

CARACTERIZAÇÃO DO MICRORNA MIR393 ENCONTRADO EM BIBLIOTECAS DE RNA-SEQ DE FRUTOS VERDES DE *Coffea arabica*¹

Andressa Spuri Azarias²; Christiane Noronha Fernandes-Brum³; Iasminy Silva Santos⁴; Thaís Cunha De Sousa Cardoso⁵; Matheus De Souza Gomes⁶; Antonio Chalfun-Júnior⁷

¹Trabalho financiado pelo INCT Café

²Graduanda em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, andressa_spuri@hotmail.com

³Doutoranda em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Biotecnologia Vegetal, chrisbioufla@gmail.com

⁴Mestranda em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, iasminsilvas@gmail.com

⁵Graduanda em Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, campus Patos de Minas, thatacunha2@hotmail.com

⁶Professor Adjunto II, Universidade Federal de Uberlândia, campus Patos de Minas, Instituto de Genética e Bioquímica, matheus@ingeb.ufu.br

⁷Professor adjunto, Universidade Federal de Lavras, Departamento de biologia, Fisiologia vegetal, chalfunjunior@dbi.ufla.br

RESUMO: Pequenos RNAs induzem a expressão gênica em nível pós-transcricional pela condução do mRNA à clivagem, repressão da tradução ou modificação da cromatina. microRNAs (miRNA) possuem ~20-24 nucleotídeos e coordenam a expressão gênica pela regulação negativa da expressão de seus genes alvo, através da degradação sequência-específica ou através da repressão da tradução. Além de plantas modelo como *Arabidopsis* e *Microtom*, os miRNAs têm sido estudados em diferentes espécies de interesse agrônomo, objetivando compreender suas funções regulatórias no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, resposta a estresses, dentre outros. Neste trabalho um pipeline específico para a busca de miRNAs homólogos às plantas modelos, foi aplicado em sequências advindas de bibliotecas de RNA-seq obtidas de frutos verdes de *Coffea arabica*. Como resultado 7 famílias de miRNAs foram identificadas em frutos verdes. Os resultados permitem vislumbrar estudos futuros que visem a compreensão da maturação de frutos de café e a importância dos miRNAs no processo, visando o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para o melhoramento do café.

PALAVRAS-CHAVE: miRNA, *Coffea arabica*, maturação.

CHARACTERIZATION OF THE MICRORNA MIR393 IN RNA-SEQ LIBRARIES OF *Coffea arabica* GREEN FRUITS

ABSTRACT: Small RNAs induce gene expression in post-transcriptional level by driving the mRNA cleavage, translational repression chromatin modification. microRNAs (miRNA) have ~ 20-24 nucleotides and coordinate gene expression by down-regulation of the expression of their target genes through sequence-specific degradation or through the translation repression. Besides model plants like *Arabidopsis* and *Microtom*, miRNAs have been studied in different species of agronomic interest in order to understand its regulatory functions in vegetative and reproductive development, stress response, and others. In this work a specific pipeline to search for miRNAs counterparts in coffee was applied to sequences from RNA-seq libraries obtained from green fruits of *Coffea arabica*. As a result 7 family of miRNAs have been identified in green fruits. The results can address future studies aimed at understanding the coffee fruit ripening and the importance of miRNAs in this process, for the development of biotechnological tools for coffee breeding

KEYWORDS: miRNA, *Coffea arabica*, maturation

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de café, a segunda maior commodity mundial, ficando atrás apenas do petróleo. A produção de café brasileira em 2014 chegou a aproximadamente 45 mi sacas, de um total mundial de 141mi (ICO, 2015a). A espécie *C. arabica* é responsável por quase a totalidade do café exportado pelo Brasil com aproximadamente 29.3 mi de sacas (ICO, 2015b). Diversos organismos produzem pequenos RNAs, entre eles os microRNAs, que possuem ~20-24 nucleotídeos e controlam a expressão gênica pela regulação negativa da expressão de seus genes alvo, através da degradação sequência-específica ou repressão da tradução (YAMAGUCHI; ABE, 2012). Estes participam de importantes processos regulatórios (ELDEM et al., 2012). Os transcritos primários (pri-miRNA) possuem tamanho semelhante aos transcritos que codificam proteínas (TANG, 2010), e possuem estrutura em formato de grampo, denominada *hairpin*. Estas moléculas são processadas em precursores (pre-miRNAs). Em seguida, os pre-miRNAs são

