

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE GENES DE EXPANSINA PRESENTES EM CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)

Ilara G. F. BUDZINSKI^{1,2}, E-mail: ilarafrass@gmail.com; Luiz Filipe P. PEREIRA³; Luiz Gonzaga E. VIEIRA¹

¹Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina, PR. ²Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, UEL – Londrina, PR. ³Embrapa Café, Brasília, DF.

Resumo:

As expansinas (EXPs) são proteínas que promovem o relaxamento e extensão da parede celular em plantas, sendo codificadas por uma multifamília gênica e classificadas em: α -expansinas, β -expansinas, expansin-like A (EXLA) e expansin-like B (EXLB). Estas proteínas atuam no alongamento celular, maciez dos frutos, abscisão, germinação e polinização. As α -expansinas representam a maior família e relacionam-se diretamente com o controle da extensão da parede celular em processos de desenvolvimento. Visto que a maturação uniforme dos frutos de café contribui para a qualidade da bebida, este trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar *in silico* genes de expansinas envolvidas neste processo. Através da mineração dos dados do Genoma Café foram encontrados 28 *contigs* referentes às EXPs, sendo dois *contigs* de EXLB, um de EXLA e os demais pertencentes à família das α -expansinas. Dentro desta última família foram identificados quatro *contigs* relacionados com o desenvolvimento dos frutos do cafeeiro. Comparação dos *contigs* obtidos nos bancos do Projeto Genoma Café e de *contigs* no banco de dados HarvEST *Coffea* permitiu a caracterização *in silico* da expressão dos *contigs* nos diferentes estádios de maturação dos frutos.

Palavras chave: expansinas, desenvolvimento de frutos, maturação de frutos, Genoma Café.

IN SILICO CHARACTERIZATION OF *COFFEA ARABICA* EXPANSINS GENES

Abstract:

Expansins (EXPs) are proteins that induce plant cell wall elongation and irreversible extension. They are encoded by a gene superfamily organized into four families: α -expansinas, β -expansinas, expansin-like A (EXLA) and expansin-like B (EXLB). Expansins activity occurs in several plant physiological and developmental processes such as: fruit softening, abscission, seed germination and polinization. The α -expansinas represents the major gene family and are directly involved into the control of cell wall extension and in developmental processes. With the objective to study the role of EXP in coffee fruit maturation we selected EXP homologous sequences on the Brazilian Coffee Genome Project for *in silico* analysis. Clusterization of EXPs sequences identified 28 EXPs *contigs*, two from EXLB, one from EXLA, and 25 belonging to α -expansin family. Within the α -expansin family four *contigs* were identified as closely related to coffee fruits development. Data comparisons between the *contigs* present in the Genoma Café Project with *contigs* from HarvEST *Coffea* database allowed the *in silico* characterization of EXPs during fruit maturation.

Key words: expansins, fruit development, fruit maturation, Coffee Genome.

Introdução

Durante o desenvolvimento e maturação dos frutos ocorre o alongamento, relaxamento e extensão da parede celular, devido à atuação de endo- α -D-glucanases, (Hayashi; Wong; Mac Lachlan, 1984) celulasas, xiloglucanas e expansinas (Fry et al., 1992). As expansinas (EXPs) formam uma classe de proteínas que induzem o relaxamento da parede e a expansão celular. Seu ótimo de atividade se dá em pH ácido, visto que é nesta condição que as células das plantas crescem mais rapidamente e a parede torna-se mais flexível (Cosgrove, 1998). As expansinas hidrolisam as ligações entre a hemicelulose e as microfibrilas de celulose e, assim, induzem o alongamento/extensão irreversível da parede celular e também o seu relaxamento. Elas também desempenham importante papel nos processos de desenvolvimento da planta como a organogênese, a germinação da semente e a maturação de frutos (Li et al., 2003b). Acredita-se que as expansinas interrompam ligações não covalentes, como as pontes de hidrogênio, na interface da celulose e hemicelulose, limitando desta forma o turgor presente na expansão celular (Mc-Queen-Manson et al., 1995). São conhecidas quatro famílias de expansinas: α -expansinas, β -expansinas, expansin-like A (EXLA) e expansin-like B (EXLB). As α -exps, que representam a maior família, referem-se a um grupo de proteínas altamente conservadas que provavelmente controla a extensão da parede celular e processos de desenvolvimento, incluindo a dissociação e separação das células. As β -exps, que compõem a segunda maior família, são secretadas pelo pólen das gramíneas e promovem intensa degradação da parede celular dos grãos de pólen. Em relação às EXLA e EXLB, atualmente são conhecidas somente as seqüências gênicas (Sampedro; Cosgrove, 2005). Tendo em vista a importância da uniformidade da maturação dos frutos do cafeeiro para a qualidade de bebida, para a facilitação da colheita e diminuição do custo de produção, este trabalho teve por objetivo analisar as

seqüências de expansinas presentes no banco de dados do Projeto Genoma Café visando caracterizar aquelas relacionadas com o desenvolvimento e maturação dos frutos do cafeeiro.

