

# ANÁLISE *IN SILICO* DE GENES DE CASEÍNO-QUINASES TIPO I E II DE *Coffea arabica*

Alba Chiesse DA SILVA<sup>1</sup>, E-mail: [alba.chiesse@embrapa.br](mailto:alba.chiesse@embrapa.br); Angela MEHTA<sup>2</sup>; Natalia F. MARTINS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Café, Brasília, DF, <sup>2</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

## Resumo:

As proteínas quinases são enzimas fundamentais na transmissão de sinais intra e extracelulares de organismos eucariotos, incluindo organismos unicelulares, animais e plantas. Esta classe de enzimas é responsável pela regulação de inúmeros processos celulares, incluindo divisão celular, expressão gênica, desenvolvimento de tecidos, entre outros. No gênero *Coffea*, há pouca informação sobre as proteínas quinases e o papel que desempenham. Este trabalho tem como objetivo identificar genes semelhantes a caseína-quinase tipo I e caseína-quinase tipo II, através da análise *in silico* utilizando a base de dados do CafEST.

Palavras-chave: CKI, CKII, *Coffea arabica*, quinases.

## *In silico* ANALYSES OF CASEIN KINASES I AND II FROM *Coffea arabica*

### Abstract:

Protein kinases are important enzymes for the signal transduction of eukaryotes, including unicellular organisms, plants and animals. This class of enzymes is responsible for the regulation of several cellular processes, including cell division, gene expression, tissue development, among others. There is very little information about protein kinases for the *Coffea* genus and the role they play within this plant. The main purpose of this work is to identify genes similar to casein kinase I and casein kinase II, through *in silico* analyses of the CafEST database.

Key words: CKI, CKII, *Coffea arabica*, kinases.

## Introdução

Caseína-quinases são enzimas solúveis, multifuncionais, independentes de nucleotídeos cíclicos, independentes de Ca<sup>2+</sup>, que fosforilam resíduos de serina e treonina e utilizam substratos de natureza acídica. Há dois tipos de caseína – quinases, o tipo I (CKI) e o tipo II (CKII). Estas quinases foram descritas inicialmente com base na sua habilidade de adicionar fosfato à caseína, entretanto, estas enzimas são estruturalmente distintas. CKI consiste de uma única subunidade, enquanto a CKII tem natureza tetramérica, com duas subunidades catalíticas (subunidade  $\alpha$ ) e duas regulatórias (subunidade  $\beta$ ). CKI utiliza apenas o ATP como doador de fosfato, enquanto que a CKII utiliza ambos ATP e GTP (Hathaway et al, 1983).

Ambas CKI e CKII estão distribuídas em várias classes de eucariotos, desde organismos unicelulares, até mamíferos e plantas (da Silva et al, 1999, Machado et al, 2002). CKII tem a habilidade de fosforilar diversos tipos de substratos, incluindo vários tipos de fatores de transcrição (Meggio e Pinna, 2003). Além disto, está envolvida em eventos de transdução de sinais importantes para proliferação celular (Litchfield and Luscher, 1993). Estudos com *A. thaliana* e *Oryza sativa* mostraram que CKII pode funcionar como um efetor negativo na expressão de genes regulados por luz e é uma enzima necessária para o funcionamento normal do relógio circadiano (Lee et al, 1999; Daniel et al 2004). Além disto, está associada com a inibição do florescimento em dias longos (Yamamoto et al, 2000).

Há poucos estudos abordando proteínas quinases no gênero *Coffea*, e o papel que desempenham nos diversos mecanismos envolvidos nos processos de desenvolvimento, nutrição, defesa contra patógenos, e outros, é praticamente desconhecido. Tendo em vista a variedade de mecanismos que as caseína-quinases estão envolvidas em plantas, o objetivo deste trabalho é identificar, por meio da análise *in silico*, genes semelhantes às CKI e CKII $\alpha$ .

## Material e Métodos

A busca de genes relacionados com CKI e CKII $\alpha$  foi feita utilizando-se a base de dados de EST's do Projeto Brasileiro do Genoma Café (CafEST) (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/café/>). Para CKI foram utilizadas sequências-âncora correspondendo a genes inteiros, provenientes de três organismos: ([gi|34910448](#)) de *Oryza sativa*, ([gi|15218569](#)) de *Arabidopsis thaliana* e ([gi|6635385](#)) de *Brassica oleraceae*. De maneira semelhante, para CKII  $\alpha$ , foram utilizadas as seguintes âncoras da subunidade catalítica: ([gi|3821793](#)) de *Zea mays*, ([gi|45238339](#)) de *Nicotiana tabacum*, ([gi|12697577](#)) de *Oryza sativa* e ([gi|30698301](#)) de *Arabidopsis thaliana*. As sequências obtidos nestas buscas foram agrupados em *contigs* e *singlets*, que foram traduzidos através da ferramenta “translate” (<http://bo.expasy.org/>) e submetidos a busca por similaridade na base de dados do NCBI, através do algoritmo BLAST (Altschul et al 1997). As sequências de aminoácidos dos *contigs* de café foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)) e a partir deste

alinhamento, foram construídas árvores filogenéticas de CKI e CKII $\alpha$  através do programa MEGA 3.1 (Kumar, et al, 2004), com o método de neighbor joining.