processados pelo complexo DCL, formando uma estrutura de duplex formada pelo miRNAs maduro e o miRNA complementar (miRNA*), o duplex miRNA/miRNA* (MARGIS et al., 2006), o qual é transportado ao citoplasma. Já no citoplasma, o miRNA guia é separado do miRNA* e incorporado a uma proteína da família ARGONAUTA (AGO) formando o sistema RISC (RNA Induced Silencing Complex), que reconhece o mRNA alvo e guia seu silenciamento. O estudo de miRNAs em espécies cultivadas pode proporcionar a compreensão de processos regulatórios como o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo e resposta a estresse. Ao identificar e caracterizar precursores de miRNAs encontrados em bibliotecas de RNA-seq obtidas a partir de frutos verdes e maduros de café, foi selecionado aleatoriamente dentre os frutos verdes o car-miR393a e car-miR393b.

MATERIAL E MÉTODOS

Bibliotecas de RNA-seq obtidas a partir de frutos verdes de *C. arabica* cultivar Acauã foram utilizadas como base de dados para este estudo. O software Trinity (GRABHERR et al., 2011) (Broad Institute e Hebrew University of Jerusalem) foi usado como ferramenta para a reconstrução dos transcriptomas das bibliotecas de RNA-seq. Foi aplicado o método utilizado em *S. mansoni* (DE SOUZA GOMES et al., 2011) e adaptado para espécies *Coffea* em Chaves et al. (não publicado) em que as sequências que potencialmente formam estruturas em *hairpin* foram obtidas utilizando as ferramentas EInverted (EMBOSS) e BLASTn (NCBI). Os parâmetros para o programa EInverted foram máximo *repeat* de 336 nucleotídeos e valor *threshold* 25 (THAKUR, 2011). Foi realizada uma busca por BLASTn para encontrar sequências que potencialmente formam *hairpin* usando todas as sequências de pre-miRNAs depositadas no miRBase versão 20.0 como *query*. O valor limite de *e-value* utilizado foi 0.001, comprimento mínimo de similaridade de 25 nucleotídeos e 80% de identidade. Foram coletadas sequências entre 60 e ~400 nt. Para obter miRNAs verdadeiros, as sequências que potencialmente formam *hairpin* foram submetidas a diferentes filtros, tais como: MFE (Minimal free energy), conteúdo de GC, homologia de sequência madura, filtro de genes que codificam proteínas, filtro de RNAs não codantes, e filtro de sequências repetitivas. As possíveis sequências *hairpin* obtidas no EMBOSS e por BLASTn foram filtradas usando seus MFE determinados via RNAfold (Vienna RNA Package) com os seguintes parâmetros: energia de dobramento secundário de RNA -20 kcal/mol e opções "-p -d2 -noLP" (HOFACKER, 2009). Em seguida, as estruturas foram filtradas para o conteúdo de GC variando entre 20% a 65%. Adicionalmente, miRNAs maduros de plantas depositados no miRBase (Versão 20.0) foram alinhados às sequências e foram aceitos no máximo 4 mismatches na estrutura madura. Outras classes de RNA não codantes (rRNA, snRNA, SL RNA, SRP, tRNAs, e RNase P) foram eliminados usando Rfam microRNA Registry (versão 11.0)(GARDNER et al., 2009). Finalmente, sequências repetitivas foram eliminadas por um banco de dados que omite sequências repetitivas (<http://www.repeatmasker.org/>)(RepeatMasker 4.0.2), e sequências positivas para possíveis precursores de miRNAs reais foram separadas. Nas sequências identificadas de pre-miRNAs de *C. arabica* foram realizadas análises de características estruturais e parâmetros termodinâmicas: Energia Mínima Livre (MFE), Energia Mínima Livre Ajustada (AMFE), Índice de Energia Mínima Livre (MFEI), tamanho, conteúdo de A, conteúdo de U, conteúdo de C, conteúdo de G, de GC e AU, razão de GC, razão de AU, Energia Mínima Livre do Conjunto (MFEE), Diversidade do Conjunto (Diversidade), e Frequência da estrutura do MFE no Conjunto (Frequência). O parâmetro de MFE ajustado (AMFE) foi definido como o MFE de 100 nucleotídeos de comprimento de sequência e o índice de energia mínima de dobramento (MFEI), calculado pela equação: $MFEI = [(AMFE) \times 100] / (G\% + C\%)$ (ZHANG, B. et al., 2006). A diversidade, MFE e frequência do ensemble foi calculada usando RNAfold assim como o MFE das estruturas secundárias (HOFACKER, 2009). O conteúdo de GC e outras características estruturais foram calculadas usando scripts Perl.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os miRNA em vegetais desempenham um papel fundamental em diversos processos biológicos incluindo embriogênese, floração, desenvolvimento de folhas e raízes e respostas das plantas em estresses bióticos e abióticos (LLAVE 2004; SUNKAR AND ZHU 2004). Os miRNA são pequenos RNAs não codificadores, de 21 a 25 nucleotídeos, que conduzem a expressão gênica de modo específico (HE L, HANNON GJ, 2004). Para a identificação via análises computacionais aspectos termodinâmicos que podem ser levados em consideração para a determinação de miRNAs, como: Energia Mínima Livre (MFE), Energia Mínima Livre Ajustada (AMFE), Índice de Energia Mínima Livre (MFEI), Energia Mínima Livre do Conjunto (MFEE), Diversidade do Conjunto (Diversidade), e Frequência da estrutura do MFE no Conjunto (Frequência) pois são critérios úteis para diferenciar miRNAs de outros tipos de RNAs. Tem sido visto que precursores de miRNAs frequentemente possuem maiores MFEI que outros RNAs. Quando apresenta valores de MFEI maiores que 0,85 uma sequência de RNA tem a predisposição de ser uma molécula silenciadora. (ZHANG, B. H.; PAN, X. P.; WANG, Q. L.; et al., 2006). Foram identificadas 7 famílias de miRNAs em frutos verdes. No presente estudo apresenta-se os resultados para a família MIR393. O miR393 encontrado em fruto verde apresentou características consistentes para classificá-lo como miRNA, pois seus pré-miRNAs caracterizados obtiveram alto MFEI (Tabela 1). Os valores encontrados são significativamente mais alto que os relatados para tRNAs (0,64), rRNAs (0,59), e mRNAs (0,62-0,66) (XIE, F. L. et al., 2007; ZHANG, B. H. et al., 2006).

