

ANÁLISE *IN SILICO* E *IN VIVO* DA VIA DE ISOPRENÓIDES EM CAFÉ

Iris TISKI^{1,2}, E-mail: iristiski@yahoo.com.br; Luiz F. P. PEREIRA³; David POT^{2,4}; Pierre R. MARRACCINI^{4,5}; Luiz G. E. VIEIRA²

¹ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – UEL, Londrina, PR, Brazil, ²IAPAR, Londrina, PR, Brazil, ³ EMBRAPA-Café/IAPAR, Londrina, PR, Brazil, ⁴CIRAD, UMR DAP Montpellier, France. ⁵ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Resumo:

Os diterpenos cafestol e caveol, presentes na fração lipídica em grãos de café, originam-se da via de síntese de isoprenóides. Estes compostos são sintetizados em todos os organismos, sendo abundantes em plantas com cerca de 10 mil componentes relatados. Apesar da diversidade de funções e estruturas todos os isoprenóides derivam de cinco comuns átomos de carbono, o isopentenil difosfato (IPP) e do isômero dimetilalil difosfato (DMAPP). Em vegetais superiores, duas vias localizadas em compartimentos intracelulares separados estão envolvidas na biossíntese de IPP e DMAPP. No citosol, IPP é derivado da via do ácido mevalônico (MVA) e no plastídeo, IPP é formado pela via do metileritritol fosfato (MEP ou não mevalonato). Com a disponibilidade das seqüências dos genes expressos (ESTs) pelo Projeto Genoma Café tornou-se possível a identificação *in silico* e o estudo funcional dos genes que codificam para as enzimas 3-hidroxi-3metilglutaril-CoA reductoisomerase (HMGR) e mevalonato difosfato decarboxilase (MPDC) para a via MVA e 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato reductoisomerase (DXR) e isopentenil difosfato sintase (IDS) para a via MEP. Foram obtidas 13 ESTs de *HMGR*, que originaram três *contigs* incompletos, resultando em duas isoformas. Para o gene *MPDC* foram encontradas 7 ESTs que clusterizaram em somente uma isoforma, diferentemente de *A. thaliana* onde duas isoformas são encontradas. Para os genes da via MEP foram encontrados 22 ESTs para *DXR* e 47 ESTs para *IDS* que formaram apenas um *contig* para cada um destes genes. Southern blots dos genes *HMGR* e *DXR* também demonstraram a presença de duas isoformas para *HMGR* e uma para *DXR* em *C. arabica*. Análise da expressão por Northern blots detectou transcritos do gene *DXR* no começo de desenvolvimento do perisperma e nas fases finais de desenvolvimento de endosperma e polpa. Transcritos da isoforma *HMGR2* foram detectados em polpa, perisperma e endosperma, em todas as fases de desenvolvimento do fruto. Entretanto, *HMGR1* apresentou transcritos apenas em polpa e fase inicial do desenvolvimento de perisperma e endosperma.

Palavras-chave: diterpenos, caveol, cafestol, isoprenoides, MEP, MVA

In silico and *in vivo* analysis of the isoprenoid pathway in *Coffea arabica*

Abstract:

The diterpenes khaweol and cafestol, which are present in the coffee lipid fraction, are originated from the isoprenoid pathway. Despite their diversity in functions and structures, all isoprenoids derive from the common-five carbon building unit isopentenyl diphosphate (IPP) and its isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP). In higher plants, there are two independent pathways located in the cytosol (mevalonic acid or MVA pathway) and in the plastids (methylerythritol phosphate – MEP pathway). Through the data mining of the Brazilian Coffee Genome Project we studied the genes that code for the enzymes 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) and mevalonate diphosphate decarboxylase (MPDC) for the MVA pathway, and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) and isopentenyl diphosphate synthase (IDS) for the MEP pathway. The search for *HMGR* resulted in 13 ESTs that originated three incomplete *contigs*, forming two isoforms. For *MPDC* 7 ESTs formed only one isoform, differently in *A. thaliana* that has two isoforms. The search for the genes in the MEP pathway resulted in 22 ESTs for *DXR* and 47 ESTs for *IDS*. In each case only one *contig* was formed, similar to found in *A. thaliana* as well. Southern blots of genes *HMGR* and *DXR* demonstrated the presence two isoforms for *HMGR* and one for *DXR*. Northern blot analysis detected transcripts of *DXR* at the beginning of the perisperm development and at the late stages of endosperm and pulp development. Transcripts of the isoform *HMGR2* were detected in pulp, perisperm and endosperm, in all the stages of development of the fruit. On the other hand, *HMGR1* transcripts were observed only in pulp and initial stage of the development of the perisperm and endosperm.