## Resultados e Discussão

As caseína-quinases estão presentes em diversos organismos eucarióticos, desde leveduras até plantas e animais superiores. A caseína-quinase tipo II é essencial para viabilidade celular e está envolvida com processos de proliferação celular, diferenciação e apoptose (Guo et al 2001, Litchfiel 2003). Em *A. thaliana*, CKII está presente em vários tecidos, incluindo flores, ramos, folhas e raízes, sendo que a subunidade catalítica está presente principalmente no núcleo celular, e a subunidade regulatória, em outros compartimentos também (Salinas et al 2006). Estudos com *A thaliana* e *Oryza sativa* sugerem que a CKII está envolvida na regulação da expressão gênica regulada pela luz, é necessária para o funcionamento normal do ritmo circadiano, e está provavelmente envolvida com inibição da floração em dias longos.

A análise do banco de dados CafEST revelou 209 seqüências relacionadas com CKI, originando 38 contigs e 27 singlets. Estas seqüências foram observadas nos vários tecidos de café utilizados na fase de construção da base de dados, incluindo células embriogênicas em suspensão, botões florais, frutos, raízes, folhas, sementes germinadas e tecidos submetidos a estresse abiótico e biótico (infecção por patógenos). A figura 1 mostra a relação filogenética entre os vários contigs semelhantes à CKI, que apresentaram as menores distâncias filogenéticas.

Com relação à busca por seqüências relacionadas com CKII $\alpha$ , foram encontradas 367 seqüências, sendo observadas nos vários tecidos utilizados, incluindo aqueles representando processos de desenvolvimento e submetidos a estresses. Neste caso, foram originados 59 contigs e 51 singlets. A figura 2 mostra a relação filogenética entre os contigs que apresentaram as menores distâncias filogenéticas.

Estes resultados mostram que os genes de CKI e CKII $\alpha$  são expressos no cafeeiro, em vários tecidos e diversas situações fisiológicas. Tanto os genes de CKI quanto de CKII $\alpha$  apresentam similaridade formando grupos, conforme mostrado nas árvores filogenéticas. Embora a análise *in silico* demonstre claramente a presença dos genes que codificam estas enzimas nas várias partes do cafeeiro, experimentos posteriores são necessários para investigação do papel que estas enzimas desempenham nesta planta.

## Conclusões

Embora estes resultados sejam preliminares, observou-se que nos vários tecidos de café analisados, há uma grande incidência de sequências com similaridade significativa com CKI e CKII $\alpha$ . Estas sequências apresentam similaridade entre si, formando grupos, conforme mostrado pelas árvores filogenéticas.

Como perspectiva futura, pretende-se, a partir do estudo cuidadoso das relações entre estas sequências, da estrutura dos domínios catalíticos e regulatórios das enzimas, estudar a expressão destes genes em diversas situações fisiológicas e de desenvolvimento. Do mesmo modo, pretende-se testar a hipótese do envolvimento da CKII com mecanismos ligados à percepção de luz pelo cafeeiro.

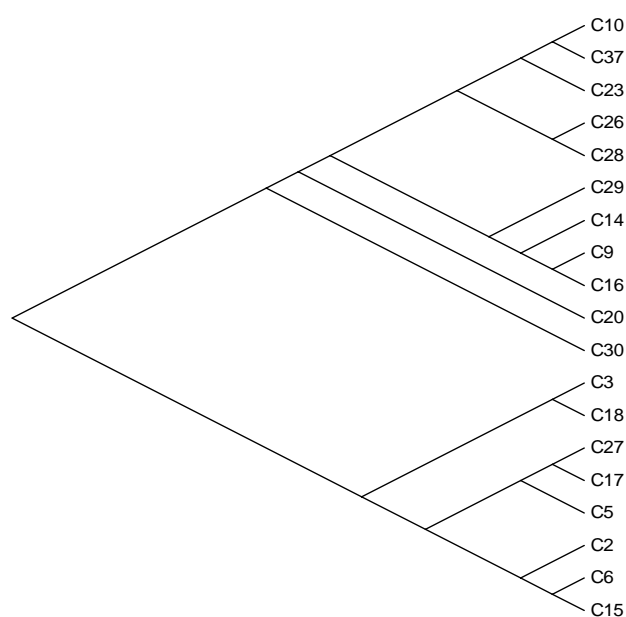


Figura 1 – Árvore filogenética de contigs relacionados com CKI encontrados no banco de dados do genoma café, utilizando o programa Mega 3.1.