Tabela 1. Características termodinâmicas do miRNA393

Amostra	miRNA ID	MFE (kcal/mol)	MFEE (kcal/mol)	Frequência (%)	Diversidade	AMFE	MFEI
Fruto Verde	ca-miR393a	-71,90	-70,90	0,0196	12,57	-39,08	-0,98
Fruto Verde	ca-miR393b	-63,70	-58,70	0,0055	24,01	-34,62	-0,87

Além disso, a estrutura do precursor de miR393 apresentou 184 bases em sua composição (Tabela 2). Os miRNAs de plantas apresentam grande variação em relação ao seu tamanho (60-509), porém a grande maioria (75%) encontram-se entre 80 – 160. (Zhang et al, 2006). Em relação à composição, o pre-miR393 apresentou conteúdo de AU (Adenina+Uracila) de 60,33% e conteúdo de GC de 39,67% (Tabela 2). Já que A-U fazem duas ligações de hidrogênio e G-C formam três ligações, um maior conteúdo de A-U conferem menor estabilidade e portanto facilitam o processamento do precursor em miRNAs maduros pelo complexo RISC (Zhang et al, 2006). Além disso, o conteúdo de AU, especialmente U podem servir como sinal para a biogênese de miRNAs (Zhang et al, 2006).

Tabela 2. Características estruturais de precursores conservados de miRNA393 em frutos verdes em *C. arabica*

Amostra	miRNA ID	Tamanho	G (%)	A (%)	C (%)	U (%)	GC Content (%)	AU Conten t (%)	UA- ratio	GC- ratio
Fruto verde	ca-miR393a	184	19,57	28,26	20,11	32,07	39,67	60,33	1,13	0,97
Fruto verde	ca-miR393b	184	20,11	32,07	19,57	28,26	39,67	60,33	0,88	1,03

As sequências maduras podem ser encontradas nos dois sentidos do precursor, tanto 5' como 3'. Os miR393a-3p, miR393a-5p, miR393b-3p e miR393b-5p encontrados apresentaram mesmo tamanho de sequências maduras que os ortólogos (22nt) e alta similaridade com a sequência dos ortólogos (Tabela 3). A figura 1 mostra o alinhamento dos precursores de miR393 em *Coffea arabica* com seus ortólogos em outras espécies, destacando-se a região madura, que é a região que se liga ao gene alvo promovendo sua clivagem ou repressão.

Tabela 3. Características do miRNA393 de fruto verde de *Coffea arabica* e seus respectivos ortólogos.

Amostra	Precursor	Maduro	Sequencia Maduro	Início e fim do precursor	Ortologo Maduro	Nº de mismatches do Ortólogo	Nº de gaps do Ortólogo	Tamanho miRNA	Tamanho Ortólogo
Fruto Verde	car-miR393a	car-miR393a-3p	aucaugcuaucc cuuuggaua	147-167	ath-miR393a-3p	2	0	21	21
Fruto Verde	car-miR393a	car-miR393a-5p	uccaaagggaucc gcauugauc	20-41	ath-miR393a-5p	0	0	22	22
Fruto Verde	car-miR393b	car-miR393b-3p	aucaaugcgaucc ccuuuggaug	146-167	zma-miR393b-3p	2	0	22	22
Fruto Verde	car-miR393b	car-miR393b-5p	uccaaagggaua gcaugauc	20-41	zma-miR393b-5p	7	0	22	22