Key words: diterpenos, khaweol, cafestol, isoprenoids, MEP, MVA

Introdução

Apesar da qualidade ser um dos aspectos mais importantes para o mercado consumidor de café, o conhecimento sobre vários componentes que afetam o aroma e sabor do café, como os lipídeos, ainda é escasso. Cerca de dez a vinte por cento da fração lipídica do café corresponde a diterpenos que além da provável relação com a qualidade também são considerados anti-cancerígenos. Os principais diterpenos em café são o cafestol (C₂₀H₂₈O₃) e o caveol (C₂₀H₂₆O₃) (Speer; Kolling-Speer, 2001). A concentração destes diterpenos pode variar de acordo com o tecido e/ou espécie analisada (Ross et al., 1997). A produção de diterpenos ocorre a partir dos isoprenóides que são sintetizados pela via biossintética do mevalonato (MVA) no citosol ou pela via independente do mevalonato – metileritritol 4-fosfato (MEP) nos plastídeos (Taiz; Zeiger, 2002) (Figura 1). A principal enzima para a via MVA ou citosólica em plantas foi identificada como a 3-

hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase (*HMGR*). Em plantas *HMGR* é codificada por duas famílias de genes (Weisscn Born; 1995). Essas isoformas de *HMGR* são diferencialmente expressas dependendo das condições fisiológicas. Para a via MEP a enzima 1-deoxi-D-xilulose redutase (*DXR*), representa o primeiro passo específico para a biossíntese de isoprenóides em plastídeos, pois a DXP, primeira enzima da via, é um intermediário não somente da biossíntese de IPP, mas também de tiamina e piridoxol na via plastídica de biossíntese (Julliard; Douce, 1991; Julliard, 1992). O gene que codifica para *DXR* possui apenas uma isoforma (Carretero-Paulet et al., 2002). Visando um entendimento maior da síntese de diterpenos de café, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão *in silico* e *in vitro* dos genes *HMGR* e *MPDC* para a via MVA e *DXR* e *IDS* para a via MEP.

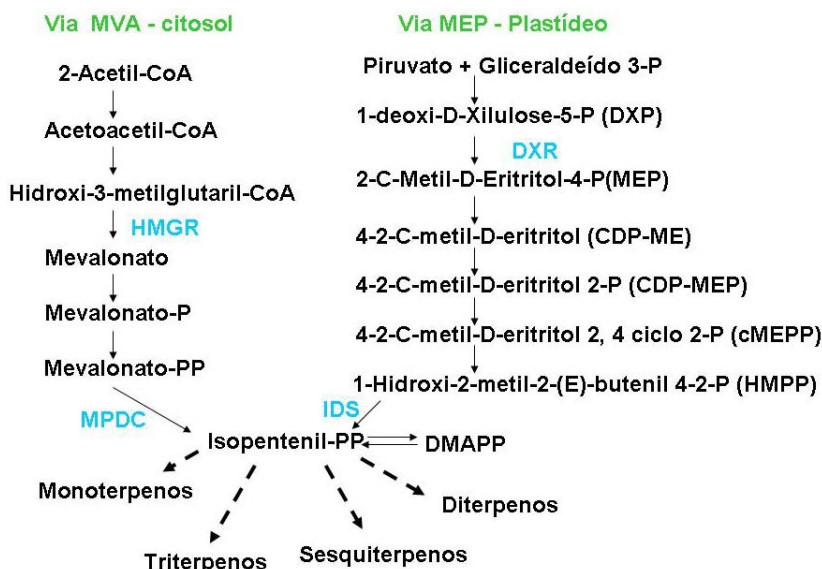


Figura 1 - Via plastídica (MEP) e citosólica (MVA) de síntese de isoprenóides.

