```

Figura 6.1. Seqüência de DNA da luciferase do corpo de *P. hirtus* e sua respectiva tradução

A seqüência de DNA apresentou 85% e 99% de identidade com as seqüências das luciferases da cabeça de *P. hirtus* e do corpo de *P. viviani* respectivamente.

A seqüência de aminoácidos desta luciferase apresentou 545 resíduos, como no caso da luciferase das lanternas laterais de *P. viviani*, apresentando identidade de 99% (541/545) com esta. Já comparando-a com a luciferase da cabeça de *P. hirtus* (mesma espécie da nova luciferase, porém de lanternas localizadas em diferente região do corpo), a seqüência é mais curta em um resíduo e apresentou identidade de 71% (388/546). É interessante notar que essa nova seqüência possui a mutação R215T, posição considerada chave na determinação da cor e atividade das luciferases em Phengodidae (VIVIANI e OHMIYA, 2000).

Segundo medições *in vitro* dos extratos das larvas (VIVIANI e BECHARA, 1997), essa luciferase deve emitir luminescência com pico em $\lambda = 572\text{nm}$, entretanto, não conseguimos obter a atividade dessa enzima expressa heterologamente.

6.1.2 Luciferase do corpo de *Brasilocerus* sp.

Isolamos e seqüenciamos 3 clones (de duas reações de PCR independentes)

contendo o gene da luciferase do corpo de *Brasilocerus* sp. em vetor “pGEM-T easy”.

Verificamos que a maior janela de leitura correspondia a um fragmento de 1638 pb (545 resíduos de aminoácidos) na janela +2, onde o códon inicial (ATG) estava localizado no par de base número 8 e o códon finalizador no par de base número 1645. A seqüência de DNA e sua tradução utilizando o código genético universal pode ser visualizada na figura 6.2.

```

8  atggaagaagaaaacattagatatggagatcgtcctcgtgatata
   M E E E N I R Y G D R P R D I
53  gttcatcccggctctgcaggggaacaattgtaccaatcattatat
   V H P G S A G E Q L Y Q S L Y
98  aaattttcatattttctgaagcaatagtagatgcccataccaat
   K F S Y F P E A I V D A H T N
143  gaaaaaatatcatatgctacaatatttgaaacaagctgccgtttg
   E K I S Y A T I F E T S C R L
188  gccgttagtattgaaaaacttggtttgaacgaaagaaatgtggta
   A V S I E K L G L N E R N V V
233  ggtgtatgcagtgaaagcaatctaaacttttttaatccgggtactt
   G V C S E S N L N F F N P V L
278  gccgctttgtacttgggtataccggtagcgacatcaaatgatatg
   A A L Y L G I P V A T S N D M
323  tatactgatggggaattgagtggtcatttgaatataatctaaacca
   Y T D G E L S G H L N I S K P
368  gatatcatgttttgttcaaagaaagcactcccgcttatttctaagg
   D I M F C S K K A L P L I L R
413  gctcaaaaaaatttgaatttcattaaaaaagtcgtagttattgat
   A Q K N L N F I K K V V V I D
458  agcatgttcaacatagatgggtgttgaatgtgttcattctttcggt
   S M F N I D G V E C V H S F V
503  tcacattatactgacagcagctttgatccgctatcatttaaacca
   S H Y T D S S F D P L S F K P
548  aaacaatttgatcctcttcaagaaattgcgttgattatgtcatct
   K Q F D P L Q E I A L I M S S
593  tctggaacaactggattgccgaaaggtgtagtggtgagtcatagg
   S G T T G L P K G V V L S H R
638  agtttaaccataagattcgtccacagcagggatcccctctacggt
   S L T I R F V H S R D P L Y G
683  actcgtactataaccagaaacatcaattctttcttttagtgcctttc
   T R T I P E T S I L S L V P F
728  catcatgcttttggaaatgtttaccacattatcatatttcgtagta
   H H A F G M F T T L S Y F V V
773  ggacttagaattgtaatggttgaaaaagtttgaggcgaccttttc

```



```

      G L R I V M L K K F E G D L F
818 ttgaaaactatacaaaaattataaaattcctactattgtagttgct
      L K T I Q N Y K I P T I V V A
863 cctccagttatggatTTTTTGGCTAAAAGTCCATTAGTTGATAAA
      P P V M V F L A K S P L V D K
908 tacgatttatcgagcttaagagaagttgctactggaggggctcct
      Y D L S S L R E V A T G G A P
953 ttaggaaaagatgtaggagaagcagtagcaaagaggctgggatta
      L G K D V G E A V A K R L G L
998 tctggagttcttcaaggatatggattaacagaaacttgctgtgct
      S G V L Q G Y G L T E T C C A
1043 gtagtgattacacctcacaataatgttaaaacaggttcagcagga
      V V I T P H N N V K T G S A G
1088 aaagttgtaccctatgtttcagctaaagtacttgataaggctact
      K V V P Y V S A K V L D K A T
1133 ggaaaagcgttaggaccaaagaaagagggtgaaatatgtttcaag
      G K A L G P K E R G E I C F K
1178 agtgaaatgcttatgaaaggatattacaacaatccagaagcaact
      S E M L M K G Y Y N N P E A T
1223 cgtgaaactattgacgaagatgggttgcttcattctggggatatt
      R E T I D E D G W L H S G D I
1268 ggatattacgaagaagatggcatgttctatatagttgatcgattg
      G Y Y E E D G M F Y I V D R L
1313 aaagagcttattaagtacaagggatatcaggttgcgccctgctgaa
      K E L I K Y K G Y Q V A P A E
1358 cttgaaaatttgcttttgcaacatccagatattgctgatgctggc
      L E N L L L Q H P D I A D A G
1403 gttactggaattcctgatgaatttgctgggcaattacctgccgct
      V T G I P D E F A G Q L P A A
1448 tgtggttgctagagcctggaaaaacgttgactgaaaaagaagct
      C V V L E P G K T L T E K E A
1493 atggattttattgcagagcaagttactccaactaaacatcttcga
      M D F I A E Q V T P T K H L R
1538 ggtggtggttatattcgtagaccgtattcctaaaggctcctactgga
      G G V I F V D R I P K G P T G
1583 aaactcatcagaaatgaactccgtgcaatatttgctaaaaaagca
      K L I R N E L R A I F A K K A
1628 gcatcttcaaaattataa 1645
      A S S K L *

```

Figura 6.2. Seqüência de DNA da luciferase do corpo de *Brasilocerus sp.* e sua respectiva tradução.

Novamente, esta luciferase oriunda das lanternas laterais, embora de um gênero diferente, apresentou 545 resíduos, como no caso das luciferases oriundas das lanternas laterais do gênero *Phrixothrix sp.*, e é mais curta do que a luciferase

oriunda da cabeça de *Phrixothrix hirtus*. A seqüência traduzida apresenta 69% (379/546) e 86% (467/545) de identidade com as seqüências das luciferases da cabeça de *P. hirtus* e do corpo de *P. viviani* respectivamente. Medições prévias *in vitro* com extratos das lanternas laterais das larvas (VIVIANI e BECHARA, 1997), indicam que essa luciferase deve emitir luminescência com pico em $\lambda = 557\text{nm}$.

6.1.3. Luciferase do corpo de *Taximastinocerus* sp.

A partir do cDNA sintetizado com material do corpo de *Taximastinocerus* sp., conseguimos isolar por PCR apenas um clone contendo o gene da luciferase. Identificamos a maior região codificante na janela de leitura +2, com o códon inicializador e finalizador nos pares de base número 8 e 1651, respectivamente, totalizando 1644 pb ou 547 resíduos de aminoácidos. A seqüência protéica é dois resíduos mais longa que as demais luciferases isoladas do corpo de outros Phengodinae, apresentando a inserção de uma Lisina na posição 71 e outra inserção, com posição de difícil determinação, na extremidade C-Terminal. Essa luciferase apresentou maior similaridade com a luciferase do corpo de *Brasilocerus* sp. (86%) e apenas 69% com a luciferase da cabeça de *P. hirtus*. Como conseguimos isolar apenas um clone positivo e não podemos assegurar a ausência de artefatos da DNA Polimerase e, conseqüentemente, a seqüência exata, não a incluímos em nossas análises filogenéticas. A seqüência de DNA e sua respectiva tradução com o código genético universal pode ser observada na figura 6.3.

```

8  atggaagaagaaaacattatgcatggtgccgaacctcgcgacttg
   M E E E N I M H G A E P R D L
53  gtccatccaggttcagcagggacgcagctataccgctcattgtat
   V H P G S A G T Q L Y R S L Y
98  aaatthttcatatthttcctgaagcaatagttgatgcacatactcat
   K F S Y F P E A I V D A H T H
143 gaagtaatatcttacgctacaatatttaacgtttagttgccgttta

```

E V I S Y A T I F N V S C R L
188 gctgCGtctttggaaaaatatggtttgggtaaagaggatgatgct
A A S L E K Y G L G K E D D V
233 gttggagtgtgcagcGaaaacaacttaaacttcttcagcccagta
V G V C S E N N L N F F S P V
278 cttgctgctttgtacctaggagtaccagtagcGacatcaaacgat
L A A L Y L G V P V A T S N D
323 atgtacactgatggggaaataagcggccatctgaatatatcaaaa
M Y T D G E I S G H L N I S K
368 ccatgcattatgttttgctcaaagaaagcacttcccctaattctg
P C I M F C S K K A L P L I L
413 aaggtaaaaaagaatctacatttcatgaaaaaagttgtagttatt
K V Q K N L H F M K K V V V I
458 gatagtatgtatgacatgaatgggtgctgaatgtatcaatacattt
D S M Y D M N G V E C I N T F
503 atgaatcattacactgaccataccttcgatccattgaaatttcag
M N H Y T D H T F D P L K F Q
548 ccaaaggagttcgatcctcttaaaaaaacCGcattgattatgtca
P K E F D P L K K T A L I M S
593 tcttctggaacaactggattacccaaaggtgttgtggtgagtc
S S G T T G L P K G V V L S H
638 agaagtcttacaataagattcgtccatagcagagatcctatttac
R S L T I R F V H S R D P I Y
683 ggcactcgaaccatacctgaaacatcaatcctttctttgggtgcct
G T R T I P E T S I L S L V P
728 ttccatcatgctttttggaatgtttacaacattgtcctacttcgta
F H H A F G M F T T L S Y F V
773 gttggtcttaggattgtaatgttaaagaaatttgaaggggagctc
V G L R I V M L K K F E G E L
818 ttcttgaaaaccatacaacattataaaattcctaccattgtagtc
F L K T I Q H Y K I P T I V V
863 gtcctccagttatggatatttttagctaaaagtccattggttgat
A P P V M V F L A K S P L V D
908 aaatacgatattatctagcttaagagaagttgccaccggaggtgct
K Y D L S S L R E V A T G G A
953 ccgataggtaaagatgtcgcacatgCGgtagctaagagattgggt
P I G K D V A H A V A K R L G
998 ttgagtggaattctccaaggatattggtttaaccgaaacatgttgt
L S G I L Q G Y G L T E T C C
1043 gctgtcGtaatcacacctcagacaacttgagaactggttcagct
A V V I T P H D N L R T G S A
1088 ggaaaagttgtgccttacgttaaagctaagatattggataaagct
G K V V P Y V K A K I L D K A
1133 accgggaaagcgttaggaccaaacgaaagaggtgaaatctgcttt
T G K A L G P N E R G E I C F
1178 aagagtGaaatgcttatgaaaggatatcacaacaaccccgaaagct
K S E M L M K G Y H N N P E A
1223 actcgtgaaactattgacgaggatggttggcttcattctggagat

```

T R E T I D E D G W L H S G D
1268 attgggtattatgaagaagatggcaccatctacattggtgatcgt
I G Y Y E E D G T I Y I V D R
1313 ttgaaggaacttattaagtacaagggttatcaagttgcaccagct
L K E L I K Y K G Y Q V A P A
1358 gaacttgaaaacttgcttttgcaacatccagatattgctgacgct
E L E N L L L Q H P D I A D A
1403 ggtgttactggagttcctgatggatttgctggacagttacctgcc
G V T G V P D G F A G Q L P A
1448 gcctgtattgtattagaacctggcaaaacacttaccgaaaaggaa
A C I V L E P G K T L T E K E
1493 gtcggtgacttccttgacagaacgagtcactccaacaaaatacctt
V V D F L A E R V T P T K Y L
1538 cgagggtggtgtcatcctttagaccgcattccaaaagggtccaact
R G G V I F V D R I P K G P T
1583 ggaaaacttatgaggcaagaactgcgcgcaatatttgccgccaana
G K L M R Q E L R A I F A A K
1628 aaagcgcaaacttctaaattgtaa 1651
K A Q T S K L *

```

Figura 6.3. Seqüência de DNA e tradução da luciferase do corpo de *Taximastinocerus* sp..

6.1.4. Análise evolutiva das novas luciferases

Clonamos e seqüenciamos os genes das luciferases do corpo de três membros de Phengodidae: *Brasilocerus* sp., *Taximastinocerus* sp. e *Phrixothrix hirtus* (figura 6.4). A primeira tem 545 resíduos e apresenta similaridade de 86% com as demais luciferases do corpo de outros Phengodinae (tabelas 6.1 e 6.2). A luciferase de *Taximastinocerus* tem 547 resíduos e maior similaridade (86%) com a luciferase do corpo de *Brasilocerus* sp. - entretanto essa não foi incluída nas análises conforme justificado anteriormente -. A nova luciferase do corpo de *P. hirtus* também apresenta 545 resíduos, maior similaridade com a luciferase do corpo de *P. viviani* (99%), e apenas 72% de identidade com a luciferase da cabeça da mesma espécie clonada por Viviani et al. (1999). Com esses resultados, pela primeira vez temos seqüências das luciferases do corpo e da cabeça de uma mesma espécie.

Tabela 6.1. Matriz de Identidade das luciferases de Phengodidae. Taxi_body: luciferase das lanternas laterais de *Taximastinocerus* sp.; Br_body: luciferase das lanternas laterais de *Brasilocerus* sp.; Ph_body: luciferase das lanternas laterais de *P. hirtus*; Pv_body: luciferase das lanternas laterais de *P. viviani*; Ph_head: luciferase das lanternas cefálicas de *P. hirtus*; Rhago: luciferase das lanternas laterais de *Rhagophthalmus ohbai*.

	Taxi_body	Br_body	Pv_body	Ph_body	Ph_head	Rhago
Taxi_body	1.000000	0.859500	0.813900	0.815700	0.693400	0.653300
Br_body	0.859500	1.000000	0.857700	0.859500	0.695300	0.642300
Pv_body	0.813900	0.857700	1.000000	0.994500	0.711700	0.664200
Ph_body	0.815700	0.859500	0.994500	1.000000	0.711700	0.666100
Ph_head	0.693400	0.695300	0.711700	0.711700	1.000000	0.562000
Rhago	0.653300	0.642300	0.664200	0.666100	0.562000	1.000000

Tabela 6.2. Características preditas das luciferases de Phengodidae

Espécies	Posição da Lanterna	Comprimento (resíduos)	Ponto Isoelétrico	Peso molecular (KDa)
<i>P. hirtus</i>	cabeça	546	6,94	60,95
	lateral	545	6,37	59,71
<i>P. viviani</i>	lateral	545	6,37	59,73
<i>Brasilocerus</i> sp.	lateral	545	6,52	59,95
<i>R. ohbai</i>	lateral	543	8,16	60.13

A análise filogenética dessas luciferases mostrou que as luciferases das lanternas laterais das diferentes espécies de Mastinocerini estudadas são mais próximas entre si do que são as luciferases do corpo e da cabeça de uma mesma espécie.

Em 1999, Viviani et al. clonaram e seqüenciaram as luciferases verde do corpo de *P. viviani* e a vermelha da cabeça de *P. hirtus*. As emissões *in vitro* e das luciferases recombinantes apresentam praticamente o mesmo comprimento de onda. As propriedades catalíticas das luciferases nativas e recombinantes também são muito semelhantes, sugerindo que as luciferases do corpo e da cabeça são codificadas por genes diferentes. Nossos dados atuais suportam essa possibilidade.

Observamos na topologia filogenética (figura 6.5) que as luciferases do corpo de 3 diferentes espécies de Mastinocerini estão agrupadas em um mesmo clado, enquanto a luciferase da cabeça de *P. hirtus* está sozinha em um ramo vizinho. Essa topologia indica que a luciferase do corpo de *P. hirtus* é mais próxima filogeneticamente das luciferases do corpo de outras espécies estudadas (*P. viviani* e *Brasilocerus* sp.) do que da luciferase da cabeça da própria espécie. Esse dado claramente indica que as luciferases do corpo e da cabeça são genes parálogos em Mastinocerini.

Lanternas cefálicas são encontradas apenas nas larvas e fêmeas neotênicas da tribo Mastinocerini (Coleoptera:Phengodidae) (VIVIANI e BECHARA, 1997), enquanto lanternas laterais são onipresentes em Phengodidae, inclusive nas larvas de Rhagophthalminae. As larvas de Lampyridae e Elateridae também apresentam lanternas no corpo, entretanto não é seguro considerá-las todas homólogas (SAGEGAMI-OBA et al., 2007; ARNOLDI et al., 2007; BOCAKOVA, 2007). Dessa forma, raciocinar apenas dentro de Phengodidae (Phengodinae + Rhagophthalminae) é mais apropriado, já que temos evidências para acreditar que a bioluminescência de ambos seja herança de um mesmo ancestral (OHMIYA et al., 2000; BOCAKOVA et al., 2007).

Como dito anteriormente, a paralogia das luciferases do corpo e da cabeça de Mastinocerini é fortemente suportada pelos nossos dados. Nesse cenário, novas questões aparecem: Qual delas é codificada por um novo gene? Quando a divergência entre elas ocorreu? Quais devem ter sido as cores das luciferases ancestrais?

Ruler10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....9
Pv_body	..-MEEENIRHGERPRDIVHPGSAGQQLYQSLYKFASFP--EAIIDAHTNEVISYAQIFETSCR LAVSIEQYGLNENN VVGVCSENNINFF
Ph_body	..-MEEENIRHGERPRDIVHPGSAGQQLYQSLYKFASFP--EAIIDAHTNEVISYAQIFETSCR LAVSIEQYGLNENN VVGVCSENNINFF
Br_body	..-MEEENIRHGERPRDIVHPGSAGQQLYQSLYKFASFP--EAIIDAHTNEVISYAQIFETSCR LAVSIEQYGLNENN VVGVCSENNINFF
Ph_head	..-MEEENIRHGERPRDIVHPGSAGQQLYQSLYKFASFP--EAIIDAHTNEVISYAQIFETSCR LAVSIEQYGLNENN VVGVCSENNINFF
Rhago	..-MPNEIILHGAKPRDPLDGTAGIQLYRALTNFSLR--EALIDAHTNEVISYADILENSCR LACKYENYGLRONS SVISVCSENSITIFF
Pirea	MMKREKNVYVGPPEKHLGNFTAGEMLYNALHKHSHIP--QAILDVNGNESLSYQEFFD TTVKLGQSLQNCGYKMNDDVVSICAEENKRF
P_pla_v0R	MMKREKNVYVGPPEKHLGNFTAGEMLYNALHKHSHIP--QAILDVNGNESLSYQEFFD TTVKLGQSLQNCGYKMNDDVVSICAEENKRF
P_pyr	..-MEDAKNIKKGPAPFPLEEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTAHAHEVNITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENS LQFF
C_dis	..-MEEDKNIMYGPAPFPLEEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTAHAHEVNITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENS LQFF
Ruler	0.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....1
Pv_body	NPVLAALYLGIPVATSNDMYTDGELTGHNLNISKPTIMFSSKKALPLILRVQQLNSFIKVVVIDSMYDINGVECVSTFVARYTDHTDFDL
Ph_body	NPVLAALYLGIPVATSNDMYTDGELTGHNLNISKPTIMFSSKKALPLILRVQQLNSFIKVVVIDSMYDINGVECVSTFVARYTDHTDFDL
Br_body	NPVLAALYLGIPVATSNDMYTDGELTGHNLNISKPTIMFSSKKALPLILRVQQLNSFIKVVVIDSMYDINGVECVSTFVARYTDHTDFDL
Ph_head	NPVLAALYLGIPVATSNDMYTDGELTGHNLNISKPTIMFSSKKALPLILRVQQLNSFIKVVVIDSMYDINGVECVSTFVARYTDHTDFDL
Rhago	YVPVIAALYMGVITATVNDYSYTERELLETNLNISKPELVFCSKKAIKMMMLKRNVNFIKVVVIDSKEDMGEAQLCSNFMARYSEPNLDVR
Pirea	IPITIASAWYIGMVVAVPNEDYIPDELCKVGTISKPILVFTRKILPKVLEVKDRNTYIKRIILDSEENLGCESLHNFMSRYSDN--NLQ
P_pla_v0R	IPITIASAWYIGMVVAVPNEDYIPDELCKVGTISKPILVFTRKILPKVLEVKDRNTYIKRIILDSEENLGCESLHNFMSRYSDN--NLQ
P_pyr	MPVCGALFIVGVAVPANDIYNERELLSNMNISOPTVVFVSKKGLQKILNVQKLPITQIKIIMDSKTDYQGFQSMYTFVSHLPPGFNEY
C_dis	MPVCGALFIVGVAVPANDIYNERELLSNMNISOPTVVFVSKKGLQKILNVQKLPITQIKIIMDSKTDYQGFQSMYTFVSHLPPGFNEY
Ruler	80.....190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....2
Pv_body	SFTPKDFDPLEKIALIMSSGTTGLPKGVVLSHRSLTIRFVHSRDPYIGTRTPQTSILSLVPPHFAFGMFTLSYFVVLKVMVLMKFFE
Ph_body	SFTPKDFDPLEKIALIMSSGTTGLPKGVVLSHRSLTIRFVHSRDPYIGTRTPQTSILSLVPPHFAFGMFTLSYFVVLKVMVLMKFFE
Br_body	SFTPKDFDPLEKIALIMSSGTTGLPKGVVLSHRSLTIRFVHSRDPYIGTRTPQTSILSLVPPHFAFGMFTLSYFVVLKVMVLMKFFE
Ph_head	SFTPKDFDPLEKIALIMSSGTTGLPKGVVLSHRSLTIRFVHSRDPYIGTRTPQTSILSLVPPHFAFGMFTLSYFVVLKVMVLMKFFE
Rhago	NFKPRDFDAKEQVALIMSSGTTGLPKGVVLSHRSLTIRFVHSRDPYIGTRTPQTSILSLVPPHFAFGMFTLSYFVVLKVMVLMKFFE
Pirea	TFKPLHYDPVDQVAAILCSSGTTGLPKGVVLSHRSLTIRFVHSRDPYIGTRTPQTSILSLVPPHFAFGMFTLSYFVVLKVMVLMKFFE
P_pla_v0R	TFKPLHYDPVDQVAAILCSSGTTGLPKGVVLSHRSLTIRFVHSRDPYIGTRTPQTSILSLVPPHFAFGMFTLSYFVVLKVMVLMKFFE
P_pyr	DFVPEFDRDKTIALIMSSGTTGLPKGVVLSHRSLTIRFVHSRDPYIGTRTPQTSILSLVPPHFAFGMFTLSYFVVLKVMVLMKFFE
C_dis	DYVPTDFDRDKTIALIMSSGTTGLPKGVVLSHRSLTIRFVHSRDPYIGTRTPQTSILSLVPPHFAFGMFTLSYFVVLKVMVLMKFFE
Ruler	70.....280.....290.....300.....310.....320.....330.....340.....350.....3
Pv_body	GALFLKTIQNYKIPTIVVAPPVMMVFLAKSPLVDQYDLSLLEVATGGAPLGDVAEAVAKRKLPGIIOGYGLTETCCAVMITPHN-AVK
Ph_body	GALFLKTIQNYKIPTIVVAPPVMMVFLAKSPLVDQYDLSLLEVATGGAPLGDVAEAVAKRKLPGIIOGYGLTETCCAVMITPHN-AVK
Br_body	GALFLKTIQNYKIPTIVVAPPVMMVFLAKSPLVDQYDLSLLEVATGGAPLGDVAEAVAKRKLPGIIOGYGLTETCCAVMITPHN-AVK
Ph_head	GALFLKTIQNYKIPTIVVAPPVMMVFLAKSPLVDQYDLSLLEVATGGAPLGDVAEAVAKRKLPGIIOGYGLTETCCAVMITPHN-AVK
Rhago	GEFFLKTQNYKIPTIVVAPPVMMVFLAKSPLVDQYDLSLLEVATGGAPLGDVAEAVAKRKLPGIIOGYGLTETCCAVMITPHN-AVK
Pirea	QEVFLKATQDYEVRSVINVPSTILFLSKSPLVDKYDLSTLAELCCGAAPLAKEVAEIAVKRLNLPGIRCGYGLTESTSANIHTLHN-EFK
P_pla_v0R	QEVFLKATQDYEVRSVINVPSTILFLSKSPLVDKYDLSTLAELCCGAAPLAKEVAEIAVKRLNLPGIRCGYGLTESTSANIHTLHN-EFK
P_pyr	EELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTLIDKYDLSNLHEIASGGAPLKEVGEAVAKRFLPGIRQGYGLTETTSAILITPEG-DDK
C_dis	EELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTLIDKYDLSNLHEIASGGAPLKEVGEAVAKRFLPGIRQGYGLTETTSAILITPEG-DDK
Ruler	60.....370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....4
Pv_body	TGSTRPLPYIAKAVLDNATGKALGPERGEICFQSEIMKGYNNPEATIDTIDKDGWLHSGDIGYDEEDGNFFIVDRKELIKYKGYQ
Ph_body	TGSTRPLPYIAKAVLDNATGKALGPERGEICFQSEIMKGYNNPEATIDTIDKDGWLHSGDIGYDEEDGNFFIVDRKELIKYKGYQ
Br_body	TGSTRPLPYIAKAVLDNATGKALGPERGEICFQSEIMKGYNNPEATIDTIDKDGWLHSGDIGYDEEDGNFFIVDRKELIKYKGYQ
Ph_head	TGSTRPLPYIAKAVLDNATGKALGPERGEICFQSEIMKGYNNPEATIDTIDKDGWLHSGDIGYDEEDGNFFIVDRKELIKYKGYQ
Rhago	KGAIFLKTQNYKIPTIVVAPPVMMVFLAKSPLVDQYDLSLLEVATGGAPLGDVAEAVAKRKLPGIIOGYGLTETCCAVMITPHN-AVK
Pirea	TGSTRVAPVYQAKIVDLTIGKSLGPNKRGELCFKSEIMKGYNNPEATIDTIDKDGWLHSGDIGYDEEDGNFFIVDRKELIKYKGYQ
P_pla_v0R	TGSTRVAPVYQAKIVDLTIGKSLGPNKRGELCFKSEIMKGYNNPEATIDTIDKDGWLHSGDIGYDEEDGNFFIVDRKELIKYKGYQ
P_pyr	SGSLGKVTYMAAKIIDRNTGKALGPNQVGEICIGMPVTKGYNNPEATIDTIDKDGWLHSGDIGYDEEDGNFFIVDRKELIKYKGYQ
C_dis	SGSLGKVTYMAAKIIDRNTGKALGPNQVGEICIGMPVTKGYNNPEATIDTIDKDGWLHSGDIGYDEEDGNFFIVDRKELIKYKGYQ
Ruler	50.....460.....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....5
Pv_body	VAPAELENLLQHPISADAGVTGVDFAGQLPAACVLESKGLTTEKEVQDFIAAQVTPTKHLRGGVVFVDSIPKPGTGLIRKELREI
Ph_body	VAPAELENLLQHPISADAGVTGVDFAGQLPAACVLESKGLTTEKEVQDFIAAQVTPTKHLRGGVVFVDSIPKPGTGLIRKELREI
Br_body	VAPAELENLLQHPISADAGVTGVDFAGQLPAACVLESKGLTTEKEVQDFIAAQVTPTKHLRGGVVFVDSIPKPGTGLIRKELREI
Ph_head	VAPAELENLLQHPISADAGVTGVDFAGQLPAACVLESKGLTTEKEVQDFIAAQVTPTKHLRGGVVFVDSIPKPGTGLIRKELREI
Rhago	VAPAELENLLQHPISADAGVTGVDFAGQLPAACVLESKGLTTEKEVQDFIAAQVTPTKHLRGGVVFVDSIPKPGTGLIRKELREI
Pirea	VAPAELEWLLQHPISADAGVTGVDFAGQLPAACVLESKGLTTEKEVQDFIAAQVTPTKHLRGGVVFVDSIPKPGTGLIRKELREI
P_pla_v0R	VAPAELEWLLQHPISADAGVTGVDFAGQLPAACVLESKGLTTEKEVQDFIAAQVTPTKHLRGGVVFVDSIPKPGTGLIRKELREI
P_pyr	VAPAELEWLLQHPISADAGVTGVDFAGQLPAACVLESKGLTTEKEVQDFIAAQVTPTKHLRGGVVFVDSIPKPGTGLIRKELREI
C_dis	VAPAELEWLLQHPISADAGVTGVDFAGQLPAACVLESKGLTTEKEVQDFIAAQVTPTKHLRGGVVFVDSIPKPGTGLIRKELREI
Ruler	40.....550.....
