

ACÇÃO DA S-BENZIL-L-CISTEÍNA SOBRE A ATIVIDADE DA O-ACETILSERINA(TIOL) LIASE E TEOR DE GLUTATIONA EM MILHO

Rafaela Andreza de Souza Soares (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Rogério Marchiosi (Orientador), e-mail: rmarchiosi@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Botânica/Fisiologia Vegetal

Palavras-chave: Assimilação do enxofre, sítios de ação herbicida, desenvolvimento de herbicidas.

Resumo:

Plantas daninhas competem com as culturas por importantes recursos naturais. A habilidade de controlar as plantas daninhas eficientemente e o uso de fertilizantes sintéticos possibilitaram a “Revolução Verde”, que resultou no aumento da produtividade agrícola. Entretanto, o uso contínuo de herbicidas tem resultado no desenvolvimento de resistência pelas plantas daninhas. Atualmente, são conhecidos aproximadamente 300 biótipos de plantas daninhas resistentes. Dessa forma, a procura por novas moléculas ativas é uma necessidade eminente. Recentemente, nós identificamos a S-benzil-L-cisteína (SBC) como um possível inibidor da O-acetilserina(tiol) liase (OAS-TL), uma enzima que catalisa a síntese de cisteína em plantas. Neste trabalho, nós realizamos a expressão heteróloga e purificação da OAT-TL de *Arabidopsis thaliana* para posterior análise cinética *in vitro* na presença de SBC. Também construímos uma curva padrão com glutationa, que será útil para posterior determinação dos teores de glutationa reduzida e oxidada em plantas de milho tratadas com o SBC.

Introdução

As plantas daninhas representam um dos principais empecilhos à produção agrícola, pois competem com as culturas por recursos naturais como luz, água, nutrientes e espaço (Vargas e Roman, 2006). Segundo o *Herbicide Resistance Action Committee (HRAC)*, os herbicidas atuais podem afetar os processos luminosos, o metabolismo celular ou o crescimento/divisão celular.

O enxofre é um macronutriente vital. As plantas são capazes de captar e reduzir as formas inorgânicas do enxofre e assimilá-lo em uma variedade de compostos orgânicos. Elas reduzem o sulfato em uma via conhecida como via de assimilação do sulfato, cujo produto final é a cisteína, um dos três aminoácidos presentes na molécula de glutationa. Em plantas, assim como

em bactérias, a reação é catalisada pela O-acetilserina(tiol)liase (OAS-TL), e requer dois substratos: (1) sulfeto livre, fornecido pela via de redução do sulfato, e (2) O-acetilserina (OAS), um derivado ativado da serina que é metabolicamente usado apenas na síntese da cisteína (Kredich, 1996; Hell et al., 2002).

Devido à importância da OAS-TL para a sobrevivência das plantas, neste trabalho nós realizamos a expressão heteróloga e purificação da OAS-TL de *A. thaliana* para posterior análise cinética na presença de SBC. Também construímos uma curva padrão de glutatona que será utilizada para quantificação dos teores de glutatona reduzida e oxidada em plantas de milho exposta ao SBC.

Materiais e métodos

Expressão e purificação da OAS-TL de Arabidopsis thaliana

Para determinação da atividade da OAS-TL, realizamos a expressão e purificação da isoenzima de *Arabidopsis thaliana*. A sequência de nucleotídeo que codifica a proteína OAS-TL de *A. thaliana* foi clonada em vetor bacteriano (pET28a), e a expressão proteica foi realizada utilizando o sistema pET. A purificação por cromatografia por afinidade ao níquel foi utilizada e, com o objetivo de analisar o grau de pureza e massa molecular aparente da proteína estudada, fizemos eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Para determinar a concentração de proteínas, utilizamos a metodologia de Bradford. As absorbâncias da curva padrão de soroalbumina bovina (BSA) e das amostras foram medidas a 595 nm em um leitor de placa. Os resultados foram expressos como mg de proteína por mL (mg/mL).

Determinação dos teores de glutatona total e reduzida

Seguimos o método enzimático cinético proposto por Griffith (1980). Inicialmente construímos uma curva padrão de atividade da glutatona redutase *versus* concentração de glutatona reduzida. Foram utilizadas soluções contendo glutatona reduzida em cinco concentrações: 0, 25, 50, 100 e 200 μM . Para a reação enzimática, foram adicionados na cubeta de quartzo: tampão de sódio 100 mM (pH 7,5), contendo EDTA 6,3 mM, DTNB 6 mM, NADPH 2 mM e glutatona redutase 2,5 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV/visível, em triplicata, medindo a absorbância a 412 nm durante três min. Ao final, foram feitas as médias das variações da velocidade (Abs/min) de cada concentração. A análise de regressão linear, com intervalo de confiança de 95%, foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism versão 6.01.