Material e Métodos

A busca das seqüências no banco de dados do Genoma Café foi realizada utilizando palavra-chave (expansinas). As seqüências foram clusterizadas localmente para em seguida realizar uma nova clusterização utilizando o programa Sequencher (Gene Codes – Demo Version). Para obtenção da seqüência deduzida de aminoácidos foi utilizado o Orf Finder (NCBI) e para a busca dos domínios característicos da família das EXPs e da região do peptídeo sinal foram utilizados os programas ScanProsite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>) e SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), respectivamente. As buscas de homologia foram feitas utilizando o programa BLAST e a árvore filogenética foi construída com ajuda do programa MEGA 3.1. Foi utilizado também o banco de dados do HarvEST Coffea (Wanamaker e Close, 2006) para encontrar seqüências de EXPs expressas em bibliotecas de frutos de *C. canephora*. As seqüências provenientes do Projeto Genoma Café foram então clusterizadas com seqüências de expansinas provenientes do HarvEST.

Resultados e Discussão

Foram encontradas 162 seqüências de expansinas no banco de dados do Genoma Café. As seqüências foram clusterizadas automaticamente dentro do banco de dados, resultando em 22 *contigs* e 22 *singlets*. A clusterização destas seqüências com o programa Sequencher produziu 28 *contigs*. Cada *contig* foi analisado individualmente de forma a eliminar aqueles que não tivessem os domínios característicos das EXPs. Todas as EXPs analisadas mostraram dois domínios, um homólogo ao domínio catalítico da família 45 de hidrolases glicosídicas (GH45) e o outro homólogo ao grupo 2 de alergênicos de pólen de gramíneas, cuja função ainda é desconhecida (Sampedro e Cosgrove, 2005). Estas proteínas possuem peptídeo sinal contendo aproximadamente 20 aminoácidos (aa) na região N-terminal. As α -exps e β -exps possuem resíduos conservados de cisteínas (Cys) na região N-terminal do domínio catalítico (domínio 1), um motif HFD (histidina, fenilalanina e aspartato) na região central e resíduos conservados de triptofanos (Trp) na região C-terminal do domínio de ligação para celulose (domínio 2) (Choi et al., 2006). Treze *contigs*, caracterizados inicialmente como α -exp, foram separados para análise mais detalhada. Para confirmar que as seqüências encontradas pertencem à família das α -exp, uma árvore filogenética (Figura 1) foi construída utilizando as seqüências protéicas referentes a cada *contig* obtidas através do programa Orf Finder (NCBI). Seqüências de α -exp, β -exp, EXLA e EXLB de outras espécies (<http://www.bio.psu.edu/expansins/naming.htm>) foram utilizadas nesta análise como *outgroups*. Dos *contigs* selecionados, oito foram agrupados no mesmo ramo filogenético das α -exp, dois no mesmo grupo das EXLB, sendo que somente um *contig* foi inserido juntamente com as EXLAs.

Quatro *contigs* de α -exp foram considerados de interesse por apresentarem seqüências providas de bibliotecas de frutos e botão floral e por apresentarem seqüência de cDNA completa (Tabela 1). Os quatro genes selecionados em café codificam para proteínas de tamanho similar as α -exps de outros organismos. Foi verificado um alto grau de similaridade entre as quatro α -exps selecionadas (73%), sendo que essa similaridade normalmente ocorre devido ao primeiro domínio (Choi et al., 2006). Todas as α -exps selecionadas possuem os *motifs* característicos de EXPs. Os quatro *contigs* da família das α -exps selecionadas do banco de dados do Genoma Café foram clusterizados com 4 *contigs* e 3 *singlets* provenientes do banco HarvEST Coffea. Uma vez que este banco de dados fornece informações sobre os tecidos e estádios de desenvolvimento de frutos onde os genes são expressos, foi possível inferir a provável expressão temporal dos genes selecionados (Figura 2). Foi verificado que somente o *CaEXPA4* não apresenta similaridade com as seqüências do HarvEST, não sendo assim possível determinar o provável estágio de desenvolvimento do fruto no qual o gene é expresso. Os dados obtidos *in silico* estão sendo confirmados através de experimentos de expressão dos genes selecionados em diferentes estádios de desenvolvimento e tecidos dos frutos de café através de Northern blot.