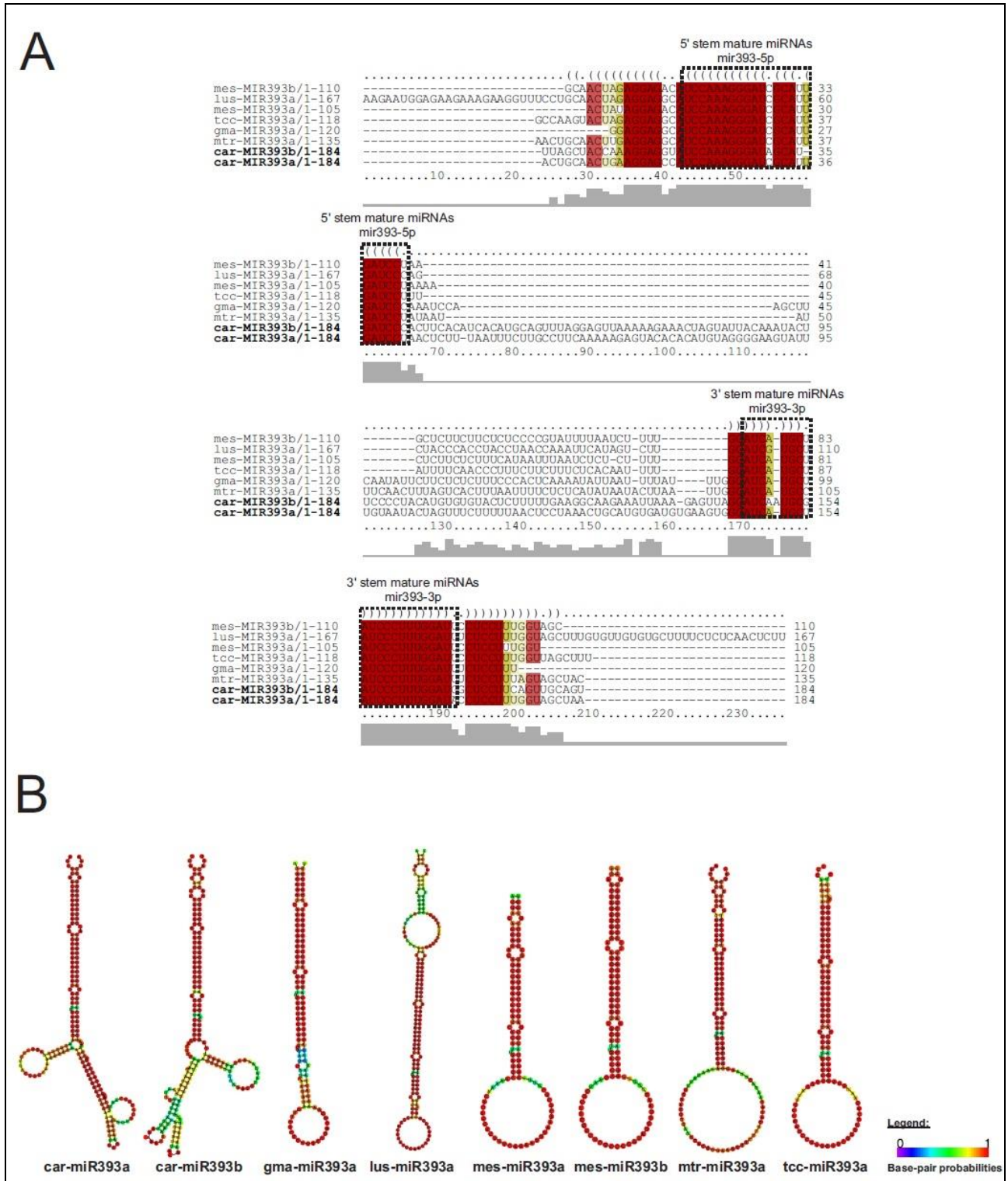


Figura 1. Alinhamento do precursor de ca-MIR393 com seus homólogos de outras espécies vegetais.

A identificação de alvos de miR393 preveem que este atua sinalização de auxina. Os alvos identificados e validados de miR393 são: TIR1(At3g62980) e outras três proteínas F-box (AFB1- At4g03190, AFB2 – At3g26810 e AFB3 – At1g12820) (JONES-RHOADES AND BARTEL 2004). O TIR1/AFBs, constitui um pequeno subconjunto de F-box contendo receptores de auxina e funcionam como um componente da proteína Skp 1-Cul-LIN1-F-box (SCF) complexos ubiquitina ligase. Eles regulam a sinalização da auxina por proteólise de repressores de auxina/ácido indol-3-acético (Aux/IAA), e liberam as atividades dos fatores de resposta da auxina (ARFs) (DHARMASIRI ET AL. 2005A; KEPINSKI AND LEYSER 2005; RUEGGER ET AL. 1998).As auxinas são descritas por estimularem o alongamento de coleóptilos de segmentos de caule, divisão celular em cultura de calos em presença de citocininas, formação de raízes adventícias em folhas ou caules excisados entre outros fenômenos de desenvolvimento (TAIZ L, ZEIGER E, 2002). A principal auxina descrita é o ácido indol-3-acético (AIA), sua biossíntese está associada aos tecidos de rápida

divisão celular e crescimento, principalmente nas partes aéreas. Apesar de que quase todos os tecidos vegetais sejam capazes de produzir baixos níveis de AIA, os meristemas apicais, as folhas jovens, os frutos e as sementes em desenvolvimento são os principais locais de síntese deste hormônio. (LJUNG, L ET. AL. 2001). Entretanto, para afirmar se os alvos de miR393 em *Coffea arabica* também estão relacionados à síntese de auxina são necessárias análises complementares para a identificação de possíveis alvos através de análises computacionais. Além disso, posteriormente, deve-se fazer estudos moleculares para validação dos dados encontrados. Estudos tais como os de expressão gênica do miR393 e dos possíveis alvos identificados auxiliarão na compreensão da atividade do miR393 no processo de desenvolvimento e maturação de frutos.