Pv_body	FAQRAPKSKL--
Ph_body	FAQRAPKSKL--
Br_body	FAKKAASKL--
Ph_head	FAREQAKSKL--
Rhago	LAQKSKL---
Pirea	LMEKASKL---
P_pla_v0R	LLEKSKL---
P_pyr	LKAKKGGKSKL---
C_dis	LVMGKSKL---

Figura 6.4. Alinhamento das luciferases de Phengodidae. Ph_body: *Phrixothrix hirtus*, lanternas laterais; Br_body: *Brasilocerus* sp., lanternas laterais; Pv_body: *P. viviani*, lanternas laterais (AF139644.1); Ph_head: *P. hirtus*, lanternas cefálicas (AF139645.1); Rhago: *Rhagophthalmus ohbai* (AB255748.1); P_pyr: *Photinus pyralis* (M15077.1), C_dis: *Cratomorphus distinctus* (AY633557.1); Pirea: *Pyrearinus termitilluminans* (AF116843.1); P_pla_v0R: *Pyrophorus plagiophthalmus*, lanterna ventral laranja (AAQ11692.1). As posições do alinhamento onde existe 100% de identidade entre as seqüências estão destacadas em cinza escuro. Aquelas em que um mesmo resíduo de aminoácido está presente em pelo menos 75% das seqüências estão em cinza claro.

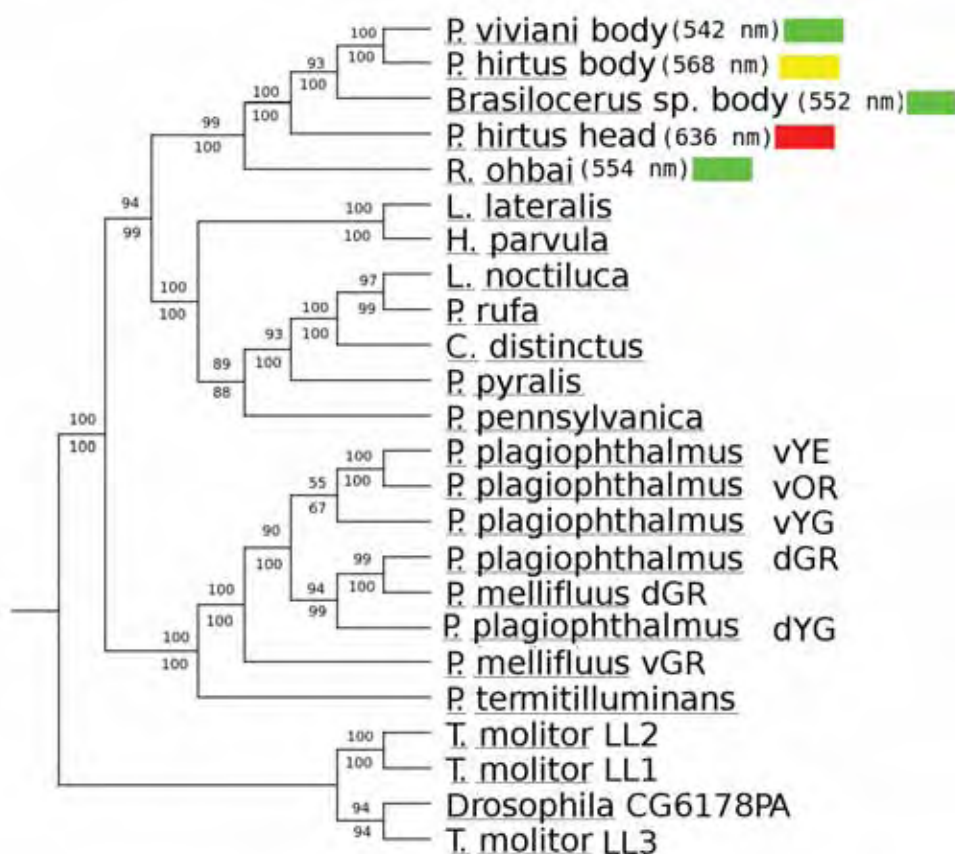


Figura 6.5. Análise filogenética das luciferases de Elateroidea. Os valores acima e abaixo dos ramos representam o suporte de *bootstrap* para os métodos de *Parcimônia* e *Neighbor-joining* respectivamente. Os valores entre parênteses indicam o comprimento de onda do pico de emissão da bioluminescência das luciferases. vYE: luciferase abdominal emissora de luz amarela; vOR: luciferase abdominal emissora de luz laranja; vYG: luciferase abdominal emissora de luz verde-amarelada; dGR: luciferase dorsal emissora de luz verde; dYG: luciferase dorsal emissora de luz verde-amarelada.

A lanterna da cabeça é unicamente presente nos membros da tribo Mastinocerini (VIVIANI e BECHARA, 1997) e como as lanternas do corpo e da cabeça expressam diferentes luciferases, podemos considerar as lanternas cefálicas e suas luciferases como sinapomorfias de Mastinocerini. Conseqüentemente, o mais razoável é acreditar que as luciferases da cabeça são codificadas por um novo gene.

Na análise filogenética das luciferases observamos que a luciferase do corpo

de *P. hirtus* é mais próxima da luciferases do corpo de outras espécies estudadas do que da luciferases da cabeça da mesma espécie. Entretanto, todas essas luciferases, isto é, as luciferases da cabeça e do corpo de todos os Mastinocerini estudados, são mais próximas entre si do que com a luciferase do corpo de *Rhagophthalmus ohbai*. Isso indica que as luciferase do corpo e da cabeça dos membros de Mastinocerini devem ter divergido após a divergência das subfamílias Phengodinae e Rhagophthalminae.

No mesmo sentido, como as lanternas cefálicas estão presentes em todos Mastinocerini mas não em outros Phengodinae, como nos membros da tribo Phengodini, provavelmente essas devem ter surgido apenas no ancestral de Mastinocerini e, portanto, devem ter surgido após a divergência das tribos Mastinocerini e Phengodini. Embora essa hipótese seja muito provável, apenas uma análise filogenética com luciferases de Phengodini poderia confirmá-la.

Com relação as cores, enquanto a bioluminescência na região do amarelo e, muito raramente, na região do laranja sejam encontradas nas lanternas laterais de Mastinocerini, cores na região do verde e verde-amarelado predominam nos membros de Phengodidae. Como existe um predomínio dessa cor em Phengodinae e em Rhagophthalminae só se conhece lanternas laterais emitindo luz na região do verde, provavelmente essa cor deve representar a ancestral das lanternas de Mastinocerini.

As lanternas cefálicas, por outro lado, tem espectro de emissão, em geral, desviados para o vermelho quando comparadas com as lanternas laterais (tabela 6.3). Como essas luciferases são parálogas, as possíveis explicações para essa diferença nas cores poderia ser: (I) evolução paralela das luciferases da cabeça em direção do vermelho ou (II) as luciferases cefálicas tiveram um ancestral com cor já

desviada para o vermelho. A hipótese mais simples, ou mais parcimoniosa, aponta para a segunda explicação. O gênero *Phrixothrix* é o caso mais extremo, apresentando membros com luciferases cefálicas emitindo comprimento de ondas superiores a $\lambda_{\text{máx}} = 600$ nm, indicando que, possivelmente, o ancestral desse gênero apresentava emissão em comprimento de onda ainda mais longo que a luciferase cefálica ancestral de Mastinocerini.

Entretanto, não é muito simples raciocinar com todos os membros de Phengodinae, já que o comprimento de onda mais longo publicado para uma luciferase do corpo é de $\lambda_{\text{máx}} = 586$ nm, enquanto o comprimento de onda mais curto de uma luciferase da cabeça é $\lambda_{\text{máx}} = 565$ nm (VIVIANI e BECHARA, 1997). Esses últimos dados indicam que flutuações aleatórias também devem ter seu papel na determinação da cor da bioluminescência. Inclusive, análise da distribuição dos comprimentos de ondas emitidos pelas duas lanternas - cefálicas e laterais - sugerem uma distribuição Gaussiana, suportando que, provavelmente, flutuações aleatórias, provavelmente na forma de deriva genética, também venham ocorrendo.

Embora a história evolutiva das cores da bioluminescência em Phengodinae não seja uma discussão finalizada, acreditamos ter dados suficientes para propor um modelo a respeito. Nossos dados e raciocínio indicam um cenário como o da figura 6.6, com o ancestral das luciferases de Phengodinae (Phengodidae excluindo-se Rhagophthalminae) sendo uma luciferase das lanternas laterais emitindo na região do verde; as luciferases da cabeça de Mastinocerini aparecem após a divergência das tribos Mastinocerini e Phengodini, a partir de um evento de duplicação gênica da luciferase verde; o novo gene sofre mutações posteriores deslocando seu comprimento de onda em direção ao vermelho, atingindo, posteriormente, seu extremo no ancestral do gênero *Phrixothrix*.

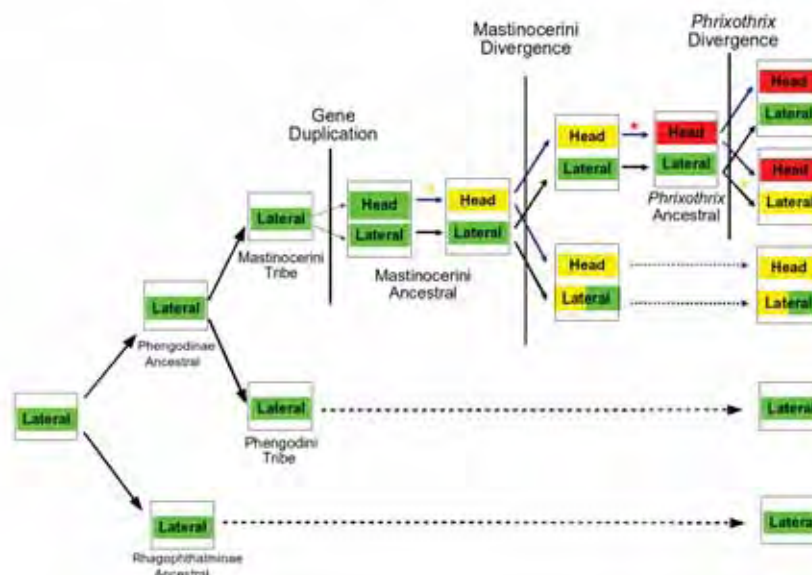


Figura 6.6. Modelo de evolução das cores em Phengodidae

Tabela 6.3. Comprimento de onda emitido por diferentes lanternas de diferentes espécies (ordenadas por comprimento de onda)

Espécie	Localização da Lanterna	λ max (nm)	Referência
<i>P. viviani</i>	lateral	535	Viviani et al., 1993
<i>Phengodes laticollis</i>	larva	535	Viviani et al., 1993
<i>R. ohbai</i>	larva (luciferase)	538	Ohmiya et al., 2000
<i>Phrixothrix sp2</i>	lateral	540	Viviani et al., 1993
<i>Pseudophengodes brasilienses</i>	Macho adulto	542	Viviani et al., 1997
<i>Mastinocerus nigrocollis</i>	Macho adulto	549	Viviani et al., 1993
<i>Brasilocerus impressicollis</i>	lateral	550	Viviani et al., 1997
<i>Stenophrixothrix sp2</i>	lateral	550	Viviani et al., 1993
<i>Stenophrixothrix sp3</i>	lateral	552	Viviani et al., 1993
<i>P. viviani</i>	Macho adulto	560	Viviani et al., 1993
<i>P. hirtus</i>	lateral	563	Viviani et al., 1993
<i>Stenophrixothrix sp2</i>	cefálica	565	Viviani et al., 1993
<i>Phrixothrix heydeni</i>	lateral	568	Viviani et al., 1997
<i>Stenophrixothrix sp3</i>	cefálica	570	Viviani et al., 1993
<i>Stenophrixothrix sp1</i>	lateral	577	Viviani et al., 1993
<i>Mastinocerus nigrocollis</i>	cefálica	578	Viviani et al., 1993
<i>Mastinomorphus sp1.</i>	cefálica fêmea	578	Viviani et al., 1997
<i>Mastinomorphus sp1.</i>	macho adulto	580	Viviani et al., 1997
<i>Mastinocerus nigrocollis</i>	lateral	580	Viviani et al., 1993
<i>Mastinomorphus sp1.</i>	fêmea lateral	580	Viviani et al., 1997
<i>Mastinomorphus sp2.</i>	fêmea lateral	586	Viviani et al., 1997
<i>Brasilocerus impressicollis</i>	cefálica	595	Viviani et al., 1997
<i>Mastinomorphus sp2.</i>	cefálica fêmea	597	Viviani et al., 1997
<i>Stenophrixothrix sp1</i>	cefálica	597	Viviani et al., 1993

<i>Phrixothrix sp4</i>	macho adulto	600	Viviani et al., 1993
<i>Phrixothrix sp2</i>	cefálica	600	Viviani et al., 1993
<i>P. hirtus</i>	cefálica	609	Viviani et al., 1993
<i>P. viviani</i>	cefálica	620	Viviani et al., 1993
<i>Phrixothrix heydeni</i>	cefálica larval	636	Viviani et al., 1997

6.1.5. Subclonagem, expressão e purificação das luciferases do corpo de *P. hirtus* e *Brasilocerus* sp.

Subclonamos para expressão heteróloga as luciferases do corpo de *Brasilocerus* sp. e *P. hirtus* no vetor pproEx HTA (Invitrogen). O procedimento foi realizado conforme protocolo descrito nos Materiais e Métodos 5.2.6. Nossa metodologia foi eficaz no sentido de colocar os genes das luciferases na janela de leitura correta do vetor, como pode ser observado na figura 6.7, que mostra o resultado do seqüenciamento do vetor de expressão já com a luciferase do corpo de *P. hirtus*. Nessa figura pode-se notar que o gene da luciferase de *P. hirtus* está na mesma a janela de leitura que a cauda poli(His) adicionada pelo vetor. Entretanto, mesmo utilizando uma câmera CCD de alta sensibilidade e luminometria (Materiais e Métodos 5.2.7 e 5.2.12), não detectamos nenhum sinal de luminescência quando células contendo esses plasmídios foram cultivadas e induzidas a expressar o gene recombinante. Um controle positivo com a luciferase de *Pyrearinus termitiluminans*, no mesmo vetor e nas mesmas condições de cultivo e expressão, subclonadas com metodologia semelhante, apresentou a luminescência esperada.

Na purificação dessas enzimas em condições não desnaturantes, isto é, em tampão fosfato 0.1M pH 7.5, só observamos uma única banda de tamanho diferente do esperado (observada em torno de 25 KDa, enquanto uma luciferase teria em torno de 60 KDa) no gel de SDS-Page (figura 6.8), o que nos levou a pensar que as luciferases estavam insolúveis.

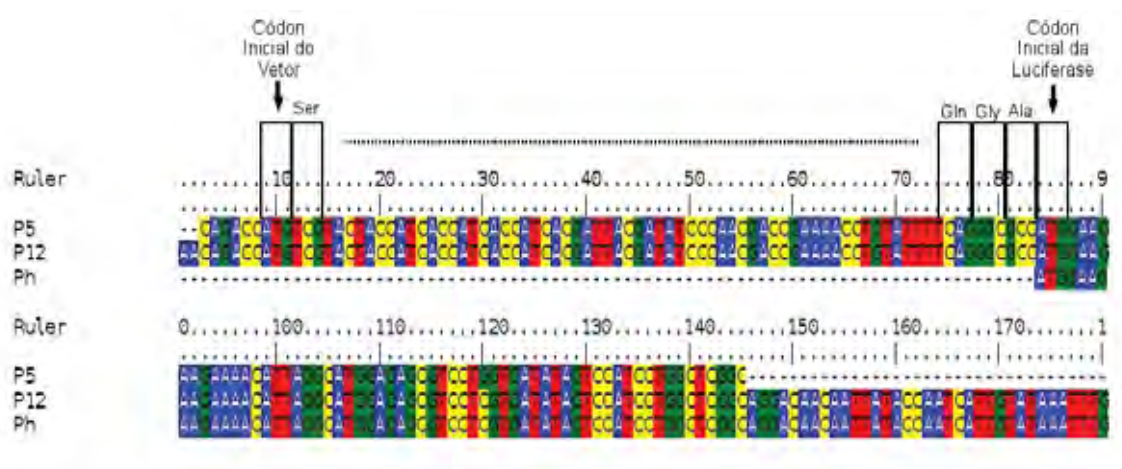


Figura 6.7. Seqüência mostrando a transição entre o vetor de expressão e a região 5' da luciferase do corpo de *P. hirtus* no vetor pproExHTA. A figura mostra que a seqüência codificante de luciferase está na mesma janela de leitura que a cauda adicionada pelo vetor.

Em condições desnaturantes, onde adiciona-se uréia ao tampão A na concentração final de 8M e todas as proteínas ficam em solução, pudemos identificar uma banda parcialmente pura do tamanho esperado, isto é, em torno de 60 KDa (figura 6.9). Com a intenção de confirmar que as bandas observadas na purificação eram das luciferases do corpo de *P. hirtus* e *Brasilocerus*, realizamos a imunodeteção por Western Blotting (figura 6.10).

O resultado da imunodeteção (com anticorpo policlonal primário obtido contra a luciferase da cabeça de *P. hirtus*) foi positivo para ambas as purificações (figura 6.10).

Confirmada a expressão e purificação das luciferases, realizamos a diálise dos eluatos em 1000 volumes de tampão A fosfato suplementado com 10% de glicerol e DTT. Entretanto, a diálise logo resultou na formação de um precipitado branco que acreditamos ser a luciferase recombinante insolúvel.

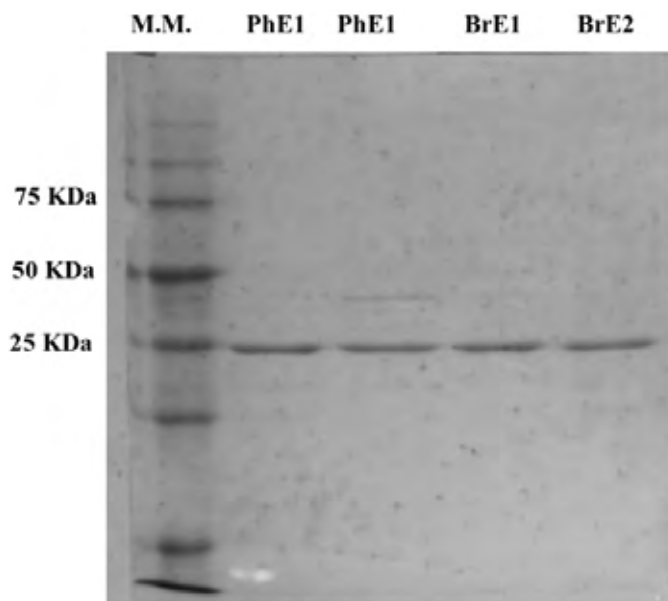


Figura 6.8. SDS Page da purificação das luciferases de *P. hirtus* (Ph) e *Brasilocerus* (Br) em condições não desnaturantes. M.M, marcador molecular; PhE1, eluição em Tampão A pH 5.9; PhE2, eluição em Tampão A pH 4.5.; BrE1, eluição em Tampão A pH 5.9; BrE2, eluição em Tampão A pH 4.5.

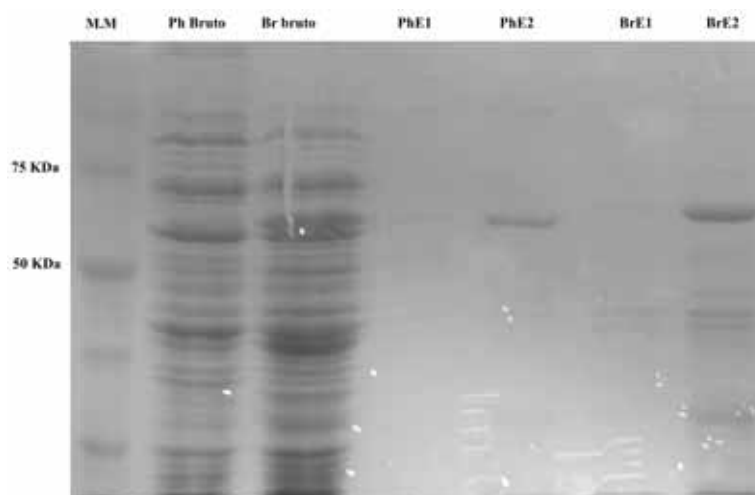


Figura 6.9. SDS Page da purificação das luciferases de *P. hirtus* (Ph) e *Brasilocerus* sp. (Br) em condições desnaturantes (Uréia 8M). M.M, marcador molecular; Ph Bruto, extrato clarificado da luciferase de *P. hirtus*; Br Bruto, extrato clarificado da luciferase de *Brasilocerus* sp.; PhE1, eluição em Tampão A uréia pH 5.9; PhE2, eluição em Tampão A uréia pH 4.5.; BrE1, eluição em Tampão A uréia pH 5.9; BrE2, eluição em Tampão A uréia pH 4.5.

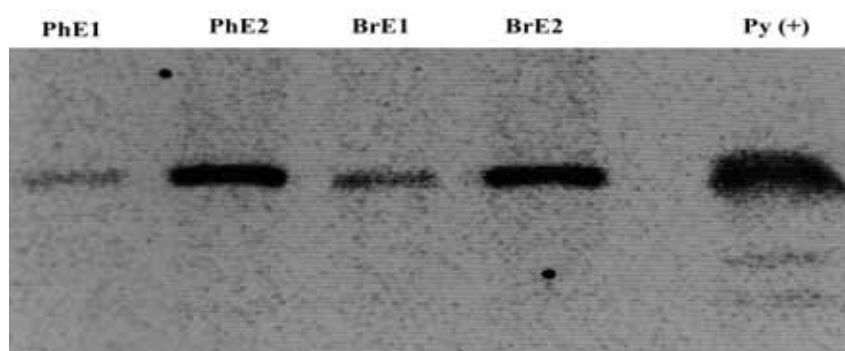


Figura 6.10. Western Blot da purificação das luciferase de *P. hirtus* (Ph) e *Brasilocerus* sp. (Br) em condições desnaturantes (Uréia 8M): PhE1, eluição em Tampão A uréia pH 5.9; PhE2, eluição em Tampão A uréia em pH 4.5.; BrE1, eluição em Tampão A uréia pH 5.9; BrE2, eluição em Tampão A uréia em pH 4.5.; Py (+), controle positivo, luciferase de *P. termitilluminans* purificada em condições não desnaturantes.

Tentamos variações do protocolo de purificação com a intenção de obter enzimas mais puras e ativas. Entretanto, preliminarmente, o melhor protocolo de purificação foi como acima descrito. Nós não observamos qualquer atividade luminescente com qualquer uma das luciferases expressas e purificadas, tanto *in vivo*, quanto nos extratos brutos, clarificados, eluatos e eluatos dialisados concentrados e diluídos 10, 100 e 1000 vezes.