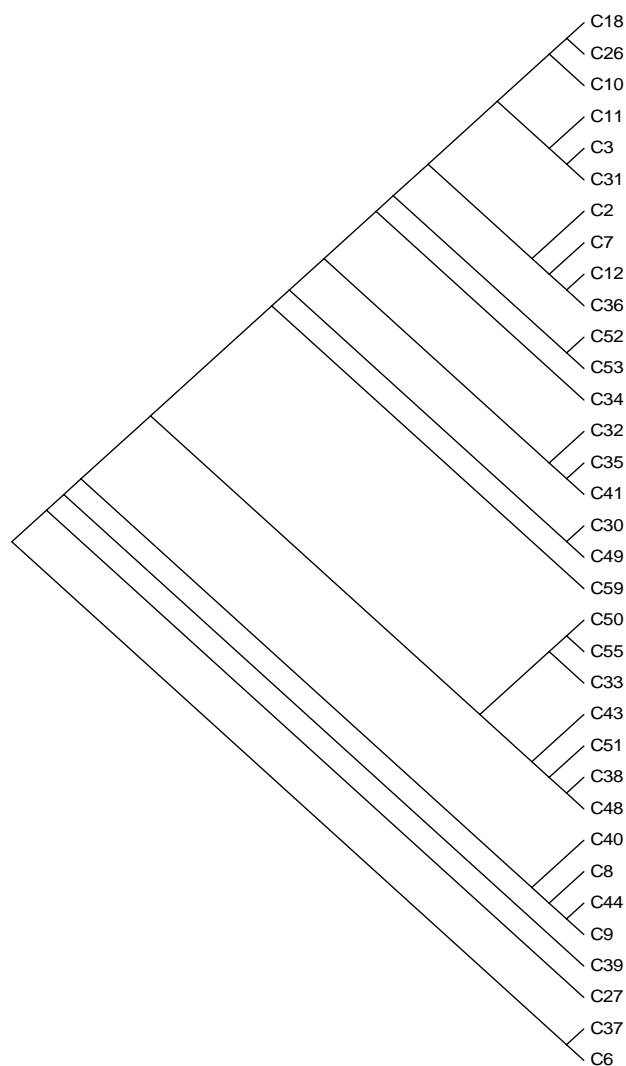


Figura 2 - Árvore filogenética de contigs relacionados com CKII encontrados no banco de dados do genoma café, utilizando o programa Mega 3.1.

### Referências Bibliográficas

Daniel, X., Gugano, S., Tobin, E. M. (2004) CK2 phosphorylation of CCA1 is necessary for its circadian oscillator function in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 101:3292-3297.

Da Silva, A. C., Liu, S.L., e Bouck, G. B.(1999) A 30-KD protein in the surface complex and flagella of Euglena has protein kinase activity. *J. Euk. Microbiol.* 46(2):95-104.

Guo, C., Yu, S., Davis, A.T., Wang, H., Green, J.E. and ahmed, K. (2001) A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 276:5992-5999.

Hathaway, G. M., Tuazon, P. T., Traugh, J. A. (1983) Casein kinase I. *Methods in Enzymology.* 99:308-317.

Hathaway, G. M., Traugh, J. A. (1983) Casein kinase II. *Methods in Enzymology.* 99:317-3131.

Kumar S, Tamura K & Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.

- Lee, Y., Lloyd, A. M., Roux, S. J. (1999) Antisense expression of the CK2 alpha-subunit gene in Arabidopsis. Effects on light-regulated gene expression and plant growth. *Plant Physiol.* 119:989-1000.
- Litchfield, D. W., Luscher B (1993) Casein kinase II in signal transduction and cell cycle regulation. *Mol. Cell Biochem* 127/128:187-199.
- Litchfield, D.W. (2003) Protein kinase CK2: structure, regulation, and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J.* 369:1-15.
- Machado, E.L., da Silva, A. C., da Silva, M. J., Leite, A., Ottoboni, L. M. M. (2002) Endogenous protein phosphorylation and casein kinase activity during seed development in *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* 61:835-842.
- Meggio, F., Pinna, L. A. (2003) One-thousand-and-one-substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* 17:349-368.
- Salinas, P., Fuentes, D., Vidal, E., Jordana, X., Echeverria, M e Holuigue, L. (2006) An extensive survey of CK2a and b subunits in Arabidopsis: multiple isoforms exhibit differential subcellular localization. *Plant Cell Physiol.* 47(9):1295-1308.
- Yamamoto, T., Lin, H., Sasaki, T., Yano M. (2000) Identification of heading data quantitative locus Hd6 characterization of its epistatic interaction with Hd2 in rice using advanced back-cross progeny. *Genetics*154:885-891.