TRIAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDORES DA *O*-ACETILSERINA (TIOL) LIASE PARA CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS

Daniela Motta (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Rogerio Marchiosi (Orientador), Ana Paula Boromelo (Coorientadora). E-mail:ra133657@uem.br.

Botânica/Fisiologia Vegetal

Palavras-chave: Enzima; docking reverso; OAS-TL.

RESUMO:

As plantas daninhas representam um dos principais desafios da agricultura, sobretudo diante da seleção de genótipos resistentes decorrente do uso repetido de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, o que reforça a importância de investigar novos alvos moleculares. Neste trabalho, avaliou-se o efeito dos compostos *S*-fenil-L-cisteína (SPC) e 1-(*p*-toluenossulfonil)-3-nitro-1,2,4-triazol (TNT), inibidores da via do enxofre, sobre plantas de *Ipomoea grandifolia* e *Euphorbia heterophylla*, bem como sobre a atividade da enzima *O*-Acetilserina (tiol) liase (OAS-TL) em plantas de *I. grandifolia*, além de conduzir a expressão e purificação desta enzima visando ensaios *in vitro* e a investigação de possíveis alvos moleculares por docking reverso. Sementes de ambas as espécies foram germinadas e cultivadas em sistema hidropônico por 12 dias, sob tratamento com TNT (*I. grandifolia*) e com ambos os compostos SPC e TNT (*E. heterophylla*), nas concentrações de 0, 25 e 50 µM. Nas folhas de *I. grandifolia*, o TNT reduziu a atividade da OAS- TL em 61,11% (25 µM) e 55,55% (50 µM), sem efeito significativo nas raízes. Em *E. heterophylla*, ambos os compostos reduziram os parâmetros biométricos avaliados, com maior efeito em plantas sob efeito do tratamento com TNT. A enzima OAS-TL foi expressa e purificada (*AtOAS-TL*), porém não apresentou atividade detectável nos ensaios *in vitro*. A estratégia de docking reverso, com a cadeia beta da Triptofano sintase (TS) de *Escherichia coli* selecionada como alvo para um dos compostos (SPC), encontra-se em andamento, visando investigar potenciais interações entre o composto e diferentes proteínas-alvo.

INTRODUÇÃO

O manejo de plantas daninhas constitui um desafio para a agricultura devido ao uso recorrente de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, favorecendo a seleção de biótipos resistentes, mais de 200 espécies apresentam resistência a um ou mais herbicidas (HEAP, 2014). Nesse contexto, enzimas da via de assimilação do enxofre destacam-se como potenciais alvos herbicidas. A *O*-acetilserina(tiol) liase (OAS-TL) catalisa a síntese de L-cisteína, sendo essencial ao metabolismo vegetal, e sua inibição pode comprometer o crescimento de plantas daninhas (FOLETTO et al., 2023).

A integração de resultados *in vitro* (expressão e purificação enzimática), juntamente aos achados *in vivo*, associados às ferramentas de bioinformática como o docking reverso permite investigar possíveis interações entre compostos e diferentes proteínas-alvo, contribuindo para a elucidação de mecanismos de ação (HUANG et al., 2018). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos compostos SPC e TNT sobre a OAS-TL purificada (*in vitro*) e os efeitos dos mesmos sobre plantas daninhas (*in vivo*), além de investigar, por docking reverso, suas possíveis interações com proteínas de diferentes vias metabólicas vegetais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sementes de *Ipomoea grandifolia* tiveram dormência quebrada com ácido sulfúrico (H□SO□) 95% por 40 min, enquanto sementes de *Euphorbia heterophylla* foram sanitizadas com hipoclorito à (0,41%) e em seguida lavadas em água deionizada. Ambas foram germinadas em papel Germitest (BOD, fotoperíodo 12 h/12 h). Para *I. grandifolia*, foi estabelecido temperatura de 30 ºC por 2 dias e 27 ºC por 3 dias para *E. heterophylla*. Plântulas de 5–7 cm foram cultivadas em solução de *Hoagland* (pH 6,0; 100mL/suporte), renovada a cada 48 h por 12 dias, com número de 5 repetições para ambos os tratamentos e espécies. *I. grandifolia* recebeu TNT (0, 25 e 50 µM) para avaliação da atividade da enzima OAS-TL, enquanto *E. heterophylla* recebeu SPC e TNT nas mesmas concentrações, avaliando-se parâmetros biométricos.

A atividade *in vivo* da OAS-TL foi determinada em extratos vegetais, com reação a 25 ºC por 15 min utilizando Na_2S e *O*-acetilserina (OAS), seguida de quantificação colorimétrica de formação de L-cisteína com o reagente ninhidrina a 560 nm. As proteínas do ensaio enzimático foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando curva padrão de BSA. Para os ensaios *in vitro*, a OAS-TL foi expressa em sistema bacteriano, induzida com IPTG e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, com análise por SDS-PAGE, diálise e quantificação. Para o docking reverso, selecionou-se a cadeia β da Triptofano Sintase (TS) de *E. coli* (397 aa; ~42,98 kDa), utilizando como referência o estudo de Xu et al. (2019), que empregou essa enzima na síntese de SPC. A sequência foi obtida no UniProt (P0A879) e a estrutura se encontra em processo de modelamento utilizando AlphaFold, para posterior docking por meio da interface gráfica do PyRx. Os dados dos experimentos *in vivo* foram processados por one-way ANOVA e teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) no pacote estatístico Graphpad Prism™.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas diferenças significativas na atividade da OAS-TL nas raízes de *I. grandifolia* entre os tratamentos com TNT e o controle. Nas folhas, o TNT reduziu a atividade enzimática em 61,11% a 25 µM e 55,55% a 50 µM, em relação ao controle (Figura 1), indicando efeito tecido-específico, mais pronunciado na parte aérea. Em *E. heterophylla*, Foram testados os inibidores TNT e SPC, com o TNT

