

SEQUENCIAMENTO E MODELAGEM ESTRUTURAL DO RECEPTOR DE ECDISÔNIO EM *Chrysoperla externa* (HAGEN, 1861) (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE)

**LOPES, Isac Heres^{1*}; ZOTTI, Moisés João²; SIQUEIRA, Paulo Ricardo Baier³;
ZIMMER, Paulo Dejalma⁴; GRÜTZMACHER, Anderson Dionei⁵**

¹Acadêmico do curso de Agronomia Bolsista PIBIC/CNPq, ²Doutorando em Fitossanidade FAEM/UFPEL, ³Acadêmico do curso de Agronomia Bolsista CNPq, ⁴Prof. Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPEL, ⁵Prof. Orientador Departamento de Fitossanidade, FAEM/UFPEL, Campus Universitário - Caixa Postal 354, Pelotas, RS - CEP 96010-900. e-mail isachlopes2@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Ecdisteróides são hormônios produzidos por glândulas protorácicas que desempenham um papel importante na ativação do receptor do ecdisônio (EcR) e regulação do desenvolvimento e reprodução em insetos e crustáceos (Nakagawa & Henrich, 2009). O EcR é um membro da superfamília de receptores nucleares e possuem pelo menos um dos dois domínios conservados: o domínio de ligação com o DNA (DBD) e o domínio de ligação com o ligante (LBD) (Billas et al., 2009), que atua na sinalização e no reconhecimento da molécula ligante.

O ecdisônio atua na forma de seu metabólito ativo 20-hidroxiecdisonio (20E), ligando-se ao EcR-LBD, e formando um complexo heterodimérico com a proteína *ultraspiracle* (USP) (Jones & Sharp, 1997). Como o ecdisônio é um hormônio esteróide específico para os invertebrados, nas últimas décadas, o receptor do ecdisônio surgiu como um possível alvo bioquímico para o planejamento racional de inseticidas.

Vários inseticidas tal como as dibenzoilhidrazinas (DBH) exercem sua atividade através da ligação no EcR-LBD, ativando-o de forma permanente (Nakagawa, 2005). Entretanto experimentos recentes usando o complexo recombinado EcR/USP (Graham et al., 2007) revelaram que a afinidade de ligação das DBHs variam em várias ordens de grandeza entre os grupos taxonômicos e refletem toxicidade seletiva para lepidópteros. Também foi demonstrado que as DBHs são inativas para polinizadores, predadores e parasitóides (Retnakaran et al., 2003).

A estrutura do EcR-LBD de *Heliiothis virescens* F. complexado com o composto BY106830 (DBH) revelou que o substituinte *t-butyl* localiza-se em uma região hidrofóbica do sítio de ligação e interage com um resíduo de valina (V384), conservada em lepidópteros, mas substituída por um metionina em outros insetos. Além disso, o LBD pode adotar diferentes conformações, ilustrando a alta flexibilidade e adaptabilidade desta proteína e permitindo diferentes rearranjos em torno do ligante e, conseqüentemente, moldando o seu próprio sítio de ligação (Billas et al., 2003). Os DBHs são inofensivos para insetos não-alvo, embora não existam estudos sobre detalhes moleculares e estruturais que expliquem as razões para a alta especificidade em lepidópteros.