Material e Métodos

A partir do banco de dados do Genoma Café (www.lge.ibi.unicamp.br/café/) foram realizadas buscas por palavras-chave dos genes das vias biossintéticas de isoprenóides, *DXR* e *IDS* (via MEP), e *HMGR* e *MPDC* (via MVA). As seqüências obtidas foram clusterizadas para formação de *contigs*. Cada *contig* foi analisado e/ou comparado individualmente com seqüências de proteínas depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

Para verificar a complementariedade entre os *contigs* de *HMGR*, foi feita PCR utilizando diferentes combinações de oligonucleotídeos. Foi realizado Southern Blot para confirmar a presença e o número de isoformas de *DXR* e *HMGR* em *Coffea eugenoides*, *Coffea canephora* e *Coffea arabica*. Para análise de expressão dos genes foram utilizados frutos *C. arabica* cv. IAPAR 59, da safra 2005/2006. RNA total de polpa, perisperma e endosperma de fruto em diferentes estágios de maturação foi extraído para análise de expressão dos genes. Condições de extração de DNA e RNA, assim como de hibridização para Southern e Northern blots foram descritos previamente (Geromel et al. 2006; Pereira et al. 2005).

Resultados e Discussão

Análise *in silico*

A partir da busca realizada no banco de dados do Genoma Café, para a via MEP foram obtidas 22 ESTs de *DXR*, formando apenas um *contig* completo, isto é, apenas uma isoforma para este gene. O Northern eletrônico mostrou maior expressão em bibliotecas de sementes germinando (Tabela 1). A busca por *IDS* resultou em 47 ESTs formando apenas um *contig*. As seqüências foram originadas principalmente de hipocótilos induzidos com acilbenzolar-S-metil. A maioria das ESTs obtidas de outros genes da via MEP é de bibliotecas de cultura de células em suspensão ou bibliotecas de estresse induzido (Tabela 1).

Para a via MVA, a busca resultou em 13 ESTs para *HMGR* que originaram três *contigs* incompletos chamados de *HMGR6749*, *HMGR6175* e *HMGR000*. Análise destes *contigs* através de PCR demonstrou amplificação entre os *contigs* *HMGR000* e *HMGR6749* que foi denominado *CAHMGR1*. O *contig* *HMGR6175* foi denominado de *CAHMGR2*. O Northern eletrônico das duas isoformas de *HMGR* mostrou maior expressão em flores e frutos (Tabela 1). Para *MPDC*, somente 7 ESTs foram encontradas formando apenas um *contig*, apresentando maior número de ESTs em cultura de tecidos e células. O número de isoformas dos genes obtidos através de dados *in silico* foi o mesmo relatado para *Arabidopsis thaliana*, com exceção para *MPDC* que possui duas isoformas em *A. thaliana* e somente uma foi obtida através da análise do banco de dados do Projeto Genoma Café.

Análise in vivo de DXR e HMGR

As membranas de Southern blot obtidas por digestão com as enzimas *DraI*, *XhoI* e *HindIII* foram hibridizadas com as sondas correspondentes aos genes *CaDXR* e *CaHMGR1* (Figura 2). Como esperado, quando as membranas foram hibridizadas com *CaDXR* obteve-se uma banda com cerca de 2 Kb. A banda com menor tamanho é devido a sítios de restrição de *Hind III* no gene produzindo fragmentos menores. Quando as membranas foram hibridizadas com a sonda de *CaHMGR1*, observou-se a presença de duas bandas correspondentes a duas isoformas de *HMGR* com cerca de 3,3Kb e 2,0Kb. Membranas que serão hibridizadas com a isoforma *CaHMGR2* deverão confirmar esses resultados.