6.2. Genoma mitocondrial de *Pyrophorus divergens*

6.2.1. Estrutura do genoma mitocondrial

O genoma de *Pyrophorus divergens* codifica 13 proteínas, 2 RNAs ribossomais, e 22 RNA transportadores, o que representa um genoma mitocondrial típico de inseto. A molécula contém 6521 adeninas, 4673 timinas, 3181 citosinas e 1745 guaninas, totalizando 16.120 pb. A organização genômica é basicamente a mesma dos outros genomas mitocondriais de Coleoptera e outros insetos (STEWART et al., 2003; FRIEDRICH et al., 2003; BAE et al., 2004), que compartilham a organização proposta para o genoma ancestral de Pancrustacea

(BOORE et al., 1998) (figura 6.11 e tabela 6.4).

As estruturas preditas dos tRNAs podem ser visualizadas na figura 6.12.

Comparativamente, *Pyrophorus divergens* apresentou um genoma mitocondrial compacto, apresentando apenas 1470 pb na região não codificante rica em A+T, identificada pela posição entre a subunidade menor do RNAr e o RNAt de Isoleucina (tabela 6.5). Acredita-se que essa região contenha a origem de replicação do genoma. Apenas outros 45 nucleotídeos não codificantes foram encontrados ao longo do genoma, esses estando principalmente em seqüências curtas de 1-7 pb (tabela 6.4). Adicionalmente, o genoma apresentou genes com sobreposição de seqüência totalizando 74 pb.

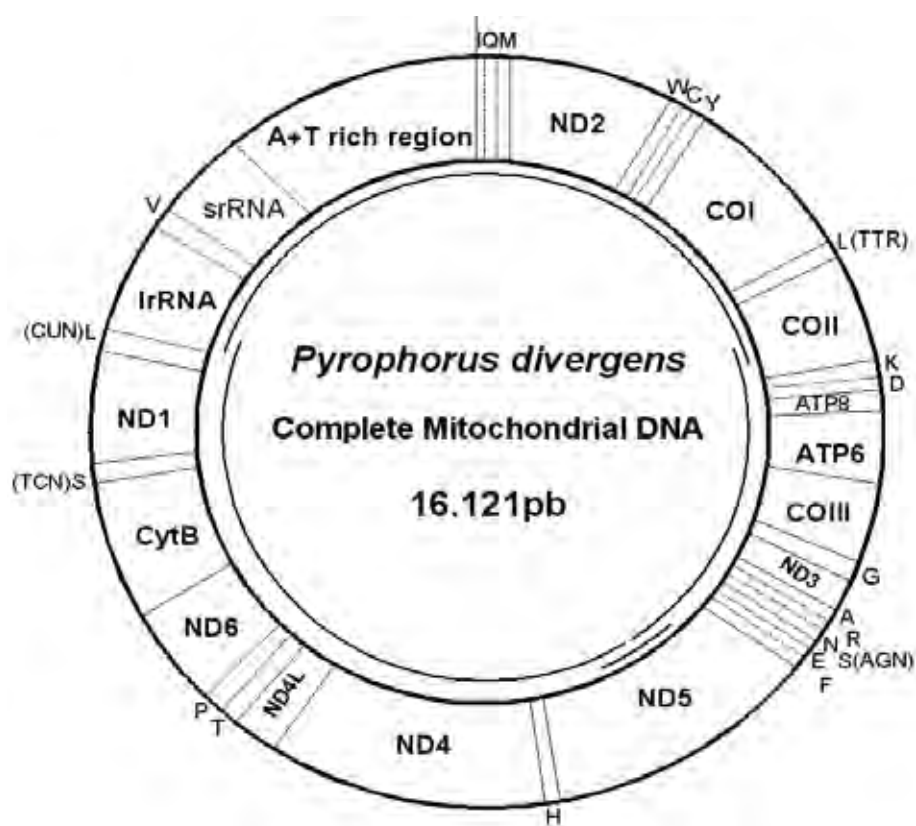


Figura 6.11. Organização do genoma mitocondrial de *Pyrophorus divergens*.

Tabela 6.4. Organização do genoma mitocondrial de *Pyrophorus divergens*. CI: Códon iniciador; CF: Códon finalizador; "-": Sobreposição de genes; "+" Espaçamento entre genes

Gene		Início	Fim	Anti códon	CI	CF	Nota
<i>tRNA-Ile</i>	F	1	66	GAT			
<i>tRNA-Gln</i>	R	132	64	TTG			- 3 pb (5')
<i>tRNA-Met</i>	F	132	197	CAT			- 1 pb (5')
<i>NADH2</i>	F	198	1220		ATA	TAA	
<i>tRNA-Trp</i>	F	1222	1289	TCA			+ 1 pb (5')
<i>tRNA-Cys</i>	R	1347	1285	GAC			- 5 pb (5')
<i>tRNA-Tyr</i>	R	1408	1345	GTA			- 3 pb (5')
<i>COXI</i>	F	1404	2945		ATC	TAA	- 5 pb (5')
<i>tRNA-Leu(TTR)</i>	F	2947	3009	TAA			+ 1 pb (5')
<i>COXII</i>	F	3012	3693		ATG	T	+ 2 pb (5')
<i>tRNA-Lys</i>	F	3688	3758	CTT			- 6 pb (5')
<i>tRNA-Asp</i>	F	3758	3822	GTC			- 1 pb (5')
<i>ATPase8</i>	F	3826	3981		ATT	TAA	+ 3 pb
<i>ATPase6</i>	F	3975	4649		ATG	TAA	- 7 pb (5')
<i>COXIII</i>	F	4649	5435		ATG	T	- 1 pb (5')
<i>tRNA-Gly</i>	F	5432	5495	TCC			- 4 pb (5')
<i>NADH3</i>	F	5503	5853		ATG	TAG	+ 7 pp (5')
<i>tRNA-Ala</i>	F	5848	5913	TGC			- 6 pb (5')
<i>tRNA-Arg</i>	F	5913	5978	TCG			- 1 pb (5')
<i>tRNA-Asn</i>	F	5983	6047	GTT			+ 4 pb (5')
<i>tRNA-Ser(AGN)</i>	F	6048	6114	TCT			
<i>tRNA-Glu</i>	F	6111	6175	TTC			- 4 pb (5')
<i>tRNA-Phe</i>	R	6235	6174	GAA			- 2 pb (5')
<i>NADH5</i>	R	7959	6239		ATA	T	- 5 pb (5')
<i>tRNA-His</i>	R	8016	7953	GTG			- 7 pb (5')

Tabela 6.4. Organização do genoma mitocondrial de *Pyrophorus divergens*. CI: Códon iniciador; CF: Códon finalizador; "-": Sobreposição de genes; "+" Espaçamento entre genes

Gene		Início	Fim	Anti códon	CI	CF	Nota
<i>NADH4</i>	R	9350	8018		ATG	T	+ 1 pb (5')
<i>NADH4L</i>	R	9634	9344		ATG	TAA	- 7 pb (5')
<i>tRNA-Thr</i>	F	9632	9695	TGT			+ 1 pb (5')
<i>tRNA-Pro</i>	R	9760	9696	TGG			
<i>NADH6</i>	F	9766	10272		ATA	TAA	+ 5 pb (5')
<i>CytB</i>	F	10272	11405		ATG	TAA	- 1 pb (5')
<i>tRNA-Ser(TCN)</i>	F	11404	11469	TGA			- 2 pb (5')
<i>NADH1</i>	R	12437	11487		TTG	TAG	+ 17 pb (5')
<i>tRNA-Leu(CUN)</i>	R	12498	12435	TAG			- 3 pb (5')
<i>IrRNA</i>	R	13770	12502				+ 3 pb (5')
<i>tRNA-Val</i>	R	13840	13771	TAC			
<i>srRNA</i>	R	14650	13845				
<i>Região rica em AT</i>	-	14651	16120				

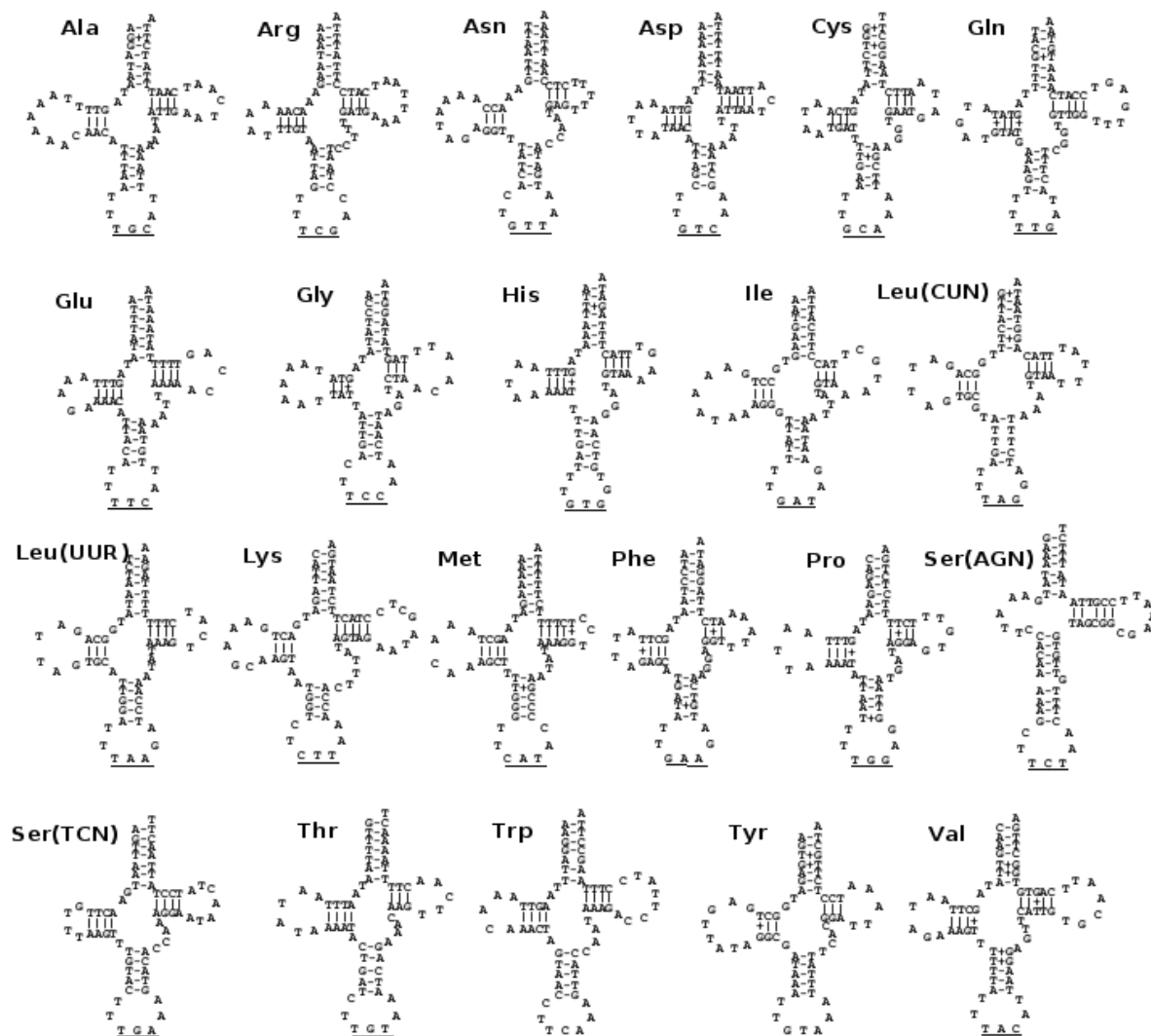


Figura 6.12. Estruturas secundárias previstas para os tRNAs mitocondriais de *Pyrophorus divergens*.

O códon inicial ATG foi encontrado em 6 dos 13 genes previstos, enquanto os demais genes apresentaram os códons ATT, ATC, ATA e TTG. Por outro lado, 7 dos 13 apresentaram o códon finalizador TAA, 4 deles apresentaram um único “T”, e os demais TAG (tabela 6.4).

A quantidade A+T representa 69.44% do genoma total, enquanto que a porcentagem de G+C é 30.55%, uma das mais altas entre os insetos estudados,

sendo menor apenas que *Tricholepidion gertschi* (AY191994) (31%), *Thermobia domestica* (AY639935) (33%), *Nesomachilis australica* (AY793551) (31%) e *Petrobius brevistylis* (AY956355) (32%).

Tabela 6.5. Composição genômica mitocondrial de diferentes Holometábolos. AA.*: Número de códons, excluindo-se os finalizadores; Nucs: número de nucleotídeos;

Taxon	Comprimento		Códons totais		16S		12S		Região Controle	
	Nucs.	%A+T	AA.*	%A+T	Nucs.	%A+T	Nucs.	%A+T	Nucs.	%A+T
Coleoptera										
<i>Pyrophorus divergens</i>	16120	69.44	3723	67.51	1269	72.73	806	72.20	1470	74.69
<i>R. ohbai</i>	15704	79.10	3692	77.48	1277	82.53	785	82.54	1044	85.34
<i>Anoplophora glabripennis</i>	15774	78.30	3693	76.95	–	–	1076	79.46	1115	87.98
<i>Tribolium castaneum</i>	15881	71.68	3700	69.17	1280	76.01	774	76.22	1239	82.48
<i>Pyrocoelia rufa</i>	17739	77.41	3689	76.27	1242	81.64	765	81.83	1522	87.58
<i>Crioceris duodecimpunctata</i>	15880	76.88	3694	75.20	1276	82.44	804	79.60	1220	83.27
Diptera										
<i>Anopheles gambiae</i>	15363	77.56	3733	75.93	1325	82.49	800	79.62	518	94.2
<i>Drosophila yakuba</i>	16019	78.58	3727	76.64	1326	83.33	789	79.34	1077	92.85
Lepidoptera										
<i>Bombyx mori</i>	15643	81.32	3714	79.50	1375	84.36	783	85.56	499	95.39
<i>Ostrinia furnacalis</i>	14536	80.37	3719	79.35	1339	84.98	435	82.75	–	–
Hymenoptera										
<i>Apis mellifera ligustica</i>	16343	84.85	3676	83.24	1371	84.60	786	81.42	827	96.00

Excluindo-se os códons finalizadores, o genoma contém 3723 trincas codificantes de aminoácidos, ou 11.169 nucleotídeos, dos quais 67,51% são A+T. A subunidade maior do RNAr apresenta 1269 pb, onde 72,73% é A+T, enquanto a subunidade menor apresenta 806 pb, com 74,69% de A+T (Tabela 6.5).

A quantidade de A+T observadas na primeira, segunda e terceira posições dos códons foram, respectivamente, 62,36%, 66,28% e 73,88%.

6.2.2. Análise filogenética do genoma mitocondrial

Todas as seqüências protéicas preditas pelo seqüenciamento do genoma foram alinhadas e concatenadas para reconstruir as relação filogenéticas de Coleópteros com genoma mitocondrial disponível (figura 6.13). A topologia resultante concorda com aquela publicada por Bae et al. (2004). O clado de Coleoptera concorda parcialmente com a visão clássica (CROWSON, 1972; LAWRENCE e NEWTON, 1995), agrupando todos os membros de Cucujiformia em um clado, e os bioluminescentes, membros de Elateriformia, em outro. Entretanto, diferentemente da visão tradicional, nossa análise agrupou *Rhagophthalmus ohbai* (Ragophthalminae:Phengodidae) e *Pyrophorus divergens* (Elateridae), deixando em um clado vizinho *Pyrocoelia rufa* (Lampyridae). Na visão clássica, *R. ohbai* e *P. rufa* deveriam estar no mesmo clado (CROWSON, 1972).

As análises filogenéticas com todos os genes concatenados suportaram, portanto, a monofilia de Elateroidea *sensu* Lawrence e Newton (1995), por agrupar todos os coleópteros bioluminescentes com genoma mitocondrial determinado – *R. ohbai*, *P. rufa* e *P. divergens* – em um grupo monofilético. Por outro lado, nossas análises não suportaram o agrupamento Cantharoidea *sensu* Crowson (1972), pelo fato de o clado *R. ohbai* e *P. rufa* ser parafilético.

De acordo com Crowson (1972) e Beutel (1995), a bioluminescência de Phengodidae e Lampyridae foram herdadas de um mesmo ancestral. Nossas análises, ao indicarem um parentesco mais próximo de *R. ohbai* e *P. divergens*, indicam possível independência dessas. Considerando-se que a independência da bioluminescência de Elateridae já tem grande suporte (SAGEGAMI-OBA et al., 2007; BOCAKOVA et al., 2007), especulamos que a bioluminescência pode ter surgido, independentemente, 3 vezes em Elateroidea *sensu* Lawrence e Newton (1995).

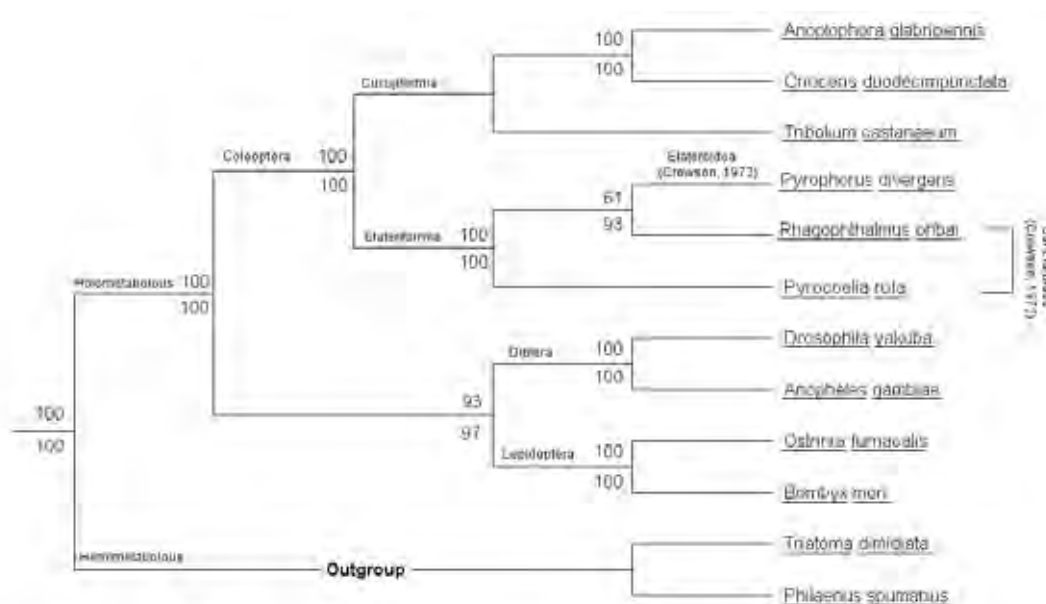


Figura 6.13. Filogenia dos genomas mitocondriais de Holometabola. Os valores acima e abaixo dos ramos representam o suporte de *bootstrap* para os métodos de Parcimônia e *Neighbor-joining* respectivamente.

Embora análises filogenéticas baseadas nos genes das luciferases de Coleoptera concordem com a visão tradicional (figura 6.14), é notável que as luciferases de Elateridae e Phengodidae são pH-insensíveis, enquanto as luciferases de Lampyridae são sensíveis ao pH (VIVIANI, 2002).

Nossos resultados são baseados em uma matriz de 3784 caracteres e claramente indicam para a formação do clado monofilético com *P. divergens* e *R. ohbai*. Entretanto, salientamos que, quando utilizamos cada gene separadamente como matriz de dados, observamos a reconstrução do clado tradicional em 30% das análises.

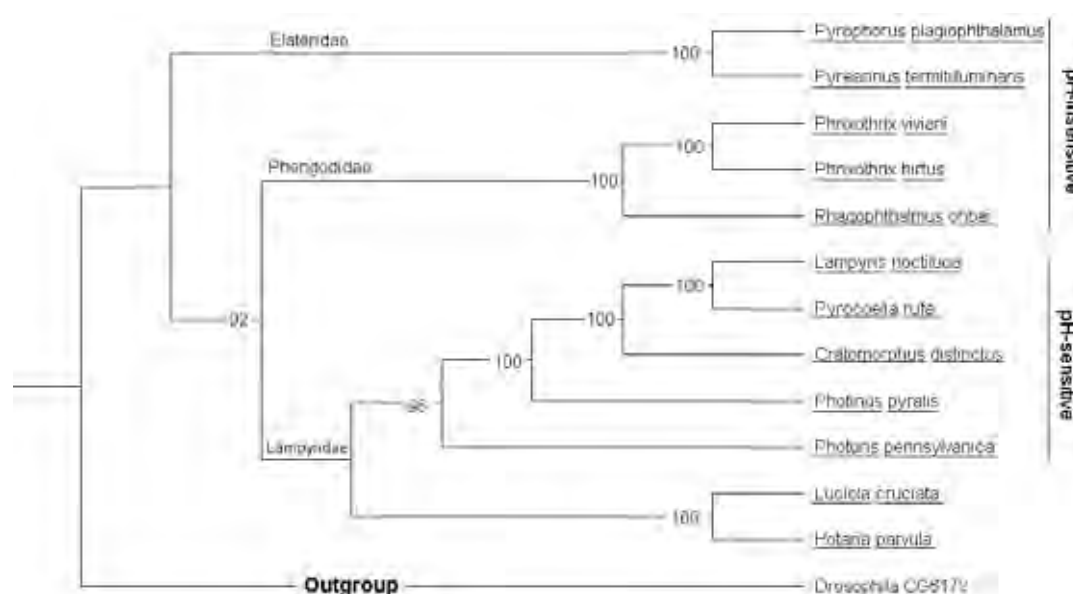


Figura 6.14. Filogenia dos cDNA codificantes de luciferases. Os valores nos ramos representam o suporte de *bootstrap* para o método *Neighbor-joining*.

Para reconstruir relações filogenéticas de um grande número de espécies não podemos utilizar todas as regiões protéicas do genoma mitocondrial, devido a alta quantidade de recursos financeiros e de tempo que esses estudos demandariam. Paralelamente, não é possível generalizar sobre a utilidade de genes específicos para diferentes grupos e níveis taxonômicos (SIMON et al., 1994). Com a intenção de achar genes que refletem a evolução do genoma completo, realizamos análises filogenéticas por meio dos métodos de parcimônia e *neighbor-joining* utilizando-se as seqüências de cada gene como matriz de dados.

Pelo método de parcimônia, apenas as topologias construídas a partir dos genes NADH2 e COX2 foram congruentes com aquela baseada em todos os genes concatenados, isto é, reconstruiu os mesmo ramos de Coleoptera com índices de suporte superiores a 50%. Da mesma forma, usando o método de *neighbor-joining*,

apenas os genes NADH2 e NADH4 foram consistentes.

Quando analisamos os índices de consistência rescalonados, os menores níveis de homoplasia foram encontrados nos seguintes genes: COX2, NADH4L, COX3, COX1 e CytB (tabela 6.6). Excluindo-se NADH4L, esses são também os genes mais conservados.

Também medimos a presença de sinal filogenético pelo índice G1 (HILLIS HUELSENBECK, 1992), que mede a assimetria da distribuição do número de passos de todas as topologias possíveis. Excluindo-se o gene *ATP8*, todos os genes codificantes de proteína apresentaram valores significativos ao nível de 1%, indicando a presença de informação filogenética. Entretanto, verificamos uma forte correlação de Pearson negativa (-0.7840) entre o comprimento do gene e o valor de G1, sugerindo que, talvez, essa medida não seja tão confiável quanto se esperava pelos resultados de Hillis e Huelsenbeck (1992), mesmo utilizando limites conservadores.

A utilidade de combinações gênicas foi testada concatenando-se os genes *ATP6* e *CytB*, que reconstruíram topologias semelhantes àquela esperada e ainda apresentaram bons índices de consistência, com *NADH2* e *COX2*, que reconstruíram topologias congruentes com aquela utilizando-se todos os genes mitocondriais. Os melhores resultados foram obtidos com a combinação de *NADH2* com *ATP6* ou *COX2*, gerando a mesma topologia e com suporte dos ramos muito próximos daqueles quando utilizadas todas as seqüências gênicas. Fortuitamente, esses genes estão entre os menores entre aqueles testados e, portanto, além da eficiência em estimar a topologia congruente, ainda são os mais fáceis de serem trabalhados no laboratório.

Tabela 6.6. Informação, conservação, sinal filogenético e quantidade de homoplasia de cada gene mitocondrial. Total: quantidade total de caracteres no alinhamento; Info: porcentagem de caracteres informativos; Constante: porcentagem dos caracteres constantes; RC: índice de consistência rescalonado

Gene	Total	Info	Constante	RC
<i>ATP6</i>	230.0000	0.5130	0.3522	0.2801
<i>ATP8</i>	53.0000	0.7736	0.1509	0.2085
<i>COX1</i>	515.0000	0.2641	0.6155	0.2812
<i>COX2</i>	229.0000	0.4629	0.4105	0.3435
<i>COX3</i>	263.0000	0.4449	0.4297	0.2910
<i>CYTB</i>	384.0000	0.4375	0.4063	0.2855
<i>NADH1</i>	329.0000	0.4985	0.3252	0.2503
<i>NADH2</i>	348.0000	0.7500	0.1494	0.2406
<i>NADH3</i>	119.0000	0.5798	0.3361	0.2665
<i>NADH4</i>	451.0000	0.6208	0.2794	0.2494
<i>NADH4L</i>	101.0000	0.6040	0.1980	0.2954
<i>NADH5</i>	584.0000	0.5702	0.3031	0.2467
<i>NADH6</i>	178.0000	0.7697	0.1292	0.2497

VII. Conclusões Finais

As luciferases da cabeça e do corpo dos membros da tribo Mastinocerini (Coleoptera: Phengodidae) são codificadas por genes parálogos.

Embora a evolução desse genes ainda necessite mais estudos, com base nos dados já existentes, propusemos um modelo de evolução onde o ancestral das luciferases de Phengodinae (Phengodidae excluindo Rhagophthalminae) é uma luciferase das lanternas laterais emitindo luz na região do verde; as luciferases da cabeça de Mastinocerini aparecem após a divergência de Mastinocerini e Phengodini, a partir de um evento de duplicação gênica dessa luciferase verde; o novo gene sofre mutações posteriores deslocando seu comprimento de onda em direção ao vermelho, atingindo, posteriormente, seu extremo no ancestral do gênero *Phrixothrix*.