Neste trabalho, foi realizada a análise molecular do EcR-LBD de *Chrysoperla externa* (CeEcR-LBD) e estudos de ancoragem molecular.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Larvas de terceiro instar de *C. externa* foram usadas na extração de RNA total usando TRI (Sigma-Aldrich). Este RNA foi usado na síntese de cDNA usando SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) e na amplificação do terminais 3' do gene EcR utilizando 3' RACE system kit (Invitrogen). Os inicializadores degenerados, 5'-TGCCGGHGAYMGDGCNTCYGG-3' (F1) e 5'-GAAGTVATGATGYTNMGNATG-3' (F2) foram projetados com base nas seqüências de aminoácidos CGGRASG e EVMMLRM localizadas no LBD e DBD, respectivamente. Também foi projetado um inicializador reverso 5'-ACGTCCCAKARTYTCWKCNCARVAA-3' (R1). Foram utilizados os inicializadores F1_R1 para obter o primeiro fragmento, utilizando reação de cadeia de polimerase (PCR). Os produtos obtidos a partir da PCR foram purificados e sequenciados pela empresa LGC genomics (Berlim, Alemanha). Esta seqüência parcial foi utilizada para o planejamento de um inicializador específico que foi utilizado com o inicializador F1. Ainda nesta seqüência parcial foi projetado um inicializador específico 5'-GGTGCTACGATEGCAAATCC-3' sendo utilizados com o kit RACE para obtenção da seqüência final 3' do gene EcR. A modelagem molecular foi feita em uma Workstation Silicon Graphics O2 R10000 usando os programas InsightII, Homology e Discover3 (Accelrys, San Diego, CA). As coordenadas atômicas do receptor do ecdisônio de *Tribolium castaneum* foram utilizadas na construção do modelo 3D. No final da modelagem a minimização da energia foi realizada com 200-250 ciclos usando como campo de força cvff (consistent valence force field) do programa Discover.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seqüência parcial de CeEcR-LBD foi depositada no banco de dados da NCBI sob número JN367450. A seqüência de aminoácidos apresenta alto grau de identidade e similaridade (84% e 92%) com a seqüência de *Locusta migratoria* (GeneBank nº AAD19828) seguida pela seqüência de *T. castaneum* (TcEcR-LBD) (GeneBank nº NP_001152827) (Fig. 1). De forma similar a TcEcR-LBD, o modelo de CeEcR-LBD também apresenta 12 hélices fortemente empacotadas na volta do sítio de ligação que ancora ecdisteróides e outros ligantes (Fig. 2 A e B). Nove aminoácidos em TcEcR-LBD participam na ligação do panasterone A (PonA) através de uma rede de ligações de hidrogênio (Glu330, Thr362, Thr365, Arg402, Val417 e Tyr427) e interações de empilhamento aromático (Phe416 e Trp543). Asn521 interage com o ecdisônio através de uma ligação de hidrogênio mediada por uma molécula de água (Fig. 2 C). No modelo de CeEcR-LBD a cadeia alifática de PonA fica ancorada em uma cavidade localizada na parte basal do sítio através de interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos Ile50, Met91, Met92, Met124, Leu231 e Trp235. Uma grupo de pontes de hidrogênio, através de resíduos hidrofílicos (Glu22, Thr54, Arg94, Ala109 e Tyr119) e interações aromáticas com os resíduos Phe108 e Trp235, participam da ligação do PonA (Fig. 2 D). Da mesma forma como reportado por Soin et al., (2009), diferentes soluções podem surgir de uma análise de ancoragem molecular. Uma solução relevante é a ancoragem do anel etil-fenil (B anel das DBH) em uma cavidade oposta a cavidade que ancora a cadeia alifática de PonA (Fig. 2. E). Embora, em CeEcR-LBD que não contém esta cavidade oposta, e assim não existe espaço para acomodar o anel B das DBH ocorrendo desta forma um impedimento estérico (Fig. 2 F). Estas análises de docking molecular sugerem que as DBH são desprovidas de qualquer efeito deletério sobre *C. externa*.

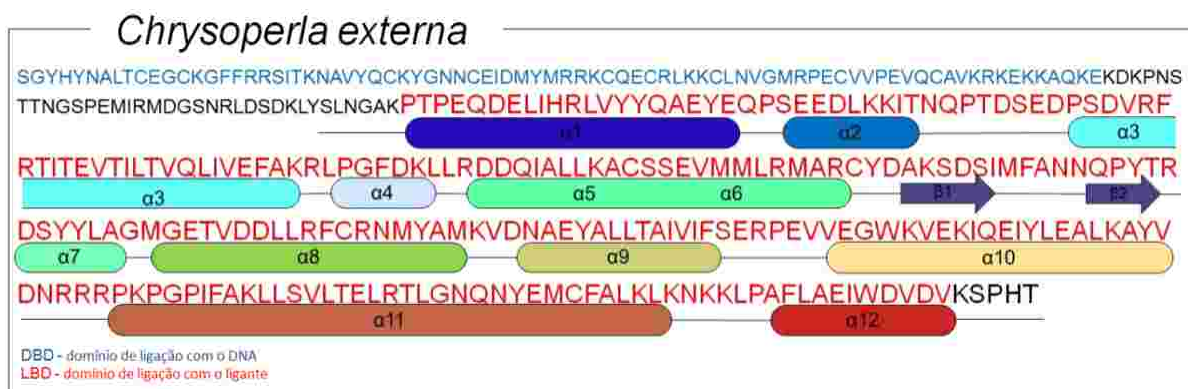


Figura 1. Sequência de aminoácidos deduzida a partir da seqüência de nucleotídeos. As regiões indicadas como α 1- α 12 representam as hélices. A região destacada em azul indica o domínio de ligação com o DNA (LBD) e a região em vermelho indica o domínio de ligação com o ligante (LBD).