As membranas de Northern blot, contendo RNA de polpa, perisperma e endosperma de três espécies de *Coffea* foram hibridizadas com *DXR* e com as duas isoformas de *HMGR*. Transcritos do gene *CaDXR* foram detectados no começo de desenvolvimento do perisperma e nas fases finais de desenvolvimento de endosperma e polpa (Figura 3). Transcritos do *CaHMGR2* foram detectados em polpa, perisperma e endosperma, em todas as fases de desenvolvimento do fruto; já a isoforma *HMGR1* apresentou transcritos apenas em polpa e fase inicial do desenvolvimento de perisperma e endosperma (Figura 3 e 4). Os resultados sugerem uma expressão mais constitutiva da isoforma *CaHMGR2*, enquanto a isoforma *CaHMGR1* teria indução específica.

Tabela 1. Northern eletrônico dos principais genes das vias de síntese de isoprenóides. Bibliotecas do Genoma Café foram agrupadas de acordo com tecidos ou condições fisiológicas.

Gene	ESTs	Frutos e Flores	Folhas	Cultura de Tecidos e Células	Stress hídrico (pool de tecidos)	Sementes germinando
CAHMGR1	11	8	2	1		
CAHMGR2	2			2		
MPDC	7	2		4	1	
DXR	22	4	3	7	3	5
IDS	47	9	9	24	4	1

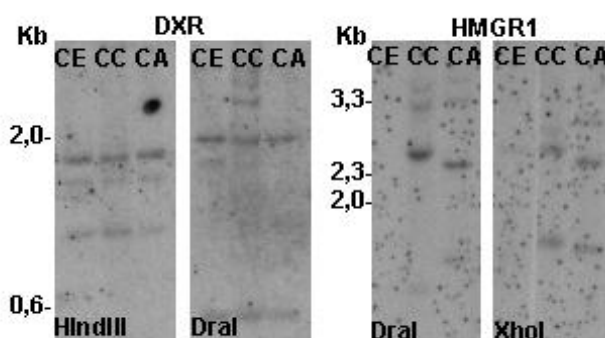


Figura 2– Análise por Southern blot do DNA genômico de *C.arabica* (CA), *C. canephora* (CC) e *C. eugenioides* (CE), digerido com *HindIII*, *DraI* e *XhoI*, e hibridizados com as sondas de *DXR* e *CAHMGR1*.

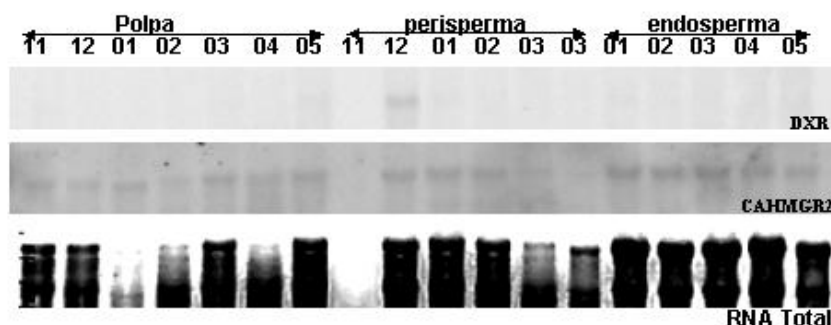


Figura 2– Análise por Southern blot do DNA genômico de *C.arabica* (CA), *C. canephora* (CC) e *C. eugenioides* (CE), digerido com *HindIII*, *DraI* e *XhoI*, e hibridizados com as sondas de *DXR* e *CAHMGR1*. Números de 11 a 06 representam respectivamente os meses de coleta de material (novembro a junho). RNA Total: gel das amostras para comparação da concentração utilizada.