Relativo ao genoma mitocondrial de *Pyrophorus divergens*, observamos que esse tem estrutura semelhante a dos demais Coleoptera, isto é, 16.120 pb e mesma disposição gênica.

A análise filogenética dos genomas mitocondriais dos coleópteros luminescentes estudados aponta para um parentesco mais próximo de *P. divergens* com *R. ohbai*, e não com *P. rufa*, como na visão clássica. Dessa forma, nossas análises suportam o grupo Elateroidea *sensu* Lawrence e Newton (1995), porém não suportam o grupo Cantharoidea *sensu* Crowson (1972).

Esses dados, analisados conjuntamente com dados de Sagegami-Oba et al. (2007) e Bocakova et al. (2007), indicam que a bioluminescência pode ter surgido 3 vez independentemente em Elateroidea.

Os genes NADH2 e COX2, usados independentemente ou concatenados, representam, segundo nossos dados atuais, as melhores possibilidades de se estimar, a partir de uma amostra, a evolução do genoma mitocondrial completo.

VIII. Bibliografia

ABASCAL, F.; Posada, D.; Knight, R.D.; Zardoya, R. (2006). Parallel evolution of the genetic code in arthropod mitochondrial genomes. *PLoS Biology*, 4, e127.

ABASCAL, F.; Posada, D.; Zardoya, R. (2007). MtArt: a new model of amino acid replacement for Arthropoda. *Molecular biology and evolution*, 24, 1–5.

ARNOLDI, F.G.C. (2005). MPAlign editor: uma ferramenta gráfica e intuitiva para alinhamentos moleculares. *Anais do II Workshop TIDIA—FAPESP*.

ARNOLDI, F.G.C.; Ogoh, K.; Ohmiya, Y.; Viviani, V. R. (2007). Mitochondrial genome sequence of the Brazilian luminescent click beetle *Pyrophorus divergens* (Coleoptera: Elateridae): Mitochondrial genes utility to investigate the evolutionary history of Coleoptera and its bioluminescence. *Gene*, 405, 1-9.

AYABE, K.; Zako, T.; Ueda, H. (2005). The role of firefly luciferase C-terminal domain in efficient coupling of adenylation and oxidative steps. *FEBS letters*, 579, 4389-4394.

BAE, J.S.; Kim, I.; Sohn, H.D.; Jin, B.R. (2004). The mitochondrial genome of the firefly, *Pyrocoelia rufa*: complete DNA sequence, genome organization and phylogenetic analysis with other insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32, 978-985.

BEUTEL, R.G. (1995). Phylogenetic analysis of Elateriformia (Coleoptera: Polyphaga) based on larval characters. *Journal of Zoological Systematics and*

Evolutionary Research, 33, 145–171.

BOCAKOVA, M.; Bocak, L.; Hunt, T.; Teraväinen, M.; Vogler, A. P. (2007). Molecular phylogenetics of Elateriformia (Coleoptera): evolution of bioluminescence and neoteny. *Cladistics* 23, 477–496.

BONFIELD, J.K.; Smith, K.F.; Staden, R. (1995). A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research*, 23, 4992–4999.

BOORE, J.L.; Lavrov, D.V.; Brown, W.M. (1998). Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature* 392, 667–668.

BRANCHINI, B.R.; Murtiashaw, M.H.; Magyar, R. A.; Portier, N.C.; Ruggiero, M.C.; Stroh, J.G. (2002). Yellow-green and red firefly bioluminescence from 5,5-dimethyloxyluciferin. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 2112-2113

BRANCHINI, B.R.; Southworth, T.L.; Murtiashaw, M.H.; Magyar, R.A.; Gonzalez, S.A.; Ruggiero, M.C.; Stroh, J.G. (2004). An alternative mechanism of bioluminescence color determination in firefly luciferase. *Biochemistry* 43,7255-62.

BRANHAM, M. A.; Wenzel, J. W. (2003). The origin of photic behavior and the evolution of sexual communication in fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *Cladistics* 19, 1-22.

CAVALLI-SFORZA, L.L.; Edwards, A.W.F. (1964). Analysis of human evolution. *Genetics Today*, 3:923-933.

CAVALLI-SFORZA, L.L.; Edwards, A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis: models and estimation procedure. *Evolution*, 21:550-570.

CHEN, W-J.; Bonillo, C.; Leointre, G. (2003). Repeatability of clades as a criterion of reliability: a case study for molecular phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with a larger number of taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26, 262-288

CHOI, Y.S.; Bae, J.S.; Lee, K.S.; Kim, S.R.; Kim, I.; Kim, J.G.; Kim, K.Y.; Kim, S.E.; Suzuki, H.; Lee, S.M.; Sohn, H.D.; Jin, B.R. (2003). Genomic structure of the luciferase gene and phylogenetic analysis in the Hotaria-group fireflies. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134, 199-214

CHOMCZYNSKY, P.; Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acidic guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extractions. *Analytical Biochemistry*, 162, 156 – 159.

COSTA, C. ; Vanin, P. ; Colepicolo-Neto, P. (1986). Larvae of Neotropical Coleoptera, XIV: First record of bioluminescence in the family Staphilinidae (Xantholinini). *Revista Brasileira de Entomologia*, 30, 101-104.

COSTA, C. (1975). Systematics and evolution of the tribes Pyrophorini and Heligmini, with description of Campyloxeninae, new subfamily (Coleoptera: Elateridae). *Arquivos de Zoologia*. 26, 49–190.

COSTA, C. (1979). Novas Especies do Gênero *Hypsiophthalmus Latreille*, 1834 e Revalidação de *Pyrearinus Brevicollis* (Eschscholtz, 1829), Comb.N. (Coleoptera, Elateridae, Pyrophorinae). *Papéis avulsos de zoologia*, 32, 261-276

COSTA, C.; Vanin, S.A.; Casarini-Chen, S.A.. *Larvas de Coleoptera do Brasil*. 1988. Museu de Zoologia. Universidade de São Paulo. São Paulo.

COSTA, C.. Estado de Conocimiento de los Coleoptera Neotropicales. In: Martin-Pera, F.; Morrone, J. J.; Melic, A.. *PRIBES*. 2000. Zaragoza, Spain. p99-114

CROWSON, R.A. (1972). A review of the classification of Cantharoidea (Coleoptera), with the definition of two new families, Cneoglossidae and Omethidae. *Revista de la Universidad de Madrid*, 21, 35–77.

De WET, J.R.; Wood, K.V.; Helinski, D.R.; DeLuca, M. (1985). Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., 82, 7870–7873.

DeLUCA, M. (1969). Hydrophobic nature of the active site of firefly luciferase. *Biochemistry*, 8, 160–166.

EDWARDS, A.W.F.; Cavalli-Sforza, L.L. (1963). The reconstruction of evolution. *Annals of Human Genetics*, 27, 104-105.

EFRON, B. (1979). Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *The Annals of Statistics*, 7, 1-26.

FELSENSTEIN, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.

FELSENSTEIN, J. *Inferring Phylogenies*. 2004. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts.

FITCH, W.M.; Margoliash, E. (1967). The construction of phylogenetic trees. *Science*, 155, 279-284.

FRAGA, H. (2008). Firefly luminescence: A historical perspective and recent developments. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 7, 146-158 .

FRIEDRICH, M.; Muqim, N. (2003). Sequence and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of the flour beetle *Tribolium castanaeum*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 26, 502–512.

FUJII, H.; Noda, K.; Asamo, Y.; Kuroda, A.; Sakata, M.; Tokida, A. (2007). Increase in bioluminescence intensity of firefly luciferase using genetic modifications. *Analytical Biochemistry*, 366, 131-136.

FUJINO T.; Yamamoto, T. (1992). Cloning and functional expression of a novel long chain acyl-CoA synthetase expressed in brain. *The Journal of Biochemistry*, 111, 197-203.

GASCUEL, O.; Steel, M. (2006). Neighbor-Joining revealed. *Molecular Biology*

and Evolution, 23, 1997-2000.

HADDOCK, S.H.D. Luminous marine organisms. In: DAUNERT, S; Deo, S.K., Photoproteins in Bioanalysis. 2006. Wiley, New York, p. 25-47.

HARVEY, E.N. Bioluminescence. 1952. Academic Press, New York, 367-471.

HASTING, J.W. (1983). Biological diversity, chemical mechanisms and evolutionary origins of bioluminescent systems. *Journal of Molecular Evolution*, 19, 309-321.

HASTINGS, J.W.; Morin, J.G. Bioluminescence. In: Prosser, C.L. Neural and integrative animal physiology. 1991. New York: Wiley Interscience, 131–170.

HASTINGS, J.W.; Wood, K. Luciferases did not evolve from precursors having similar enzymatic properties. In: COOHILL, T.P.; Valenzano, D.P. Photobiology for the 21 st Century. 2000. Valdenmar, Overland Park, Kansas. p. 199-210.

HENIKOFF, S.; Henikoff, J.G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 89, 10915–10919.

HERRING, P.J. A Classification of Luminous Organisms. In: HERRING, P.J. (ed.). *Bioluminescence in Action*. 1978. Academic Press, London, 461-476.

HILLIS, D.M.; Bull, J.J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42, 182-192.

HILLIS, D.M.; Huelsenbeck, J.P. (1992). Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetics analyses. *Journal of Heredity*, 83, 189–195.

KITAYAMA, A.; Yoshizaki, H.; Ohmiya, Y.; Ueda, H.; Nagamune, T. (2003). Creation of the most stable firefly luciferase with pH-insensitive color. *Photochemistry and Photobiology*, 77, 333-338.

KJER, K.M. (2004). Aligned 18S and Insect Phylogeny. *Systematic biology*,

53, 506-514.

LAWRENCE, J.F.; Newton, A.F. (1995). Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references, and data on family-group names). In: Pakaluk, J., Slipinski, S.A. (eds.), *Biology, phylogeny, and classification of Coleoptera: Papers celebrating the 80th birthday of Roy A. Crowson*. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa. pp. 779-1006.

LI, W-H. *Molecular Evolution*. 1997. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.

LI, X.; Ogoh, K.; Ohba, N.; Liang, X.; Ohmiya, Y. (2007). Mitochondrial genomes of two luminous beetles, *Rhagophthalmus lufengensis* and *R. ohbai* (Arthropoda, Insecta, Coleoptera). *Gene*, 392,196–205.

LLOYD, J.E. (1971). Bioluminescent Communication in Insects. *Annual Review of Entomology*, 16, 97-122.

LLOYD, J.E. Insect Bioluminescence. In: HERRING, P.J. (ed.). *Bioluminescence in Action*. 1978. Academic Press, London, 241-272.

LOWE, T.M; Eddy, S.R. (1997). tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research*, 25, 955–964.

MASUDA, T.; Tatsumi, H.; Nakano, E. (1989). Cloning and sequence analysis of cDNA for luciferase of a Japanese firefly *Luciola cruciata*. *Gene*, 77, 265–270.

McCAPRA, F.; Gilfoyle, D. J.; Young, D.W.; Church, N. J.; Spencer, P. The chemical origin of color differences in beetle bioluminescence. In: CAMPBELL, A.K.; Kricka, L.J.; Stanley, P.E. (eds). *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamental and Applied Aspects*. 1994. Wiley, Chichester, 387 – 391.

McDERMOTT, F. A. (1964). The Taxonomy of Lampyridae. *Transactions of the American Entomological Society*, 90, 1-72.

McELROY, W.D.; DeLuca, M.; Travis, J. (1967). Molecular uniformity in biological catalyses. The enzymes concerned with firefly luciferin, amino acid, and fatty acid utilization are compared. *Science* 157,150-157.

MÜLLER, K.F. (2005). The efficiency of different search strategies in estimating parsimony jackknife, bootstrap, and Bremer support. *BMC Evolutionary Biology*, 5, 58.

NAKATSU, T.; Ichiyama, S.; Hiratake, J.; Saldanha, A.; Kobashi, N.; Sakata, K.; Kato, H. (2006) Structural basis for the spectra difference in luciferase bioluminescence. *Nature*, 440, 372-376.

NARDI, F.; Spinsanti, G.; Boore, J.F.; Carapelli, A.; Dallai, R.; Frati, F.(2003). Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic? *Science*, 299, 1887–1889.

OBA, Y.; Iida, K.; Ojika, M.; Inouye, S. (2008). Orthologous gene of beetle luciferase in non-luminous click beetle, *Agrypnus binodulus* (Elateridae), encodes a fatty acyl-CoA synthetase. *Gene*, 407, 169-175.

OBA, Y.; Ojika, M.; Inouye, S. (2003). Firefly luciferase is a bifunctional enzyme: ATP-dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl-CoA synthetase. *FEBS Letters*, 540, 251-254.

OBA, Y.; Ojika, M.; Inouye, S. (2004). Characterization of CG6178 gene product with high sequence similarity to firefly luciferase in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 329, 137 –145.

OBA, Y.; Sato, M; Inouye,S. (2006a). Cloning and characterization of the homologous genes of firefly luciferases in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Insect Molecular Biology*, 15, 293-299.

OBA, Y.; Sato, M.; Ohta, Y.; Inouye, S. (2006b). Identification of paralogous genes of firefly luciferase in the Japanese firefly *Luciola cruciata*. *Gene*, 368,53-60.

OHMIYA, Y.; Mina, S.; Viviani, V.R.; Ohba, N. (2000). Comparative aspects of a luciferase molecule from the Japanese luminous beetle, *Ragophthalmus ohbai*. Science Report of Yokosuka City Museum, 47, 31–38.

ORLOVA, G.; Goddard, J. D.; Brovko, L. Y. (2003). A Theoretical Study of Amazing Firefly Bioluminescence: the Structure of the Light Emitters. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125, 6962-6971.

PAGE, R.D.M.; Holmes, E.C. Molecular Evolution: A phylogenetic approach. 1998. Blackwell Scientific, Oxford.

RZHETSKY, A.; Nei, M. (1993). Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference. Molecular biology and evolution, 10,1073-1095.

SAGEGAMI-OBA, R.; Oba, Y.; Ôhira, H. (2007). Phylogenetic relationship of click beetles (Coleoptera:Elateridae) inferred from 28S ribosomal DNA: Insights into the evolution of bioluminescence in Elateridae. Molecular Phylogenetics and Evolution, 42, 410-421.

SAGEGAMI-OBA, R.; Takahashi, N.; Oba, Y. (2007b). The evolutionary process of bioluminescence and aposematism in cantharoid beetles (Coleoptera: Elateroidea) inferred by the analysis of 18S ribosomal DNA. Gene. 400, 104-113.

SAITOU, N.; Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. Molecular biology and evolution, 4, 406–425.

SAMBROOK, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 1989. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.

SANKOFF, D.D. (1975). Minimal mutation trees of sequences. SIAM Journal on Applied Mathematics, 28,35-42.

SCHINEIDER, H. Métodos de análise filogenética - Um guia prático. 2003.

Holos Editora, Ribeirão Preto, SP.

SCHOLTEN, J.D.; Chang, K.H.; Babbit, P.C.; Charest, H.; Sylvestre, M.; Mariano D.D. (1991). Novel enzymic hydrolytic dehalogenation of chlorinate aromatic. *Science*, 253, 182-182.

SCHRÖDER, S. (1989). Protein sequence homology between plant 4-coumarate :CoA ligase and firefly luciferase. *Nucleic Acids Research*, 17, 460.

SELIGER, H.H. (1975). The origin of bioluminescence. *Photochemistry and Photobiology*, 21, 355-361.

SELIGER, H.H. (1987). The evolution of bioluminescence in bacteria. The origin of bioluminescence. *Photochemistry and Photobiology*, 45, 291-297.

SELIGER, H.H.; McElroy, W.D. Bioluminescence-enzyme catalyzed chemiluminescence. In: Seliger, H. H.; McElroy W. D. (eds). *Light: Physical and Biological Action*. 1965. Academic Press, New York, pp. 169-198.

SIMON, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.; Crespi, B.; Liu, H.; Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651–701.

SOKAL, R. R.; Michener, C.D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*, 38, 1409-1438.

SOKAL, R.R.; Sneath, P.H.A. *Principles of Numerical Taxonomy*. 1963. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

STANGER-HALL, K. F.; Lloyd, J. E., Hillis, D.M. (2007). Phylogeny of North American fireflies (Coleoptera: Lampyridae): Implications for the evolution of light signals. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45, 33-49.

STEWART, J.B.; Beckenbach, A.T. (2005). Insect mitochondrial genomics: the

complete mitochondrial genome sequence of the meadow spittlebug *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cercopoidae). *Genome* 48,46-54.

STOLZ, U.; Velez, S.; Wood, K. V.; Wood, M.; Feder, J. L. (2003). Darwinian natural selection for orange bioluminescent color in a Jamaican click beetle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 100, 14955–14959.

SUZUKI, I. H.; Sato, Y.; Ohba, N. (2002). Gene Diversity and Geographic Differentiation in Mitochondrial DNA of the Genji Firefly *Luciola cruciata* (Coleoptera: Lampyridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 22,193-205.

SUZUKI, H.; Kawarabashi, Y.; Kondo, J.; Abe, T.; Nishikawa, K.; Kimura, S.; Hashimoto, T.; Yamamoto, T. (1990). Structure and regulation of rat long chain fatty acyl-CoA synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 8681-8685.

SWOFFORD, D.L. (1998). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

TAFRESHI, N.K.; Hosseinkhani, S.; Sadeghizadeh, M.; Sadeghi, M.; Ranjbar, B.; Naderi-Manesh, H. (2007). The influence of insertion of a critical residue (Arg356) in structure and bioluminescence spectra of firefly luciferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 8641-8647.

THOMPSON, J. D.; Higgins D. G.; Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.

UGAROVA, N.N.; Maloshenok, L.G.; Uporov, I.V.; Koksharov, M.I. (2005). Bioluminescence spectra of native and mutant firefly luciferases as a function of pH. *Biochemistry (Moscow)*, 70,1262-1276.

VIVIANI, V. R. . Descrição dos estágios imaturos e dados biológicos de

Aspisma sp.. Revista Brasileira de Entomologia, v. 33, p. 359-366, 1989.

VIVIANI, V. R. (2001). Fireflies from Southeastern Brazil: habitats, life-history and bioluminescence. Annals of Entomological Society of America, v. 94, p. 129-145.

VIVIANI, V. R. (2008). Luciferases de Vagalumes. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 37, 8-19.

VIVIANI, V.R. (2002). The origin, diversity, and structure function relationships of insects luciferases – Review. Cellular and molecular life sciences, 59, 1833-1850.

VIVIANI, V.R.; Arnoldi, F.G.C.; Venkatesh, B.; Silva Neto, A. J.; Ogawa, F.G.T.; Oehlmeyer, A.T.L.; Ohmiya, Y. (2006). Active-site properties of *Phrixotrix* railroad worm green and red bioluminescence-eliciting luciferases. Journal of Biochemistry, 140, 467-474.

VIVIANI, V.R.; Bechara, E.J.H. (1993). Biophysical and biochemical aspects of Phengodiade (Railroad-worm) bioluminescence. Photochemistry and Photobiology, 58, 615-622

VIVIANI, V.R.; Bechara, E.J.H. (1996). Larval *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) fat body extracts catalyze firefly D-Luciferin and ATP-dependent chemiluminescence: A luciferase-like enzyme. Photochemistry and Photobiology, 63, 713-718.

VIVIANI, V.R.; Bechara, E.J.H. (1997). Bioluminescence and Biological Aspects of Brazilian Railroad-Worms (Coleoptera: Phengodidae). Annals of the Entomological Society of America, 90, 389-398.

VIVIANI, V.R.; Bechara, E.J.H.; Ohmiya, Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: Relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry,

38, 8271 – 8279.

VIVIANI, V.R.; Oehlmeyer, T.L.; Arnoldi, F.G.C; Brochetto-Braga, M.R. (2005). A new firefly luciferase with bimodal spectrum: Identification of structural determinants of spectral pH-sensitivity in firefly luciferases. *Photochemistry and Photobiology*, 81, 843-848.

VIVIANI, V.R.; Ohmiya, Y. (2000). Bioluminescence Color Determinants of *Phrixothrix* Railroad-worm Luciferases: Chimeric Luciferases, Site-directed Mutagenesis of Arg 215 and Guanidine effect. *Photochemistry and Photobiology*, 72, 267-271.

VIVIANI, V.R.; Ohmiya, Y. (2006). Bovine serum albumin displays luciferase-like activity in presence of luciferyl adenylate: insights on the origin of protoluciferases activity and bioluminescence colours. *Luminescence*, 21, 262-267.

VIVIANI, V.R.; Okawachi, F.M.; Scorsato, V.; Abdalla, F.C. (2008). CCD imaging of basal bioluminescence in larval fireflies: clues on the anatomic origin and evolution of bioluminescence. *Photochemical and Photobiological Science*, 7, 448-452.

VIVIANI, V.R.; Silva Neto, A.J. ; Arnoldi, F.G.C. ; BARBOSA, J.A. ; OHMIYA, Y. (2007). The influence of the loop between residues 223-235 in beetle luciferases bioluminescence spectra: a solvent gate for the active site of pH-sensitive luciferases. *Photochemistry and Photobiology*, 1-7.

VIVIANI, V.R.; Silva Neto, A.J.; Arnoldi, F.G.C.; Barbosa, J. A. R. G.; Ohmiya, Y. (2007). Luciferase Bioluminescence Spectra: A Solvent Gate for the Active Site of pH-Sensitive Luciferases. *Photochemistry and Photobiology*, 83, 1-7.

VIVIANI, V.R.; Silva, A.C.R.; Perez, G.L.O.; Santelli, R.V.; Bechara, E.J.H.; Reinach, F.C. (1999). Cloning and molecular characterization of cDNA for the

brazilian larval click-beetle *Pyrearinus termitilluminans* luciferase. *Photochemistry and Photobiology*, 70,254-260.

VIVIVANI, V.R.; Uchida, A.; Suenaga, N.; Ryufuku, M.; Ohmiya, Y. (2001). Thr226 Is a Key Residue for Bioluminescence Spectra Determination in Beetle Luciferases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280, 1286-1291.

WHITE, E.H.; Rapaport, E.; Hopkins, T.A.; Seliger, H.H. (1969). Chemi- and bioluminescence of firefly luciferin. *Journal of the American Chemical Society*, 91,2178-2180.

WHITE, P.J.D.; Squirrell, D.J.; Arnaud, P.; Lowe; C.R.; Murray, H. (1996). Improved thermostability of the North American firefly luciferase: Saturation mutagenesis at position 354. *The Biochemical journal*, 319, 343-350.

WHITING, M.F.; Carpenter, J.C.; Wheeler, Q.D.; Wheeler, W.C. (1997). The Strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Systematic Biology*, 46, 1-68.

WILSON, T.; Hastings, W. (1998). Bioluminescence. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14, 197-230.

WITTMER, W. 1976. Arbeiten zu einer Revision der Familie Phengodidae (Coleoptera). *Entomologische Arbeiten aus dem Museum G. Frey*, 27, 415–524.

WOOD, K.V. (1995). The chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence. *Photochemistry and Photobiology*, 62,662-673.

XAYAPHOUMMINE, A.; Bucher, T.; Isambert, H (2005). Kinefold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots. *Nucleic Acids Research*, 33, 605-610

ZAKO, T.; Ayabe, K., Aburatani, T.; Kamiya, N.; Kitayama, A.; Ueda, H.; Nagamune, T. (2003). Luminescent and substrate binding activities of firefly luciferase N-terminal domain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1649: 183-189.

IX. Anexos

9.1. Artigo publicado relativo aos dados do genoma mitocondrial de *Pyrophorus divergens*



Mitochondrial genome sequence of the Brazilian luminescent click beetle *Pyrophorus divergens* (Coleoptera: Elateridae): Mitochondrial genes utility to investigate the evolutionary history of Coleoptera and its bioluminescence

F.G.C. Arnoldi^a, K. Ogoh^b, Y. Ohmiya^b, V.R. Viviani^{a,c,*}

^a *Biology Department, UNESP, Rio Claro, Brazil*

^b *Research Institute for Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ikeda, Japan*

^c *Universidade Federal de São Carlos, Campus de Sorocaba, Av. Darci Dafferner 200, Alto da Boa Vista, Sorocaba, SP, Brazil*

Received 10 May 2007; received in revised form 27 July 2007; accepted 30 July 2007

Available online 28 August 2007

Received by M. Di Giulio

Abstract

The Coleoptera order is the richest group among Metazoa, but its phylogenetics remains incompletely understood. Among Coleoptera, bioluminescence is found within the Elateroidea, but the evolution of this character remains a mystery. Mitochondrial DNA has been used extensively to reconstruct phylogenetic relationships, however, the evolution of a single gene does not always correspond to the species evolutionary history and the molecular marker choice is a key step in this type of analysis. To create a solid basis to better understand the evolutionary history of Coleoptera and its bioluminescence, we sequenced and comparatively analyzed the mitochondrial genome of the Brazilian luminescent click beetle *Pyrophorus divergens* (Coleoptera: Elateridae).

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Click beetle; Mitochondrial genome; Elateridae; Pyrophorus; Bioluminescence; Molecular phylogeny

1. Introduction

Metazoan mitochondrial DNA (mtDNA) is a circular double-strand molecule of 14–39 kb, which usually encodes 13 protein-coding genes, 2 rRNA genes, and 22 tRNA genes (Wolstenholme, 1992).

Complete or partial single gene sequences have been successfully used as molecular markers to determine recent taxonomic levels (Simon et al., 1994; Howland and Hewitt, 1995;

Sagegami-Oba et al., 2007). However, generalizations about the utility of particular genes for particular taxonomical levels are impossible (Simon et al., 1994), and specific preliminary analyses are necessary in order to select the right marker.