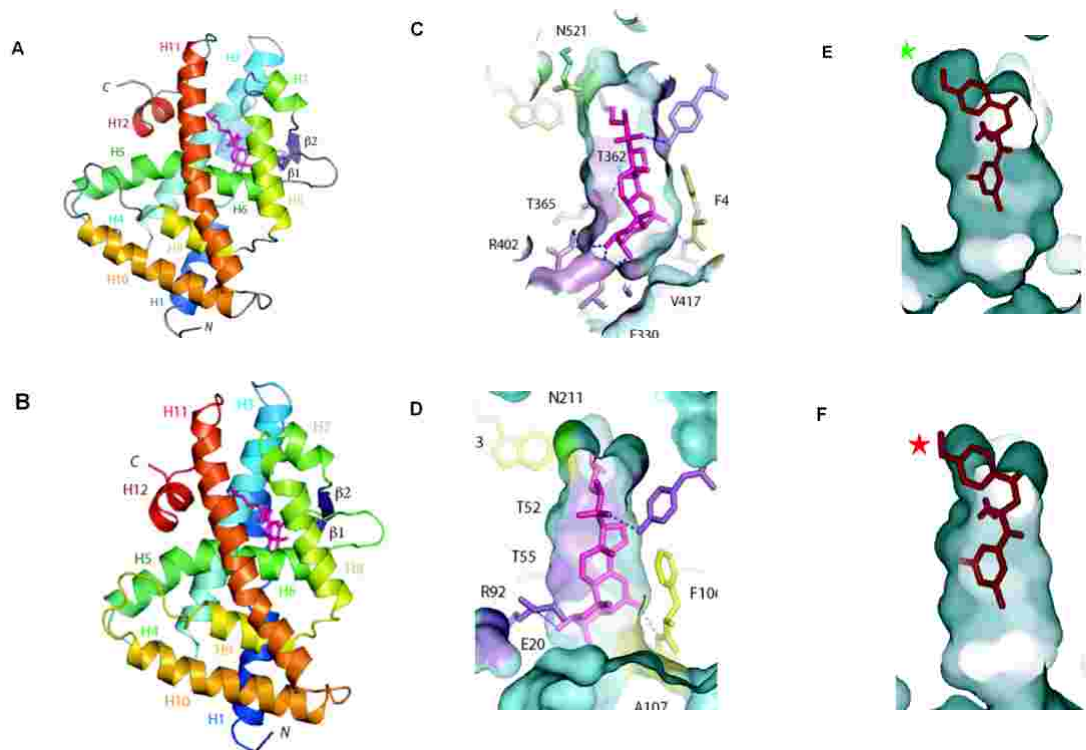


Figura 2. Diagrama das fitas das seqüências modeladas TcEcR-LBD (A) e CcEcR-LBD (B). As 12 α -hélices são numeradas como H1-H12. As duas fitas simples são numeradas como β 1 e β 2 e são coloridas como roxas. O complexo como o ecdisônio e representado como cor rosa. Cortes representam o sítio de ligação dos receptores TcEcR-LBD (C) and CcEcR-LBD (D). Cortes representam o sítio de ligação com tebufenozide (palitos rosa) e com os receptores TcEcR-LBD (E) and CcEcR-LBD (F). A não existência de impedimento estético e demonstrado pela estrela verde. No caso de CcEcR-LBD a redução da cavidade causou um impedimento estético durante as análises de docking molecular, demonstrado pela estrela vermelha.

4 CONCLUSÃO

Devido a um impedimento estético que ocorreu nas análises de ancoragem molecular, as dibenzoilhidrazinas são desprovidas de qualquer efeito nocivo para o predador *C. externa* (CcEcR-LBD).

5 REFERÊNCIAS

BILLAS, I.M.L.; WEMA, T.; GARNIER, J.M.; MITSCHLER, A.; ROCHEL, N.; MORAS, D. Structural adaptability in the ligand-binding pocket of the ecdysone hormone receptor. **Nature**, v. 426, p. 91–96, 2003.

BILLAS, I.M.L.; BROWNING, C.; LAWRENCE, M.C.; GRAHAM, L.D.; MORAS, D.; HILL, R.. The structure and function of ecdysone receptor, In: SMAGGHE, G. (Ed.) **Ecdysone: Structures and Functions**. New York: Springer, 2009. IV, p. 335-360.

GRAHAM, L.D.; JOHNSON, W.M.; PAWLAK-SKRZECZ, A.; EATON, R.E.; BLIESE, M.; HOWELL, L.; HANNAN, G.N.; HILL, R.J. Ligand binding by recombinant domains from insect ecdysone receptors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 37, p. 611–626, 2007.

JONES, G.; SHARP, P.A. Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. **The National Academy of Sciences of the USA**. v. 94, p. 13499–13503, 1997.

NAKAGAWA, Y. Nonsteroidal ecdysone agonists. **Vitamins & Hormones**. v. 73, p. 131–173, 2005

NAKAGAWA, Y.; HENRICH, V. Arthropods nuclear receptors and their role in molting. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 276, p. 6128-6157, 2009

RETNAKARAN, A.; KRELL, P.; FENG, Q.; ARIF, B. Ecdysone agonists: mechanism and importance in controlling insect pests of agriculture and forestry. **Archives Insect Biochemistry Physiology**. v. 54, p. 187–199, 2003.

SOIN, T.; IGA, M.; SWEVERS, L.; ROUGÉ, P.; JANSSEN, C.R.; SMAGGHE, G. Towards Coleoptera-specific high-throughput screening systems for compounds with ecdysone activity: development of EcR reporter assays using weevil (*Anthonomus grandis*)-derived cell lines and *in silico* analysis of ligand binding to *A. grandis* EcR ligand-binding pocket. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 39, p. 523-534, 2009.