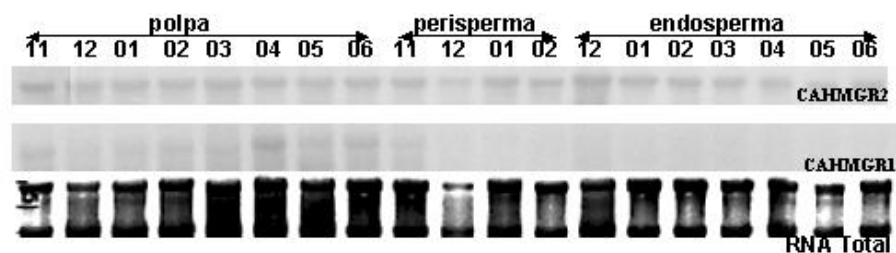


Figura 3 – Análise por Northern blot do RNA de polpa, perisperma e endosperma de *C. arabica* safra 2005/2006. Membranas hibridizadas com sondas de *CAHMGR1* e de *CAHMGR2*. Números de 11 a 06 representam respectivamente os meses de coleta de material (novembro a junho). RNA Total: gel das amostras para comparação da concentração utilizada.

Conclusões

Apesar dos resultados de expressão *in vivo* serem consistentes com dados bioquímicos obtidos na análise da concentração de diterpenos em tecidos de café (dados não mostrados), os genes estudados apresentaram um sinal de hibridização fraco, o que dificulta a análise do padrão de expressão destes genes via Northern blot. Técnicas mais sensíveis para detecção da expressão, como RT PCR poderão auxiliar para elucidar melhor a ação destes genes na biossíntese de isoprenoides e de diterpenos.

Agradecimentos

Apoio financeiro do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café) e do CNPq Proj 470875/2004-06. Iris Tiski – Bolsista Anotação e Mineração do Genoma Café - CBP&D-Café

Referências Bibliográficas

- Carretero-Paulet, L.; Ahumada, I.; Cunillera, N.; Rodriguez-Concepcion, M.; Ferrer, A.; Boronat, A.; Campos, N. (2002) Expression and Molecular Analysis of the Arabidopsis DXR gene Encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C- methyl-D-Erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Physiology*, 129:1581-1591.
- Geromel C., Ferreira L.P., Guerreiro S.M.C., Cavalari A.A., Pot D., Pereira L.F.P., Leroy T., Vieira L.G.E., Mazzafera P., Marraccini P.(2006) Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development.. *J. Exp. Bot.* 57:3243-3258.
- Julliard, J. H (1992) Biosynthesis of the pyridoxal ring (vitamin B₆) in higher plant chloroplasts and its relationship with the biosynthesis of the thiazole ring (vitamin B₁). *C. R. Acad. Sci. Series III*, 314:285-290.
- Julliard, J. H.; Douce, R. (1991) Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B₁) in higher plant chloroplasts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 88:2042-2045.
- Pereira, L. F. P.; Galvão, R. M.; Kobayashi, A. K.; Cação, S.M. B.; Vieira, L. G. E. (2005) Ethylene production and ACC oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. *Braz. J. Plant Physiol.* 17(3): 283-289.
- Ross, B.; Van Der Weg, G.; Urget, R.; Van Den Bonvenkamp, P.; Charrier, A.; Katan, M. B. (1997) Level of cafestol, cavaol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant. *Journal Agric Food Chemistry*, 45:3065 – 3069.
- Speer, K.; Kolling-Speer. (2001) I. Lipids , in: Clarke RJ and Vitzthum OG (EDS). *Coffee: recent developments*. Blackwell Science, p. 33-49.
- Taiz, L.; Zeiger. (2002) *E. Plant Physiology*, 3th Edition. Ad Sinauer (Ed.), Sinauer Ass Inc Publishers, Sunderland (MA).
- Weisscnborn, D. L.; Denboy, C. J.; Laine, M.; Lång, S. S.; Yang, Z.; Yu, X.; Cramer, C. L. (1995) *Plant Physiol*, 98:393-400.