apresentando maior efeito sobre os parâmetros avaliados (Figura 2), atingindo 38,08% no comprimento da parte aérea, 51,53% e 60,09% nas biomassas fresca e seca da parte aérea, 72,22% no número de folhas, 99,99% e 95,90% nas biomassas fresca e seca das folhas, 57,49% no comprimento das raízes e 86,75% e 69,80% nas biomassas fresca e seca das raízes. Esses resultados indicam maior sensibilidade de *E. heterophylla* ao TNT nos parâmetros avaliados, sem estabelecer, isoladamente, seu mecanismo de ação. A expressão e purificação da AtOAS-TL foram realizadas, porém não foi detectada atividade enzimática na proteína obtida, constituindo uma limitação da etapa *in vitro* e indicando a necessidade de otimização do protocolo. Os resultados de cinética enzimática (ainda não obtidos) são indispensáveis para relacionar com os resultados que obtivemos a partir da atividade observada in vivo nos extratos de i. grandifolia. O docking reverso com a cadeia beta da triptofano sintase de *E. coli*, selecionada como alvo do SPC, encontra-se em andamento e poderá contribuir para a identificação de possíveis alvos moleculares.

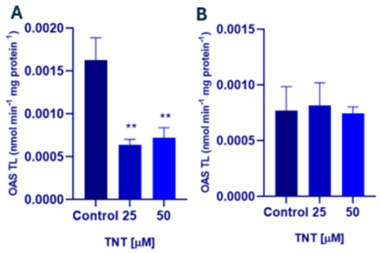


Figura 1 - Atividade da enzima *O*-acetilserina (tiol) liase (OAS-TL) em folhas e raízes de *Ipomoea grandifolia* tratadas com TNT (0, 25 e 50 µM). Os valores representam média ± erro padrão (EP; n = 5). Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle, de acordo com a análise estatística realizada: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**).

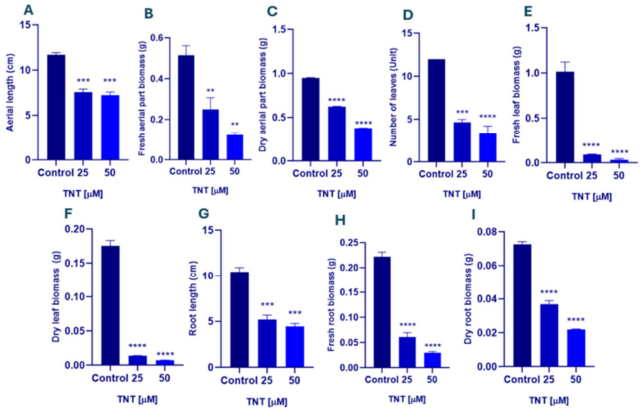


Figura 2 - Parâmetros biométricos de Euphorbia heterophylla tratadas com TNT (0, 25 e 50 µM) após 12 dias em cultivo hidropônico

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, os compostos SPC e TNT apresentaram efeitos esperados sobre os parâmetros avaliados. O TNT reduziu a atividade da

OAS-TL nas folhas de *I. grandifolia*, porém, sem diferenças significativas nas raízes. Em *E. heterophylla*, ambos os compostos reduziram os parâmetros biométricos, com efeitos mais acentuados para o TNT. A obtenção de OAS-TL purificada funcional para os ensaios *in vitro* ainda requer aprimoramentos, enquanto o docking reverso, em andamento, poderá complementar a interpretação dos resultados. Até o momento, não há evidências que permitam afirmar que SPC ou TNT atuem diretamente sobre o sítio ativo de uma enzima específica relacionada à assimilação de enxofre, sendo necessário estudos adicionais que possibilitem esclarecer essas possíveis interações envolvidas nesse processo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa que viabilizou este projeto, e ao Laboratório de Bioquímica de Plantas (BioPlan/UEM), pelo suporte técnico e infraestrutura disponibilizados. Registro minha gratidão ao professor Rogério, pela orientação, e à Mestre Ana Boromelo, pela coorientação.

REFERÊNCIAS

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

FOLETTO, F. M. de P.; et al. Inhibition of O-acetylserine (thiol) lyase as a promising new mechanism of action for herbicides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 204, art. 108127, 2023.

HEAP, I. Global perspective of herbicide-resistant weeds. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1306-1315, 2014.

HUANG, H.; et al. Reverse screening methods to search for the protein targets of chemopreventive compounds. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, art. 138, 2018.

XU, L. ; et al. Highly efficient preparation of active S-phenyl-L-cysteine with tryptophan synthase using a chemoenzymatic method. **BMC Biotechnology**, v. 19, art. 49, 2019.