Resultados e Discussão

O gel de SDS-PAGE com as frações da purificação está mostrado na figura 1. O sobrenadante injetado na coluna possuía a proteína OAS-TL, demonstrando que a expressão nas condições testadas foi efetiva para adquirir a proteína de forma solúvel após a lise bacteriana. Após remover as impurezas com menores concentrações de imidazol, foi possível obter a OAS-TL com alto grau de pureza e massa molecular aparente semelhante à proteína padrão LDH que possui 36 kDa.

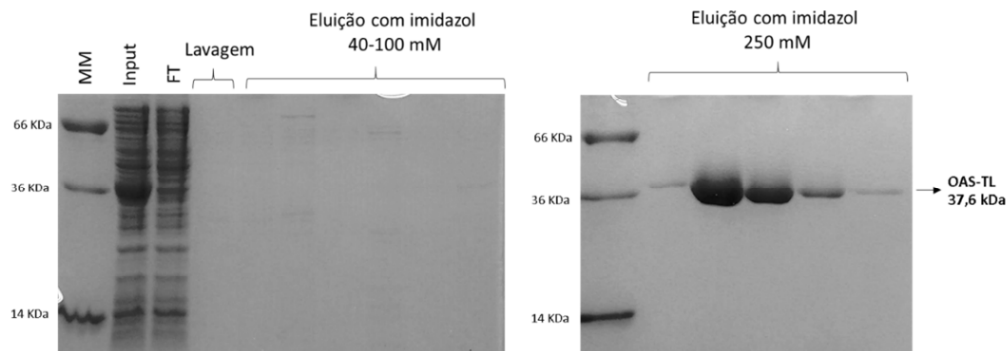


Figura 1– Gel de SDS-PAGE com amostras da purificação por cromatografia de afinidade da OAS-TL de *A. thaliana*. MM = padrão de massa molecular; *Input* = sobrenadante após a lise das bactérias; FT = do inglês *flow through*, isto é, o que eluiu diretamente pela coluna (fração de cerca de 5 mL); Flecha = indicação da proteína OAS-TL. Lavagem = última fração da lavagem com tampão A; Eluição com imidazol 40-100 mM = lavagem com tampão A contendo imidazol 40-100 mM (frações de 5 mL); Eluição com imidazol 250 mM = eluição com tampão A contendo imidazol 250 mM (frações de 1 mL).

A eluição que continha a maior concentração de proteína foi utilizada para a dosagem de proteína. A curva padrão com BSA está mostrada na figura 2. Utilizando a equação da reta obtida pelo gráfico, obtivemos a concentração de 2,3 µg/uL de OAS-TL no extrato purificado.

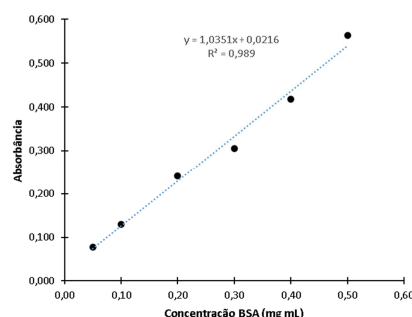


Figura 2 - Curva padrão da proteína BSA utilizando o reagente de Bradford.

Houve uma relação linear satisfatória entre as concentrações que foram utilizadas de glutatona e as velocidades obtidas durante as corridas em espectrofotômetro. A equação da reta obtida através de regressão linear foi $Y=0.0007817X$. Nos próximos passos, esta curva padrão será utilizada para a determinação dos conteúdos de glutatona reduzida e oxidada em raízes de plantas de milho. Também avaliaremos a inibição da SBC sobre a

atividade da OAS-TL purificada de *A. thaliana*. Estes experimentos ainda não foram realizados devido ao distanciamento social necessário ao combate da Covid-19.

$$Y = 0.0007817 * X + 0$$

Figura 3 - Curva padrão de glutathiona reduzida

Conclusões

A enzima OAS-TL de *A. thaliana* foi expressa heterologicamente e purificada satisfatoriamente. Esta enzima será posteriormente utilizada em ensaios de inibição enzimática na presença de SBC. Uma curva padrão necessária para quantificação de glutathiona reduzida e oxidada em raízes de plantas de milho expostas ao SBC foi também construída.

Agradecimentos

Agradeço meu orientador Rogério Marchiosi, aos colegas de laboratório pela ajuda e à Fundação Araucária e CNPq pela bolsa de estudos concedida.

Referências

GRIFFITH, O. W. **Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine**. Anal Biochem. v.106, p. 207-212, 1980.

HELL, R. et al. **Molecular and biochemical analysis of the enzymes of cysteine biosynthesis in the plant *Arabidopsis thaliana***. Amino Acids, v. 22, p. 245–257, 2002.

KREDICH, N. M.; TOMKINS, G. M. **The enzymic synthesis of L-cysteine in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium***. The Journal of Biological chemistry. v. 241, p. 4955-4965, 1996.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas: conceitos, origem e evolução**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. p. 22. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 58). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do58.htm> Acesso em: 29 jul. 2020.