Solving ancient taxonomic levels has been a challenge for many scientists (Howland and Hewitt, 1995; Curole and Kocher, 1999; Cameron et al., 2004), and complete mitochondrial genomes and their deduced protein sequences have been used as an alternative to improve the consistency and resolution of ancient divergences (Stewart and Beckenbach, 2003; Friedrich and Muqim, 2003; Nardi et al., 2003; Bae et al., 2004). Furthermore, mitochondrial genomes produce a large amount of nonredundant molecular data that can be used to orient the choice of the right gene to estimate the correct evolutionary history of a great number of taxa.

The order of Coleoptera is the richest group of Metazoa, but its phylogenetics has not been completely solved, despite its inclusion in several phylogenetic studies (Crowson, 1972; Beutel, 1995; Muona, 1995; Howland and Hewitt, 1995). This order has six sequenced mitochondrial genomes: three from

Abbreviations: ATP 6 and 8, ATPase subunits 6 and 8; bp, base pair; COX1–3, cytochrome oxidase subunits 1–3; CytB, cytochrome b; lrRNA, large subunit rRNA; mtDNA, mitochondrial DNA; NADH1–6 and 4 L, NADH dehydrogenase subunits 1–6 and 4 L; PCR, polymerase chain reaction; srRNA, small subunit rRNA; RC, rescaled consistency.

* Corresponding author. Universidade Federal de São Carlos, Campus de Sorocaba, Av. Darci Dafferner 200, Alto da Boa Vista, Sorocaba, SP, Brazil.

E-mail address: viviani@power.ufscar.br (V.R. Viviani).

Cucujiformia, *Crioceris duodecimpunctata* (Chrysomelidae), *Anoplophora glabripennis* (Cerambycidae), and *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae); and, from Elateriformia, the bioluminescents *Pyrocoelia rufa* (Lampyridae), *Rhagophthalmus ohbai*, and *Rhagophthalmus lufengensis* (Phengodidae) (Friedrich and Muqim, 2003; Stewart and Beckenbach, 2003; Bae et al., 2004; Li et al., 2007).

Within Coleoptera, bioluminescence is found in the superfamily Elateroidea (Lawrence and Newton, 1995), which includes the former Cantharoidea (Lampyridae, Phengodidae, Rhagophthalmidae, and Homalidae) (Crowson, 1972) and the traditional Elateroidea, which includes Elateridae. However, in addition to the uncertainty about the precise Rhagophthalmidae taxonomical status, the origin and evolution of bioluminescence in Coleoptera remain a mystery (Ohmiya et al., 2000; Viviani, 2002).

By using morphological characters, Branham and Wenzel (2003) proposed that bioluminescence arose three times in Elateroidea. However, studies based on cDNA sequences of luciferases, the enzymes responsible for producing light, and on morphological and behavioral characters do not completely support the independence between Phengodidae and Rhagophthalmidae (Crowson, 1972; Ohmiya et al., 2000; Viviani, 2002). Therefore, another source of information is needed in order to solve some of these divergences.

Among Elateridae, luminescence is found only in a single tribe, Pyrophorini (subfamily Agryppinae) (Costa, 1975). By using the 28S nuclear ribosomal subunit, Sagegami-Oba et al. (2007) provided strong support for the independence of Elateridae bioluminescence, but a detailed description of Coleoptera bioluminescence history is still lacking.

The Coleoptera neotropical fauna from South America is considered the richest in the world, and accounts for about 23% of the described species of luminescent beetles, which are found in three main families: Lampyridae, Elateridae, and Phengodidae. Except for the systematic review carried out on Elateridae by



Fig. 1. *Pyrophorus divergens* click beetle.

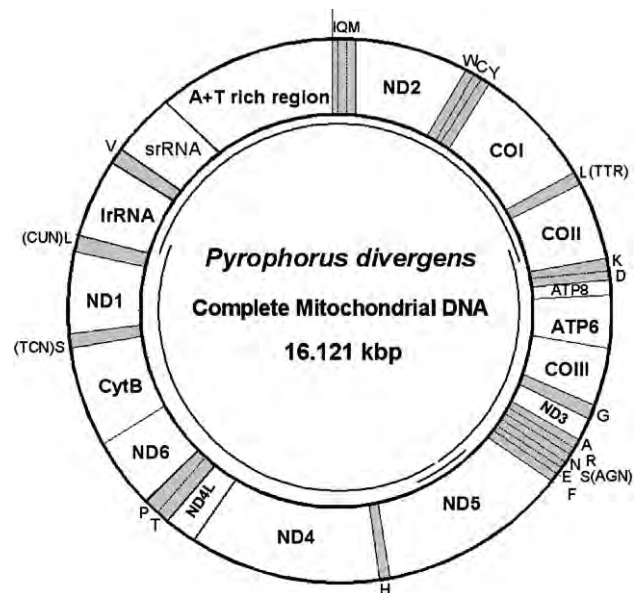


Fig. 2. Map of *Pyrophorus divergens* mitochondrial genome organization. The tRNAs are denoted by the shaded blocks and are labeled according to the IUPAC-IUB single letter amino acid code. Overlapping lines within the circle denote PCR fragments amplified for cloning and sequencing.

Costa (1975) and Costa et al. (1988), for some biological studies carried out on Lampyridae (Viviani, 2001) and Phengodidae (Viviani and Bechara, 1997), and for cDNA analyses from Brazilian beetle luciferases (Viviani et al., 1999a,b, 2004, 2005), the Coleoptera neotropical fauna remains poorly studied.

Table 1
Sequences used in the comparative analyses

Order	Taxon	GenBank accession number	Reference
Diptera	<i>Anopheles gambiae</i>	L20934	Beard et al. (1993)
	<i>Drosophila yakuba</i>	X03240	Clary et al. (1982)
Lepidoptera	<i>Bombyx mori</i>	AF149768	Unpublished
	<i>Ostrinia furnacalis</i>	AF467260	Coates et al. (2005)
Coleoptera	<i>Crioceris duodecimpunctata</i>	AF467886	Stewart and Beckenbach (2003)
	<i>Anoplophora glabripennis</i>	DQ768215	Unpublished
	<i>Pyrocoelia rufa</i>	AF452048	Bae et al. (2004)
	<i>Rhagophthalmus ohbai</i>	AB267275	Li et al. (2007)
	<i>Tribolium castaneum</i>	AJ312413.2	Friedrich and Muqim (2003)
	<i>Pyrophorus divergens</i>	EF398270	Present work
Hymenoptera	<i>Apis mellifera ligustica</i>	L06178	Crozier and Crozier (1993)
Hemiptera	<i>Triatoma dimidiata</i>	AF301594	Dotson and Beard (2001)
(Outgroup)	<i>Philaenus spumarius</i>	AY630340	Stewart and Beckenbach (2005)

To generate a solid basis in order to understand the evolutionary history of Coleoptera and its bioluminescence, we cloned, sequenced, and comparatively analyzed the complete mitochondrial genome of *Pyrophorus divergens* (Coleoptera: Elateridae) (Fig. 1), a common large luminescent click beetle from the Brazilian southeastern Atlantic rain forest.

2. Material and methods

2.1. Insects

Adults of the click beetle *P. divergens* (Fig. 1) were collected during spring evenings in an Atlantic rainforest remnant at

Fazenda Santana (Sousas) in Campinas (22°44'45''S, 47°06'33''), SP, Brazil, and frozen at –80 °C.

2.2. Mitochondrial DNA extraction, PCR, cloning, and sequencing

Genomic and mitochondrial DNA were extracted from frozen tissues obtained from 200 mg of the abdomen of one organism using DNA Easy Kit (QIAGEN, USA), in accordance with the manufacturer's protocol.

The whole mitochondrial DNA was amplified in four fragments corresponding to the regions between *16S* and *COX2* (about 7 kb), *COX2* and *NADH5* (4.5 kb), *NADH5* and *16S* (6 kb), and an overlapping region between the two latter fragments (500 bp)

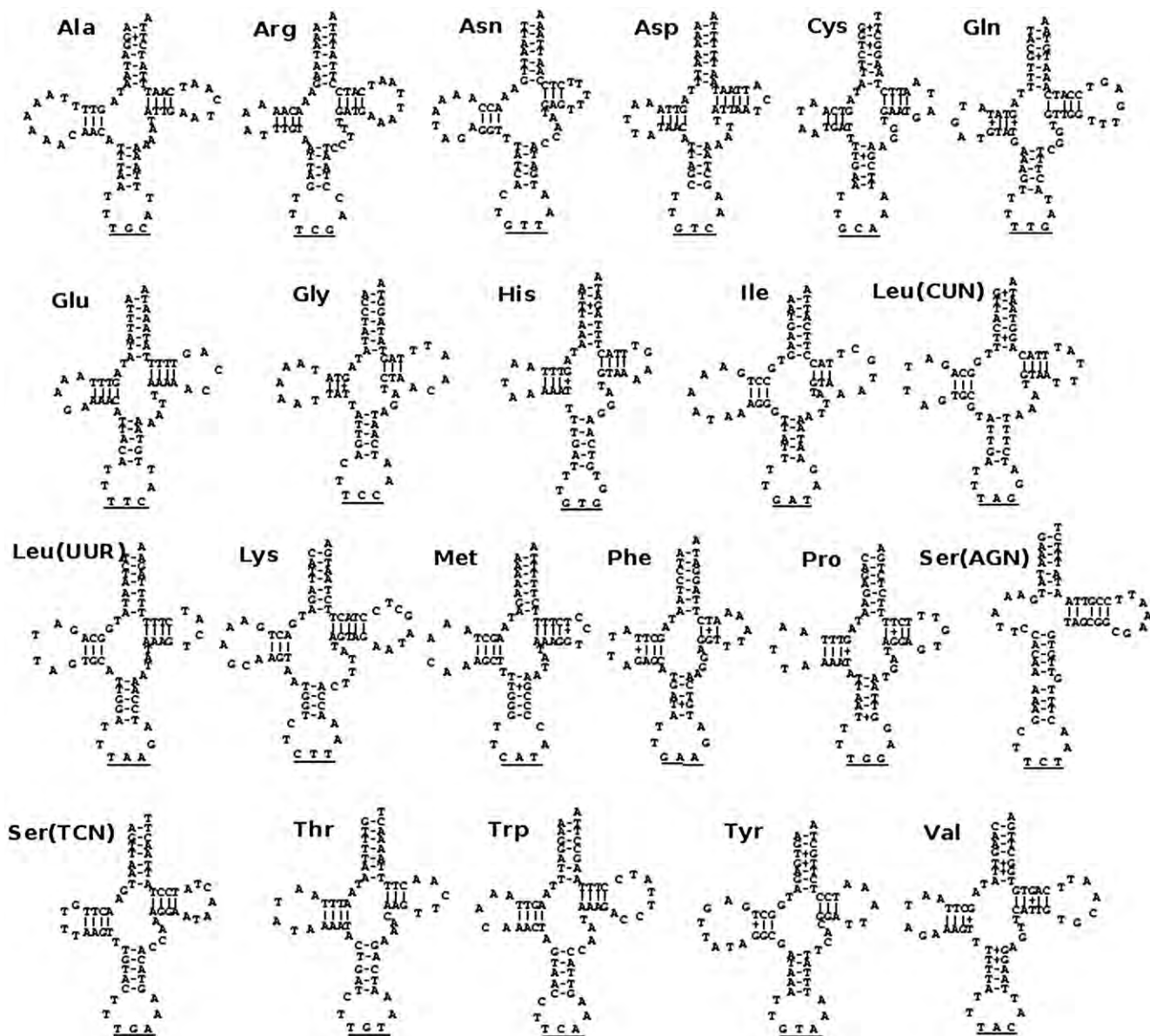


Fig. 3. Predicted secondary structures of *Pyrophorus divergens* mitochondrial tRNAs. tRNAs were predicted using the tRNAscan-SE (Lowe and Eddy, 1997). The I, N, C, and S(CUN) tRNAs were found and folded manually by sequence comparison with other Coleoptera mitochondrial genomes. Especially, the S(AGN) tRNA was folded using Kinefold Web Server (Xayaphoummine et al., 2005).

Table 2
Organization of *Pyrophorus divergens* mitochondrial genome

Gene	Direction	Begin	End	Anticodon	Start codon	Stop codon	Note
<i>tRNA-Ile</i>	F	1	66	GAT			
<i>tRNA-Gln</i>	R	132	64	TTG			3 bp overlap 5'
<i>tRNA-Met</i>	F	132	197	CAT			1 bp overlap 5'
<i>NADH2</i>	F	198	1220		ATA	TAA	
<i>tRNA-Trp</i>	F	1222	1289	TCA			1 bp gap 5'
<i>tRNA-Cys</i>	R	1347	1285	GAC			5 bp overlap 5'
<i>tRNA-Tyr</i>	R	1408	1345	GTA			3pb overlap 5'
<i>COXI</i>	F	1404	2945		ATC	TAA	5 bp overlap 5'
<i>tRNA-Leu (TTR)</i>	F	2947	3009	TAA			1 bp gap 5'
<i>COXII</i>	F	3012	3693		ATG	T	2 bp gap 5'
<i>tRNA-Lys</i>	F	3688	3758	CTT			6 bp overlap 5'
<i>tRNA-Asp</i>	F	3758	3822	GTC			1 bp overlap 5'
<i>ATPase8</i>	F	3826	3981		ATT	TAA	3 bp gap 5'
<i>ATPase6</i>	F	3975	4649		ATG	TAA	7 bp overlap 5'
<i>COXIII</i>	F	4649	5435		ATG	T	1 bp overlap 5'
<i>tRNA-Gly</i>	F	5432	5495	TCC			4 bp overlap 5'
<i>NADH3</i>	F	5503	5853		ATG	TAG	7 bp gap 5'
<i>tRNA-Ala</i>	F	5848	5913	TGC			6 bp overlap 5'
<i>tRNA-Arg</i>	F	5913	5978	TCG			1 bp overlap 5'
<i>tRNA-Asn</i>	F	5983	6047	GTT			4 bp gap 5'
<i>tRNA-Ser (AGN)</i>	F	6048	6114	TCT			
<i>tRNA-Glu</i>	F	6111	6175	TTC			4 bp overlap 5'
<i>tRNA-Phe</i>	R	6235	6174	GAA			2 bp overlap 5'
<i>NADH5</i>	R	7959	6239		ATA	T	5 bp overlap 5'
<i>tRNA-His</i>	R	8016	7953	GTG			7 bp overlap 5'
<i>NADH4</i>	R	9350	8018		ATG	T	1 bp gap 5'
<i>NADH4L</i>	R	9634	9344		ATG	TAA	7 bp overlap 5'
<i>tRNA-Thr</i>	F	9632	9695	TGT			1 bp gap 5'
<i>tRNA-Pro</i>	R	9760	9696	TGG			
<i>NADH6</i>	F	9766	10272		ATA	TAA	5 pb gap 5'
<i>CytB</i>	F	10272	11405		ATG	TAA	1 bp overlap 5'
<i>tRNA-Ser (TCN)</i>	F	11404	11469	TGA			2 bp overlap 5'
<i>NADH1</i>	R	12437	11487		TTG	TAG	17 bp gap 5'

Table 2 (continued)

Gene	Direction	Begin	End	Anticodon	Start codon	Stop codon	Note
<i>tRNA-Leu (CUN)</i>	R	12498	12435	TAG			3 bp overlap 5'
<i>lrRNA</i>	R	13770	12502				3 bp gap 5'
<i>tRNA-Val</i>	R	13840	13771	TAC			
<i>srRNA</i>	R	14650	13845				
<i>AT-rich region</i>	–	14651	16120				

(Fig. 2) using specific primers (Appendix A). These primers were designed based on *P. rufa* (NC_003970) (Lampyridae), *A. glabripennis* (NC_008221) (Cerambycidae), and *T. castaneum* (AJ312413) (Tenebrionidae) mitochondrial genomes. The amplification reaction was set in a nested polymerase chain reaction (PCR) using LA Taq (Takara, Tokyo, Japan), in accordance with the manufacturer's protocol and under the following conditions: 1 min at 94 °C, five cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, and 8 min at 68 °C; 25 cycles of 10 s at 98 °C and 8 min at 68 °C; and a final elongation step of 10 min at 72 °C.

The three largest fragments were cloned into XL-Topo vector (Invitrogen, USA), and the overlapping fragment was directly used for sequencing. Three 7 kb fragment clones and five 6 and 4.5 kb fragments were selected for sequencing. Pure plasmids were obtained using Miniprep Kit (QIAGEN).

The three clones of the 7 kb fragment containing the A+T-rich region were sequenced using the deletion kit for kilobase sequencing (Takara). Each of the five clones containing the 6 kb and 4.5 kb fragments were directly sequenced by primer walking. Each genome position was independently determined, at least, 3 times.

The DNA sequencing was performed using BigDye Terminator V3.1 and a Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.3. Sequence assembly

The genome assembly was performed using the Staden Package (Bonfield et al., 1995).

2.4. General sequence analysis

Multiple sequence alignments were performed using Clustal W 1.8 (Thompson et al., 1994). General sequence analyses were performed using MPAlign editor (Arnoldi, 2005). Predicted protein genes were translated with the genetic codes proposed by Abascal et al. (2006).

2.5. tRNA searching and folding

In order to find and fold the tRNAs, we used the tRNAscan-SE (Lowe and Eddy, 1997). Those tRNAs which were not automatically found were found and folded manually by sequence comparison with other Coleoptera mitochondrial genomes. Especially, the Serine tRNA-AGN was folded using Kinofold Web Server (Xayaphoummine et al., 2005).

Table 3
Holometabolous mitochondrial genomes nucleotide composition

Taxon	Total length		Total P.C.G.		lrRNA		srRNA		C.R.	
	Length	%A+T	AA.*	%A+T	Length	%A+T	Length	%A+T	Length	%A+T
Coleoptera										
<i>Pyrophorus divergens</i>	16120	69.44	3723	67.51	1269	72.73	806	72.20	1470	74.69
<i>R. ohbai</i>	15704	79.10	3692	77.48	1277	82.53	785	82.54	1044	85.34
<i>Anoplophora glabripennis</i>	15774	78.30	3693	76.95	–	–	1076	79.46	1115	87.98
<i>Tribolium castaneum</i>	15881	71.68	3700	69.17	1280	76.01	774	76.22	1239	82.48
<i>Pyrocoelia rufa</i>	17739	77.41	3689	76.27	1242	81.64	765	81.83	1522	87.58
<i>Crioceris duodecimpunctata</i>	15880	76.88	3694	75.20	1276	82.44	804	79.60	1220	83.27
Diptera										
<i>Anopheles gambiae</i>	15363	77.56	3733	75.93	1325	82.49	800	79.62	518	94.2
<i>Drosophila yakuba</i>	16019	78.58	3727	76.64	1326	83.33	789	79.34	1077	92.85
Lepidoptera										
<i>Bombyx mori</i>	15643	81.32	3714	79.50	1375	84.36	783	85.56	499	95.39
<i>Ostrinia furnacalis</i>	14536	80.37	3719	79.35	1339	84.98	435	82.75	–	–
Hymenoptera										
<i>Apis mellifera ligustica</i>	16343	84.85	3676	83.24	1371	84.60	786	81.42	827	96.00

*Stop codons are not included.

Length, number of nucleotides; %A+T, percentage of A and T; P.C.G., protein-coding genes; AA., number of amino acids; C.R., control region.

2.6. Phylogenetic analysis

Phylogenetic analyses were performed with the use of PAUP* 4.0b10 (Swofford, 1998) using parsimony and neighbor-joining methods (Saitou and Nei, 1987) with the mean character difference as the distance measure. Two phylogenetic approaches were used to test the influence of different criteria on the data set, and, consequently, its reliability (Cameron et al., 2004). All available Coleoptera mitochondrial genomes up to the submission date were included except for one from *R. lufengensis*, which belongs to the same genus of *R. ohbai*, which is already represented. Two Diptera and two Lepidoptera species were also included to represent other

holometabolous orders. We did not include any Hymenoptera mitochondrial genome because of its unusual sequence evolution. As outgroup, we used two Hemiptera species that are close to holometabolous but are, definitely, an outgroup (Nardi et al., 2003; Stewart and Beckenbach, 2003; Bae et al., 2004) (Table 1). The MtArt matrix (Abascal et al., 2007) was selected as the amino acid substitution model.

For parsimony analyses, the branch and bound method was used in order to find the best tree. In each analysis, all characters had equal weight.

In order to analyze branch support and repeatability, we used bootstrap values performed with PAUP* default parameters and

Table 4
Base composition at each codon position of protein-coding genes from Holometabolous mitochondrial genomes

	1st codon position				2nd codon position				3rd codon position				Overall			
	%A	%T	%G	%C	%A	%T	%G	%C	%A	%T	%G	%C	%A	%T	%G	%C
Coleoptera																
<i>Pyrophorus divergens</i>	31.23	31.13	21.21	16.41	20.17	46.11	14.20	19.5	36.23	37.65	10.1	16.08	29.21	38.30	15.14	17.33
<i>R. ohbai</i>	35.86	36.61	16.65	10.86	20.72	47.72	13.29	18.25	44.20	47.34	3.46	4.98	33.59	43.89	11.14	11.36
<i>Anoplophora glabripennis</i>	34.17	36.01	17.68	12.10	20.98	47.44	13.78	17.76	44.08	48.17	3.08	4.57	33.08	43.87	11.51	11.48
<i>Tribolium castaneum</i>	32.86	31.89	19.64	15.59	19.51	46.78	14.27	19.43	38.43	38.02	14.33	14.45	30.27	38.9	9.08	14.45
<i>Pyrocoelia rufa</i>	35.99	35.32	17.10	11.57	19.86	48.19	13.41	18.51	43.94	45.48	4.28	6.28	33.2	43.0	11.60	12.12
<i>Crioceris duodecimpunctata</i>	34.29	35.73	17.75	12.20	20.68	47.29	14.07	17.94	42.12	45.47	5.38	7.01	32.36	42.83	12.40	12.38
Diptera																
<i>Anopheles gambiae</i>	31.05	37.94	19.93	11.06	20.57	46.09	13.97	19.34	45.45	46.84	3.39	4.30	32.36	43.63	12.43	11.57
<i>Drosophila yakuba</i>	31.07	38.63	19.69	10.59	20.23	46.20	14.24	19.31	45.29	48.51	28.70	3.32	32.19	44.45	12.27	11.08
Lepidoptera																
<i>Bombyx mori</i>	37.31	37.50	15.72	9.45	22.26	48.62	13.19	15.91	43.67	49.13	2.71	4.46	34.41	45.09	10.54	9.94
<i>Ostrinia furnacalis</i>	37.67	36.75	16.07	9.49	21.64	48.72	13.28	16.34	43.66	49.61	2.68	4.00	34.32	45.03	10.68	9.94
Hymenoptera																
<i>Apis mellifera ligustica</i>	40.17	39.03	12.21	8.56	23.53	51.79	10.47	14.20	47.57	47.60	2.80	2.01	37.09	46.14	8.23	8.52

5000 replications, which, according to Müller (2005), are enough to achieve around 1% of accuracy in a 95% confidence interval.

3. Results

3.1. Genomic structure

The *P. divergens* complete mitochondrial genome codes 13 putative proteins, two ribosomal RNAs, and 22 tRNAs, which represents a typical insect mitochondrial genome (NCBI accession number EF398270). This molecule contains 6521 adenines, 4673 thymines, 3181 cytosines, and 1745 guanines, totaling 16,120 bp.

The genome arrangement is almost the same as that of the other Coleoptera and insect mitochondrial genomes (Stewart and Beckenbach, 2003; Friedrich and Muqim, 2003; Bae et al., 2004), which share the proposed Pancrustacea ancestral organization (Boore et al., 1998) (Fig. 2).

All tRNA sequences could be folded into usual two-dimensional structures; 17 were automatically found by tRNAscan-SE (Lowe and Eddy, 1997) and other four – I, N, C, S(CUN) – were manually folded by comparison with other published sequences (Fig. 3). Especially the tRNA for Serine (AGN) was folded using Kinofold Web Server (Xayaphoumine et al., 2005).

The click beetle *P. divergens* has a compact mitochondrial genome, displaying a 1470 bp A+T-rich noncoding region, identified by the position between the srRNA and tRNA-Ile, which is supposed to contain the replication origin. Another 45 noncoding nucleotides are spread along the whole genome in

short sequences, mainly 1–7 bp (Table 2). In addition, it has genes that overlap over 74 bp (Table 2).

The usual ATG start codon was found in six of the 13 predicted genes whereas the others show ATT, ATC, ATA, and TTG. In seven of the 13 predicted genes, the stop codon has the usual TAA, four are a single T, and the last two are TAG (Table 2).

The regions coding for the large and small ribosomal subunits were predicted to have around 1268 and 805 bp, respectively.

3.2. Base composition and codon usage

The A+T content represents 69.44% of the total genome whereas the G+C content represents 30.55%. The latter is one of the highest among insect mitochondrial genomes and is just slightly lower than the content of *Tricholepidion gertschi* (NCBI accession number AY191994) (31%), *Thermobia domestica* (AY639935) (33%), *Nesomachilis australica* (AY793551) (31%), and *Petrobius brevistylis* (AY956355) (32%).

Excluding the stop codons, the genome contains 3723 protein codons or 11,169 coding nucleotides, of which 67.51% were represented by nucleotides A and T. The 1269 bp long lrRNA subunit has 72.73% of its nucleotides as A+T, whereas the 806 bp long srRNA has 72.20%. The 1470 bp long control region has an A+T content of 74.69%. These contents are the lowest among the Coleoptera mitochondrial genomes studied (Table 3) and one of the lowest levels among the Holometabola.