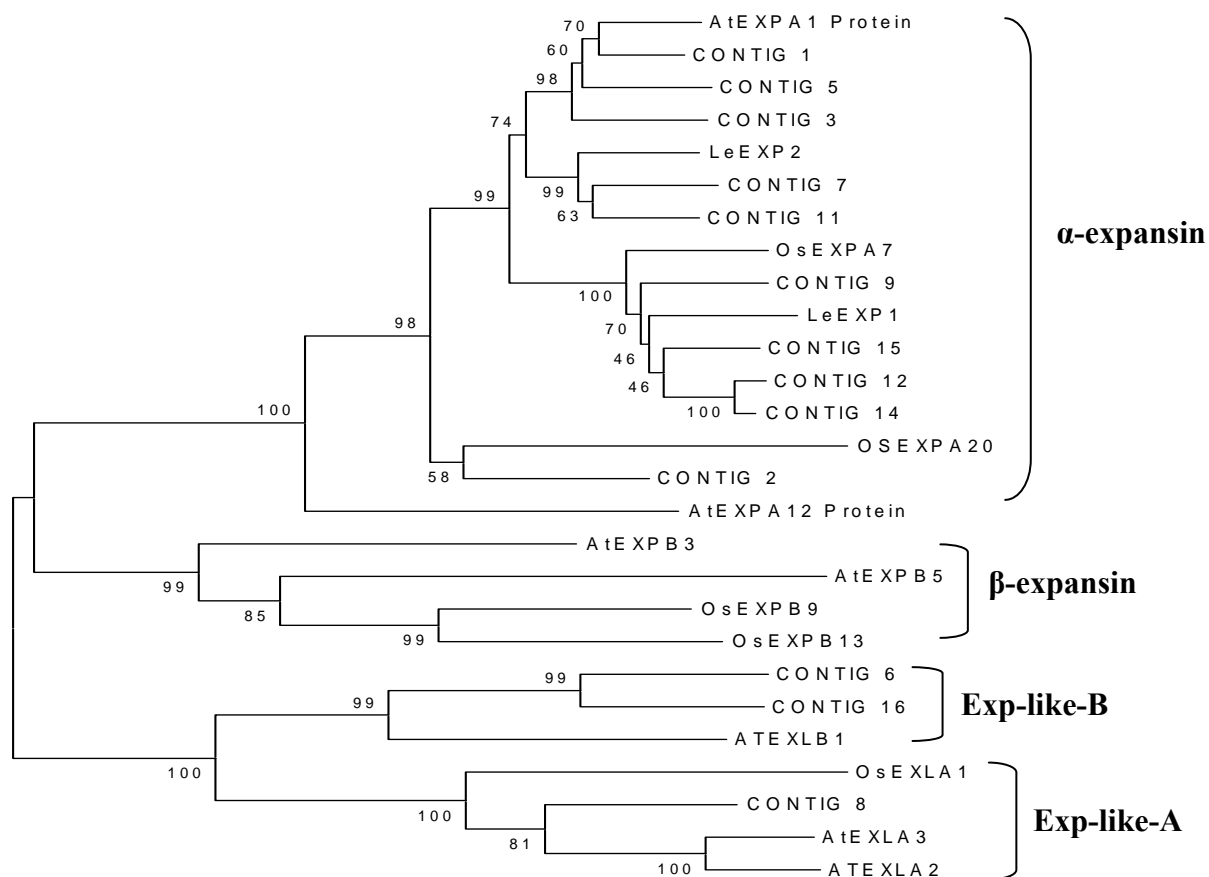


Figure 1. Árvore filogenética construída com seqüências selecionadas da superfamília das expansinas. Seqüências analisadas incluem as de *Coffea arabica* presentes do Projeto Genoma Café e seqüências de α -exp, β -exp, EXLA e EXLB obtidas no site <http://www.bio.psu.edu/expansins/naming.htm>.

Tabela 1. Seqüências de expansinas em café selecionadas por possuírem ESTs provenientes de bibliotecas de frutos. Tamanho dos *contigs*, bibliotecas que compõem cada *contig* e o número de repetições das bibliotecas

Expansinas	cDNA pb	Proteína aa	Número de ESTs por biblioteca					Total ESTs
			Fruto e Flor	Folha	Célula em Suspensão	Botão Floral	Calo	
<i>CaEXPA1</i>	774	257	4	5	13	1	2	28
<i>CaEXPA2</i>	765	248	1	X	1	4	3	11
<i>CaEXPA3</i>	777	258	2	4	X	1	1	8
<i>CaEXPA4</i>	747	254	3	X	1	3	3	8

Tabela 2. Análise do grau de similaridade entre os quatro cDNAs de expansina selecionados. *I refere-se ao grau de identidade (aas iguais) e P ao grau de positividade (aas com mesmas propriedades físico-química).