CONCLUSÕES

O miR393 foi identificado em frutos verdes de *Coffea arabica* através da comparação com outras espécies, observando-se elevada conservação na região da sequência madura. Análises moleculares permitirão a melhor compreensão das funções do miR393 no processo de desenvolvimento e maturação de frutos de café. Estudos tais como o descrito no presente trabalho podem auxiliar no desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para o melhoramento do cafeeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DE SOUZA GOMES, M. et al. Genome-wide identification of novel microRNAs and their target genes in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Genomics*, v. 98, n. 2, p. 96-111, Aug 2011.
- DHARMASIRI, N, DHARMASIRI, S, ESTELLE, M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: pp. 441-445, 2005.
- ELDEM, V. et al. Genome-Wide Identification of miRNAs Responsive to Drought in Peach (<italics>Prunus persica</italics>) by High-Throughput Deep Sequencing. *PLoS ONE*, v. 7, n. 12, p. e50298, 2012.
- GARDNER, P. P. et al. Rfam: updates to the RNA families database. *Nucleic acids research*, v. 37, n. Database issue, p. D136-40, Jan 2009.
- GRABHERR, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*, v. 29, n. 7, p. 644-52, Jul 2011.
- HE L, HANNON GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*. 5:522-531.
- HOFACKER, I. L. RNA secondary structure analysis using the Vienna RNA package. *Curr Protoc Bioinformatics*, v. Chapter 12, p. Unit12.2, Jun 2009.
- ICO. BREAKDOWN OF EXPORTS OF GREEN ARABICA AND GREEN ROBUSTA FOR COUNTRIES EXPORTING SIGNIFICANT VOLUMES OF BOTH TYPES OF COFFEE FEBRUARY 2015. 2015a. Disponível em: < <http://dev.ico.org/prices/mla.htm> >. Acesso em: 19/04.
- _____. EXPORTING COUNTRIES: TOTAL PRODUCTION CROP YEARS COMMENCING: 2009 TO 2014. 2015b. Disponível em: < <http://dev.ico.org/prices/po.htm> >. Acesso em: 19/04.
- JONES-RHOADES, M.W., BARTEL, D.P.. Computational identification of plant MicroRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol. Cell*14:787–799, 2004.
- JONES-RHOADES, M.W., BARTEL, D.P., BARTEL, B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:19–53, 2006.
- KEPINSKI, S, LEYSER, O. The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: pp. 446-451, 2005.
- LJUNG, K; BHALERAO, R. P; E SANDBERG, C. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant. J.* 29: 465-474, 2001.
- LLAVE, C. MicroRNAs: more than a role in plant development? *Mol. Plant Pathol.*, 5, pp. 361–366, 2004.
- MARGIS, R. et al. The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Letters*, v. 580, n. 10, p. 2442-2450, 5/1/ 2006.
- RUEGGER, M, DEWEY, E, GRAY, WM, HOBBIE, L, TURNER, J, ESTELLE, M. The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev* 12: pp. 198-207, 1998.
- SUNKAR AND ZHU.R. SUNKAR, J.K. ZHU. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16, pp. 2001–2019, 2004.
- TAIZ L, ZEIGER E. *Plant physiology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. Massachusetts. 3rd edition. p. 450-451, 2002.
- TANG, G. Plant microRNAs: An insight into their gene structures and evolution. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 21, n. 8, p. 782-789, 10// 2010.
- XIE, F. L. et al. Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus*. *Febs Letters*, v. 581, n. 7, p. 1464-1474, Apr 2007.
- YAMAGUCHI, A.; ABE, M. Regulation of reproductive development by non-coding RNA in Arabidopsis: to flower or not to flower. *Journal of Plant Research*, v. 125, n. 6, p. 693-704, Nov 2012.
- ZHANG, B. et al. Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, v. 46, n. 2, p. 243-59, Apr 2006.

- ZHANG, B. H. et al. Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 63, n. 2, p. 246-254, Jan 2006.
- ZHANG, B. H. et al. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Research*, v. 15, n. 5, p. 336-360, May 2005.