Considering each codon position of the new genome, the A+T content was 62.36% in the first position, 66.28% in the second position, and 73.88% in the third position (Table 4). The A+T

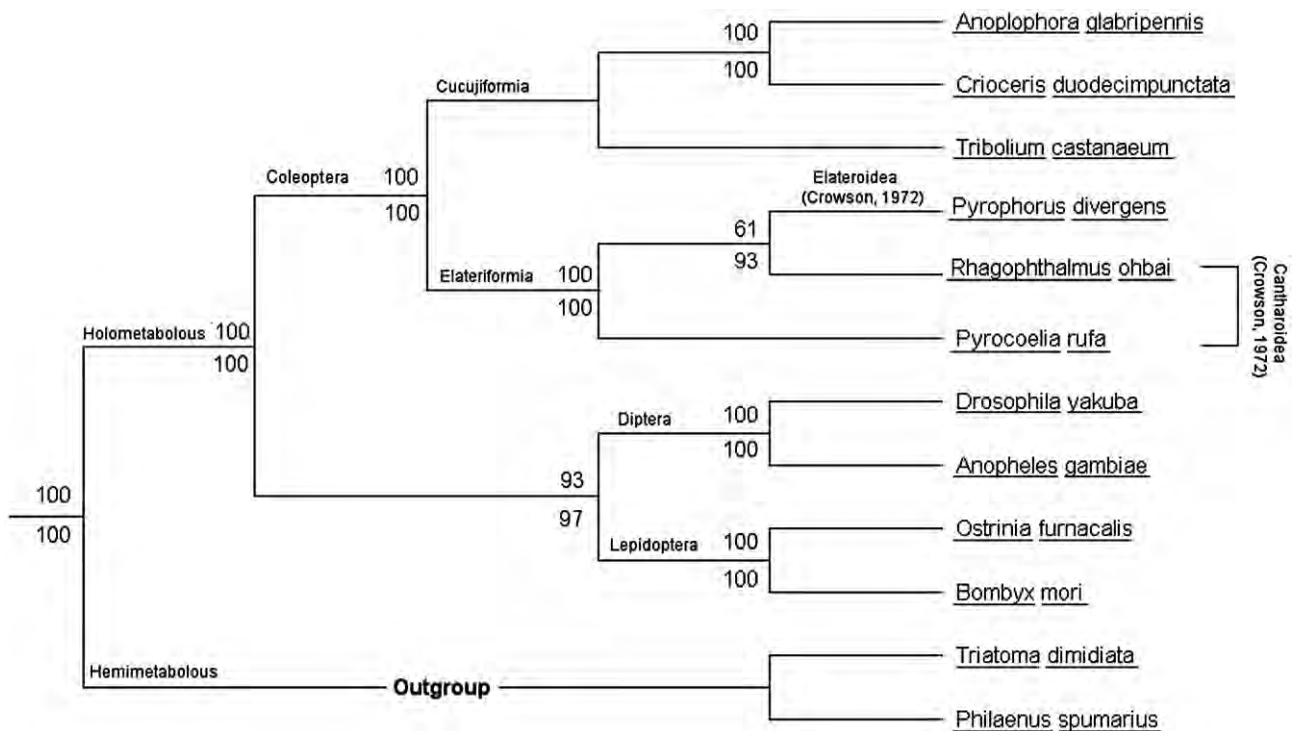


Fig. 4. Phylogenetic analysis of all mitochondrial protein coding genes. All characters were equally weighted and the MtArt matrix was selected as amino acid substitution model. Values above and under branches represent bootstrap support from 5000 replicates when parsimony and neighbor-joining were used respectively.

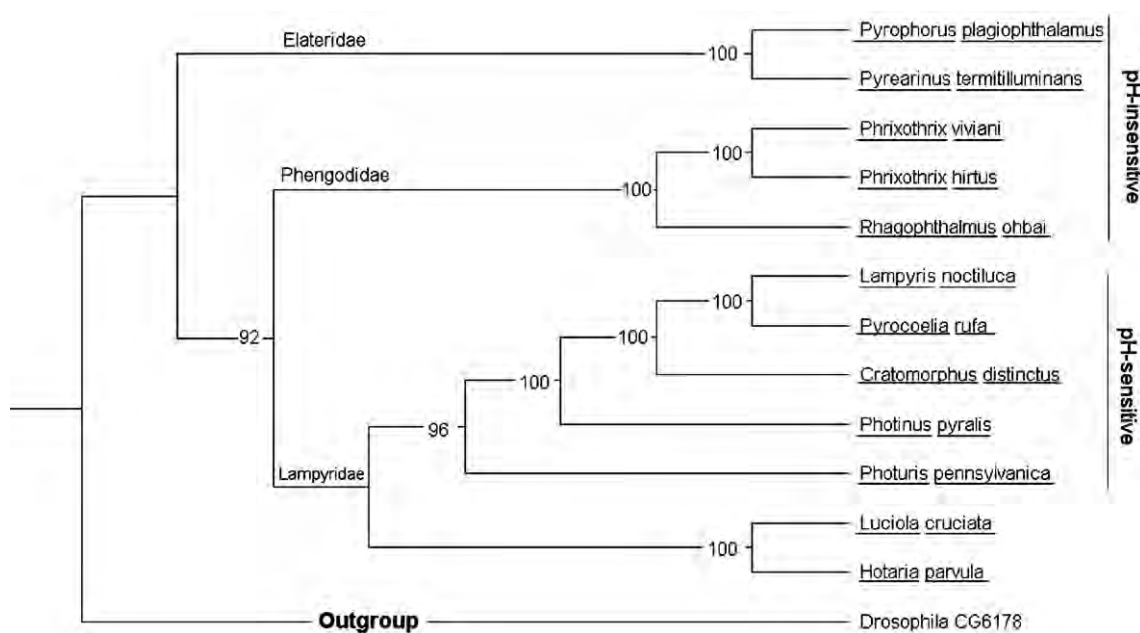


Fig. 5. Neighbor-joining phylogenetic analysis of Coleoptera cDNA luciferases. Values in branches represent bootstrap support from 1000 replicates. *Luciola cruciata* (M26194.1), *Lampyris noctiluca* (AY753186.1), *Photuris pennsylvanica* (D25415.1), *Photinus pyralis* (M15077.1), *Cratomorphus distinctus* (AY633557.1), *Pyrocoelia rufa* (AF328553.1), *Hotaria parvula* (L39929.1), *Pyrophorus plagiophthalmus* (AF543414.1), *Pyrearinus termitilluminans* (AF116843.1), *Phrixothrix viviani* (AF139644.1), *Phrixothrix hirtus* (AF139645.1), *Rhagophthalmus ohbai* (AB255748.1).

content is lower in the first and third positions compared to other Coleoptera mitochondrial genomes.

3.3. Phylogenetic analysis

The predicted protein sequences were used all together in a concatenated manner to reconstruct the phylogenetic relationships (Fig. 4). The resulting topology is in accord with that published by Bae et al. (2004). The Coleoptera branches are partially in accord with the classical view, clustering all Cucujiformia in one branch, and *P. divergens* mitochondrial genome with the bioluminescents *P. rufa* and *R. ohbai*, Elateriformia members, in another one. Interestingly, our data clustered *R. ohbai* and *P. divergens*, and left *P. rufa* alone in another branch, whereas, in the classical view (Crowson, 1972; Lawrence and Newton, 1995; Beutel, 1995), *P. rufa* and *R. ohbai* should be closer to each other than to *P. divergens*.

We also analyzed mitochondrial single gene topologies of Coleoptera. Using parsimony, we found that only *NADH2* and *COX2* topologies were consistent with that one using all mitochondrial protein-coding genes, i.e., reconstructed the same Coleoptera branches with bootstrap values above 50%. In addition, using neighbor-joining, the *NADH2* and *NADH4* genes also reconstructed the same topology for Coleoptera.

When the rescaled consistency (RC) index of each gene was analyzed, the lowest amount of homoplasy was found in the *COX2*, *NADH4L*, *COX3*, *COX1* and *CytB* genes.

4. Discussion

The *P. divergens* mitochondrial genome displays the usual pattern for an insect. It is 16 kb in size with a gene arrangement

like proposed for the insect ancestral mitochondrial genome (Boore et al., 1998). The genome has the usual A + T-rich region between srRNA and tRNA-I genes, whereas *P. rufa* has an additional noncoding region between *NADH2* and *tRNA-W*. The start codons are predominantly ATG, and the stop codons are predominantly TAA.

Phylogenetic analysis of all protein-coding genes of available Coleoptera mitochondrial genomes supports the monophyly of the Elateroidea (Lawrence and Newton, 1995) by clustering the bioluminescents *P. rufa* (Lampyridae), *R. ohbai* (Phengodidae), and *P. divergens* (Elateridae). However, this analysis does not support the former Cantharoidea monophyly proposed by Crowson

Table 5
Phylogenetic information and amount of homoplasy in Holometabolous mitochondrial genes

Gene	Total	Info	Constant	RC
<i>ATP6</i>	230.0000	0.5130	0.3522	0.2801
<i>ATP8</i>	53.0000	0.7736	0.1509	0.2085
<i>COX1</i>	515.0000	0.2641	0.6155	0.2812
<i>COX2</i>	229.0000	0.4629	0.4105	0.3435
<i>COX3</i>	263.0000	0.4449	0.4297	0.2910
<i>CYTB</i>	384.0000	0.4375	0.4063	0.2855
<i>NADH1</i>	329.0000	0.4985	0.3252	0.2503
<i>NADH2</i>	348.0000	0.7500	0.1494	0.2406
<i>NADH3</i>	119.0000	0.5798	0.3361	0.2665
<i>NADH4</i>	451.0000	0.6208	0.2794	0.2494
<i>NADH4L</i>	101.0000	0.6040	0.1980	0.2954
<i>NADH5</i>	584.0000	0.5702	0.3031	0.2467
<i>NADH6</i>	178.0000	0.7697	0.1292	0.2497

Total, total number of characters in the alignment; Info, percentage of parsimony-informative characters in the data matrix; Constant, percentage of constant characters in the data matrix; RC, rescaled consistency index.

(1972) because it clusters *P. divergens* and *R. ohbai* together (Fig. 4), instead of the expected clade with *R. ohbai* and *P. rufa*.

According to Crowson (1972) and Beutel (1995), Phengodidae and Lampyridae bioluminescence could have the same ancestral origin. Surprisingly, our analysis indicates that *R. ohbai* is closer to click beetles than to fireflies, suggesting a possible independence between Lampyridae and Phengodidae bioluminescence. Considering recent results that supported the independence of click beetles's bioluminescence (Sagegami-Oba et al., 2007), we speculate that bioluminescence could have appeared, within Elateroidea (Lawrence and Newton, 1995), three times independently.

Although the phylogenetic analysis based on cDNA from beetle luciferases (Fig. 5) is in accord with the classical view, we note that, functionally, luciferases from Elateridae and Phengodidae are closer to each other, which are pH insensitive, than to Lampyridae luciferases, which are pH sensitive (Viviani, 2002) (Fig. 5).

Our result is based on a 3784-characters matrix and points to the *R. ohbai* and *P. divergens* clade (Fig. 4). However, we note that this result does not display unquestionable robustness because the unexpected branch has only intermediate bootstrap support, it is not completely insensitive to different substitution weights (unpublished data), and we observed the traditional clade (*P. divergens*, (*R. ohbai*, *P. rufa*)) in around 30% of our single gene phylogenetic analyses.

To reconstruct phylogenetic relationships of a greater number of taxa, we could not use all mitochondrial protein-coding genes because of the time and cost of determining and analyzing the whole mitochondrial genome for many species. Moreover, it is impossible to generalize about the utility of particular genes for particular taxonomical levels (Simon et al., 1994). In this context, another important utility of complete sequencing mitochondrial genomes is that it produces a large and nonredundant amount of data that is useful for understanding more about mitochondrial gene evolution and their utility in estimating phylogenetic relationships for particular taxonomical levels. Therefore, we performed phylogenetic analyses under parsimony and neighbor-joining criteria using each gene as the source of information, and compared these results with the reconstruction using all mitochondrial genes.

We observed that, when parsimony was used, only the *NADH2* and *COX2* genes estimated correctly the expected topology of Coleoptera with bootstrap values above 50% for every branch. Using neighbor-joining, only the *NADH2* and *NADH4* genes reflected the same topology with overall bootstrap support higher than 50%.

The RC index was analyzed in order to measure the amount of homoplasy in each gene. The *COX2*, *NADH4L*, *COX3*, *CytB*, *COX1* and *ATP6* genes showed the lowest amount of homoplasy (Table 5). Excluding *NADH4L*, these are the most conserved genes.

We also tested the utility of gene combinations and concatenated the *ATP6* and *CytB* genes, which reconstructed topologies close to the expected and displayed the best RC indexes, with *NADH2* and *COX2*. The best results were obtained with *NADH2* concatenated with the *ATP6* or *COX2*, with overall branch support very close to those using all protein-coding genes. These genes are also the smallest of those tested and, consequently, easier to be sequenced.

In summary, our data suggest that, in order to reconstruct the molecular evolutionary history of Coleoptera and Elateroidea, a reasonable starting point would be either employing *NADH2* or *COX2* individually, or employing the combination of *NADH2* with the *ATP6* or *COX2* genes.

5. Conclusions

The click beetle *P. divergens* has the usual insect mitochondrial genome, and the results of our phylogenetic analysis supported the monophyly of Elateroidea *sensu* reported by Lawrence and Newton (1995). However, our analysis clustered together *P. divergens* and *R. ohbai* against the classical clade with *P. rufa* and *R. ohbai*, and did not support the monophyly of Cantharoidea *sensu* reported by Crowson (1972). This result suggests that Lampyridae and Phengodidae bioluminescence could be independent and could have appeared three times parallel within Elateroidea. However, more taxa are needed to confirm these conclusions and to provide more details. Our comparative analysis suggested that the most reasonable starting point would be either employing the *NADH2* and *COX2* genes alone, or employing the combination of *NADH2* with *ATP6* or *COX2*.

Acknowledgments

This work was supported by grants of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil) and the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS, Japan). We thank Dr. K. Niwa (AIST, Osaka, Japan) and Antonio J. S. Neto (UNESP, Rio Claro, Brazil) for discussions.

Appendix A. Primers used to amplify the whole mitochondrial genome

Primer name	Sequence
Hm_COX2-1F	ATAGARCAATTAACMTTYTTYTCAYGAYCA
Hm_COX2-2R	GRTTTRTWCCRCARATCTCWGARCATTG
Hm_16S-1F	ATAATTTAARRTYTRAYCTGCTCAATGA
Hm_16S-2R	ARAAATWACGCTGTTATCCCYAAGGTAA
COX2_F1	CATGATCACGCCATGATAATCCTAGTAATAATTACC
COX2_F2	CACCTATCGTTTCCTTCTTGAAGGACAAACAATTG
COX2_R1	CCGCAGATCTCTGAGCATTGACCGAAATATATTCC
COX2_R2	TAGCCGTCCAGGATTGGCGTCAACCTTAACCTCCTATTG
16S_F1	TTGCCCGGTTATTTTGACCGTGCGAAGGTAGC
16S_F2	AATGATTGGACGAGGGGACAGCTGTCTACTATTGA
16S_R1	TACGCTGTTATCCCTAAGGTAATTTTCATTAATCT
16S_R2	ATCTTCCAGTCAACCCAAACCAACCTATTTCATG
ENADH5F	GGACTAATAATCAAAAACATCATTGAAGC
SNADH5F	TCGGTCCGTTTGAGTTATTACAC
OverlapF	CAAGTTGACTAGACAAGGC
OverlapR	GGTATGATTACTGCTCTTTCTAACC

References

- Abascal, F., Posada, D., Knight, R.D., Zardoya, R., 2006. Parallel evolution of the genetic code in arthropod mitochondrial genomes. *PLoS Biol.* 4, e127.
- Abascal, F., Posada, D., Zardoya, R., 2007. MtArt: a new model of amino acid replacement for Arthropoda. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1–5.

- Arnoldi, F.G.C., 2005. MPAlign editor: uma ferramenta gráfica e intuitiva para alinhamentos moleculares. Proceedings of II Workshop TIDIA—FAPESP.
- Bae, J.S., Kim, I., Sohn, H.D., Jina, B.R., 2004. The mitochondrial genome of the firefly *Pyrocoelia rufa*: complete DNA sequence, genome organization, and phylogenetic analysis with other insects. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32, 978–985.
- Beard, C.B., Hamm, D.M., Collins, F.H., 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol. Biol.* 2, 103–124.
- Beutel, R.G., 1995. Phylogenetic analysis of Elateriformia (Coleoptera: Polyphaga) based on larval characters. *J. Zoolog. Syst. Evol. Res.* 33, 145–171.
- Bonfield, J.K., Smith, K.F., Staden, R., 1995. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 23, 4992–4999.
- Boore, J.L., Lavrov, D.V., Brown, W.M., 1998. Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature* 392, 667–668.
- Branham, M.A., Wenzel, J.W., 2003. The origin of photic behavior and the evolution of sexual communication in fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *Cladistics* 19, 1–22.
- Cameron, S.L., Miller, K.B., D’Haese, C.A., Whiting, M.F., Barker, S.C., 2004. Mitochondrial genome data alone are not enough to unambiguously resolve the relationships of Entognatha, Insecta and Crustacea *sensu lato*. *Cladistics* 20, 534–557.
- Clary, D.O., Goddard, J.M., Martin, S.C., Fauron, C.M., Wolstenholme, D.R., 1982. *Drosophila* mitochondrial DNA: a novel gene order. *Nucleic Acids Res.* 10, 6619–6637.
- Coates, B.S., Sumerford, D.V., Hellmich, R.L., Lewis, L.C., 2005. Partial mitochondrial genome sequences of *Ostrinia nubilalis* and *Ostrinia furnicalis*. *Int. J. Biol. Sci.* 1, 13–18.
- Costa, C., 1975. Systematics and evolution of the tribes Pyrophorini and Heligmini, with description of Campyloxeninae, new subfamily (Coleoptera: Elateridae). *Arq. Zool.* 26, 49–190.
- Costa, C., Vanin, S.A., Casari-Chen, S.A., 1988. Larvas de Coleoptera do Brasil. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Crowson, R.A., 1972. A review of the classification of Cantharoidea (Coleoptera), with the definition of two new families, Cneoglossidae and Omethidae. *Rev. Univ. Madrid XXI*, 37–77.
- Crozier, R.H., Crozier, Y.C., 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* 133, 97–117.
- Curole, J.P., Kocher, T.D., 1999. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes. *Trends Ecol. Evol.* 14, 394–398.
- Dotson, E.M., Beard, C.B., 2001. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. *Insect Mol. Biol.* 10, 205–215.
- Friedrich, M., Muqim, N., 2003. Sequence and phylogenetical analysis of the complete mitochondrial genome of the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26, 502–512.
- Howland, D.E., Hewitt, G.M., 1995. Phylogeny of the Coleoptera based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data. *Insect Mol. Biol.* 4, 203–215.
- Lawrence, J.F., Newton Jr., A.F., 1995. Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references, and data on family-group names). In: Pakaluk, J., Slipinski, S.A. (Eds.), *Biology, phylogeny, and classification of Coleoptera: Papers celebrating the 80th birthday of Roy A. Crowson*. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warsaw, pp. 779–1006.
- Li, X., Ogoh, K., Ohba, N., Liang, X., Ohmiya, Y., 2007. Mitochondrial genomes of two luminous beetles, *Rhagophthalmus lufengensis* and *R. ohbai* (Arthropoda, Insecta, Coleoptera). *Gene* 392, 196–205.
- Lowe, T.M., Eddy, S.R., 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 25, 955–964.
- Müller, K.F., 2005. The efficiency of different search strategies in estimating parsimony jackknife, bootstrap, and Bremer support. *BMC Evol. Biol.* 5, 58.
- Muona, J., 1995. The phylogeny of Elateroidea (Coleoptera), or which tree is best today? *Cladistics* 11, 317–341.
- Nardi, F., Spinsanti, G., Boore, J.F., Carapelli, A., Dallai, R., Frati, F., 2003. Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic? *Science* 299, 1887–1889.
- Ohmiya, Y., Mina, S., Viviani, V.R., Ohba, N., 2000. Comparative aspects of a luciferase molecule from the Japanese luminous beetle, *Rhagophthalmus ohbai*. *Sci. Rep. Yokosuka City Mus.* 47, 31–38.
- Sagegami-Oba, R., Oba, Y., Ôhira, H., 2007. Phylogenetic relationships of click beetles (Coleoptera: Elateridae) inferred from 28S ribosomal DNA: insights into the evolution of bioluminescence in Elateridae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 42, 410–421.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651–701.
- Stewart, J.B., Beckenbach, A.T., 2003. Phylogenetic and genomic analysis of the complete mitochondrial DNA sequence of the spotted asparagus beetle *Crioceris duodecimpunctata*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26, 513–526.
- Stewart, J.B., Beckenbach, A.T., 2005. Insect mitochondrial genomics: the complete mitochondrial genome sequence of the meadow spittlebug *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cercopoidae). *Genome* 48, 46–54.
- Swofford, D.L., 1998. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Viviani, V.R., 2001. Fireflies from southeastern Brazil: habitats, life-history and bioluminescence. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94, 129–145.
- Viviani, V.R., 2002. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1833–1850.
- Viviani, V.R., Arnoldi, F.G., Brochetto-Braga, M., Ohmiya, Y., 2004. Cloning and characterization of the cDNA for the Brazilian *Cratomorphus distinctus* larval firefly luciferase: similarities with European *Lampyris noctiluca* and Asiatic *Pyrocoelia* luciferases. *Comp. Biochem. Physiol., Part B Biochem. Mol. Biol.* 139, 151–156.
- Viviani, V.R., Bechara, E.J.H., 1997. Bioluminescence and biological aspects of Brazilian railroad worms (Coleoptera: Phengodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90, 389–393.
- Viviani, V.R., Bechara, E.J.H., Ohmiya, Y., 1999a. Cloning, sequence analysis and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: relationships between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38, 8271–8279.
- Viviani, V.R., Silva, A.C., Perez, G.L., Santelli, R.V., Bechara, E.J., Reinach, F.C., 1999b. Cloning and molecular characterization of the cDNA for the Brazilian larval click-beetle *Pyrearinus termitilluminans* luciferase. *Photochem. Photobiol.* 70, 254–260.
- Viviani, V.R., Oehlmeyer, T.L., Arnoldi, F.G., Brochetto-Braga, M.R., 2005. A new firefly luciferase with bimodal spectrum: identification of structural determinants in spectral pH-sensitivity firefly luciferases. *Photochem. Photobiol.* 81, 843–848.
- Wolstenholme, D.R., 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cyt.* 141, 173–216.
- Xayaphoummine, A., Bucher, T., Isambert, H., 2005. Kinefold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots. *Nucleic Acid Res.* 33, 605–610.

9.2. Artigo em fase de publicação relativo aos dados das luciferases de Phengodidae

Evolution of the lateral and head lantern luciferases in railroad-worms (Coleoptera: Phengodidae): clues on the evolution of bioluminescence colors

Frederico G. C. Arnoldi^{1,2}, Vadim R. Viviani^{2*}

¹ Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, SP, Brazil

² Laboratório de Bioluminescência e Biotecnologia, UNISO/Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, SP, Brazil

*To whom correspondence should be addressed: viviani@ufscar.br

Abstract

Bioluminescence in beetles is found mainly in Elateroidea superfamily, which includes fireflies (Lampyridae), click beetles (Elateridae) and railroad worms (Phengodidae). The family of Phengodidae is divided in Phengodinae and Rhagophthalminae, the former in three tribes: Phengodini, Pennicilloporini and Mastinocerini. In the larval stage and in larviform females, members of this family display punctiform or transversal lanterns emitting green-yellow bioluminescence in all segments of the body. Additionally, members of the Mastinocerini tribe display unique cephalic organs that emit red-shifted light. Although the luciferases from the head lantern of *Phrixothrix hirtus* and from the lateral lanterns of *P. viviani* were previously cloned, the relationship between head and lateral lanterns in the Mastinocerini tribe, and the evolutionary history of bioluminescence in Phengodinae remains unknown. Here we cloned two new Phengodinae luciferases from the body of *Phrixothrix hirtus* and *Brasilocerus* sp.. The results indicate that the head lanterns and lateral lanterns luciferases are coded by paralogous genes. The evolutionary history of bioluminescence colors within Phengodinae is discussed.

Keywords: *Phrixothrix*; *Brasilocerus*; Phylogenetics; cloning.

1. Introduction

Bioluminescence in beetles is found mainly in Elateroidea superfamily, which includes fireflies (Lampyridae), railroad worms (Phengodidae) and click beetles (Elateridae). They produce light through light organs located in different parts of the body using a common mechanism in which the luciferin substrate, a benzothiazole compound, is adenylated in the presence of ATP, Mg^{++} and the enzyme luciferase (McElroy et al., 1967). The luciferyl-adenylate is then oxidized by molecular oxygen yielding CO_2 , AMP and an excited oxyluciferin, which decays to its ground state emitting light ranging from green to red ($\lambda_{max}=530-623nm$)(Viviani, 2002).

Since the bioluminescent system is the same for all Elateroidea beetles, the different bioluminescence colors are attributed to differences in the luciferase primary structures, which may affect the active site environment (Wood, 1995; Viviani, 2002). Three basic mechanisms have been proposed to explain how the luciferase determines the bioluminescence spectrum: (I) active-site polarity effects (DeLuca, 1969; Ugarova 2005); (II) specific interaction of excited oxyluciferin with basic residues (White et al, 1969) and (III) the rotation of thiazinic rings under the influence of the active site geometry (McCapra et al., 1994). Recent studies suggest that the polarizability of phenolate and keto/enolate groups may play major role in bioluminescence color determination (Branchini et al., 2003; Orlova et al., 2003)

The origin and evolution of bioluminescence in Elateroidea, has been challenging many scientists (Viviani, 2002; Arnoldi et al., 2007; Bocakova et al., 2007; Sagegami-Oba et al., 2007). Despite sharing the same luciferin-luciferase system, it is unclear whether bioluminescence in these families developed from a common ancestor, or if it arose independently some times.

The clade of Phengodidae is divided in two subfamilies: the American Phengodinae and the Asiatic Rhagophthalminae. Within Phengodinae, three tribes are found: Phengodini, Mastinocerini and Pennicilloporini (Wittmer, 1976). In the Phengodini tribe, larvae and larviform females display green-yellow bioluminescence through punctiform or transversal light organs spread throughout the entire body (Tiemann, 1967; Viviani and Bechara, 1997). Gruber et al. (1996) reported the first cloning of a Phengodidae luciferase, from the genus *Phengodes*, however, they did not publish its sequence. In the Mastinocerini tribe, larvae and larviform females display additional cephalic organs that emit red-shifted light (figure 1) (Viviani and Bechara, 1997); adult males are usually luminescent, displaying green-yellow lateral lanterns. Although the green emitting luciferase from the lateral lanterns of *Phrixothrix viviani*, and the red emitting luciferase from the head lanterns of *P. hirtus* were previously cloned (Viviani et al., 1999), the evolutionary relationship between these luciferases, as well as the evolution of bioluminescence in Phengodidae remains unknown.