	<i>CaEXPA1</i>		<i>CaEXPA2</i>		<i>CaEXPA3</i>		<i>CaEXPA4</i>	
	I*	P	I	P	I	P	I	P
<i>CaEXPA1</i>	-----	-----	68%	82%	75%	89%	87%	95%
<i>CaEXPA2</i>	68%	82%	-----	-----	70%	81%	70%	81%
<i>CaEXPA3</i>	75%	89%	70%	81%	-----	-----	71%	81%
<i>CaEXPA4</i>	87%	95%	70%	81%	71%	81%	-----	-----

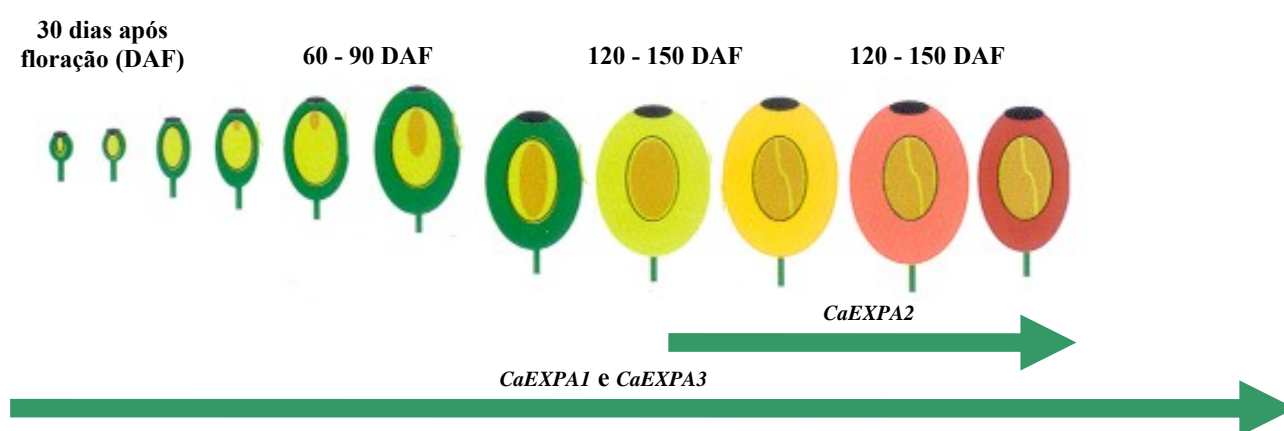


Figura 2. Estágios do desenvolvimento do fruto de café com provável expressão de genes EXPA. (Adaptado de De Castro e Marraccini, 2006).

Conclusões

Através das análises *in silico* no banco de dados do Genoma Café foi possível identificar e caracterizar quatro *contigs* de α -exp provavelmente relacionados com o desenvolvimento e maturação dos frutos de cafeeiro. Foi possível também inferir a provável expressão temporal em frutos de café os para três dos *contigs* selecionados. *CAEXP1* e *CAEXP3* devem ter expressão constitutiva durante o desenvolvimento e maturação do fruto enquanto que *CAEXP2* deve ter maior atividade no final da maturação.

Agradecimentos

Ilara G. F. Budzinski - Bolsista Anotação e Mineração do Genoma do Café CBP&D-Café

Referências Bibliográficas

- Choi, D., Hyung-Taeg, C., Yi Lee. (2006) Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiologia Plantarum*, 126: 511–518.
- Cosgrove, D.J. (1998) Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiology*, 118: 333–339.
- De Castro, RD., Marraccini, P. (2006) Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Brazilian Journal of Plant Physiology.*, 18:175-199.
- Expansin Central. Disponível em <<http://www.bio.psu.edu/expansins/naming.htm>>. Acesso em 5 dez 2006.
- Fry, S.C., Smith, R.C., Renwick, K.F., Martin, D.J., Hodge, S.K., Matthews, K.J. (1992) Xyloglucan endotransglycosylase, a new wallloosening enzyme activity from plants. *Biochemical Journal*, 282: 821–828.

Hayashi, T., Wong, Y.S., Maclachlan, G.A. (1984) Pea Xyloglucan and Cellulose : II. Hydrolysis by Pea Endo-1, 4- β -Glucanases. *Plant Physiology*, 75: 605-610.

Li Y., Jones, L., McQueen-Mason, S.J. (2003b) Expansins and plant cell growth. *Current Opinion Plant Biology*, 6: 603–610.

McQueen-Mason, S., Cosgrove, D.J. (1995) Expansin mode of action on cell walls (analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding). *Plant Physiology*, 107: 87–100.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 18 nov 2006.

Sampedro, J., Cosgrove, D.J. (2005) The expansin superfamily. *Genome Biology*, 6: 242.1 -242.11.

ScanProsite – Expasy home page. Disponível em <<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>>. Acesso em 10 dez 2006.

SignalP 3.0 Server. Disponível em <<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>>. Acesso em 10 dez 2006.

Wanamaker, S., Close, T. HarvEST Coffea. HarvEST Home Page. Disponível em: <<http://harvest.ucr.edu/>>. Acesso em: 18 nov 2006.