Rhagophthalminae has very similar species to Phengodinae, however, its taxonomical status has been intensively discussed (Crowson, 1972; Wittmer e Ohba 1994; Ohmiya et al., 2000), being classified as a subfamily within Lampyridae, Phengodidae and as independent family. Similarities in behaviour, morphology, lanterns anatomical location, luciferases sequences with Phengodinae (Ohmiya et al., 2000), and some molecular phylogenetics studies (Bocakova et al., 2007) support that this group forms a monophyletic clade with Phengodidae, suggesting a common origin for their bioluminescence.

In order to investigate the bioluminescence evolution in Mastinocerini tribe, and more generally in Phengodidae, here we report the cloning of two new luciferases from the body of *Phrixothrix hirtus* and *Brasilocerus* sp., and their phylogenetical analysis

2. Materials and methods

2.1 Insects

Larvae were collected during spring and summer nights. *Brasilocerus* sp. larvae were collected in the Biological Station of Boracéia, an Atlantic rain forest reservation located in Salesópolis (São Paulo, Brazil). Larvae of *P. hirtus* were collected in “cerradão” formation at Fazenda Sta Cruz (Costa Rica prefecture, MS, Brazil).

2.2 cDNA cloning

The cDNA libraries were previously constructed from the bodies of *Phrixothrix hirtus* (Viviani et al., 1999) and *Brasilocerus* sp. The cDNA libraries were amplified and re-amplified using specific primers (P34F: 5'GATCAAAATGGAAGAAGAAAAC 3'; P1734R: 5' AATGAATGTATTAGGTTCTAAAA 3') and “PCR Master Mix” (Promega), following the manufacturer protocol and under the following conditions: 2' at 94°C; 25 cycles of 45" at 94°C, 45" at 50°C, 2' at 72°C; and a final 15' at 72°C. Two independent reactions of each library were carried out in order to avoid PCR artifacts on sequences. The PCR products were purified with Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and cloned into the p-GEM T Easy Vector (Promega). At least one positive clone of each reaction was then cultured and had its plasmid purified using Wizard *Plus* SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega). The cDNA was then sequenced using M13 universal and specific primers.

2.3 Luciferase expression and purification

The cloned cDNAs were ligated in frame into the pProEx HTa expression vector (Invitrogen) - at Nco I and Not I sites - and transformed into competent cells of *E. coli* strain BL21 DE3. The transformants were grown in 300 mL of LB medium, under shaking, at 37°C up to OD₆₀₀ = 0.3 and then induced at 20°C with 0.5 mM IPTG overnight. Cells were harvested by centrifugation at 2500xg for 15 min and resuspended in urea buffer A -

8M Urea, 0.1 M sodium phosphate, 10 mM Tris, 20 mM Imidazole, EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science), pH 7.5 – or phosphate buffer A – 0.1mM Phosphate, 250mM NaCl, protease inhibitor, pH 7.5 - , freeze-thawed three times in dry ice and centrifuged at 15.000xg for 15 min at 4°C. The supernatant was mixed with Ni-NTA resin (Qiagen) and incubated at 4°C for 45 min with gentle shaking. The protein bound to the resin was packed in a column and washed with 10-column volumes of buffer A supplemented with 20mM 2-Mercaptoethanol, 5mM ATP and 10% Glycerol. Then, the recombinant luciferases were eluted using two buffers: (A) 1 volume of buffer A at pH 5.9 and (B) 1 volume of the same buffer at pH 4.5. Fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE and Western Blotting.

2.4 Western Blotting

Denatured samples were applied to 10% Acrylamide SDS gels and subsequently electro-blotted onto nitrocellulose membranes. The membranes were first incubated with polyclonal antibodies raised against *Phrixothrix hirtus* head luciferase and then with anti-rabbit secondary antibody. The immunodetection was then visualized by chemiluminescence using an ECL Western Blotting kit (GE HealthCare) and a CCD camera system LightCapture I (Atto, Tokyo, Japan), in accordance with the manufacturer's protocol.

2.5 Luminescence assay

Luminescence activity was measured using a luminometer model TDIII (Tokyo, Japan) and a reaction mixture consisting of 100 µL of 1mM D-Luciferin, 2 mM ATP, 5 mM MgSO₄ and, 10 µL of purified luciferase sample in 100mM Tris-HCl buffer pH 8.0.

2.6 Alignment and general sequence analysis

Multiple sequence alignments were performed using Clustal W 1.8 (Thompson et al., 1994) using default parameters and BLOSUM. General sequence analysis were performed using MPAlign editor 2 (Arnoldi, 2005).

2.7 Phylogenetic analysis

Phylogenetic analyses were performed with PAUP* 4.0b10 (Swofford, 1998) using parsimony and neighbor-joining methods (Saitou and Nei, 1987) with the mean character difference as the distance measure. Two phylogenetic approaches were used to test the influence of different criteria on the data set, and, consequently, its reliability (Cameron et al., 2004). In each analysis, all characters had equal weight.

In order to analyze branch support and repeatability, we used bootstrap values performed with PAUP* default parameters and 5000 replications, which, according to Müller (2005), are enough to achieve around 1% of accuracy in a 95% confidence interval.

3. Results

3.1 Luciferase cloning

We cloned and sequenced the luciferase genes from the larval body of two Mastinocerini species: *Brasilocerus* sp. (Genbank FJ545728) and *Phrixothrix hirtus* (FJ545729) (figure 2). The luciferase cDNA from *Brasilocerus* sp. body has an ORF of 545 residues and displayed the highest similarity with the luciferases from the body of *P. hirtus* e *P. viviani* (86%) (table 2). The luciferase cDNA from *P. hirtus* also has 545 residues and displayed the highest similarity (99%) with *P. viviani* lateral lanterns luciferase, and just 72% with the head lantern luciferase from the same species.

3.2 Luciferase expression and purification

We subcloned the open reading frame (ORF) of these new luciferases into the pProEx HTa expression vector (Invitrogen), which adds a His(6x) tag on the protein N-terminal, and transformed BL21 DE3 *E. coli* lineage with them.

The recombinant luciferases had its expression induced overnight, and were extracted either under non-denaturing and denaturing conditions. No luciferase activity was detected under both conditions. However, Western Blot analysis with primary antibody raised against *P. hirtus* head luciferase showed positive antigenic bands with these samples. Under denaturing conditions (Urea 8M, Phosphate 0.1M, Tris 0.01M, pH 8.0), SDS-PAGE analysis showed partially purified bands around 60-65 kDa (unpublished).

Dialysis of these samples in 0.1M Phosphate buffer caused the formation of a white precipitate, that we suppose to be the recombinant luciferases. This probable insolubility can explain the absence of luminescent activity in our extracts.

3.3 Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis showed that the lateral lantern luciferase from *P. hirtus* is closer to *Brasilocerus* sp. and *P. viviani* lateral luciferase than to the head luciferase of the same species.

4. Discussion

In 1999, Viviani et al. cloned and sequenced the green emitting luciferase from the body of *P. viviani* and the red emitting from the head of *P. hirtus*. The *in vivo* bioluminescence spectrum of each lantern matches the *in vitro* spectrum of the respective recombinant luciferase. Native and recombinant luciferases showed similar properties. Altogether, these data indicate that luciferases from the body and head lanterns are coded by different genes. However, it was unclear if the luciferase isozymes from head and lateral lanterns of the same species are closer to each other, or if the lateral and head

lanterns luciferases are closer to the respective luciferases from other species. We observe in the phylogenetic tree (figure 3) that luciferases from the body of 3 different Mastinocerini species are clustered together in the same clade, whereas the luciferase from the head lantern of *P. hirtus* is alone in a neighbor branch. Noteworthy, the luciferase from the body of *P. hirtus* is closer to lateral lantern luciferases of other species (*Phrixothrix viviani* and *Brasilocerus* sp.) than to its own head lantern luciferase, indicating that head and body lanterns luciferases are coded by paralogous genes.

The head lanterns are just found in larvae and neotenic adult females of Mastinocerini members (Viviani and Bechara, 1997), whereas body lanterns are ubiquitous in Phengodidae, including in Rhagophthalminae larvae. Larvae of Lampyridae and Elateridae also have body lanterns, however, it is not clear if they are homologous (Bocakova et al., 2007; Sagegami-Oba et al., 2007; Arnoldi et al., 2007). Reasoning within the Phengodinae + Rhagophthalminae clade is, currently, more appropriate, as we have evidences to believe that bioluminescence in this clade has a common ancestral (Ohmiya et al., 2000, Bocakova et al., 2007).

The paralogy of head and body luciferases is strongly supported by our data. In this scenario, new questions arise: Which one is coded as a new gene? When their divergence occurred? What were the ancestral colors of head and body lanterns luciferases?

The head lantern is present only in the Mastinocerini members (Viviani and Bechara, 1997), and we can consider it and its luciferase as synapomorphies. Consequently, the most reasonable is to believe that the head lantern luciferase constitute the new gene.

By the luciferases phylogenetic analysis, we observed that luciferases from the body of Mastinocerini are closer to each other than to the head lantern luciferase of

Phrixothrix hirtus (Mastinocerini). However, they are closer to each other than to *Rhagophthalmus ohbai* body lantern luciferase. It indicates that head and body luciferases may have diverged after Phengodinae and Rhagophthalminae had diverged.

Head lanterns are found in all Mastinocerini members, but not in Rhagophthalminae and Phengodini tribe. Consequently, head lanterns luciferases would have appeared just on the Mastinocerini tribe ancestral. However, we do not have phylogenetic analysis with Phengodini luciferases to confirm it.

Based on the fact that just green lanterns are found in Rhagophthalminae, and the green-shifted colors are ubiquitously found and predominate in the lateral lanterns of Phengodinae members (table 1), we believe that the green should represent the ancestral color for body lanterns luciferases of Mastinocerini members.

Mastinocerini head lanterns luciferases are, in general, red-shifted compared with body lanterns (table 1). As these luciferases are homologous to the green shifted body lantern luciferases, possible explanations for this difference in color are: (I) parallel evolution occurred in head luciferases towards red-shifted colors, or (II) head luciferases had a red-shifted ancestral. The simplest hypothesis, or the most parsimonious, indicates for a red-shifted ancestral. The *Phrixothrix* genus is the most extreme case, displaying wavelengths longer than 600nm, also indicating an ancestral with head lanterns emitting light in the red region for this genus. However, this explanation, alone, can not completely explain all lantern colors on Phengodinae, as the longest published wavelength for body luciferases is $\lambda_{\text{m\acute{a}x}} = 586 \text{ nm}$, while the shortest published for head luciferases is $\lambda_{\text{m\acute{a}x}} = 565 \text{ nm}$ (Viviani and Bechara, 1997). Analysis of the luciferases wavelength distributions (unpublished data) suggested a Gaussian distribution for both lanterns, indicating that genetic drift could be one of the actors in determining the color of light emitted by luciferases.

Although the evolutionary history of bioluminescence colors in Phengodinae is not yet a finished discussion, we have enough data to speculate about the whole process. Our results indicate for a scenario like that in the figure 4: with green ancestral body luciferases for all Phengodinae; Mastinocerini head lantern luciferases appearing after the divergence of this and Phengodini, further changing the color to a red-shifted one, reaching red color just in *Phrixothrix* genus.

5. Concluding Remarks

Our analysis indicates that Phengodinae lateral lanterns luciferases are orthologous genes to Rhagophthalminae luciferases, while the head lanterns luciferases are paralogous. The head lantern luciferase must have evolved by a gene duplication event departing from a green ancestral luciferase just before the Mastinocerini tribe members had diverged. After gene duplication and before the divergence of Mastinocerini members, the head lantern must have accumulated mutations towards the yellow, trending all head luciferases for red-shifted colors. In the *Phrixothrix* genus ancestral, further mutations may have been accumulated in the head luciferase creating the unique natural red color in Coleoptera bioluminescence.

Acknowledgments

We would like to thank FAPESP (extensor) and CNPq for the financial support and Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) for providing sequencing facilities.

References

Arnoldi, F.G.C., 2005. MPAlign editor: uma ferramenta gráfica e intuitiva para alinhamentos moleculares. Anais do II Workshop TIDIA—FAPESP.

Arnoldi, F.G.C., Ogoh, K., Ohmiya, Y., Viviani, V. R., 2007. Mitochondrial genome sequence of the Brazilian luminescent click beetle *Pyrophorus divergens* (Coleoptera: Elateridae): Mitochondrial genes utility to investigate the evolutionary history of Coleoptera and its bioluminescence. *Gene* 405, 1-9.

Bocakova, M., Bocak, L., Hunt, T., Teraväinen, M., Vogler, A. P., 2007. Molecular phylogenetics of Elateriformia (Coleoptera): evolution of bioluminescence and neoteny. *Cladistics* 23, 477–496.

Branchini, B.R., Southworth, T.L., Murtiashaw, M.H., Boije, H., Fleet, S.E., 2003. A Mutagenesis Study of the Putative Luciferin Binding Site Residues of Firefly Luciferase. *Biochemistry* 42,10429-10436.

Cameron, S.L., Miller, K.B., D'Haese, C.A., Whiting, M.F., Barker, S.C., 2004. Mitochondrial genome data alone are not enough to unambiguously resolve the relationships of Entognatha, Insecta and Crustacea *sensu lato*. *Cladistics* 20, 534–557.

Crowson, R.A., 1972. A review of the classification of Cantharoidea (Coleoptera), with the definition of two new families, Cneoglossidae and Omethidae. *Revista de la Universidad de Madrid* 21, 35–77.

DeLuca, M., 1969. Hydrophobic nature of the active site of firefly luciferase. *Biochemistry* 8, 160–166.

Gruber, M. G., Kutuzova, G. D., Wood, K. V., 1996. Cloning and expression of a *Phengodes* luciferase. In *Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons*, in: Hastings, J.W., Kricka, L.J., Stanley, P.E. (Eds.), *Proceedings of the 9th International Symposium*, John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 244-247.

McCapra, F., Gilfoyle, D.J., Young, D.W., Church, N.J., Spencer, P., 1994. The chemical origin of colour differences in beetle bioluminescence, In: Campbell, A.K., Kricka,

L.J., Stanley, P.E. (eds), *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamentals and Applied Aspects*, John Wiley & Sons, Chichester, pp. 387–391.

McElroy, W.D., DeLuca, M., Travis, J., 1967. Molecular uniformity in biological catalyses. The enzymes concerned with firefly luciferin, amino acid, and fatty acid utilization are compared. *Science* 157,150-157.

Müller, K.F., 2005. The efficiency of different search strategies in estimating parsimony jackknife, bootstrap, and Bremer support. *BMC Evol. Biol.* 5, 58.

Ohmiya, Y., Mina, S., Viviani, V.R., Ohba, N., 2000. Comparative aspects of a luciferase molecule from the Japanese luminous beetle, *Rhagophthalmus ohbai*. *Sci. Rep. Yokosuka City Mus.* 47, 31–38.

Orlova, G., Goddard, J.D., Brovko, L.Y., 2003. A Theoretical Study of Amazing Firefly Bioluminescence: the Structure of the Light Emitters. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 6962-6971.

Sagegami-Oba, R., Takahashi, N., Oba, Y., 2007. The evolutionary process of bioluminescence and aposematism in cantharoid beetles (Coleoptera: Elateridae) inferred by the analysis of 18 S ribosomal DNA. *Gene* 400, 104–113.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.

Swofford, D.L., 1998. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.

Tieman, D.L., 1967. Observations on the natural history of the western banded glowworm *Zarhipis integripennis* (LeConte) (Coleoptera: Phengodidae). *Proc. Calif. Acad. Sci.* 35,235-264.

Ugarova, N.N., Maloshenok, L.G., Uporov, I.V., Koksharov, M.I., 2005. Bioluminescence spectra of native and mutant firefly luciferases as a function of pH. *Biochemistry (Moscow)* 70,1262-1276.

Viviani, V.R., 2002. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1833–1850.

Viviani, V.R., Bechara, E.J.H., 1993. Biophysical and biochemical aspects of Phengodidae (Railroad-worm) bioluminescence. *Photochem. Photobiol.* 58, 615-622

Viviani, V.R., Bechara, E.J.H., 1997. Bioluminescence and Biological Aspects of Brazilian Railroad-Worms (Coleoptera: Phengodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90, 389-398.

Viviani, V.R., Bechara, E.J.H., Ohmiya, Y., 1999. Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: Relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry*, 38, 8271 – 8279.

White, E.H., Rapaport, E., Hopkins, T.A., Seliger, H.H., 1969. Chemi- and bioluminescence of firefly luciferin. *J. Am. Chem. Soc.* 91,2178-2180.

Wittmer, W., 1976. Arbeiten zur einer Revision der Familie Phengodidae. *Entomol. Arb. Mus.Frey* 27, 415-524.

Wittmer, W., Ohba, N., 1994. Neue Rhagophthalmidae (Coleoptera) aus China und benachbarten Länder. *Jpn. J. Ent.* 62, 341-355.

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

Figures

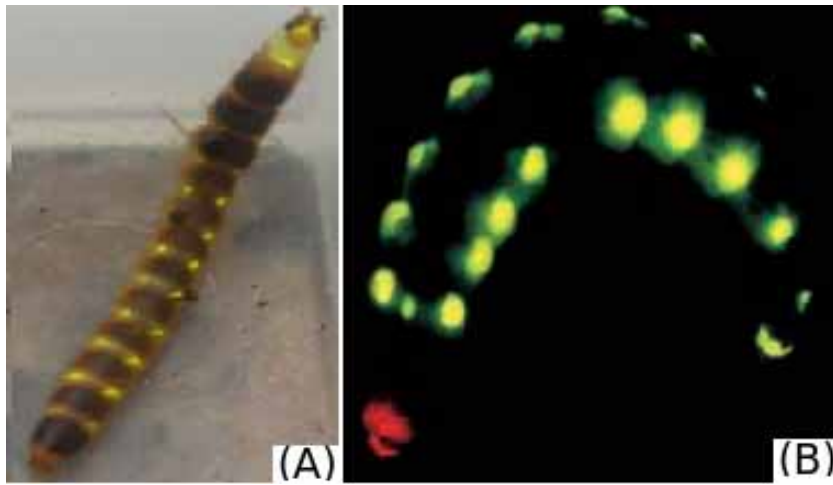


Figure 1. Railroad worms: (A) *Brasilocerus* sp (Phengodinae: Mastinocerini). (B) *Phrixothrix hirtus* (Phengodinae:Mastinocerini).

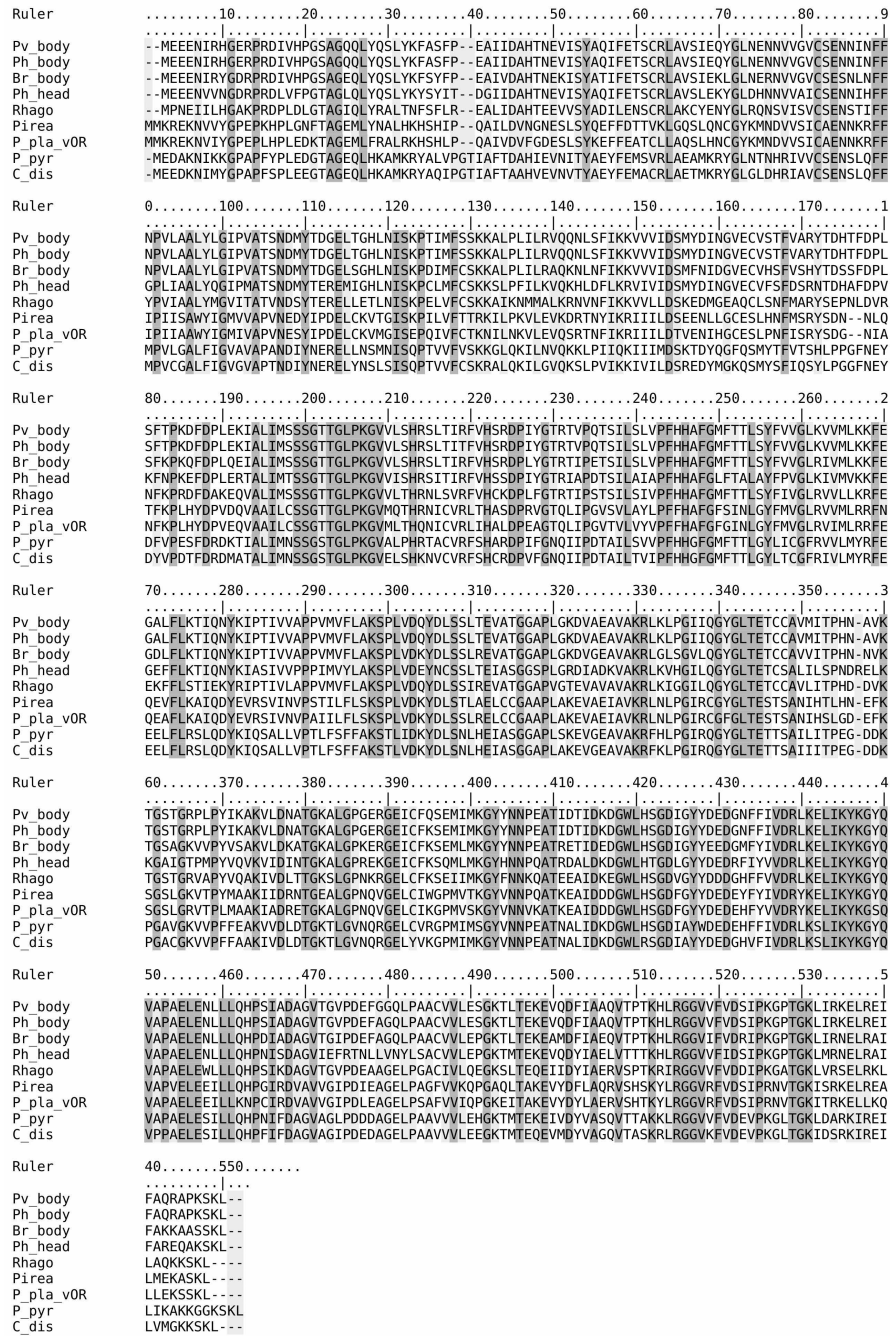


Figure 2. Alignment of the new railroad worm luciferases. Ph_body: *P. hirtus* lateral lanterns; Br_body: *Brasilocerus* sp. lateral lantern; Pv_body: *P. viviani* lateral lanterns (AF139644.1); Ph_head: *P. hirtus* head lantern (AF139645.1), *R. ohbai* (AB255748.1).P_pyr: *Photinus pyralis* (M15077.1), C_dis: *Cratomorphus distinctus* (AY633557.1); Pyrea: *Pyrearinus termitilluminans* (AF116843.1); P_pla_vOR: *Pyrophorus plagiophthalmus* orange ventral lantern (AAQ11692.1) .

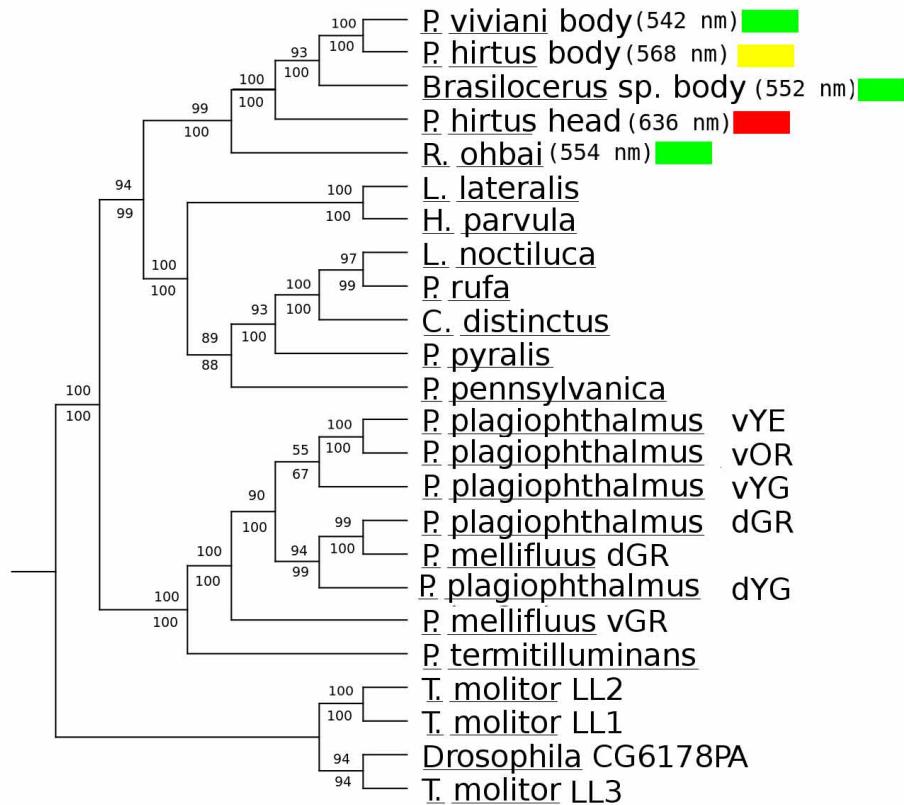


Figure 3. Phylogenetic analysis of Elateroidea luciferases. Values above and below branches display bootstrap support (5000 pseudo-replications) for parsimony and Neighbor-joining respectively.

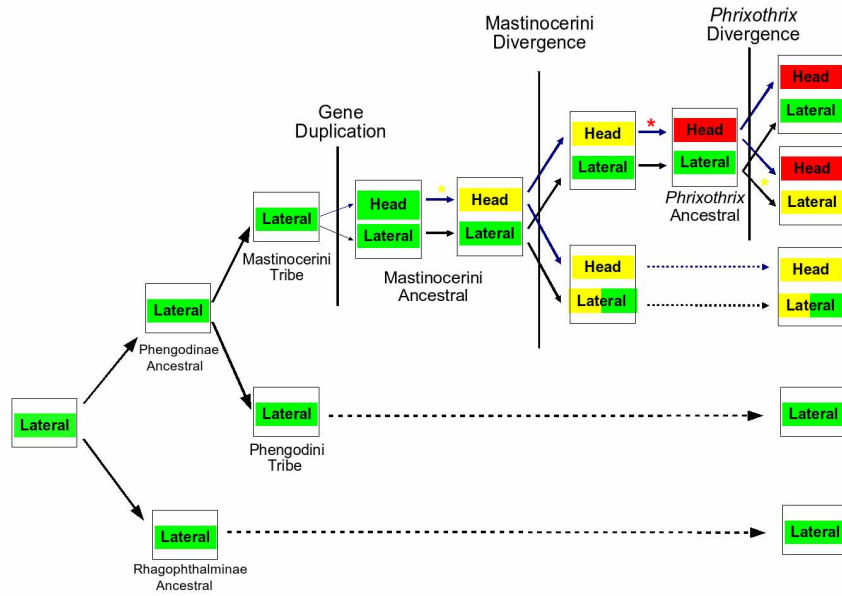


Figure 4. Model for bioluminescence color evolution in Phengodidae.

Tables

Table 1. Maximum wavelengths for the *in vivo* bioluminescence for different Phengodidae members (sorted by wavelengths).

Specie	Lantern location	λ max	Reference
<i>P. viviani</i>	lateral	535	Viviani et al., 1993
<i>Phengodes laticollis</i>	larvae	535	Viviani et al., 1993
<i>R. ohbai</i>	larvae (luciferase)	538	Ohmiya et al., 2000
<i>Phrixothrix sp2</i>	lateral	540	Viviani et al., 1993
<i>Pseudophengodes brasilienses</i>	adult male	542	Viviani et al., 1997
<i>Mastinocerus nigrocollis</i>	adult male	549	Viviani et al., 1993
<i>Brasilocerus impressicollis</i>	lateral	550	Viviani et al., 1997
<i>Stenophrixothrix sp2</i>	lateral	550	Viviani et al., 1993
<i>Stenophrixothrix sp3</i>	lateral	552	Viviani et al., 1993
<i>P. viviani</i>	adult male	560	Viviani et al., 1993
<i>P. hirtus</i>	lateral	563	Viviani et al., 1993
<i>Stenophrixothrix sp2</i>	head	565	Viviani et al., 1993
<i>Phrixothrix heydeni</i>	larval lateral	568	Viviani et al., 1997
<i>Stenophrixothrix sp3</i>	head	570	Viviani et al., 1993
<i>Stenophrixothrix sp1</i>	lateral	577	Viviani et al., 1993
<i>Mastinocerus nigrocollis</i>	head	578	Viviani et al., 1993
<i>Mastinomorphus sp1.</i>	female head	578	Viviani et al., 1997
<i>Mastinomorphus sp1.</i>	adult male	580	Viviani et al., 1997
<i>Mastinocerus nigrocollis</i>	lateral	580	Viviani et al., 1993
<i>Mastinomorphus sp1.</i>	female lateral	580	Viviani et al., 1997
<i>Mastinomorphus sp2.</i>	female lateral	586	Viviani et al., 1997
<i>Brasilocerus impressicollis</i>	head	595	Viviani et al., 1997
<i>Mastinomorphus sp2.</i>	female head	597	Viviani et al., 1997
<i>Stenophrixothrix sp1</i>	head	597	Viviani et al., 1993
<i>Phrixothrix sp4</i>	adult male	600	Viviani et al., 1993
<i>Phrixothrix sp2</i>	head	600	Viviani et al., 1993
<i>P. hirtus</i>	head	609	Viviani et al., 1993
<i>P. viviani</i>	head	620	Viviani et al., 1993
<i>Phrixothrix heydeni</i>	larval head	636	Viviani et al., 1997

Table 2. Phengodidae luciferases predicted features.

Species	Lantern position	Residues	Isoelectric point	Molecular weight (KDa)
<i>P. hirtus</i>	head	546	6,94	60,95
	lateral	545	6,37	59,71
<i>P. viviani</i>	lateral	545	6,37	59,73
<i>Brasilocerus sp.</i>	lateral	545	6,52	59,95
<i>R. ohbai</i>	lateral	543	8,16	60.13

9.3. Resumo de outros artigos publicados em colaborações durante o período de doutoramento

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

V.R. Viviani^{1,2,*}, F.G.C. Arnoldi², B. Venkatesh³, A.J.S. Neto², F.G.T. Ogawa²,
A.T.L. Oehlmeier² and Y. Ohmiya³

¹Universidade Federal de Sao Carlos, Campus de Sorocaba, Sorocaba, SP, Brazil; ²Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24 A, 1515, Bela Vista, Rio Claro, SP, Brazil 13506-900; and ³Cell Dynamics Research Group, National Institute of Advanced Science and Technology (AIST), 1-8-31 Midorigaoka, Ikeda, Osaka

Received June 19, 2006; accepted July 11, 2006

The luciferases of the railroad worm *Phrixotrix* (Coleoptera: Phengodidae) are the only beetle luciferases that naturally produce true red bioluminescence. Previously, we cloned the green- (PxGR) and red-emitting (PxRE) luciferases of railroad worms *Phrixotrix viviani* and *P. hirtus*[OLE1]. These luciferases were expressed and purified, and their active-site properties were determined. The red-emitting PxRE luciferase displays flash-like kinetics, whereas PxGR luciferase displays slow-type kinetics. The substrate affinities and catalytic efficiency of PxRE luciferase are also higher than those of PxGR luciferase. Fluorescence studies with 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid and 6-*p*-toluidino-2-naphthalene sulfonic acid showed that the PxRE luciferase luciferin-binding site is more polar than that of PxGR luciferase, and it is sensitive to guanidine. Mutagenesis and modelling studies suggest that several invariant residues in the putative luciferin-binding site of PxRE luciferase cannot interact with excited oxyluciferin. These results suggest that one portion of the luciferin-binding site of the red-emitting luciferase is tighter than that of PxGR luciferase, whereas the other portion could be more open and polar.

Key words: bioluminescence, luciferases, *Phrixotrix*, railroad worms.

Abbreviations: ANS, 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid; TNS, 6-*p*-toluidino-2-naphthalene sulfonic acid; DTT, dithiothreitol; PxGR, *Phrixotrix viviani* green-light-emitting luciferase cDNA; PxRE, *Phrixotrix hirtus* red-light-emitting luciferase cDNA; CoA, coenzyme A.

Beetle luciferases catalyse the ATP-activated oxidation of firefly D-luciferin, producing bioluminescence, usually in the green-yellow region. They are the most sensitive and versatile reporter genes for bioanalytical purposes (1). Most studies have focused on firefly luciferases, many of which have been cloned and sequenced (2–11). However, the physicochemical properties of only a few of them have been studied in detail (10, 11). The three-dimensional structure of *Photinus pyralis* firefly luciferase was resolved in the absence of substrates (12), and two active-site models have been proposed (13, 14). According to these models, the luciferin-binding site consists of residues R218, 244HHGF247, 315GG316, R330, T343, S347, A348, and I351. Although the active site of firefly luciferase was originally thought to be hydrophobic (15), more recent results suggest that it is amphiphilic (16). Click beetle luciferases, which produce different colours, have also been cloned (17, 18). Mutagenesis studies identified the residues important for the bioluminescence activity and colours of these luciferases (19–24). Three mechanisms

have been proposed to explain bioluminescence colour modulation by beetle luciferases: (I) non-specific solvent and orientation polarizability effects (15, 16); (II) specific active-site interactions with the emitter (25); and (III) the effect of the conformation of the active site on the rotational properties of the oxyluciferin thiazine rings (26). Recent theoretical and experimental studies suggested that the polarization of the phenolate and enolate groups of excited oxyluciferin under the influence of active site residues determine of the emission spectra (27, 28). However, the contribution of each mechanism to the determination of the bioluminescence colours produced by different beetle luciferases is unclear.

The luciferases of the *Phrixotrix* railroad worms are the only [OLE2] luciferases that naturally catalyse bioluminescence in the red region of the spectrum. For this reason, they constitute useful models with which to study the relationship between the structures and bioluminescence colours of beetle luciferases. Because they are the only luciferases to produce red light, they have strong potential applications in a wide variety of bioanalytical contexts. Previously, we cloned the green-emitting luciferase from *P. viviani* and the red-emitting luciferase from *P. hirtus* railroad worms (29), which are 71% identical at the primary structure level. We used mutagenesis and chimerization studies based on a comparison of their primary structures to identify the structural determinants of the

*To whom correspondence should be addressed at: Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24 A, 1515, Bela Vista, Rio Claro, SP, Brazil 13506-900. Tel: +55 19 35264149, Fax: +55 19 35236502, E-mail: viviani@rc.unesp.br

Few substitutions affect the bioluminescence spectra of *Phrixotrix* (Coleoptera: Phengodidae) luciferases: a site-directed mutagenesis survey

Vadim R. Viviani,^{1,2*} Frederico G. C. Arnoldi,² Florisbela T. Ogawa² and M. Brochetto-Braga²

¹Universidade Federal de São Carlos, Campus de Sorocaba, Sorocaba, SP, Brazil

²Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, SP, Brazil

Received 10 August 2006; revised 24 January 2007; accepted 5 February 2007

ABSTRACT: *Phrixotrix* (railroad worm) luciferases produce bioluminescence in the green and red regions of the spectrum, depending on the location of the lanterns, and are the only luciferases naturally producing red bioluminescence. Comparison of the luciferase sequences showed a set of substitutions that could be involved in bioluminescence colour determination: (a) unique substitutions in the red luciferase replacing otherwise invariant residues; (b) conserved basic residues in the green–yellow emitting luciferases; and (c) an additional R353 residue in red-emitting luciferase (Viviani *et al.*, 1999). To investigate whether these sites have a functional role in bioluminescence colour determination, we performed a site-directed mutagenesis. Natural substitutions in the region 220–344 and residues in the putative luciferin-binding site were also investigated. With the exception of the previously identified substitution of R215 and T226 (Viviani *et al.*, 2002), which display dramatic red-shift effects on the spectrum of green–yellow-emitting luciferases, only a few substitutions had a moderate effect on the spectrum of the green-emitting luciferase. In contrast, no single substitution affected the spectrum of the red-emitting luciferase. The results suggest that the identity of the active site residues is not so critical for determining red bioluminescence in PxRE luciferase. Rather, the conformation assumed during the emitting step could be critical to set up proper interactions with excited oxyluciferin. Copyright © 2007 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: luciferases; bioluminescence; railroad worms; *Phrixotrix*; click beetles; fireflies

INTRODUCTION

Among beetle luciferases, those from railroad worms (genus *Phrixotrix*) are especially interesting because they emit at the green and at the red extremes of the beetle bioluminescence spectrum, with the latter being the only luciferase that naturally produces red light (1). Most studies on the relationship between structure and bioluminescence colour, however, have focused on firefly luciferases (2–9). The three-dimensional structure of firefly luciferase was solved by X-ray crystallography in the absence of substrates, showing a main N-terminal (residues 1–435) domain bound by a flexible loop (residues 436–440) to a smaller C-terminal domain (residues 441–550) (10). Extensive mutagenesis studies with firefly luciferase identified many residues affecting bioluminescence colour. The three-dimensional structure of the related phenylalanine synthetase associated with AMP and phenylalanine and the mutagenesis

studies provided theoretical support for active site models showing that the luciferin-binding site involves the residue R218, the peptide 244HHGF247, F250, R337 and T343 (11, 12). More recently, the three-dimensional structure of the Japanese *Luciola cruciata* firefly luciferase, in the presence of the 5'-O-[N-(dehydrolyciferin)sulphamoyl] adenosine (DLSA) analogue and oxyluciferin, was solved, showing the importance of residue I288 in creating a hydrophobic and rigid environment favourable for green light emission (13). However, the mystery of bioluminescence colour determination is not yet solved. Previously we cloned the cDNAs for *Phrixotrix vivianii* green-emitting (PxvGR) and *P. hirtus* red-emitting (PxhRE) luciferases (14). Sequence comparisons showed several sites that could be potentially involved in the determination of bioluminescence colour in these luciferases (Fig. 1): (i) residues unique to the red luciferase replacing otherwise invariant residues; (ii) basic residues in the green-emitting luciferase substituted by non-basic residues in the red luciferase; and (iii) the presence of the additional R353 in the red-emitting luciferase. The construction of chimerae showed that exchanging the segments between residues 220–344, which corresponds to most of the subdomain B in beetle luciferases, between green- and red-emitting railroad worm luciferases has small effect on the spectrum,

*Correspondence to: V. R. Viviani, Universidade Federal de São Carlos, Campus de Sorocaba, Av. Darci Dafferner 200, Sorocaba, SP, Brazil.

E-mail: viviani@power.ufscar.br

Contract/grant sponsor: FAPESP, Brazil; Contract/grant number: 00/05467-4.

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

Vadim R. Viviani^{*1,2}, Antonio J. Silva Neto², Frederico G. C. Arnoldi², João A. R. G. Barbosa³ and Yoshihiro Ohmiya⁴

¹Laboratório de Biotecnologia e Bioluminescência, Universidade de Sorocaba (UNISO), Universidade Federal de São Carlos, Campus de Sorocaba, Sorocaba, São Paulo, Brazil

²Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Rio Claro, São Paulo, Brazil

³Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, São Paulo, Brazil

⁴Cell Dynamics Research Group, National Institute of Advanced Science and Technology (AIST), Osaka, Japan

Received 22 May 2007, accepted 16 August 2007, DOI: 10.1111/j.1751-1097.2007.00209.x

ABSTRACT

Beetle luciferases emit a wide range of bioluminescence colors, ranging from green to red. Firefly luciferases can shift the spectrum to red in response to pH and temperature changes, whereas click beetle and railroadworm luciferases do not. Despite many studies on firefly luciferases, the origin of pH-sensitivity is far from being understood. Through comparative site-directed mutagenesis and modeling studies, using the pH-sensitive luciferases (*Macrolampis* and *Cratomorphus distinctus* fireflies) and the pH-insensitive luciferases (*Pyrearinus termitilluminans*, *Phrixotrix viviani* and *Phrixotrix hirtus*) cloned by our group, here we show that substitutions dramatically affecting bioluminescence colors in both groups of luciferases are clustered in the loop between residues 223–235 (*Photinus pyralis* sequence). The substitutions at positions 227, 228 and 229 (*P. pyralis* sequence) cause dramatic redshift and temporal shift in both groups of luciferases, indicating their involvement in labile interactions. Modeling studies showed that the residues Y227 and N229 are buried in the protein core, fixing the loop to other structural elements participating at the bottom of the luciferin binding site. Changes in pH and temperature (in firefly luciferases), as well as point mutations in this loop, may disrupt the interactions of these structural elements exposing the active site and modulating bioluminescence colors.

INTRODUCTION

Beetle luciferases emit a wide range of bioluminescence colors, ranging from green to red (1). Click beetle and railroadworm luciferases emit a single bioluminescence color (2), however firefly luciferases can modulate the proportion of green and red bioluminescence through a pH-sensitive mechanism (3).

Recent theoretical and experimental studies suggest that the mechanism of bioluminescence color determination by luciferase involves the polarization of oxyluciferin phenol and keto/enol groups, under the influence of active site residues,

and the rigidity of the active site (4–6). The primary sequences of several beetle luciferases (7–18) are known. The three-dimensional structure has been solved for the North American firefly luciferase, in the absence of substrates (19), and more recently for the Japanese *Luciola cruciata* firefly luciferase in the presence of either the luciferyl-adenylate analog 5'-O-[N-(dehydrolyciferin)-sulphamoyl] adenosine (DLSA), and of oxyluciferin and adenosine monophosphate (AMP) (20). Some luciferin binding-site residues were identified by modeling studies (21,22), site-directed mutagenesis (23–26) and by direct inspection of the three-dimensional structure in the presence of analogs (20). However, several other residues distributed seemingly randomly over the primary structure of firefly luciferases are known to affect bioluminescence colors, many of them resulting in red mutants (27–31).

One approach to investigate the structure/function relationships in proteins is through comparative site-directed mutagenesis of homolog proteins. To investigate the relationship between luciferase structure, bioluminescence colors and pH-sensitivity, we previously cloned the pH-insensitive click beetle and railroadworm luciferases (15–17). In contrast to firefly luciferases, much fewer residues were found to affect the bioluminescence colors of the pH-insensitive luciferases (32–34): none of them displaying the large redshifts observed in firefly luciferases (35). A set of residues differing between pH-sensitive and pH-insensitive luciferases was identified (16), and site-directed mutagenesis of several residues was performed. However, none of these substitutions conferred pH-sensitivity to a pH-insensitive luciferase. Only the substitution of T226 in pH-insensitive luciferases and the analogous N229 in pH-sensitive luciferases, caused dramatic redshift in both groups of luciferases (33–35). We also cloned two new firefly luciferases (36,37) and found that the substitution E354N is responsible for the presence of a shoulder in the red region of the spectrum of *Macrolampis* luciferase (37). From these studies, a network of interacting residues which could be involved with pH-sensitivity determination, including the residue N229, was identified (37).

*Corresponding author email: viviani@power.ufscar.br (Vadim Viviani)

© 2007 The Authors. Journal Compilation. The American Society of Photobiology 0031-8655/07

The structural origin and biological function of pH-sensitivity in firefly luciferases†

V. R. Viviani,^{*a,b,c} F. G. C. Arnoldi,^d A. J. S. Neto,^d T. L. Oehlmeyer,^d E. J. H. Bechara^e and Y. Ohmiya^f

Received 2nd October 2007, Accepted 3rd January 2008

First published as an Advance Article on the web 24th January 2008

DOI: 10.1039/b714392c

Firefly luciferases are called pH-sensitive because their bioluminescence spectra display a typical red-shift at acidic pH, higher temperatures, and in the presence of heavy metal cations, whereas other beetle luciferases (click beetles and railroadworms) do not, and for this reason they are called pH-insensitive. Despite many studies on firefly luciferases, the origin of pH-sensitivity is far from being understood. This subject is revised in view of recent results. Some substitutions of amino-acid residues influencing pH-sensitivity in firefly luciferases have been identified. Sequence comparison, site-directed mutagenesis and modeling studies have shown a set of residues differing between pH-sensitive and pH-insensitive luciferases which affect bioluminescence colors. Some substitutions dramatically affecting bioluminescence colors in both groups of luciferases are clustered in the loop between residues 223–235 (*Photinus pyralis* sequence). A network of hydrogen bonds and salt bridges involving the residues N229-S284-E311-R337 was found to be important for affecting bioluminescence colors. It is suggested that these structural elements may affect the benzothiazolyl side of the luciferin-binding site affecting bioluminescence colors. Experimental evidence suggest that the residual red light emission in pH-sensitive luciferases could be a vestige that may have biological importance in some firefly species. Furthermore, the potential utility of pH-sensitivity for intracellular biosensing applications is considered.

^aUniversidade Federal de São Carlos (UFSCAR), Campus de Sorocaba, Av. Darci Dafferner, 200, Alto da Boa Vista, Sorocaba, 18043-970, Sorocaba, SP, Brazil. E-mail: viviani@ufscar.br; Tel: +55 15 32181619

^bLaboratório de Biotecnologia e Bioluminescência, Universidade de Sorocaba, Sorocaba (UNISO), SP, Brazil

^cDepartamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

^dDepartamento de Biologia, Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, SP, Brazil

^eDepartamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^fDepartment of Photobiology, Hokkaido Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan

† This paper was published as part of the themed issue on bioluminescence.

Introduction

Bioluminescent beetles emit a wide variety of colors ranging from the green to the red.¹ The bioluminescence color is determined by the luciferase structures, which influence the active site microenvironment around the excited emitter. Different bioluminescence colors, such as those occurring in click beetles and railroadworms, are usually displayed by different luciferase isozymes.^{1,2} In the Jamaican click beetle, the bioluminescence color is determined by the co-expression of different isozymes.³ Although firefly luciferases usually elicit bioluminescence in the yellow-green region, they can shift the spectrum to the red at acidic pH, a condition that has been called pH-sensitivity^{4,5} (Fig. 1). Higher temperatures,



V. R. Viviani

V. Viviani got his BS degree in Biological Sciences from the Catholic University of Campinas (Brazil) in 1990. He got the Master (1992) and PhD (1996) degrees at the Dept. of Biochemistry at the Instituto de Química of São Paulo University (São Paulo, Brazil), under the supervision of Prof. Dr E. J. H. Bechara. He did post-doctoral stages in the laboratories of Prof. Dr F. C. Reinach (São Paulo University, Brazil), Prof. Dr Y. Ohmiya (Shizuoka University, Japan) and Prof. Dr

J.W. Hastings and T. Wilson (Dept. Molecular and Cellular Biology, Harvard University, USA). He came back to Brazil and established his own research group of Bioluminescence, originally at the Universidade Estadual de São Paulo (UNESP-Rio Claro). Now he is Associate Professor of Biochemistry at the Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), Campus of Sorocaba, and leads the Bioluminescence Research Group in partnership with UFSCAR and Universidade de

Sorocaba (UNISO, Sorocaba, Brazil). He is also Scientific Councilor of the International Society of Bioluminescence and Chemiluminescence, having organized several symposia on beetle luciferases and bioluminescence. During his career, Prof. Viviani studied the bioluminescence systems of beetles and fungus-gnats, having cloned several new luciferases and investigating their structure, function and evolution.

An ancestral luciferase in the Malpighi tubules of a non-bioluminescent beetle!

V. R. Viviani,^{*a,b} R. A. Prado,^{a,b} F. C. G. Arnoldi^{a,c} and F. C. Abdalla^a

Received 1st October 2008, Accepted 20th November 2008

First published as an Advance Article on the web 9th December 2008

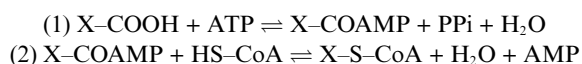
DOI: 10.1039/b817114a

The evolutionary origin of beetle bioluminescence is enigmatic. Previously, weak luciferase activity was found in the non-bioluminescent larvae of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), but the detailed tissular origin and identity of the luciferase-like enzyme remained unknown. Using a closely related giant mealworm, *Zophobas morio*, here we show that the luciferase-like enzyme is located in the Malpighi tubules. cDNA cloning of this luciferase like enzyme, showed that it is a short AMP-ligase with weak luciferase activity which diverged long ago from beetle luciferases. The results indicate that the potential for bioluminescence in AMP-ligases is very ancient and provide a first reasonable protoluciferase model to investigate the origin and evolution of beetle luciferases.

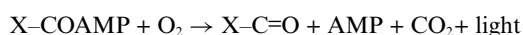
Introduction

The evolutionary origin of bioluminescence, and of beetle bioluminescence in particular, is of evident interest.^{1,2} Luciferases, the enzymes that catalyze the production of bioluminescence, are a diverse group of evolutionarily unrelated oxygenases catalyzing the oxidation of distinct luciferins.^{3,4} In the case of bioluminescent beetles, luciferases evolved from AMP-CoA ligases,^{1,2} an ancient group of enzymes that catalyze (i) the activation of carboxylic substrates through adenylation at the expense of ATP, and (ii) the subsequent transfer and thioesterification of the carboxylic group to CoA (step 2). In beetle luciferases, however, the second-half reaction is replaced by the oxygenase activity, which ultimately leads to the bioluminescence function. How these luciferases evolved from AMP-ligase is not known.

AMP/CoA ligases



Luciferases



Twelve years ago, an enzyme able to catalyze the emission of weak light in the presence of firefly D-luciferin and Mg/ATP or of luciferyl adenylate was reported in larvae of the non-luminous beetle *Tenebrio molitor*.⁵ While the sequence of this luciferase-active protein is still unknown, several genes homologous to firefly luciferases, perhaps resulting from gene duplication, were recently found in the same mealworm and subsequently cloned; however, the proteins they expressed showed acyl-coenzymeA synthetic activity, but no luciferase activity.⁶

We report here the anatomic location, cloning, sequence analysis and properties of the protein responsible for light emission upon injection of firefly D-luciferin in a closely related beetle, the giant mealworm *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Fig. 1, see later).

Experimental

Insects

Live *Zophobas morio* and *Tenebrio molitor* mealworms were commercially available in pet shops.

CCD Imaging

Mealworm weak chemiluminescence was imaged after injecting 100 μL of 10 mM D-luciferin in citrate buffer pH 5 by exposure during 5 min with a Xenogen IVIS CCD camera system (CA, USA), or by 20–30 min exposure with an ATTO Light-Capture I CCD camera system (Tokyo, Japan). Controls using only citrate buffer instead of luciferin, did not produced luminescence. The Malpighi tubules were isolated from the live larvae previously injected with D-luciferin, and drawn in 100 μL of a solution consisting of 7.1 mM NaH_2PO_4 , 4.9 mM MgCl_2 , 22.3 mM MgSO_4 , 4 mM CaCl_2 , 260 mM sucrose, 8.8 mM glucose before imaging.

cDNA cloning

A cDNA library was constructed into UNI-ZAP vector (Stratagene, La Jolla, CA) using mRNA isolated from the Malpighi tubules (Mini RNAm kit; QIAGEN). The amplified phage library was excised in *E. coli* SOLR cells to yield the phagemid library, and the transfected into SOLR cells to produce bacterial colonies with plasmids. The bacterial colonies were transferred to nitrocellulose membranes, induced with IPTG at 20 °C overnight, sprayed with 10 mM D-luciferin pH 5, and finally exposed in Xenogen IVIS CCD camera (5 min). One positive clone was isolated and sequenced using universal M13 and internal primers. Recombinant luciferase-like enzyme was expressed in *E. coli* BL21-DE3 cells, after IPTG induction at 20 °C overnight.

^aLaboratório de Bioluminescência e Biotecnologia, UNISO, Universidade Federal de São Carlos, Campus de Sorocaba, Sorocaba, SP, Brazil. E-mail: viviani@ufscar.br

^bDepartamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

^cDepartamento de Biologia Celular e Molecular, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil