

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Estudo do ciclo celular e sua regulação em plantas

Marcelo de Freitas Lima

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Estudo do ciclo celular e sua regulação em plantas

Marcelo de Freitas Lima

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

Orientador: Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira

Rio de Janeiro
Fevereiro/2010

Estudo do ciclo celular e sua regulação em plantas

Marcelo de Freitas Lima

Orientador: Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

Aprovada por:

Presidente, Prof. Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira

Prof. Dr Carlos Frederico Leite Fontes

Prof. Dr. Gilberto Sachetto Martins

Prof. Pedro Geraldo Pascutti

Prof. Dr. Julio Alberto Mignaco

Rio de Janeiro
Fevereiro/2010

Ficha Catalográfica

Lima, Marcelo de Freitas.

Estudo do ciclo celular e sua regulação em plantas./ Marcelo de Freitas Lima. – Rio de Janeiro.: UFRJ/ IBqM, 2010

xv, 225f.:il.;30 cm

Orientador: Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira

Tese (doutorado) – UFRJ/ Instituto de Bioquímica Médica/ Programa de Pós-graduação em Química Biológica, 2010.

Referências Bibliográficas: f.133-150

1.Ciclo Celular. 2. Complexo Promotor da Anáfase. 3. *Arabidopsis thaliana*. 4. *Nicotiana tabacum* . 5 Desenvolvimento vegetal

I. Ferreira, Paulo Cavalcanti Gomes. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-graduação em Química Biológica. III. Título

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Antonio e Marlene;

Aos meus irmãos Junior e Clícia;

Ao Paulo Ferreira pela orientação desde a Iniciação Científica. Aprendi muito e espero ter acertado mais do que errado;

A Adriana Hemerly pela co-orientação;

A Núbia, nossa espiã na Bélgica, que ajudou muito com as transformações de Arabidopsis;

Ao Cristian por seus inúmeros protocolos;

Ao Luiz que sempre esteve caoticamente “organizado” e disposto a ajudar;

Ao Thiago pelo trabalho extra;

Ao Pedro pela cerveja com certificação ISO;

A comunidade do LBMP;

RESUMO

Estudo do ciclo celular e sua regulação em plantas

Marcelo de Freitas Lima

Orientador: Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

A correta progressão durante a mitose é regulada pelo Complexo Promotor da Anáfase (APC), uma grande E₃ ubiquitina-ligase que marca reguladores importantes do ciclo celular para destruição via proteossoma 26S. O APC é composto por pelo menos 11 subunidades e associa-se com ativadores durante a mitose e a interfase. Apesar de extensas pesquisas sobre o APC e seus ativadores durante o ciclo celular, apenas alguns destes componentes foram caracterizados funcionalmente em plantas. Neste trabalho, nós realizamos uma profunda pesquisa sobre os genes das subunidades do APC e seus ativadores nos genomas de Arabidopsis, arroz e poplar; além de seqüências disponíveis de outras plantas. Análises filogenéticas indicam que alguns genes das subunidades do APC e dos ativadores experimentaram maiores eventos de duplicação gênica em plantas do que em animais. Padrões de expressão de parálogos de algumas subunidades e ativadores de arroz sugerem que essas duplicações, ao invés de total redundância, refletem a especialização. A subunidade APC7 não está presente em algumas espécies de algas verdes e estes dados, juntamente com a sua ausência em linhagens mais antigas de metazoários, poderia significar que o APC7 não é exigido para a função APC em organismos unicelulares e pode ser resultado da duplicação de outra subunidade com domínio tetratricopeptideo (TPR). As análises de evolução das subunidades TPR sugerem que a duplicação de subunidades iniciou-se a partir dos domínios centrais. A crescente complexidade gênica/estrutural do APC, ligada à diversificação dos padrões de expressão sugere que as plantas terrestres desenvolveram mecanismos sofisticados de regulação da APC para lidar com o estilo de vida sésil associado a riscos ambientais. Plantas transgênicas de tabaco

superexpressando a subunidade APC10 de Arabidopsis foram expostas a condições de estresse hídrico e salino. Os resultados mostram que o gene AtAPC10 é um potencial candidato para aumentar a tolerância ao estresse salino em plantas cultivadas. A superexpressão de três amiRNAs, que possuem como alvos os genes das subunidades do APC (AtAPC4 e AtAPC5), resultou em fenótipos robustos, que lembram os fenótipos das plantas com mutações nos respectivos genes alvo. Para investigar a regulação da APC, o promotor do gene APC5 de Arabidopsis foi fusionado ao gene repórter GUS. Estudo histoquímico das plantas transgênicas revelou que o promotor de APC5 está ativo nas zonas meristemáticas.

Palavras-chave: Ciclo celular, complexo promotor da anáfase, Arabidopsis.

ABSTRACT

Study of the cell cycle and its regulation in plants

Marcelo de Freitas Lima

Orientador: Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

The orderly progression through mitosis is regulated by the Anaphase-Promoting Complex (APC), a large multiprotein E₃ ubiquitin ligase that targets key cell-cycle regulators for destruction by the 26S proteasome. The APC is composed of at least 11 subunits and associates with additional regulatory activators in mitosis and during interphase. Despite extensive research on APC and activator functions in the cell cycle, only a few these components have been characterized functionally in plants. Here, we describe an in-depth search for APC subunits and activator genes in the Arabidopsis, rice and poplar genomes, and among available sequences from other plant genomes. Phylogenetic analyses indicate that some APC subunits and activator genes have experienced more gene duplication events in plants than in animals. Expression patterns of paralog subunits and activators in rice suggest that this duplication, rather than complete redundancy, reflects specialization. The subunit APC7 is not present in some green algae species and these data, together with its absence from early metazoan lineages, could mean that APC7 is not required for APC function in unicellular organisms and it may be a result of duplication of another tetratricopeptide (TPR) subunit. Analyses of TPR evolution suggest that duplications of subunits started from the central domains. The increased complexity of the APC genic structural, tied to the diversification of expression paths suggests that land plants developed sophisticated mechanisms of APC regulation to cope with the sedentary life style associated with environmental exposures. Transgenic tobacco plants overexpressing APC10 subunit from Arabidopsis were exposed to drought and salt conditions. The results show that AtAPC10 is a potentially useful candidate gene for engineering salt tolerance in cultivated plants. Overexpression of three amiRNAs

designed to target APC subunits genes (AtAPC4 and AtAPC5) resulted in robust and strong phenotypes that resembled those of plants with mutations in the respective target gene. To investigate the regulation of APC, the promoter of Arabidopsis APC5 gene was fused to a GUS reporter gene. Histochemic study of these transgenic seedlings revealed that promoter of APC5 is active in meristem zones.

Key-words: Cell cycle, anaphase-promoting complex, Arabidopsis.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES, QUADROS E TABELAS	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Ciclo celular vegetal	1
1.2 Controle do ciclo celular vegetal	4
• CDKs em plantas	8
• CYCs em plantas	9
• Regulação por CKI	10
1.3 Ubiquitinação	11
1.4 Complexo promotor da anáfase (APC)	14
1.5 Ativadores do APC	15
1.6 Substratos do APC	18
• Proteólise de CYCs	18
• Separação das cromátides	19
• Retorno a G ₁ e progressão no ciclo	21
• Outros substratos	21
1.7 Subunidades do APC/C	23
1.8 Genômica comparativa em plantas	30
2 OBJETIVOS	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Hormônios e antibióticos	33
3.1.1 Hormônios para cultivo de <i>N. tabacum</i>	33
3.1.2 Antibióticos para cultivo de <i>N. tabacum</i>	33
3.1.3 Antibióticos para seleção de bactérias transformadas	33
3.2 Cepas de bactérias	34
3.3 Plantas	34
3.4 Meios de cultura	34
3.4.1 Composição do meio LB para crescimento de <i>E. coli</i>	34
3.4.2 Composição do meio YEB para crescimento de <i>A. tumefaciens</i>	35
3.4.3 Composição do meio MS para cultivo de <i>N. tabacum</i>	35
3.4.4 Composição do meio GM para cultivo de <i>A. thaliana</i>	36
3.4.5 Composição da solução de Hoagland para cultivo de <i>O. sativa</i>	36
3.5 Material vegetal e condições de crescimento	37
3.5.1 <i>A. thaliana</i>	37
3.5.2 <i>N. tabacum</i>	37

3.5.3 <i>O. sativa</i>	38
3.6 Material biológico para análise da expressão gênica	38
3.6.1 Arroz	38
3.6.2 Arabidopsis	39
3.6.3 Poplar	39
3.7 Análise da expressão gênica	40
3.7.1 Extração de RNA total e tratamento com DNase I	40
3.7.2 Síntese de primeira fita de cDNA	42
3.7.3 RT-PCR em tempo real	43
3.8 Clonagem	45
3.8.1 Clonagem utilizando o sistema Gateway	45
• Reação BP	45
• Reação LR	51
• Clonagem em vetor amiRNA	52
3.8.2 Verificação do produto de PCR em gel de agarose e eluição do DNA	57
3.8.3 Preparação de bactérias eletrocompetentes e eletroporação	58
3.8.4 Preparação de <i>A. tumefaciens</i> competente	58
3.8.5 Transformação de <i>A. tumefaciens</i> e seleção	59
3.8.6 Minipreparação de DNA plasmidial e digestão com enzimas de restrição	59
3.9 Plantas transgênicas	62
3.9.1 Obtenção das plantas APC10OE	62
3.9.2 Estresses salino e hídrico das plantas AtAPC10OE, AtCDC27aOE, 10/27aOE e SR1	63
3.9.3 Verificação de massa fresca e seca das plantas de tabaco	64
3.9.4 Análise estatística das plantas de tabaco	64
3.9.5 Conteúdo relativo de água	65
3.10 Análise fotossintética	65
3.11 Identificação dos genes e localização cromossômica	66
3.12 Identificação dos domínios de proteínas	67
3.13 Análise filogenética	67
3.14 Exon-intron e domínio TPR	68
CAPÍTULO I - Análise evolutiva do APC em plantas	69
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1 Identificação das subunidades do APC e dos ativadores	70
4.2 Localização dos genes das subunidades do APC e dos ativadores	78
4.3 Análise filogenética das subunidades do APC contendo o domínio TPR e dos ativadores	82
4.4 Comparação das proteínas contendo o domínio TPR em <i>A. thaliana</i> , <i>P. tricocharpa</i> e <i>O. sativa</i> e determinação de ortologia	88
4.5 Análise de expressão das subunidades do APC e dos ativadores	93

CAPÍTULO II - Superexpressão da subunidade AtAPC10 em tabaco	98
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
5.1 Dados obtidos durante o doutorado que complementaram as análises realizadas no mestrado	99
• Estresse salino	100
• Análise fotossintética	103
CAPÍTULO III - Superexpressão do amiRNA-AtAPC4 e amiRNA-AtAPC5 em Arabidopsis	110
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	111
6.1 Análise de plantas amiRNA-AtAPC4 e amiRNA-AtAPC5	111
CAPÍTULO IV - Promotor do gene AtAPC5	116
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
7.1 Estudo do promotor do gene AtAPC5	117
8 CONCLUSÕES	120
• Estudo evolutivo do APC	120
• Plantas de tabaco superexpressando AtAPC10OE, AtCDC27aOE e 10/27aOE	124
• Redução da expressão dos genes AtAPC4 e AtAPC5 através da técnica de microRNA artificial	127
• Análise da fusão promotor APC5 - GUS	130
9 PERSPECTIVAS	132
10 REFERÊNCIAS	133
APÊNDICES	151
APÊNDICE I	152
APÊNDICE II	154
APÊNDICE III	158
APÊNDICE IV	159
APÊNDICE V	160
APÊNDICE VI	164
APÊNDICE VII	166
APÊNDICE VIII	167
APÊNDICE IX	175
APÊNDICE X	177
APÊNDICE XI	180
APÊNDICE XII	214

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

6BA- 6 Benziladenina

aa - Aminoácido

APC - Anaphase Promoting Complex ⇔ Complexo Promotor da Anáfase

CAK - CDK-activating kinase ⇔ Quinase Ativadora de CDK

CBP - Calmodulin-Binding Protein ⇔ Proteína Ligadora de Calmodulina

CDC - Cell Division Cycle ⇔ Ciclo de Divisão Celular

CDK - Cyclin-Dependent Kinases ⇔ Kinase Dependente de Ciclina

cDNA - DNA complementar

CKI - CDK-inhibitors ⇔ Inibidor de CDK

CKS - CDK-subunit ⇔ Subunidade da CDK

CYC - Cyclin ⇔ Ciclina

D-Box - Destruction-box ⇔ Seqüência de destruição

DEPC - Diethylpyrocarbonate ⇔ Dietilpirocarbonato

dNTP- Desoxinucleotide Triphosphate ⇔ Desoxinucleotídeo trifosfato

D.O. - Densidade Ótica

DOC - Destruction of Cyclin ⇔ Destruição de Ciclina

DTT - Dithiothreitol ⇔ Ditioneitol

E₁ - Enzima ativadora

E₂ - Enzima conjugadora

E₃ – Enzima ligase

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid ⇔ Ácido Etilenodiaminotetracético

G₁- Gap 1 – Intervalo 1

G₂ - Gap 2 – Intervalo 2

IAA - Indol-3-Acetic Acid ⇔ Ácido Indol-3-Acético

KEN-Box – Seqüência K (Lisina), E (Glutamato), N (Asparagina)

KRP - Kip-Related Protein ⇔ Proteína semelhante ao KIP

Lux - Definido como um fluxo luminoso de um lux uniformemente distribuído em uma superfície plana de área 1,0 m² [lúmens/m²].

M - Mitose

M - Concentração Molar

MES - 2-Morpholinoethanesulfonic acid ⇔ 2- N-Ácido Morfolino Etanosulfônico

ORF - Open Reading Frame ⇔ Fase Aberta de Leitura

pb - pares de base

PCR - Polymerase Chain Reaction ⇔ Reação em Cadeia da Polimerase

S - Fase de síntese

SCF - Skp1/Cullin/E-box protein

SDS - Sodium Dodecyl Sulfate ⇔ Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis ⇔ Dodecil Sulfato de Sódio
Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

T (0, 1, 2) - transformante - geração 0, 1 e 2

TAE - Tris-Acetate-EDTA buffer pH 8,0 ⇔ Tampão Tris-Acetato EDTA pH 8,0

Taq - enzima purificada da *T. aquaticus*

U - unidade de enzima

ÍNDICE DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

	Página	
Figura 1	Representação esquemática das fases do ciclo celular	2
Figura 2	Representação da fase M em uma célula vegetal eucariótica	4
Figura 3	Atividade do complexo CDK-CYC durante as fases do ciclo celular	6
Figura 4	Controle do ciclo celular em <i>A. thaliana</i>	7
Figura 5	Ciclo ubiquitina 26S proteassoma (Ub-26S)	12
Figura 6	Ubiquitina E ₃ ligase	14
Figura 7	Ativação do APC por CDC20 ou CDH1 durante o ciclo celular	17
Figura 8	Regulação na mitose pelo APCCDC20	20
Figura 9	Modelo de ubiquitinação via APC	24
Figura 10	Esquema da metodologia GATEWAY de clonagem dos cDNAs das subunidades do Complexo Promotor da Anáfase	49
Figura 11	Representação esquemática da metodologia de produção de amiRNA utilizando como molde o miR319a clonado no vetor pBSK	53
Figura 12	Esquema para obtenção de uma geração T ₂	63
Figura 13	Confirmação da funcionalidade do PtCDC27_2	74
Figura 14	Localização cromossômica das subunidades do APC e ativadores em arroz e poplar	79
Figura 15	Análise filogenética das proteínas do APC contendo o domínio TPR em diversas espécies	84
Figura 16	Relação filogenética entre plantas e algas	85
Figura 17	Análise filogenética das proteínas das proteínas CDC20 e CCS52 em diversas espécies	87
Figura 18	Subunidades TPRs de Arabidopsis	91
Figura 19	Perfil de expressão relativa das subunidades do APC e ativadores em arroz.	95
Figura 20	Plantas SR1, APC10OE e 10/27AOE germinadas em diferentes concentrações de NaCl	101
Figura 21	Plantas SR1, APC10OE, CDC27aOE e 10/27AOE germinadas, na posição vertical, em diferentes concentrações de NaCl	102
Figura 22	Comprimento radicular das plantas SR1, APC10OE, CDC27aOE e 10/27AOE submetidas ao estresse salino com NaCl.	103
Figura 23	Efeito do estresse hídrico sobre o transporte aparente de elétrons nas plantas de tabaco	105
Figura 24	Rendimento quântico da planta controle ao longo do tratamento de estresse hídrico	106
Figura 25	Efeito do estresse hídrico sobre a eficiência quântica fotoquímica máxima do fotossistema II pela radiação fotossinteticamente ativa	107
Figura 26	Verificação do conteúdo relativo de água durante o estresse hídrico	108
Figura 27	Estresse hídrico em plantas de tabaco	109

Figura 28	Diferentes linhagens da construção amiRNA-AtAPC4	112
Figura 29	Diferentes linhagens da construção amiRNA-AtAPC5	113
Figura 30	Perfil de expressão das plantas amiRNA-AtAPC4 na geração T ₁	115
Figura 31	Perfil de expressão das plantas amiRNA-AtAPC5 5b na geração T ₁	115
Figura 32	Padrão de expressão da construção promAtAPC5-GUS em Arabidopsis	119
Quadro 1	Protocolo da reação do 1° PCR para clonagem em vetores Gateway	46
Quadro 2	Programa da primeira reação da PCR para clonagem em vetores Gateway	47
Quadro 3	Programa da segunda reação da PCR para clonagem em vetores Gateway	48
Quadro 4	Componentes da reação BP	50
Quadro 5	Componentes da reação LR	52
Quadro 6	Conjunto de reações necessárias para produção do amiRNA	54
Quadro 7	Protocolo da reação da PCR para produção dos fragmentos (a), (b) e (c)	54
Quadro 8	Programa das reações (a), (b) e (c) para produção do amiRNA	55
Quadro 9	Protocolo da reação da PCR para produção do fragmento (d)	55
Quadro 10	Programa das reações (d) para produção do amiRNA	56
Quadro 11	Protocolo da reação da PCR para produção do fragmento (e)	56
Quadro 12	Programa das reações (e) para produção do amiRNA	57
Tabela 1	Substratos mitóticos do APC	22
Tabela 2	Subunidades do APC	24
Tabela 3	Subunidades do APC e ativadores em Arabidopsis, arroz e poplar	72
Tabela 4	Subunidades do APC em plantas e alga vermelha	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ciclo celular vegetal

As células eucarióticas em divisão passam por uma seqüência regular e repetida de eventos, conhecida como ciclo celular (Stillman, 1996). Este processo é a base fundamental da hereditariedade, crescimento e desenvolvimento do ser vivo, portanto, assegura a duplicação exata do material genético e posterior distribuição das cromátides irmãs para as células filhas (Mironov *et al.*, 1999). O ciclo celular é dividido em interfase e mitose. A interfase precede a mitose e pode ser dividida em três fases: G₁, S e G₂. A mitose (M) corresponde ao processo de separação dos cromossomos duplicados para cada célula resultante e juntamente com a citocinese - processo que divide a célula em duas novas células - compõem a fase M (Elledge, 1996). Além destas fases, existe a fase G₀ onde o ciclo sofre uma pausa e a célula entra em repouso (figura 1) (Pardee, 1989). Para monitorar a progressão do ciclo celular, existe um mecanismo bioquímico denominado ponto de checagem (*checkpoint*) (Wassmann e Benezra, 2001). Este é um importante sistema regulatório que controla a ordem e o tempo dos principais eventos ocorridos nas fases e assegura que eventos críticos sejam efetuados corretamente. Caso isto não ocorra, há uma paralisação do ciclo. Os pontos de checagem identificados são: no final de G₁, no final da fase S, na transição G₂-M, na transição metáfase-anáfase e na saída da fase M (figura 1).

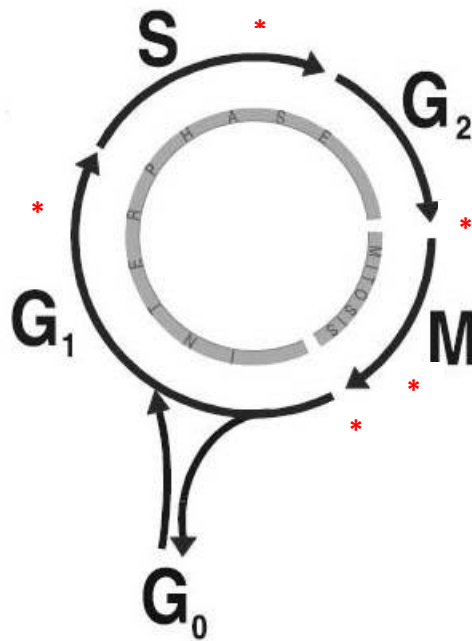


Figura 1: Representação esquemática das fases do ciclo celular. O símbolo * representa os pontos de checagem. No final de G_1 a célula opta por entrar numa nova rodada do ciclo; no final de S a célula verifica se o DNA foi duplicado corretamente; na transição G_2 -M a célula verifica se o ambiente está favorável para a divisão celular com a completa duplicação dos cromossomos; na transição metáfase-anáfase a célula inibe a separação das cromátides até que todos os cinetócoros estejam unidos aos microtúbulos; na saída de M a célula decide retornar ao ciclo celular ou pára e fica num estado quiescente (G_0).

Durante a fase G_1 , a célula monitora o seu tamanho e checa se o ambiente está favorável para a duplicação do DNA. Em plantas, a célula dobra de tamanho, as organelas aumentam em número, aumenta a síntese protéica e o núcleo começa a migrar pra o centro da célula. A célula em G_1 pode entrar em um estado quiescente por tempo indeterminado (fase G_0) ou progredir ao longo do ciclo. Na fase G_0 , a célula possui um tamanho menor, diminui a síntese de macromoléculas e ocorre a redução da atividade metabólica, quando comparadas as células em proliferação (Pardee, 1989)

Na fase S ocorre a replicação do material genético e a síntese de proteínas associadas ao DNA, principalmente histonas. Todo o genoma deve ser duplicado apenas uma vez durante cada fase S do ciclo celular e se houver algum erro durante

esse processo, ou seja, uma falha na replicação do DNA ou ocorrer reduplicação do DNA, isso poderá resultar numa mitose anormal ou numa amplificação do DNA. Como esses eventos são raros, fica claro que os processos que coordenam o início da replicação em milhares de sítios no genoma são precisamente regulados para prevenir qualquer tipo de falha (Leno *et al.*, 1992, Stillman, 1996).

A fase G_2 é uma fase de controle, permitindo à célula checar se todo o material genético foi duplicado corretamente, antes de prosseguir para a próxima etapa. Os cromossomos começam a se condensar e ocorre a finalização da duplicação do par de centríolos. A fase M (figura 2) é dividida em cinco fases distintas: Prófase, Prometáfase, Metáfase, Anáfase e Telófase e culmina na divisão celular ou citocinese. Na Prófase os cromossomos gradualmente condensam-se e permanecem ainda difusos no citoplasma. Na Prometáfase ocorre a maturação dos cinetócoros e fixação dos microtúbulos nos mesmos, proporcionando o tensionamento dos cromossomos. Na Metáfase há o alinhamento dos cromossomos na placa equatorial. Na Anáfase, os cinetócoros de cada cromossomo separam-se, permitindo a movimentação das cromátides irmãs para os pólos opostos. Na Telófase os envoltórios nucleares são organizados ao redor de cada conjunto cromossômico e os mesmos tornam-se novamente filamentos finos (Pidoux e Allshire, 2000; Alberts, 1994). Em plantas, durante a citocinese, os microtúbulos organizam-se formando o fragmoplasto entre os dois núcleos filhos. A placa celular é formada na região equatorial do próprio fragmoplasto e com o decorrer do tempo atinge a parede celular da célula mãe (Assaad, 2001).

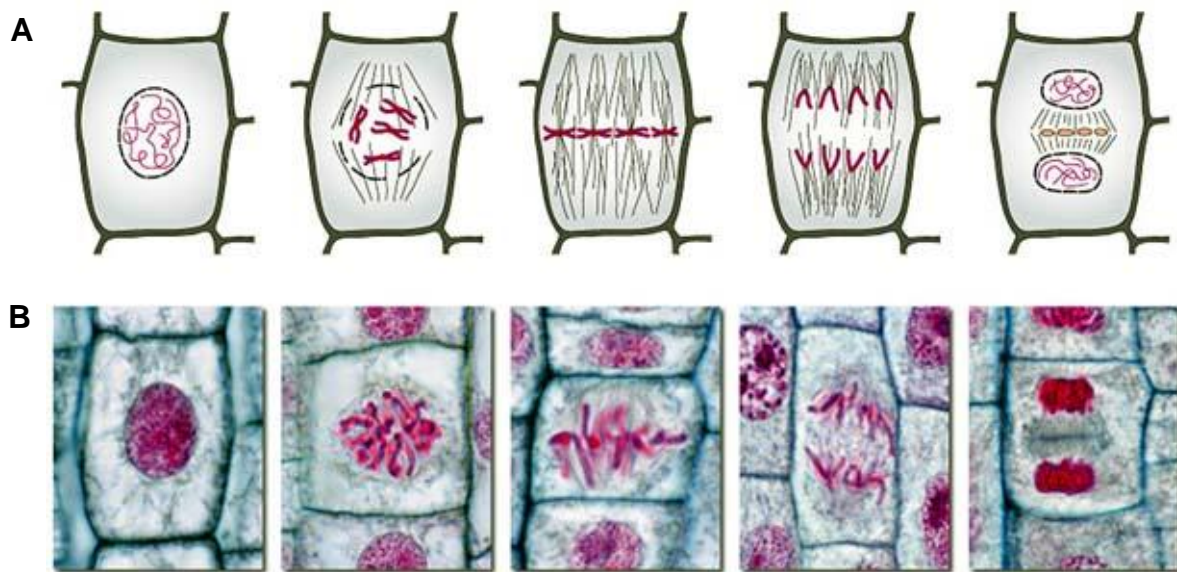


Figura 2: Representação da fase M em uma célula vegetal eucariótica. A) Desenho esquemático da mitose (Prófase, Prometáfase, Metáfase, Anáfase e Telófase). B) Imagens por microscopia de células vegetais em diferentes etapas da mitose (Retirado do domínio <http://www.sep.alquds.edu>).

1.2 Controle do ciclo celular vegetal

O ciclo celular está relacionado com o modelo de formação de cada organismo. Plantas possuem características particulares no seu crescimento, modelo de desenvolvimento e arquitetura do corpo. Em contraste com os animais, a organogênese das plantas superiores se inicia no final da embriogênese, sendo mantida durante todo o desenvolvimento pós-embriônico. A formação de novos órgãos, como raízes laterais, caule, folha ou flores, e a determinação da especificidade do tecido é prolongada durante toda a vida da planta. Este desenvolvimento contínuo dos órgãos necessita de constante coordenação da proliferação com os vários programas de diferenciação e devem estar perfeitamente integrados com os mecanismos que regulam a atividade mitótica diferencial dos meristemas, para construir estruturas ordenadas (Lyndon, 1992; Hemerly, *et al.*, 1999; Meyerowitz, *et al.*, 2002). Estudos de desenvolvimento vegetal sugerem que o

ciclo celular é adaptável, e que estratégias distintas de controle podem ser usadas. Devido ao seu estilo de vida sésstil, plantas respondem as condições ambientais do meio pela mudança na sua fisiologia e redirecionamento do seu crescimento. Sinais do ambiente que influenciam o ciclo celular das plantas incluem: luz, ataque de patógenos, temperatura, água, nutrientes, contato e gravidade. Além disso, nas respostas celulares ao ambiente, alguns estímulos são transmitidos através da planta pelos hormônios, os quais possuem importante papel no controle do crescimento e desenvolvimento da planta. (Doerner, *et al.*, 1996; Hemerly, *et al.*, 1993; Ferreira, *et al.*, 1994).

A transição de uma fase do ciclo celular para outra ocorre de maneira ordenada e é regulada principalmente por duas famílias de proteínas: as quinases dependentes de ciclinas (Cyclin-Dependent Kinases - CDK) e as ciclinas (Cyclin - CYC) (Murray, 1993; Nurse, 1990; Hemerly *et al.*, 1999). As CDKs pertencem a uma classe especial de serina-treonina quinases que fosforilam proteínas diretamente relacionadas com a progressão do ciclo. Esta atividade quinásica depende da formação do complexo CDK-CYC, pois a CYC proporciona mudanças conformacionais no sítio catalítico da CDK e determina a especificidade ao substrato (figura 3) (Morgan, 1995).

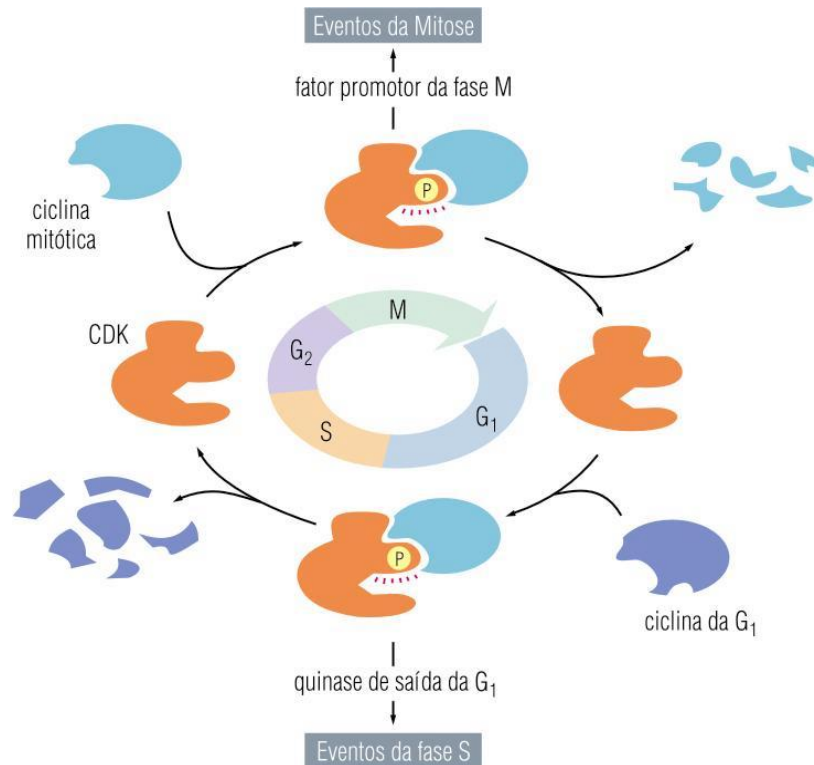


Figura 3: Atividade do complexo CDK-CYC durante as fases do ciclo celular. Uma vez ativa, as CDKs permitem a ocorrência de um determinado evento dentro do ciclo, por exemplo: duplicação do DNA ou eventos da fase M. Uma vez finalizado o evento, a atividade da CDK é inibida com a degradação da ciclina e em seguida, o ciclo celular passa para outra fase, onde um novo complexo CDK-CYC é formado e outro evento ocorre. (Retirada de Alberts *et al.*, 1994).

A atividade do complexo enzimático CDK-CYC é dependente de fosforilação, interações proteína-proteína, regulação transcricional e pós-transcricional, localização e proteólise (De Jager *et al.*, 2005, Dewitte e Murray, 2003). Para o complexo CDK-CYC se tornar ativo, a CDK precisa sofrer defosforilação dos resíduos Thr-14/Tyr-15 e fosforilação do resíduo Thr-160. A fosforilação do resíduo Thr-160 é catalisada pelas quinases ativadoras de CDK (*CDK-activating kinase* – CAK) e a defosforilação dos resíduos Thr-14/Tyr-15 por membros da família CDC25 (fosfatases) (Stals *et al.*, 2000). A fosforilação dos resíduos Thr-14/Tyr-15, ou seja, a inibição do complexo CDK-CYC é catalisada pelas enzimas WEE1 e MYT quinases. Outro método para inibir diretamente a atividade do complexo CDK-CYC é a ligação das proteínas inibitórias de CDK (*CDK-inhibitors* – CKI) (Sherr *et al.*, 1999). Estas

proteínas de baixo peso molecular dificultam a interação da CYC com a CDK correspondente. Outra família protéica, denominada subunidade da CDK (CDK-subunit – CKS), pode atuar na ativação ou inibição complexo CDK-CYC e auxilia no reconhecimento ao substrato (Dewitte e Murray, 2003).

Os níveis das CDKs e CYCs são mantidos por sofisticados mecanismos regulatórios (figura 4). A expressão dos genes das CDKs é praticamente constante ao longo do ciclo, só aumentando ligeiramente no período funcional da CDK (Joubès *et al.*, 2000). As CYCs apresentam comportamento diferente. Apresentam picos de expressão e tradução em determinados períodos do ciclo e depois são rapidamente degradadas por proteólise (Joubès *et al.*, 2000). Este comportamento assegura que a atividade quinásica do complexo CDK-CYC será restrita àquele período determinado do ciclo.

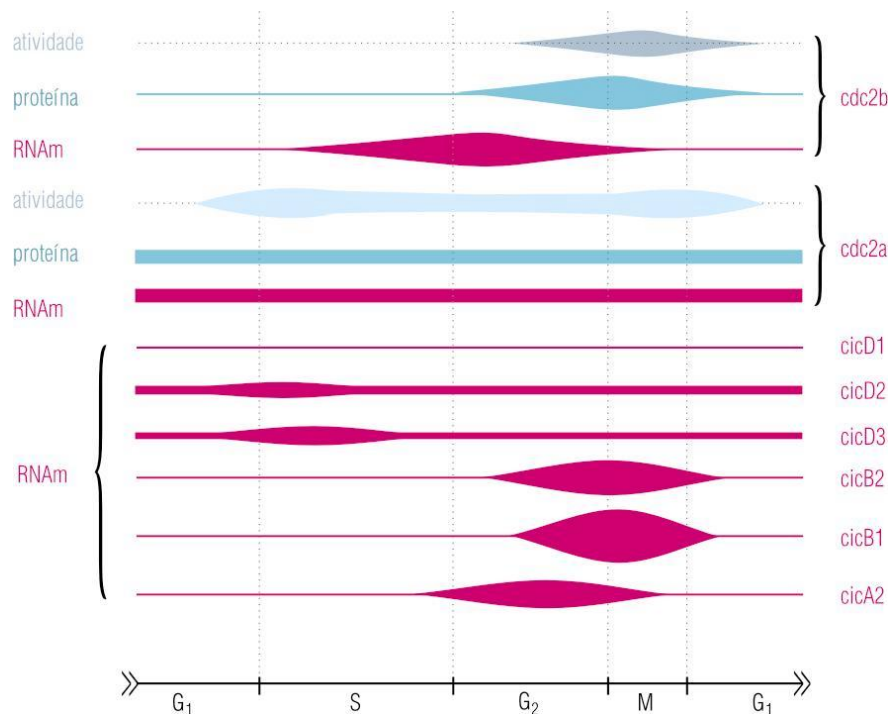


Figura 4: Controle do ciclo celular em *A. thaliana*. A expressão das CYCs (CIC), CDKs (CDC2a/CDKA e CDC2b/CDKB) e as atividades das CDKs de *A. thaliana* ao longo do ciclo celular (utilizando histona H1 como substrato para fosforilação). As áreas preenchidas refletem qualitativamente o nível de intensidade de RNAm, proteína ou atividade quinásica, conforme a indicação. (Retirada de Mironov *et al.*, 1999)

- CDKs em plantas

Baseado em estruturas primárias, CDKs em plantas foram classificadas em seis tipos: CDKA, CDKB, CDKC, CDKD, CDKE e CDKF (Joubés *et al.*, 2000; Vandepoele *et al.*, 2002). Recentemente, uma nova classe de CDK, denominada CDKG, foi encontrada (Menges *et al.*, 2005). Esta nova CDK possui homologia com a proteína quinase p58/GTA, membro da superfamília p34 (Cdc2) quinase.

A CDKA desempenha uma função importante nas transições das fases G₁-S e G₂-M. A superexpressão de dominantes negativos de CDKA de *Arabidopsis thaliana* em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) acarretou numa redução da taxa de divisão celular, diminuição do número de células e manutenção do tamanho das plantas. Entretanto, a razão G₁/G₂ continuou inalterada, corroborando com a observação da detecção de atividade da CDKA em ambos os pontos de checagem (Hemerly *et al.*, 1995; Porceddu *et al.*, 2001; Joubés *et al.*, 2004).

A CDK do tipo B é dividida em dois subgrupos: CDKB1 e CDKB2. Estes subgrupos foram encontrados tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas, sugerindo uma função única conservada na regulação do ciclo celular para cada um dos subgrupos (Corellou *et al.*, 2005). Transcritos de CDKB1 acumulam durante S, G₂ e M, enquanto a expressão de CDKB2 é específica para G₂ e M (Breyne *et al.*, 2002). A necessidade da atividade da CDKB1 durante a mitose foi demonstrada com um ensaio utilizando dominantes negativos. Este ensaio revelou que a redução na atividade da CDKB1 acarreta num aumento da razão 4C/2C, pois ocorre um bloqueio da transição G₂-M (Boudolf *et al.*, 2004).

As CDKs do tipo C e E são ortólogos das CDKs 9 e 8 de vertebrados, respectivamente. Suas funções no controle do ciclo celular ainda permanecem

obscuras. Entretanto, é sabido que as CDKCs interagem com a CYCT (Joubés *et al.*, 2001). Este complexo CDKC-CYCT atua na alongação da transcrição por fosforilar a RNA polimerase II e também fosforila a proteína retinoblastoma RBR (Barroco *et al.*, 2003; Fülöp *et al.*, 2005). Inibindo o RBR por fosforilação, as CDKCs podem controlar a diferenciação celular sob o estímulo adequado. A CDKE atua na expansão das folhas e no desenvolvimento floral (Fülöp *et al.*, 2005).

As CDKs do tipo D e F são também chamadas de CAKs (quinases ativadoras de CDK). As CDKDs são funcionalmente semelhantes às CAKs de vertebrados, mas a CDKF é específica de plantas (Vandepoele *et al.*, 2002; Umeda *et al.*, 2005). Somente as CDKDs são capazes de fosforilar a região C-terminal da RNA polimerase II (Yamaguchi *et al.*, 2003). Entretanto, a ativação do complexo CDKD-CYCH pela CDKF não é dependente de ciclina. Recentemente, foi demonstrado que a CDKF ativa as CDKDs de *Arabidopsis* através de fosforilação direta (Shimotohno *et al.*, 2004).

- CYCs em plantas

Pouco se sabe sobre a natureza das interações entre as CYCs e as CDKs. Esta falta de informação origina-se do fato de que plantas possuem muito mais CYCs do que outros organismos conhecidos (Vandepoele *et al.*, 2002). Apesar do genoma reduzido, *A. thaliana* possui pelo menos 32 CYCs com prováveis funções na progressão do ciclo celular. Em *A. thaliana* foram identificadas por anotação do genoma: 10 do tipo A, 11 do tipo B, 10 do tipo D e 1 do tipo H (Wang *et al.*, 2004). Além dessas, pelo menos outros 17 genes foram encontrados e classificados como CYCs do tipo C, P, L e T (Vandepoele *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). Um consenso

da literatura converge para algumas propriedades de certos tipos de ciclinas. As ciclinas do tipo D regulam a transição G_1 -S, as do tipo A transição S-M; e do tipo B regulam tanto G_2 -M quanto a fase M internamente (Breyne e Zabeau, 2001).

As CYCs contêm uma região conservada de \cong 250 aminoácidos chamada de núcleo da CYC (*CYC core*), o qual apresenta dois domínios: ciclina_N (*cyclin_N*) e ciclina_C (*cyclin_C*) (Wang *et al.*, 2004). O domínio ciclina_N possui \cong 100 aminoácidos e contém o sítio de ligação a CDK (também chamado de “*cyclin box*” e foi encontrada em todas as CYCs identificadas). O domínio ciclina_C é menos conservado e algumas CYCs, como as de G_1 e G_2 de humano, possuem o domínio ciclina_N, mas não o domínio ciclina_C. Além do núcleo central da CYC, existem dois motivos responsáveis pelo curso temporal das CYCs: a seqüência de destruição (*Destruction-box* – D-box) e a região PEST (região rica em resíduos de Pro(P), Glu(E), Ser(S) e Thr(T)) (Glutzer *et al.*, 1991; Nagakami *et al.*, 2002). A região PEST é encontrada em CYCs do tipo-D enquanto o D-box é encontrado em CYCs do tipo A e B. Estas seqüências de aminoácidos direcionam as CYCs para a proteólise via proteassomo 26S.

- Regulação por CKI

Durante o desenvolvimento vegetal, a célula pode executar diferentes programas do ciclo celular (Verkest *et al.*, 2005). Quando permanece no estágio proliferativo, o complexo CDKB-CYC fosforila a CKI denominada KRP (*Kip-related protein* – KRP), promovendo assim o direcionamento da KRP para proteólise. Além disso, esta fosforilação inibe a interação da KRP com a CDKA. À medida que as células vegetais diferenciam, a taxa de proliferação diminui e as células podem

trocar o ciclo celular completo por um ciclo de endoreduplicação (endociclo ou endoreplicação). Durante a endoreduplicação, o DNA é replicado sem subsequente mitose, elevando a poliploidia. Neste período, a atividade da CDKB diminui resultando na estabilização da proteína KRP. A KRP então se liga ao complexo CDKA-CYC não permitindo a entrada na mitose. Eventualmente, as células podem sair completamente do ciclo celular. Neste estágio, os níveis de KRP estão muito altos e inibem a atividade do complexo CDKA-CYC no final de G_1 e no início de M.

1.3 Ubiquitinação

O ciclo celular pode ser compreendido como uma série de reações bioquímicas reversíveis, os quais criam um problema fundamental: como se pode assegurar que a célula irá passar da fase B para C ao invés de retornar para a fase A? Como foi criada esta ordem? A solução encontrada foi a degradação de proteínas que foram necessárias no estágio anterior, cuja rápida proteólise proporciona um mecanismo irreversível que bloqueia um possível retorno, direcionando o ciclo para a próxima fase. Dois grandes complexos enzimáticos estão envolvidos diretamente na via de degradação de proteínas em eucariotos durante o ciclo celular: o complexo promotor da anáfase ou ciclossomo (*Anaphase-Promoting Complex or Cyclosome* – APC/C) e o Skp1/Culina/proteína com o sinal F (*Skp1/Cullin/E-box protein* – SCF) (Sudakin *et al.*, 1995; King *et al.*, 1995; Bai *et al.*, 1996). Ambos utilizam o sistema proteolítico ubiquitina-proteassomo 26S (*Ubiquitin-26S proteasome* – Ub-26S) para degradarem proteínas alvo (figura 5) (Hershko e Ciechanover, 1998).

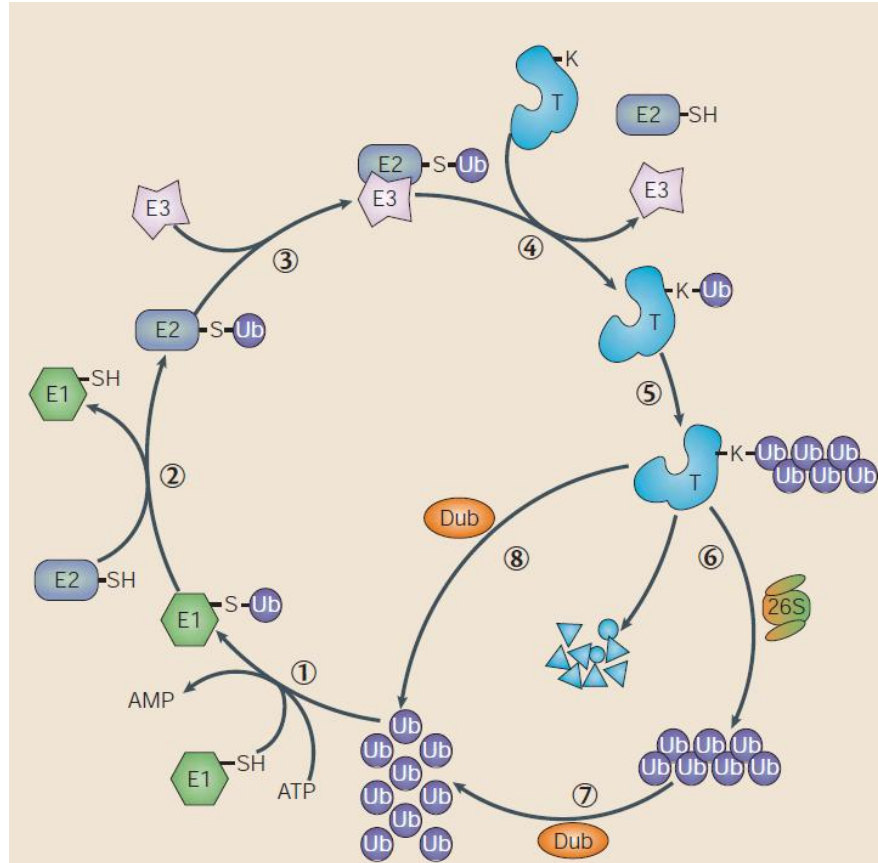


Figura 5: Ciclo ubiquitina 26S proteassoma (Ub-26S). E₁, enzima ativadora; E₂, enzima conjugadora; E₃, ubiquitina ligase; Ub, ubiquitina; T, proteína alvo; 26S, proteassomo 26S e DUB, enzima deubiquitinadora. O processo começa com a E₁, que forma uma ligação tioéster com a ubiquitina (1). Na etapa (2), a ubiquitina é transferida para a E₂ e novamente é formada uma ligação tioéster. A E₂ transfere a ubiquitina ativada para a E₃, a qual facilita a transferência da ubiquitina da E₂ para o resíduo de lisina na proteína alvo (3 e 4). Subseqüentes etapas de conjugação (5) adicionam cadeias de poliubiquitina na proteína alvo. As proteínas alvo poliubiquitinadas são direcionadas para o 26S proteassoma (6), onde as proteínas são degradadas e os monômeros de ubiquitina são recuperados pela ação da DUB (7). Eventos alternativos de ubiquitinação podem levar a uma regulação e não uma degradação. Neste processo, a ação da DUB é novamente importante para manter os níveis de ubiquitina livre constantes na célula (8). (Retirado de Sullivan *et al.*, 2003).

O processo de ubiquitinação inicia-se quando a enzima ativadora de ubiquitina (*Ubiquitin-activating* – E₁) hidrolisa ATP e forma uma ligação tioéster de alta energia entre o resíduo de cisteína e a região C-terminal da ubiquitina (Pickart, 2001). A ubiquitina “ativa” é transferida para a enzima conjugadora de ubiquitina (*Ubiquitin-conjugating* – E₂), formando a mesma ligação tioéster de alta energia com o resíduo de cisteína da E₂. Com a ajuda de uma terceira enzima, chamada de ubiquitina ligase (*Ubiquitin-ligase* – E₃), a ubiquitina é transferida da E₂ para o resíduo de lisina da proteína-alvo. Esta ligação amida é estável e permite que, ao longo do tempo,

mais moléculas de ubiquitina sejam adicionadas a proteína-alvo. A poliubiquitinação é importante, pois permite o reconhecimento do substrato pelo proteassomo 26S. As E₃s são componentes importantes do processo, porque determinam a especificidade ao substrato, recrutam a E₂ apropriada e contribuem para a atividade da E₂ (Ardley e Robinson, 2005). As principais E₃s que atuam no ciclo celular são os complexos APC e SCF (Vodermaier, 2004).

A abundância de proteínas como homologia de seqüência para componentes conhecidos da via ubiquitina-proteassoma em *A. thaliana*, ilustra o quanto é importante este sistema de degradação seletiva de proteínas nos vegetais. Tem-se especulado que um pouco mais de 5% (>1300 genes) do genoma de *A. thaliana* codifica para componentes com funções definidas nas vias Ub-26S. Isto inclui 16 genes para ubiquitina, dois genes da E₁, pelo menos 45 genes para E₂ e 54 para o 26S (23 para o núcleo 20S e 31 para a região regulatória 19S). Os genes restantes (>1200 genes) codificam para E₃s ubiquitina ligases (Yee e Goring, 2009). Em *Saccharomyces cerevisiae* existe uma única E₁, 13 E₂s e 82 E₃s (Hochstrasser, 1996). O grande número de genes para E₃s em *A. thaliana* em comparação aos outros componentes da via Ub-26S e até entre eucariotos, é um indicativo da importância da seletividade para a entrada na via de proteólise. Como é a enzima que interage com a proteína alvo, a diversidade das E₃s em eucariotos confere especificidade para o processo de ubiquitinação. As diversas E₃s podem ser divididas em várias famílias baseadas no mecanismo de ação (complexos APC ou SCF) e pela presença domínios específicos (RING, HECT e U-box) (figura 6) (Yee e Goring, 2009).

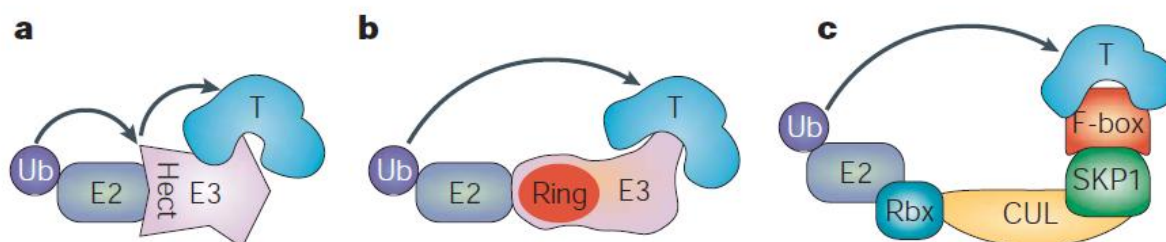


Figura 6: Ubiquitina E₃ ligase. (a) Consiste em uma única subunidade com peso típico > 100kDa com domínio HECT. A transferência da ubiquitina da E₂ para a proteína alvo passa pela E₃. (b) RING/U-box não participam diretamente da transferência da ubiquitina da E₂ para a proteína alvo, porém ajudam servindo como base para a correta interação entre a E₂ e a proteína. (c) SCF é composto por Rbx, uma proteína contendo o domínio RING que fornece a interação com a E₂. A especificidade do SCF pela proteína alvo é dada pela família F-box. O SCF ajuda no direcionamento da ubiquitina da E₂ para a proteína alvo. (Retirado de Sullivan *et al.*, 2003).

1.4 Complexo promotor da anáfase (APC)

O APC foi identificado como uma E₃, e um importante componente da maquinaria de destruição de CYCs, por dois grupos de pesquisa (Sudakin *et al.*, 1995; King *et al.*, 1995). Sudakin e colaboradores trabalharam com oócitos de molusco e isolaram um complexo de $\cong 1500$ kDa com capacidade de poliubiquitinar as CYCs do tipo A e B. O grupo o chamou de ciclossomo, pois sua propriedade de poliubiquitinar as CYCs era ativa na fase M e inativa na interfase. King e colaboradores trabalharam com extratos de ovos de *Xenopus laevis* e determinaram o valor de sedimentação do complexo em 20S. Este complexo também poliubiquitinava CYCs na presença de E₁ e E₂. Experimentos de imunoprecipitação indicaram a presença das proteínas CDC27 e CDC16 no complexo 20S. Por se tratarem de proteínas importantes para a mitose, tanto em humano quanto em leveduras, os autores preferiram adotar um novo nome: complexo promotor da anáfase (APC).

Sabe-se atualmente, que o APC não atua somente na degradação de CYCs (Peters, 2002). Além das CYCs do tipo A e B, proteínas quinases, inibidores da

anáfase, moléculas sinalizadoras, cofatores, proteínas do cinetócoro e proteínas com funções desconhecidas foram identificados como substratos dessa E_3 .

É possível que a complexidade do APC esteja relacionada com sua intrigante regulação. Esta complexidade é surpreendente, porque muitas outras E_3 s são compostas por uma ou por poucas subunidades, indicando que a atividade ubiquitina ligase não é necessariamente dependente do número de proteínas envolvidas (Peters, 2002). Isto sugere que o APC poderia ter outras funções fora do ciclo celular, não se limitando apenas ao controle da transição G_2 -M e/ou que as subunidades adicionais poderiam também exercer funções regulatórias.

1.5 Ativadores do APC

A ativação do APC, em determinadas etapas do ciclo, assim como a seleção e a ligação aos substratos são coordenadas por duas proteínas ricas em domínio WD-40: CDC20 e CDH1 (CCS52 em plantas). A ligação desses ativadores ao núcleo do APC é regulada durante o ciclo e é mediada por dois motivos: C-box (DR(F/Y)IPxR) localizado na região N-terminal e o motivo IR localizado na região C-terminal. Em células animais e em leveduras, a regulação do ciclo celular por CDC20 e CDH1 é diferente (figura 7). Em ambos, os níveis de CDC20 são controlados transcripcionalmente e por proteólise que resultam na síntese durante as fases S- G_2 e sua degradação no final da fase M. Por outro lado, os níveis de RNAm e da proteína CDH1 são constantes através do ciclo em leveduras. Em mamíferos, os níveis de RNAm de CDH1 flutuam durante o ciclo e apresentam um pico na mitose. Além disso, a proteína CDH1 medeia a própria degradação em G_1 . Ambas as proteínas, CDC20 e CDH1, contém muitos sítios para fosforilação dependente de

CDK. O complexo CDK-CYCB possui função antagonista na regulação do APC^{CDC20} e APC^{CDH1}. A fosforilação de subunidades do APC é necessária para sua ativação por CDC20, enquanto a fosforilação do CDH1 previne a formação do complexo APC^{CDH1} e leva a translocação deste complexo do núcleo para o citoplasma. A atividade quinásica do complexo CDK-CYCB é suprimida antes da mitose por fosforilação dos resíduos Thr14 e Tyr15 da CDK (Morgan, 1997). Estes resíduos são fosforilados pelas WEE1 e MYT1 e defosforilados por membros da família CDC25. No final da fase G₂, o estoque de CDK-CYCB inativo é ativado abruptamente pela CDC25, e CDC25 é ativada pela PLK1 assim como por CDK-CYCB numa retroalimentação positiva. O complexo CDK-CYCB ativado também regula negativamente a si próprio por estimular o APC^{Cdc20} através de fosforilação das subunidades CDC16, CDC23, CDC27 do APC (Shteinberg e Hershko, 1999; Kramer *et al.*, 2000). O APC também é fosforilado e ativado por PLK1 e inativado pela PKA (Golan *et al.*, 2002; Kotani *et al.*, 1999). Entretanto, a fosforilação de CDC20 por CDK-CYCB é necessária para a ativação de APC/C^{CDC20} (Kotani *et al.*, 1999). Portanto, CDK-CYCB viabiliza sua própria destruição estimulando APC^{CDC20} numa retroalimentação negativa. Em contraste, fosforilação do CDH1 por CDK-CYCB altera sua conformação e previne sua ligação ao APC (Kotani *et al.*, 1999; Zachariae e Nasmyth, 1998). Esta inibição do APC^{CDH1} por CDK-CYCB durante a mitose é importante para a subsequente ativação de APC^{CDH1} após a mitose.

Análises do CDC20 em plantas permanecem ainda inexploradas. O ativador CDH1, denominado CCS52 em plantas, já apresenta alguns dados na literatura. Já foram encontrados e analisados em *Medicago truncatula* e em *A. thaliana* (Fülöp *et al.*, 2005). MtCCS52A é um ortólogo do CDH1 de levedura. A superexpressão do MtCCS52A em leveduras resulta numa inibição do crescimento, alongação das

células e ciclos de endoreduplicação, devido alteração no padrão de degradação da CYC mitótica. Análises funcionais da proteína MtCCS52A levaram a descoberta de outro motivo conservado (YxxLL(K/R)xxLFC) em ativadores do tipo CDH1, denominado CSM (CDH1 specific motif – motivo específico para CDH1). Este motivo é essencial para interação do ativador CCS52A com o APC. O genoma de *A. thaliana* contém três genes CCS52, AtCCS52A1, AtCCS52A2 e AtCCS52B; e seis genes CDC20 (Fülöp *et al.*, 2005). Com base nesses dados oriundos da anotação do genoma de *A. thaliana*, podemos notar um aumento no número de ativadores em plantas em comparação com outros organismos. Estudos de expressão indicam que os níveis de RNAm dos ativadores AtCCS52A1 e AtCCS52A2 aumentam durante a transição G₁-S e diminuem durante G₂. O contrário é visto com AtCCS52B, onde seus níveis aumentam em G₂ e diminuem em G₁.

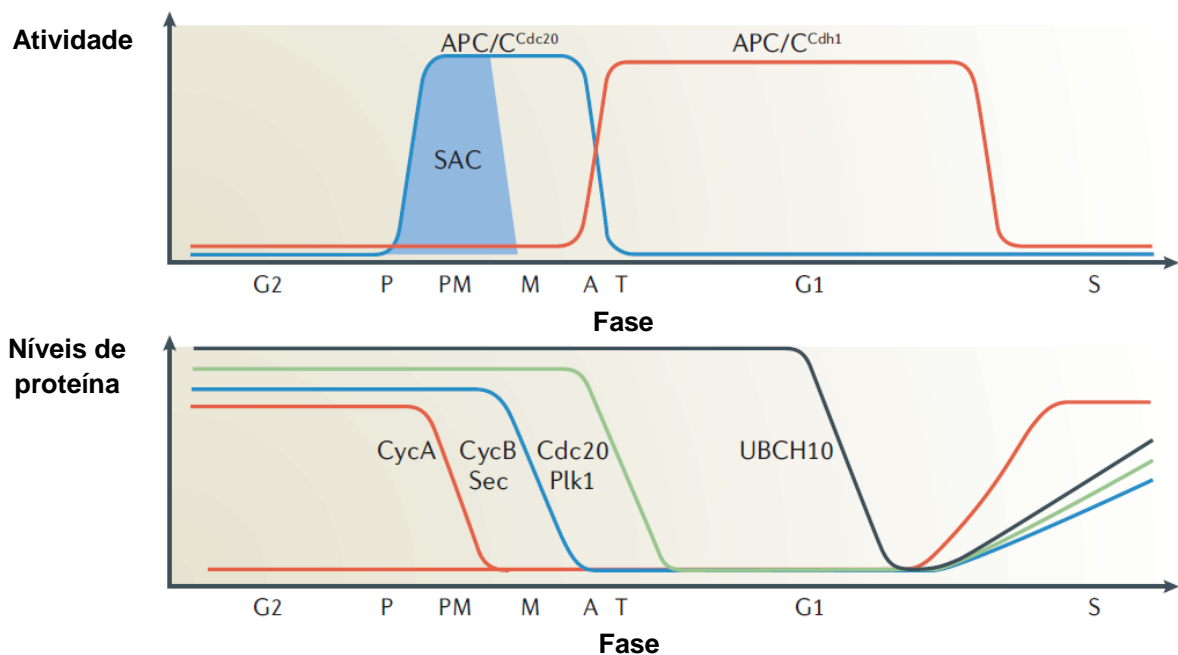


Figura 7: Ativação do APC por CDC20 ou CDH1 durante o ciclo celular. APC^{CDC20} é montado na prófase (P) e inicia a degradação da CYCA já na prometáfase (PM). A proteólise da CYCB e do inibidor da separase, securina (SEC), dependem do complexo APC^{CDC20}. Um possível atraso na metáfase (M) é normal até que o ponto de checagem do fuso mitótico (SAC) forneça sinais de regularidade na progressão. Durante a anáfase (A) e a telófase (T), APC^{CDH1} está ativo. Este complexo contribui para a degradação da securina e da CYCB; e medeia a destruição de substratos adicionais como PLK1 e CDC20. Isto leva a inativação do APC^{CDC20}. Em G₁, APC^{CDH1} medeia a destruição da E₂ (UBCH10) e, portanto, permite que ocorra o acúmulo de CYCA. Acúmulo de CYCA contribui para a inativação do APC^{CDH1} na transição G₁-S. (Retirado de Peters, 2006)

1.6 Substratos do APC

- Proteólise de CYCs

O APC foi inicialmente descoberto com uma E₃ ubiquitina ligase que é essencial para destruição da CYCB na mitose. Este processo é iniciado na metáfase e é fundamental para inativação da CDK e subsequente saída da mitose. O início da proteólise da CYCB depende da formação do complexo APC^{CDC20}. O APC^{CDC20} adiciona ubiquitina em resíduos de lisina da CYCB em uma aparente maneira não seletiva; CDK que não sofre nenhuma modificação por ubiquitinação perde a afinidade pela CYCB. A CYCB marcada, pela adição de ubiquitina, é encaminhada para degradação via 26S proteassoma. Uma vez isolada de uma CYC, a CDK muda de conformação e não consegue mais hidrolisar ATP, resultando na completa inativação da mesma. Esta situação permite que proteínas fosfatases defosforilem substratos anteriormente fosforilados pelo complexo CDK-CYCB sem que haja um ciclo fútil. A defosforilação é um pré-requisito para a desmontagem do fuso mitótico, a diminuição da condensação dos cromossomos, formação do envelope nuclear e o início da citocinese.

A instabilidade das CYCs do tipo A e B é conferida por uma pequena seqüência na região N-terminal denominada D-box (Rxx_aLx_bxx_cxN, onde x_a freqüentemente é A ou V, x_b freqüentemente é G e x_c freqüentemente é I ou L) (Glotzer *et al.*, 1991). A ausência ou mutações do D-box inibem drasticamente a proteólise dessas CYCs. Vale ressaltar que a proteína CDC20 não interage com o D-box dos substratos e a falta de outros componentes da via Ub-26S proteassomo inibe a degradação das CYCs (Yamano *et al.*, 2004). Um mutante nulo para a E₂

não apresenta degradação das CYCs do tipo A e B (Townley *et al.*, 1997). Um segundo motivo de degradação é conhecido como KEN-box (Pfleger e Kirschener, 2000). Fica localizado predominantemente na região N-terminal dos substratos e apresenta a seguinte assinatura: KENxxx(E/N/D). A própria proteína Cdc20 de humanos possui KEN-box em sua seqüência. Recentemente foi descrito um novo motivo de degradação via Ub-26AS, denominado A-box (PSxxxQRVxxQ) (Littlepage *et al.*, 2002). Foi encontrado na proteína Aurora-A durante estudos com o complexo APC^{CDH1}.

- Separação das cromátides

A mais conhecida e possivelmente a mais importante função do APC é a promoção da anáfase (como está descrito em seu próprio nome). Para permitir a segregação dos cromossomos e cumprir um de seus objetivos, a coesão das cromátides irmãs precisa ser removida (figura 8). Durante a metáfase, APC^{CDC20} inicia este processo por ubiquitinação da securina, uma pequena proteína que funciona como um inibidor da protease separase. Uma vez ativada, a separase cliva a coesina e isto resulta na separação das cromátides. Embora a destruição da securina seja essencial para a ativação da separase, em leveduras, cultura de células humanas e até camundongos podem viver sem a securina (Yamamoto *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001). Uma possível explicação seria a existência de um mecanismo independente da securina que controle a atividade da separase. Um mecanismo pode ser a fosforilação da separase e subsequente associação com o complexo CDK-CYCB, no qual seria suficiente para a inibição da separase em extratos de ovos de *Xenopus laevis* (Stemmann *et al.*, 2001; Gorr *et al.*, 2005).

APC^{CDC20} pode contribuir para a ativação da separase por ubiquitar ambas as proteínas securina e a CYCB. Durante o ponto de checagem do fuso mitótico, proteínas específicas atuam inibindo o prosseguimento da anáfase caso haja algum erro na separação das cromátides. Esta inibição se dá pela inativação do complexo APC^{CDC20} até que o problema seja de alguma forma solucionado. Fazem parte deste complexo inibidor do cinetócoro: Bub1, Bub3, Mad1, Mad2, Mad3 e MPS1 (Chan *et al.*, 2005). A ordem e a natureza das interações durante o ponto de checagem ainda não foram totalmente elucidados (Hoyt, 2001). Foi demonstrado que Mad2 se liga a Cdc20 e previne a formação do complexo APC/C^{Cdc20} (Chan *et al.*, 2003). Isto pode levar à paralisação do ciclo durante a anáfase.

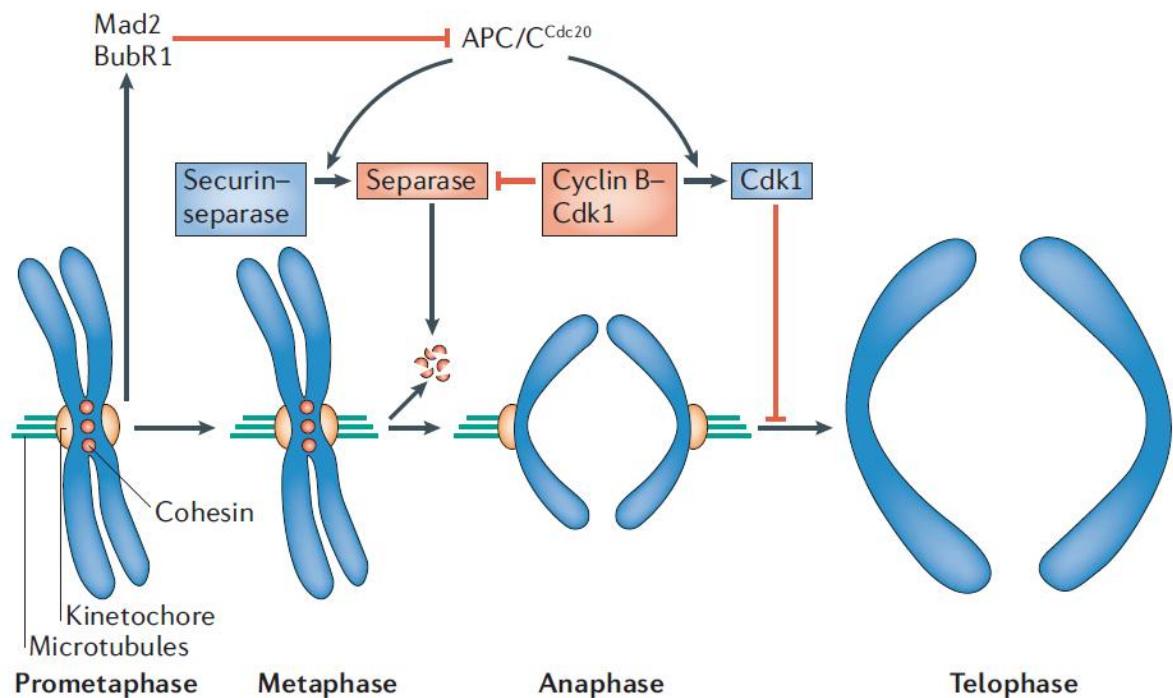


Figura 8: Regulação na mitose pelo APC/CDC20. Durante a prometáfase, proteínas do ponto de checagem do fuso, Mad2 e BubR1, estão ativas nos cinetócoros que não estão presos, firmemente, aos microtúbulos (feixes verdes). MAD2 e BubR1 inibem a capacidade de APC^{CDC20} de ubiquitar a securina e a CYCB e, portanto, previne a anáfase e saída da mitose. Na metáfase, quando os cinetócoros estão presos aos microtúbulos, APC^{CDC20} ubiquitina a securina e a CYCB. Isto promove a ativação da separase e inativa a CDK. A separase cliva a coesina e inicia-se a separação das cromátides. A inativação da CDK leva a defosforilação dos substratos por fosfatases e a saída da mitose. (Retirado de Peters, 2006).

- Retorno a G₁ e progressão no ciclo

Semelhante ao APC^{CDC20}, APC^{CDH1} é regulado e atua degradando substratos específicos durante a mitose. Começando pelo CDC20 e PLK1; e terminando pela marcação de Aurora-A e B no final da fase G₁. A destruição de proteínas via APC^{CDH1} é importante para finalizar a mitose, iniciar a fase G₁ e comprometer a célula com a fase S. No início da fase S, APC^{CDH1} está inativo pela ligação do inibidor Emi1 com CDH1, resultando na estabilização da ciclina A. Esta ativação da ciclina A - associada à CDK - acarreta numa progressão coordenada do ciclo celular na transição G₁/S. Uma falta de coordenação na transição G₁/S pode levar a uma entrada prematura na fase de replicação do DNA (Ezhevsky *et al.*, 2001).

A superexpressão de PLK1 e Aurora-A levam a anormalidades no centrôssomo, indicando que a destruição dessas proteínas em G₁ é essencial para a sincronização do ciclo celular e para duplicação do centrôssomo (Nguyen *et al.*, 2005). Durante a transição G₁-S, a proteína retinoblastoma (RB) é um regulador negativo da progressão do ciclo e foi demonstrado, recentemente, interação do APC com tal proteína (Binné *et al.*, 2007). O ativador CDH1 não somente interage com RB, mas também é necessário para a paralisação do ciclo induzida por RB. Estes dados sugerem uma regulação mediada por uma E₃ ligase no complexo RB/E2F.

- Outros substratos

Existem, todavia, muitos outros substratos do APC. Estes outros alvos incluem outras CYCs, subunidades regulatórias de quinases, quinases e proteínas acessórias (tabela 1). Uma proteólise importante na fase M é a da geminina (Bell,

2002). A degradação da geminina libera CDT1 do complexo Gemina-CDT1 e isto resulta no início da organização do complexo pré-replicativo. O complexo pré-replicativo atuará na fase S promovendo duplicação do genoma. Em plantas, até o presente momento, não foi encontrado um ortólogo para a geminina.

Tabela 1. Substratos mitóticos do APC.

Substrato	Início da degradação	APC ativo	Referência
CYCA	Prófase	APC ^{CDC20} (antes da mitose); APC ^{CDH1} (G ₁)	Geley <i>et al.</i> , 2001
Nek2A	Prófase	APC ^{CDC20}	Hames <i>et al.</i> , 2001
CYCB	Metáfase	APC ^{CDC20} e APC ^{CDH1}	King <i>et al.</i> , 1995
Securina	Metáfase	APC ^{CDC20} e APC ^{CDH1}	Jeganathan <i>et al.</i> , 2005
Xkid	Metáfase	APC ^{CDC20} e APC ^{CDH1}	Antonio <i>et al.</i> , 2000
Prc1	Metáfase	APC ^{CDH1}	Juang <i>et al.</i> , 1997
Kip1	Metáfase	APC ^{CDC20}	Gordon e Roof, 2001
Cin8	Metáfase	APC ^{CDH1}	Hildebrandt e Hoyt, 2001
Tpx2	Anáfase	APC ^{CDH1}	Stewart e Fang, 2005a
Plk1	Antes da saída da mitose	APC ^{CDH1}	Lindon e Pines, 2004
Aurora-A	Antes da saída da mitose	APC ^{CDH1}	Littlepage e Ruderman, 2002
Cdc20	Antes da saída da mitose	APC ^{CDH1}	Pfleger e Kirschener, 2000
Aurora-B	Antes da saída da mitose	APC ^{CDH1}	Stewart e Fang, 2005b
Anilina	Antes da saída da mitose	APC ^{CDH1}	Zhao e Fang, 2005

(Adaptado de Peters, 2006)

1.7 Subunidades do APC

O APC é uma E_3 que tem sido extensamente estudada, desde leveduras até plantas (figura 9). Entretanto, pouco se sabe sobre o número total de subunidades por organismo e suas funções dentro ou fora do complexo APC. O número de subunidades identificadas em *S. cerevisiae* e *Homo sapiens* é 13 e 12 respectivamente (tabela 2) (Yoon *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 2003; Passmore *et al.*, 2005). Em *S. cerevisiae* existem duas subunidades, APC9 e Mnd2, que não apresentam ortólogos em humanos. A subunidade APC7 não é encontrada em levedura. Já em *A. thaliana*, as subunidades APC9 e Mnd2 não foram identificadas (tabela 2) (Capron *et al.*, 2003a; Fülöp *et al.*, 2005). Porém, foram identificados dois genes homólogos ao CDC27 de humano: AtCDC27A e AtCDC27B. Nosso grupo isolou os genes já descritos do complexo APC em *A. thaliana* e realizou experimentos sobre níveis de expressão em alguns tecidos, interação *in vitro* e interação *in vivo* utilizando o sistema de duplo-híbrido em leveduras (Eloy *et al.*, 2006). Este trabalho serviu como base para os estudos de algumas subunidades do APC e revelou a natureza conservada das interações entre as subunidades desde levedura até plantas.

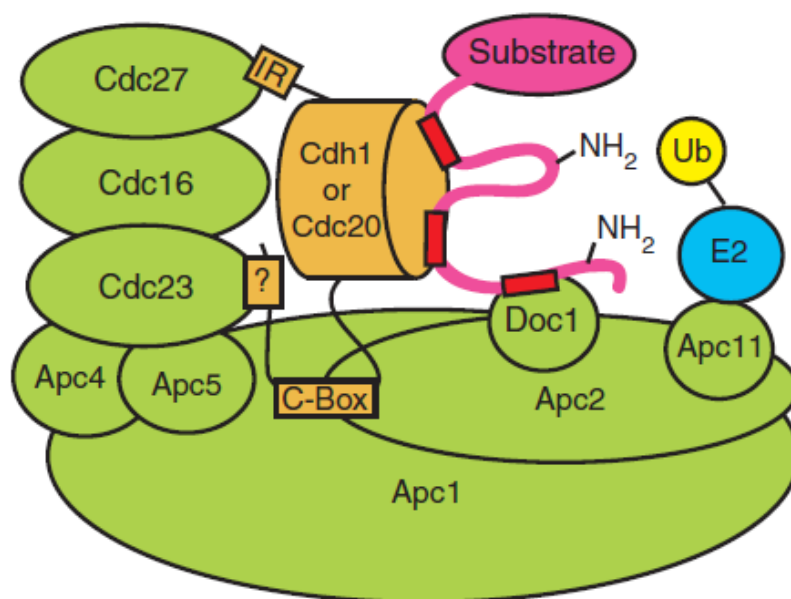


Figura 9: Modelo de ubiquitinação via APC. O substrato se liga tanto ao ativador quanto ao APC usando seqüências de degradação (retângulos vermelhos). A posição do substrato no núcleo do APC possibilita que múltiplas lisinas sejam alvo de ataque da E2-Ub. Resíduos próximos a E2 promovem a catálise, que é estimulada pela ligação ao APC. Algumas subunidades foram ocultadas para possibilitar uma melhor visualização do complexo. (Retirado de Matyskiela *et al.*, 2009)

Tabela 2. Subunidades do APC. NI, subunidade não identificada; -, motivo não encontrado.

<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. thaliana</i>	Motivo estrutural
APC1/TSG24	Apc1	APC1	Rpn1 e Rpn2
APC2	Apc2	APC2	Culina
CDC27/APC3	Cdc27	CDC27B/HOBBIT	TPR
NI	NI	CDC27A	TPR
APC4	Apc4	APC4	WD-40
APC5	Apc5	APC5	TPR
CDC16/APC6	Cdc16	CDC16/NOMEGA	TPR
APC7	NI	APC7	TPR
CDC23/APC8	CDC23	CDC23	TPR
NI	Apc9	NI	-
DOC1/APC10	DOC1	APC10	DOC
APC11	Apc11	APC11	RING-H2
CDC26	Cdc26	CDC26	-
APC13	Swm1/Apc13	APC13	-
NI	Mnd2	NI	-

Recentemente, dados relativos a estequiometria do APC mostraram que algumas subunidades estão presentes em mais de uma cópia (Passmore *et al.*, 2005). O APC de *Xenopus*, levedura e humano apresentam variações no número de cópias das subunidades e isto está diretamente relacionado com as diferenças de massa dos complexos purificados (1500 -1700KDa) (Dube *et al.*, 2005; Passmore *et al.*, 2005).

A maior subunidade do APC, APC1, possui uma região de alta homologia com as proteínas Rpn1 e Rpn2, que fazem parte da região de reconhecimento de substratos ubiquitinados do 26S proteassoma (Jørgensen *et al.*, 2001). Em *Xenopus*, mutantes da proteína XIAPC1 ficam paralisados na metáfase, acarretando um fenótipo semelhante aos mutantes XICDC27 (Peters *et al.*, 1996). As subunidades XICDC16, XICDC23 e XICDC27 interagem com a subunidade XIAPC1, sugerindo que esta subunidade seja um ancoradouro para os outros componentes do APC/C (Peters *et al.*, 1996). Em *Drosophila melanogaster*, mutações no gene DmAPC1 afetam o desenvolvimento dos olhos por causar uma paralisação em G₁ (Tanaka-Matakatsu *et al.*, 2007).

A subunidade APC2 contém o domínio culina e interage fortemente com a subunidade APC11, que contém o domínio RING-H2. Em combinação com as E₂s Ubc4 ou Ubch10, o heterodímero APC2-APC11 é suficiente para catalisar a ubiquitinação das CYCs do tipo B e securinas humanas (Tang *et al.*, 2001). Entretanto, este pequeno núcleo APC2-APC11 não possui especificidade ao substrato durante o processo de ubiquitinação. Muitas E₃s, incluindo APC e SCF, apresentam este modelo caracterizado pela presença de proteínas contendo os domínios RING e culina (Passmore, 2004). Em humanos, a proteína CDH1 interage com a região do APC onde o HsAPC2 está localizado (Dube *et al.*, 2005). Isto

confirma a hipótese de que o domínio culina do HsAPC2 é necessário para a atividade catalítica do APC. O uso de anticorpo anti-HsAPC2 inibe a poliubiquitinação de substratos específicos do APC (Dube *et al.*, 2005). Em *A. thaliana*, o gene AtAPC2 é capaz de complementar parcialmente leveduras mutantes termo-sensíveis (*apc2^{ts}*) e a proteína AtAPC2 interage fortemente com as subunidades AtAPC11 e AtAPC8/AtCDC23 (Capron *et al.*, 2003b). As plantas com gene AtAPC2 mutado (T-DNA) não apresentam paralisação na metáfase, porém foram detectados problemas na gametogênese feminina (Capron *et al.*, 2003b).

As subunidades CDC16, CDC23, CDC27, APC5 e APC7 contêm o motivo estrutural TPR (TetratricoPeptide Repeat) (Sikorski *et al.*, 1991). O motivo é caracterizado pela repetição de 34 aminoácidos em regiões variáveis da proteína. Apesar da seqüência de 34 aminoácidos ser degenerada, o motivo estrutural gerado é conservado (D'Andrea *et al.*, 2003). O motivo TPR é encontrado em proteínas com funções diversas e aparentemente está relacionado com a interação proteína-proteína. Em levedura, ScCDC16, ScCDC23 e ScCDC27 formam um complexo, e mutantes para cada subunidade ficam paralisados em metáfase (Sikorski *et al.*, 1990; Lambe *et al.*, 1994; Heichman e Roberts, 1996). Em *A. thaliana*, mutantes para o gene AtCDC16/Nomega (T-DNA) possuem embriões incapazes de degradar a CYCB. Já em *Medicago truncatula*, MtCDC16 é um regulador importante na formação de raízes laterais e nódulos (Kuppusamy *et al.*, 2009). Redução dos níveis de CDC16 em *A. thaliana*, utilizando RNAi, leva a uma diminuição do tamanho das células da epiderme foliar (Marrocco *et al.*, 2009). Mutantes AtCDC27B/Hobbit apresentam problemas no desenvolvimento das raízes laterais, expansão celular e respostas à auxina (Blilou *et al.*, 2002; Kwee e Sundaresan 2003; Serralbo *et al.*, 2006). Duplo mutantes para os genes AtCDC27A e AtCDC27B possuem gametas

não viáveis, indicando um mecanismo redundante para ambas as subunidades CDC27 durante a gametogênese (Pérez-Pérez *et al.*, 2008). Nosso grupo estudou a superexpressão do gene AtCDC27A em plantas de tabaco e constatou aumento de biomassa, reorganização do meristema, aumento no padrão de ubiquitinação, alterações dos níveis de expressão das CYCs do tipo A, B, D e da CDKA (Rojas *et al.*, 2009 - APÊNDICE XII). Esses dados comprovam que a subunidade AtCDC27A atua na regulação do crescimento da planta e pode alterar o padrão de ubiquitinação dependendo da sua concentração. Em células humanas, a subunidade CDC23 atua em conjunto com CDC27 para manter os níveis corretos e a instabilidade natural do ativador CDC20 (Prinz *et al.*, 1998). A regulação da transcrição também é alvo desta subunidade, visto que o inibidor de transcrição SIN1 interage na sua região N-terminal com o CDC23 e sua região C-terminal com proteínas envolvidas com a transcrição (Shpungin *et al.*, 1996). Isto sugere a uma função regulatória direta do APC ou somente desempenhada por uma subunidade, sem passar pela maquinaria de ubiquitinação. Em humanos, níveis baixos de APC7 está relacionado com tumores invasivos (Park *et al.*, 2005). Plantas de tabaco superexpressando AtCDC27A possuem níveis de RNAm aumentados de APC7, sugerindo uma harmonia estequiométrica do complexo TPR (Rojas *et al.*, 2009). Em tabaco, o APC7 (chamado de IVR-like) inibe a replicação viral e aumenta a sobrevivência das plantas (Akad *et al.*, 1999). Experimentos em nosso laboratório corroboram com tal dado e fortalecem a idéia da atuação do APC num possível sistema de defesa da planta, visto que algumas proteínas virais possuem subunidades do APC como alvo inibitório ou até o complexo em si (Teodoro *et al.*, 2004; Mo *et al.*, 2009). A subunidade APC5 de *A. thaliana* e humanos contém o domínio TPR com alta degeneração e baixa homologia quando comparado com outras subunidades TPR.

Mutantes do APC5 de *D. melanogaster* diminuem a degradação da CYCB, mas não apresentam o fenótipo característico de mutantes paralisados em metáfase (Bentley *et al.*, 2001). Isto corrobora com os dados que sugerem que o APC5 está comprometido com outros processos regulatórios. Em *S. cerevisiae* a E₃ Rsp5p interage com o ScAPC5 e ambos regulam o remodelamento da cromatina (Arnason *et al.*, 2005). Em humanos, HsAPC5 e HsAPC7 interagem diretamente com os coativadores CBP (Calmodulin-Binding Protein - CBP) e p300 (Turnell *et al.*, 2005). A interação estimula a atividade acetiltransferase e potencializa a transcrição dependente de CBP/p300.

A subunidade APC4 apresenta repetições do domínio WD40. Este mesmo domínio é encontrado nas proteínas ativadoras CDC20 e CDH1. Experimentos com *S. pombe* revelam uma localização celular da subunidade somente no APC, diferente do ScCDC23 que se encontra tanto no APC quanto no ambiente nuclear (Yamashita *et al.*, 1999). Mutantes do APC4 em *Caenorhabditis elegans* não realizam a anáfase I e os cromossomos permanecem sem segregarem (Furuta *et al.*, 2000).

A subunidade APC10/Doc1 possui o domínio DOC e foi identificada primeiramente em *S. cerevisiae* (Hwang *et al.*, 1997). Mutantes Doc1 (Destruction of Cyclin), embora não letais, apresentam um atraso no ciclo celular por degradarem baixas taxas de CYCB (Kominami *et al.*, 1998). Imunoprecipitação utilizando anticorpo anti-ScCDC16 co-sedimenta ScCDC23, ScCDC27 e Doc1 em levedura (Hwang *et al.*, 1997). O APC sem a subunidade Doc1 (APC^{ΔDoc1}) se liga a CDC20 ou CDH1 normalmente, porém enquanto o APC^{Cdh1} interage com CYCB o APC^{ΔDoc1} não reconhece o substrato (Passmore *et al.*, 2003). Doc1 reconhece o substrato através do D-box e auxilia no processo de ubiquitinação estimulando a taxa de incorporação

de ubiquitina (Carroll *et al.*, 2005). Provavelmente, reduzindo a velocidade de dissociação do substrato (Carroll *et al.*, 2002). A região C-terminal do APC10 de eucariotos contém o motivo IR que está relacionado diretamente com a interação com a subunidade HsCDC27 (Vodermaier *et al.*, 2003; Wendt *et al.*, 2001). Curiosamente, os ativadores CDC20 e CDH1 também possuem este motivo, sugerindo que as subunidades contendo TPR auxiliam no contato entre o APC10, proteínas ativadoras (CDC20 ou CDH1), E₂ e outras subunidades do APC (Vodermaier *et al.*, 2003). Em *A. thaliana*, a superexpressão de APC10 reduz o número de células com conteúdo 8C, 16C e 32C comparado ao controle (Marrocco *et al.*, 2009). Nosso grupo vem estudando a subunidade AtAPC10 tanto em *A. thaliana* quanto em tabaco. Dados experimentais indicam a que a superexpressão de AtAPC10 propicia um aumento da área foliar e conseqüente aumento de biomassa em tabaco.

A subunidade CDC26 foi identificada em *S. cerevisiae*, e o seu papel se manteve pouco estudado até recentemente (Hall *et al.*, 2003). Em *C. elegans*, uma pequena inibição via RNAi do gene CDC26 acarreta defeitos na polaridade celular do embrião, e uma forte inibição leva a uma paralisação na metáfase da meiose I (Dong *et al.*, 2007). Em *S. pombe* foi identificada interação entre CDC26 e CDC16 e em *S. cerevisiae* foi verificada a perda da subunidade CDC16 quando retirada a subunidade CDC26 (Yamada *et al.*; 1997; Thornton, *et al.*, 2006). Estes dados ajudaram a criar um modelo onde a subunidade CDC26 ajudaria na estabilização do complexo TPR (Wang *et al.*, 2009).

A subunidade Swm1/APC13 foi descrita em *S. cerevisiae* atuando na estabilização das subunidades CDC16 e CDC27 (Hall *et al.*, 2003) Em *A. thaliana*, BNS/APC13 está relacionado com o fenótipo “bonsai” quando regulado

epigeneticamente pelo alelo DDM1 através de modificações no padrão de metilação do DNA (Saze e Kakutani; 2007).

1.8 Genômica comparativa em plantas

O ciclo celular tem sido amplamente estudado em vários organismos e com o acesso recente a uma enorme quantidade de dados genômicos, deu-se origem a uma nova abordagem integrada chamada genômica comparativa. Nós cogitamos a possibilidade da análise comparativa de genomas para identificação de genes ortólogos em organismos importantes e estratégicos. Comparando o ciclo celular através das espécies, revelou-se que sua regulação é conservada evolutivamente. O melhor exemplo conhecido é o papel central das CYCs e quinases em todas as linhagens eucarióticas até agora investigadas. Curiosamente, a rede molecular diretamente relacionada com a atividade dos complexos CDK-CYC também é evolutivamente conservada (Doonan e Kitsios, 2009).

Para melhor analisar a diversidade dos genes do ciclo celular, utilizamos os genomas de plantas disponíveis, em especial das espécies que estão localizadas na base evolutiva das plantas: as algas. Estes são organismos com um mínimo de organização celular e possuem, de forma intrigante, um conjunto completo de genes do ciclo celular - CDKs, CYCs, CKS, RB, E2F, DP, DEL, CDC25 e Wee1 (Robbens *et al.*, 2005). Quando analisamos o APC e seus ativadores nas algas, encontramos o mesmo padrão de conservação, porém com algumas peculiaridades.

O desenvolvimento vegetal possui características particulares e tentar compreender este processo é de grande importância para a pesquisa biológica. Uma forma de desvendar como o desenvolvimento está sendo regulado nas plantas é

investigar como a maquinaria que controla o ciclo celular é regulada neste modelo. Através do estudo da holoenzima APC ou de cada subunidade do APC ou de subcomplexos do APC que atuam, principalmente, na transição G₂-M nos eucariotos, tentaremos compreender uma parte do desenvolvimento vegetal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais do projeto

Nosso grupo de pesquisa visa estudar o complexo promotor da anáfase (APC) em plantas, buscando entender os mecanismos envolvidos nas transições das fases do ciclo celular que levam a célula a eventos de diferenciação celular. O objetivo geral do meu trabalho consiste na caracterização das subunidades APC4, APC5 e APC10 de *A. thaliana*, bem como determinar a função dessas proteínas nos processos biológicos.

2.2 Objetivos específicos do projeto

- Análise evolutiva do APC e seus ativadores em plantas;
- Caracterização das plantas de tabaco AtAPC10OE, AtCDC27aOE e 10/27aOE sob estresse salino;
- Caracterização das plantas de tabaco AtAPC10OE, AtCDC27aOE e 10/27aOE sob estresse hídrico;
- Análise de parâmetros fotossintéticos das plantas de tabaco AtAPC10OE, AtCDC27aOE e 10/27aOE sob estresse hídrico;
- Análise das plantas de *A. thaliana* superexpressando as construções de microRNA artificial das subunidades AtAPC4 e AtAPC5 (amiRNA-AtAPC4 e amiRNA-AtAPC5);
- Análise do promotor do gene AtAPC5.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Hormônios e antibióticos

3.1.1 Hormônios para cultivo de *N. tabacum*

Hormônio	Solução estoque	Concentração final de uso na cultura de tecidos
AIA	10mg/mL	0,1µg/mL
6BA	10mg/mL	1µg/mL

3.1.2 Antibióticos para cultivo de *N. tabacum*

Antibiótico	Solução estoque	Concentração final de uso na cultura de tecidos
Kanamicina (Km)	50mg/mL	50µg/mL
Cefotaxima (Cf)	250mg/mL	250µg/mL

3.1.3 Antibióticos para seleção de bactérias transformadas

Antibiótico	Solução estoque	Concentração final	
		<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Ampicilina (Ap)	100mg/mL	100µg/mL	-
Cloranfenicol (Cm)	100mg/mL	34µg/mL	-
Espectinomicina (Sp)	50mg/mL	50µg/mL	100µg/mL
Estreptomicina (Sm)	100mg/mL	20µg/mL	300µg/mL
Gentamicina (Gm)	40mg/mL	5µg/mL	40µg/mL
Kanamicina (Km)	50mg/mL	50µg/mL	-
Rifamicina (Rf)	50mg/mL	100µg/mL	100µg/mL

3.2 Cepas de bactérias

- *Escherichia coli* DH5 α
- *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 Rf^R pMP90 Gm^R

3.3 Plantas

- *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col)
- *Nicotiana tabacum* variedade SR1
- *Oryza sativa* cultivar Nipponbare
- *Populus trichocarpa*

3.4 Meios de cultura

Todos os meios de cultura foram esterilizados por autoclavação durante 15 minutos a 120°C e 1 atmosfera.

3.4.1 Composição do meio LB (Luria-Bertani) para crescimento de *E. coli*

- Triptona 10g/L
- Extrato de levedura 5g/L
- NaCl 10g/L
- Ajustar para o pH 7,0 com NaOH 1M
- Para meio sólido, acrescentar ágar 1,5%

3.4.2 Composição do meio YEB (Yeast Extract Broth) para crescimento de *A. tumefaciens*

- Extrato de carne - 5g/L
- Extrato de levedura - 1g/L
- Peptona - 5g/L
- Sacarose - 5g/L
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - $2 \times 10^{-3}\text{M}$
- Ajustar para o pH 7,4 com NaOH 1M
- Para o meio sólido, acrescentar ágar 1,5%

3.4.3 Composição do meio MS (Murashige-Skoog) para cultivo de *N. tabacum*

- Sais de MS - 4,03g/L
- Sacarose - 30g/L
- Ajustar para o pH 5,7 com KOH 1M
- Para meio sólido, acrescentar ágar 0,8%

3.4.4 Composição do meio GM (Germination Medium) para cultivo de *A. thaliana*

- Sais de MS - 4,03g/L
- Sacarose - 30g/L
- MES - 0,5g/L
- Ajustar para o pH 5,7 com KOH 1M
- Para meio sólido, acrescentar ágar 0,8%

3.4.5 Composição da solução de Hoagland para cultivo de *O. sativa*

- KNO₃ - 202g/L
- Ca(NO₃)₂.4H₂O - 472g/L
- FeEDTA - 15g/L
- MgSO₄.7H₂O - 493g/L
- NH₄NO₃ - 80g/L
- KH₂PO₄ - 136g/L

Micronutrientes

- H₃BO₃ - 2.86g/L
- MnCl₂.4H₂O - 1.81g/L
- ZnSO₄.7H₂O - 0.22g/L
- CuSO₄ - 0.051g/L
- Na₂MoO₄.2H₂O - 0.12g/L
- Ajustar para o pH 6,0 com KOH 3M

3.5 Material vegetal e condições de crescimento

3.5.1 *A. thaliana*

Plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia foram crescidas em potes contendo terra autoclavada e vermiculita (2:1) ou em meio GM. Para a esterilização, as sementes de *Arabidopsis*, mantidas a 4°C, foram colocadas em tubos de microcentrífuga contendo 1mL de etanol a 70% por dois minutos. Após a retirada do etanol, as sementes foram colocadas em uma solução de hipoclorito de sódio 5% e Tween a 0,01% por 15 minutos. As mesmas foram lavadas cinco vezes em água destilada autoclavada. As sementes esterilizadas foram dispostas em meio de cultura sólido com o auxílio de palitos de madeira autoclavados. A quebra da dormência foi feita a 4°C por pelo menos dois dias. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação a 21 °C com fotoperíodo de 16 horas de luz sob intensidade luminosa entre 3.500-6.000 lux.

3.5.2 *N. tabacum*

Plantas de *N. tabacum* variedade SR1 foram crescidas em vasos contendo terra autoclavada e vermiculita (2:1) ou em placas e potes contendo meio MS. Para a esterilização, as sementes de tabaco, mantidas a 4°C, foram colocadas em tubos de microcentrífuga contendo 1mL de etanol a 70% por dois minutos. Após a retirada do etanol, as sementes foram colocadas em uma solução de hipoclorito de sódio 5% e Tween a 0,01% por 15 minutos. As mesmas foram lavadas cinco vezes em água destilada autoclavada. As sementes esterilizadas foram dispostas em meio de

cultura sólida com o auxílio de palitos de madeira autoclavados. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação a 28°C com fotoperíodo de 12 horas de luz sob intensidade luminosa entre 3.500-6.000 lux.

3.5.3 *O. sativa*

Sementes de arroz foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 5% por 20 minutos e, posteriormente, lavadas com água destilada. Para o tratamento no escuro, as plantas foram cultivadas em hidroponia (0.5X solução de Hoagland) em estufa a 25-28 °C durante 2 semanas. O grupo controle foi cultivado com fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, sob intensidade luminosa entre 3.500-6.000 lux, e o grupo etiolado foi cultivado na escuridão (plantas de 10 dias). Para a coleta de tecidos (parte aérea e raiz - 5 dias), as plantas foram cultivadas em hidroponia (0.5X solução de Hoagland) em estufa a 25-28 °C durante 2 semanas. Posteriormente, as plantas foram transferidas para potes contendo terra e vermiculita (1:1) para coleta dos tecidos (bainha e lâmina - 120 dias). As plantas e tecidos coletados foram congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a extração do RNA.

3.6 Material biológico para análise da expressão gênica

3.6.1 Arroz

Para o tratamento no escuro, as plantas foram cultivadas em hidroponia (0.5X solução de Hoagland) em estufa a 25-28 °C durante 2 semanas. O grupo controle foi cultivado com fotoperíodo de 12h claro/12h escuro e o grupo etiolado foi cultivado na

escuridão (plantas de 10 dias). Para a coleta de tecidos (parte aérea e raiz - 5 dias), as plantas foram cultivadas em hidroponia (0.5X solução de Hoagland) em estufa a 25-28 °C durante 2 semanas. Posteriormente, as plantas foram transferidas para potes contendo terra e vermiculita (1:1) para coleta dos tecidos (bainha e lâmina - 120 dias). As plantas e tecidos coletados foram congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a extração do RNA.

3.6.2 Arabidopsis

Plantas de *A. thaliana* - controle e transformadas com as construções amiRNA-AtAPC4 e 5 - foram crescidas em potes contendo terra autoclavada e vermiculita (2:1) ou em meio GM. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação a 21°C com fotoperíodo de 16 horas de luz sob intensidade luminosa entre 3.500-6.000 lux. Para análise de expressão gênica, foram coletadas folhas de plantas de 20 dias.

3.6.3 Poplar

O RNA total de folhas de poplar foi fornecido por Rodrigo T. Lourenço (grupo de biotecnologia de florestas, Universidade Estadual da Carolina do Norte).

3.7 Análise da expressão gênica

3.7.1 Extração de RNA total e tratamento com DNase I

O RNA total foi extraído seguindo o método descrito por Logemann e colaboradores (1987). O material foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para tubos de 1,5mL contendo 500 μ L de um tampão de extração (200mM Tris-Cl pH7,5; 100mM LiCl; 5mM EDTA; SDS a 1%), 250 μ L de fenol pH 8,0 e 250 μ L de clorofórmio. A mistura foi agitada por 1 minuto e centrifugada a 20.000g por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 250 μ L de fenol e 250 μ L de clorofórmio. A nova mistura foi agitada por 1 minuto e centrifugada a 20.000g por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 1 volume de LiCl 6M DEPC*, e deixada a 4°C por aproximadamente 16 horas. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi ressuspensão com 1mL de LiCl 3M DEPC e centrifugado a 20.000g por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado, e o precipitado ressuspensão em 250 μ L de água destilada DEPC, ao qual foram adicionados 25 μ L de NaOAc 3M DEPC e 550 μ L de etanol absoluto. A mistura foi incubada a -70°C por 30 minutos ou durante a noite a -20°C, e posteriormente centrifugada a 20.000g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com uma solução etanol 70% DEPC, sendo posteriormente centrifugado a 20.000g por 5 minutos. A solução de etanol foi descartada e o excesso do mesmo foi retirado com auxílio de uma pipeta. O RNA precipitado foi finalmente ressuspensão em 50 μ L de H₂O milli-Q DEPC.

* Todas as soluções usadas para extração de RNA e síntese de 1^a fita foram tratadas com 0.1% de dietilpirocarbonato (DEPC), um potente inibidor de RNase, durante 16 horas e foram depois autoclavadas.

Antes da síntese do cDNA, os RNAs totais foram tratados com DNase I, para eliminar qualquer contaminação por DNA genômico. Os RNAs foram incubados com 0,5U de DNase I (*Amersham biosciences - GE healthcare*) para cada 1 μ g de RNA total, no tampão da enzima (200mM Tris-Cl pH 8,3, 500mM KCl, 25mM MgCl₂, DEPC 0,1%), a 37°C por 10 minutos. O volume de reação final foi determinado pela quantidade da enzima usada, sendo 10 μ L de reação para cada microlitro de enzima.

Ao tubo de microcentrífuga de 1,5mL, contendo o RNA tratado, foram adicionados um volume de fenol. As fases foram misturadas por agitação por 2 minutos e o material foi centrifugado a 20.000g por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 1 volume de clorofórmio. O material foi misturado por agitação durante 1 minuto e centrifugado a 20.000g por 2 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. O RNA foi precipitado pela adição de 1/10 do volume de NaOAc 3M DEPC e 2 volumes de etanol absoluto, seguido de incubação a -70°C por 30 minutos ou durante a noite a -20°C. Depois foi centrifugado a 20.000g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado foi lavado com uma solução de etanol a 70% em água DEPC. A amostra foi centrifugada a 20.000g por 5 minutos a 4°C. A solução de etanol foi descartada e o excesso de etanol foi retirado com uma breve centrifugação. O RNA precipitado foi ressuspenso em 30 μ l de H₂O milli-Q DEPC.

3.7.2 Síntese de primeira fita de cDNA

O RNA total foi tratado com DNase I e depois foi feita uma reação de transcrição reversa para a obtenção da primeira fita de cDNA a partir do RNAm. As sínteses de primeira fita foram realizadas utilizando 2 kits: “*First-Strand cDNA Synthesis Pharmacia Kit*” (GE healthcare) e “*Taqman First strand cDNA synthesis kit*” (Applied Biosystems).

- Primeira fita para clonagens em vetores Gateway (Invitrogen ®)

A primeira fita de cDNA sintetizada usando o “*First-Strand cDNA Synthesis Pharmacia Kit*” foi feita em reações com volume final de 15µL, de acordo com o fabricante. 2,5µg de RNA total foram desnaturados a 65°C por 10 minutos num volume de 8µL. Após este período de desnaturação foram adicionados ao RNA: 1µL (0,2µg) do oligonucleotídeos Not-dT, 1µL de 200mM DTT e 5µL do “*Bulk Mix*” (cloned, FPLC*pure*® Murine Reverse Transcriptase, RNAGuard, RNase/DNase-Free BSA, dATP, dCTP, dGTP e dTTP). A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C. Os cDNAs sintetizados foram tratados com 1U de RNase H por reação.

Oligonucleotídeo utilizado:

Not-dT: 5'-AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAAT₁₈-3'

- Primeira fita para análise de RT-PCR em tempo real

A primeira fita de cDNA sintetizada usando o “*Taqman First strand cDNA synthesis kit*”, foi feita em reações com volume final de 25 μ L, de acordo com o fabricante. Para cada 500ng de RNA total foram adicionados 2,5 μ L de TaqMan RT Buffer 10X, 5,5 μ L de 25mM MgCl₂, 5 μ L de dNTPs Mix, 1,25 μ L de Hexâmero randômico, 0,5 μ L de RNase Inhibitor, 0,625 μ L de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/ μ L). As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, seguidos por 48°C por 30 minutos e um último passo de 95°C por 5 minutos. As amostras foram diluídas quatro vezes com 10mM de Tris-Cl pH 8,0 e armazenadas a -20°C ou prontamente utilizadas.

Oligonucleotídeo utilizado:

Hexâmero randômico (Applied Biosystems)

3.7.3 RT-PCR em tempo real

O PCR em tempo real foi realizado utilizando o reagente “SYBR Green RT-PCR Master Mix kit” (Applied Biosystems), conforme as recomendações do fabricante.

A reação foi feita em uma placa de 96 poços (MicroAmp Optical 96 - Well Reaction Plate - Applied Biosystems). Em cada poço foram colocados 6,25 μ L da reação de primeira fita diluída 4 vezes, 12,5 μ L da solução “*Mix RT-PCR*” e 6,25 μ L de uma mistura dos dois oligonucleotídeos específicos para cada gene (APÊNDICE I) a 3,6 μ M cada um. Para cada reação, que utilizava os oligonucleotídeos específicos

para cada gene, foi feita outra com oligonucleotídeos específicos para o gene RNAr 28S (28S), gene constitutivo em todas as células da planta. Esta reação foi utilizada como controle positivo e como normalizador da quantidade de primeira-fita de cDNA utilizada nos experimentos.

Como controle negativo, foi feita uma reação nas mesmas condições do controle positivo sem o molde de primeira fita.

O resultado bruto do programa do RT-PCR em tempo real é uma curva logarítmica da intensidade de fluorescência na fase inicial, que se transforma, gradativamente, num platô de saturação. Para determinarmos a quantidade precisa do produto de PCR, é imprescindível que o ponto de medição seja bem determinado. É preciso desconsiderar o sinal inicial, que pode conter fluorescência basal. Esta é muito evidente nos ciclos iniciais, antes de haver uma quantidade significativa do DNA amplificado. É baseado nestes ciclos que se determina a linha de fluorescência básica das amostras. O ponto de medição escolhido foi acima da linha de base, ainda na fase logarítmica da curva.

O ponto de medição determina o número de ciclos necessários para gerar a fluorescência no ponto escolhido. Os valores obtidos foram transformados para uma escala linear, utilizando-se a base 2 por serem duas fitas moldes de DNA. O resultado obtido é a quantidade de fluorescência encontrada naquele determinado número de ciclos, em unidade arbitrária. O valor da fluorescência de cada amostra com os oligonucleotídeos específicos dos genes em questão foi, então, subtraído pelo valor de fluorescência da amostra correspondente ao oligonucleotídeo 28S. A planta SR1 de cada tempo foi escolhida o “calibrador”. Assim, as amostras foram normalizadas pela quantidade de primeira-fita. Depois deste cálculo feito, os valores de cada amostra foram utilizados como expoentes na base 2. Deste modo obtemos

o valor de quantas vezes mais a amostra expressa o gene em questão em relação ao controle do experimento.

$$\text{Fl. Rel.} = (\text{CT gene} - \text{CT 28S}) = \Delta\text{CT} - \text{CT SR1} = \Delta\Delta\text{CT} = 2^{\Delta\Delta\text{CT}}$$

Onde, **Fl. Rel.** é a fluorescência relativa.

CT 28S é a média de número de ciclos no ponto escolhido do controle com 28S.

CT gene é a média de número de ciclos no ponto escolhido da curva em questão.

Para expressão relativa dos experimentos com os controles experimentais, então:

$$\text{Fl. Rel.}_{\text{exp}} / \text{Fl. Rel.}_{\text{cont}}$$

3.8 Clonagem

3.8.1 Clonagem utilizando o sistema Gateway (Invitrogen ®)

Este sistema baseia-se na transferência de uma ou mais seqüências de DNA para múltiplos vetores em reações paralelas, enquanto mantém a mesma orientação e código de leitura. Para isto, a técnica utiliza sítios específicos de recombinação (*att*) do fago λ e um conjunto de enzimas denominadas recombinases. O sistema de clonagem é constituído por duas etapas: a reação LR e a reação BP.

- Reação BP

É uma reação de recombinação, catalisada pela “*BP Clonase Enzyme Mix*”, entre um produto de PCR ou um clone de expressão e o vetor doador (neste trabalho pDONR221 - APÊNDICE II). Esta reação serve para criar um vetor de

entrada (“*entry-clone*”) a partir de um vetor doador. A partir do clone de entrada pode-se transferir o DNA para qualquer vetor Gateway. Para que haja a inserção do gene de interesse no vetor doador, é necessário acrescentar regiões de recombinação nos oligonucleotídeos específicos. Assim, o produto final da reação de PCR estará flanqueado pelas seqüências de recombinação *attB*₁ e *attB*₂. Quando ocorrer a reação BP, o vetor doador (que possui regiões *attP*₁ e *attP*₂) irá recombinar com o produto do PCR (que possui regiões *attB*₁ e *attB*₂) e formará um vetor de entrada contendo as regiões *attL*₁ e *attL*₂ (Figura 10). Isto garante a orientação correta da ORF após a reação.

As condições usadas na amplificação dos cDNAs das subunidades do APC escolhidas foram (quadro 1) (1°PCR):

Componentes	Volume
cDNA 100ng/mL	1µL
Oligonucleotídeo attB1 10µM	2,5µL
Oligonucleotídeo attB2 10µM	2,5µL
dNTP 10mM	1,5µL
<i>Enhancer</i> 10X	5µL
Tampão da enzima 10X	5µL
Enzima <i>Pfx</i> 5U/µL	0,5µL
MgSO ₄ 50mM	1µL
Água Milli-Q	31µL
Volume Final	50µL

Quadro 1: Protocolo da reação do 1° PCR para clonagem em vetores Gateway. Tampão da enzima *Pfx* (50mM Tris-Cl pH 8.0, 50mM KCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, estabilizadores e glicerol a 50%).

A reação ocorreu em um termociclador Mastercycler® (Eppendorf), utilizando as seguintes condições (quadro 2):

Etapas	Temperatura	Tempos
1	94°C	5 minutos
2	94°C	1 minuto
3	50°C	30 segundos
4	68°C	1 minuto/kb
5	30 repetições a partir do passo 2	
6	68°C	10 minutos

Quadro 2: Programa da primeira reação da PCR para clonagem em vetores Gateway.

As amplificações por PCR de algumas ORFs deste trabalho foram realizadas utilizando apenas um par de oligonucleotídeos específicos, contendo toda a seqüência adaptadora da região de recombinação *attB* (figura 10). Com a inclusão da região de recombinação nos oligonucleotídeos específicos, somente uma reação de PCR é necessária (oligonucleotídeos com 60 nucleotídeos).

Entretanto, para a amplificação de algumas ORFs, uma segunda reação de PCR foi realizada utilizando o produto do primeiro PCR como molde. Oligonucleotídeos contendo a região adaptadora, inclusive parte da região existente no primeiro par de oligonucleotídeos específicos, foram utilizados para gerar um produto final contendo a região de recombinação *attB* (figura 10).

Na segunda amplificação (quadro 3) (2° PCR), os seguintes parâmetros foram usados:

Etapas	Temperatura	Tempos
1	94°C	2 minutos
2	94°C	15 segundos
3	40°C	30 segundos
4	68°C	3 minutos
5	5 repetições a partir do passo 2	
6	94°C	15 segundos
7	55°C	30 segundos
8	68°C	3 minutos
9	25 repetições a partir do passo 6	
10	68°C	5 minutos

Quadro 3: Programa da segunda reação da PCR para clonagem em vetores Gateway.

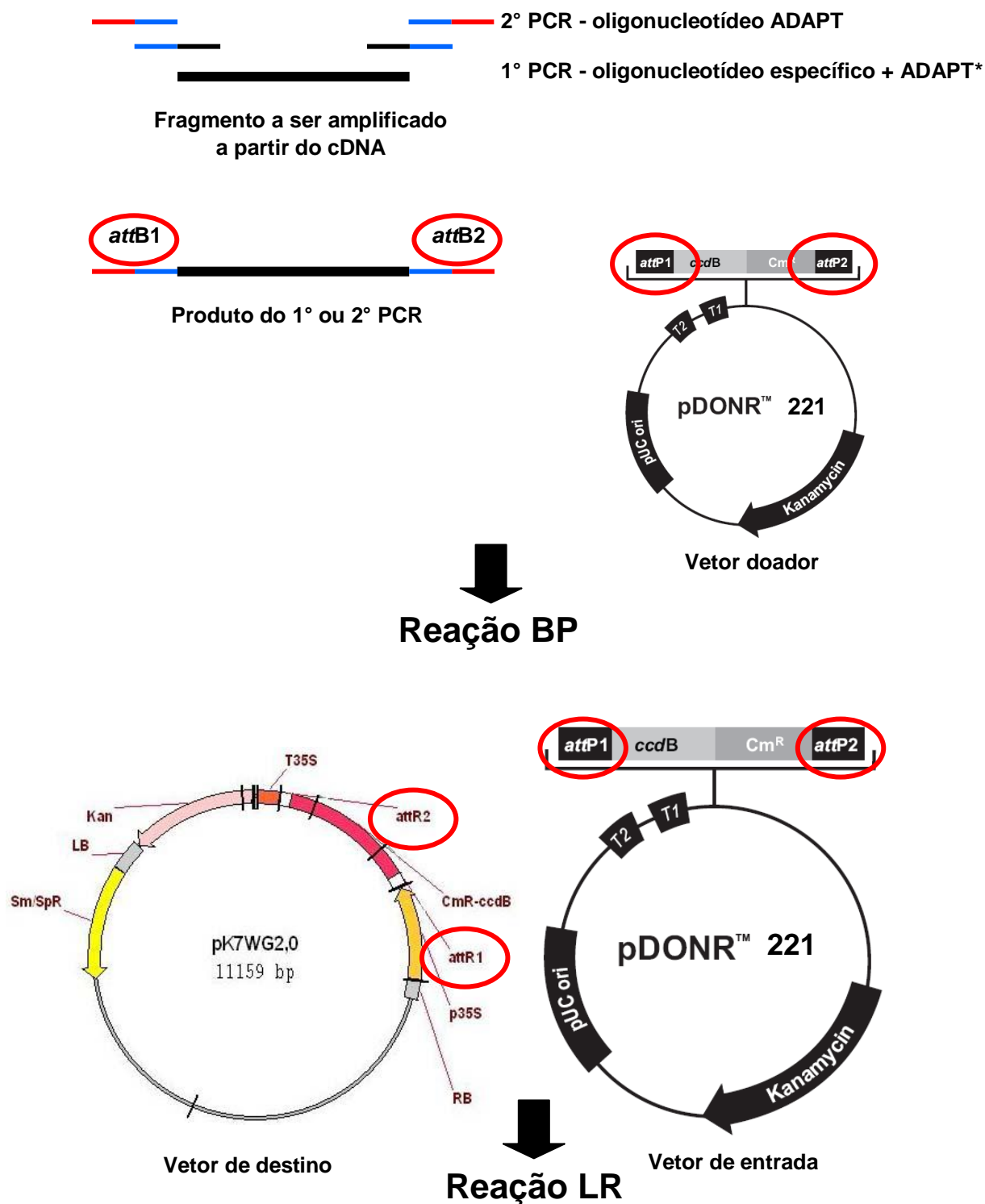


Figura 10: Esquema da metodologia GATEWAY de clonagem dos cDNAs das subunidades do Complexo Promotor da Anáfase. Os genes de interesse são amplificados com oligonucleotídeos específicos, porém com adaptadores que possuem uma parte da seqüência de recombinação (1° PCR). Uma vez amplificado, uma segunda rodada de PCR é realizada com oligonucleotídeos adaptadores (ADAPT) que reconhecem a seqüência de recombinação. Este segundo produto amplificado é clonado através de uma reação BP em um vetor doador. A partir deste vetor (vetor de entrada), é possível clonar o gene de interesse na fase de leitura correta em qualquer vetor Gateway (reação LR), desde que o vetor de destino possua a seqüência de recombinação (*attR*, círculos vermelhos). Ver APÊNDICE III para os clones de destinos construídos para a realização deste trabalho.

O fragmento de DNA de interesse, após a purificação, foi clonado no vetor pDONR221 (Invitrogen) em uma reação denominada BP (quadro 4). A reação BP foi incubada a 25°C por 12 horas e posteriormente dialisada durante 3 horas em membrana 0,025µm (Millipore). Após a diálise, a reação foi utilizada para transformar *E. coli* DH5α por eletroporação. As colônias resistentes a 50µg/mL de kanamicina foram inoculadas em meio LB líquido acrescido deste antibiótico. A extração do DNA plasmidial foi feita utilizando o kit “GFX Plasmid Minipreparation” (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. Uma vez confirmado por digestão e por seqüenciamento, este novo plasmídeo passa a ser chamado de clone de entrada.

Componentes	Quantidade
Vetor doador (pDONR 221)	40fmol
Produto de PCR	100fmol
Tampão da enzima 5X	1µL
Enzima BP Clonase 5X	1µL
Água Milli-Q	Completar até o volume final de 5µL

Quadro 4: Componentes da reação BP. Reações com volume final de 5µL.

- Reação LR

A partir do clone de entrada pode-se transferir o DNA para qualquer vetor de expressão Gateway. A reação LR é justamente a recombinação entre o vetor de entrada do sistema e o vetor de destino (figura 10). Esta reação é catalisada pela “*LR Clonase Enzyme Mix*”. As regiões *attL*₁ e *attL*₂ presentes no vetor de entrada (formado pela reação BP) e as regiões *attR*₁ e *attR*₂ presentes nos vetores de destino serão recombinadas e surgirá o clone de expressão. O clone de expressão resultante possui os sítios *attB*₁ e *attB*₂ idênticos aos presentes nos produtos de PCR. Neste trabalho, os vetores de destino utilizados foram pK7WG2 e pKGWFS7 (APÊNDICE II). Os clones destino gerados neste trabalho estão descritos no APÊNDICE III.

A reação LR deve ser incubada a 25°C por 12 horas e posteriormente dialisada durante 3 horas em membrana 0,025µm (Millipore). Após a diálise, a reação foi utilizada para transformar *E. coli* DH5α por eletroporação. As colônias resistentes aos antibióticos exigidos pela seleção do vetor foram inoculadas em meio LB líquido acrescido dos antibióticos específicos. A extração do DNA plasmidial foi feita utilizando o kit “GFX Plasmid Minipreparation” (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. Uma vez confirmado por digestão, este novo plasmídeo passa a ser chamado de clone de destino.

Componentes	Quantidade
Vetor de destino	75 fmol
Vetor de entrada com o gene de interesse	0,5 μ L (250ng) da extração de DNA plasmidial
Tampão da enzima 5X	1 μ L
Enzima LR Clonase 5X	1 μ L
Água Milli-Q	Completar até o volume final de 5 μ L

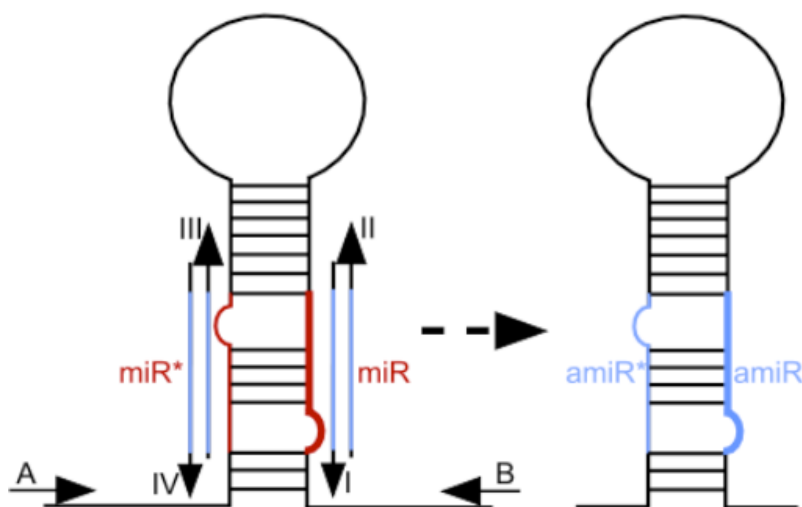
Quadro 5: Componentes da reação LR. Reações com volume final de 5 μ L.

Os vetores doadores e os vetores de destino contêm o gene *ccdB* flanqueado pelas regiões de recombinação. Por codificar uma proteína letal para as bactérias utilizadas nos experimentos, funciona como um agente inibidor de falsos positivos. Caso não ocorra a recombinação, as bactérias transformadas com estes vetores falharão no momento da replicação do DNA. Assim, qualquer falha na recombinação entre os vetores não resultará em clones viáveis.

- Clonagem em vetor amiRNA

O microRNA artificial (amiRNA) oferece 4 seqüências de oligonucleotídeos (I até IV), que são usados para projetar seu microRNA artificial no precursor miR319a por mutagênese sítio dirigida (Schwab *et al.*, 2006). Para o molde das PCRs, é utilizado o vetor pRS300, que contém o precursor miR319a no vetor pBSK (clonado através do sítio para *Sma*I) (APÊNDICE II). Vetor fornecido pelo grupo do Detlef Weigel (weigel@weigelworld.org).

O precursor contendo amiRNA é gerado por reações sobrepostas. A primeira rodada amplifica os fragmentos (a) até (c) (quadros 6, 7 e 8). Estes são, posteriormente, unidos na reação (d) (quadros 9 e 10). Oligonucleotídeos A e B são baseados na seqüência do plasmídeo. Eles estão situados fora do local de clonagem do pBSK para gerar maior número de produtos de PCR. Para clonagem no sistema Gateway (reação BP), foram utilizados oligonucleotídeos GWA e GWB para inserção das seqüências de recombinação (reação (e), quadros 11 e 12). Uma vez realizada a inserção das seqüências de recombinação, os produtos foram clonados, via reação BP, no vetor pDONR221 e, posteriormente, via reação LR, no vetor pK7WG2. Após cada reação, os produtos eram verificados em gel de agarose 1-2%, as bandas cortadas e o DNA eluído.



I: microRNA sense

II: microRNA anti sense

III: microRNA* sense

IV: microRNA* anti sense

Figura 11: Representação esquemática da metodologia de produção de amiRNA utilizando como molde o miR319a clonado no vetor pBSK. As direções de leitura dos miRNA e dos miRNA* estão representados na figura por setas.

	Oligonucleotídeo sense	Oligonucleotídeo anti sense	Molde
(a)	A	IV	pRS300
(b)	I	II	pRS300
(c)	III	B	pRS300
(d)	A	B	(a) + (b) + (c)
(e)	GWA	GWB	(d)

Quadro 6: Conjunto de reações necessárias para produção do amiRNA. Cada reação é dependente de um molde específico.

Para as reações (a), (b) e (c).

Componentes	Volume
DNA plasmidial (1:100)	2,0 μ L
Oligonucleotídeo 10 μ M	2,0 μ L
Oligonucleotídeo 10 μ M	2,0 μ L
dNTP 2mM	5,0 μ L
Tampão da enzima 10X	5,0 μ L
Enzima <i>Pfu</i> 5U/ μ L	0,5 μ L
Água Milli-Q	33,5 μ L
Volume Final	50μL

Quadro 7: Protocolo da reação da PCR para produção dos fragmentos (a), (b) e (c). Tampão da enzima *Pfu* (50mM Tris-Cl pH8.0, 50mM KCl, 1mM MgSO₄ e glicerol a 50%).

Etapas	Temperatura	Tempos
1	95°C	2 minutos
2	95°C	30 segundos
3	55°C	30 segundos
4	72°C	45 segundos
5	24 repetições a partir do passo 2	
6	72°C	7 minutos

Quadro 8: Programa das reações (a), (b) e (c) para produção do amiRNA.

Para a reação (d).

Componentes	Volume
PCR (a)	0,5µL
PCR (b)	0,5µL
PCR (c)	0,5µL
Oligonucleotídeo A 10µM	2,0µL
Oligonucleotídeo B 10µM	2,0µL
dNTP 2mM	5,0µL
Tampão da enzima 10X	5,0µL
Enzima <i>Pfu</i> 5U/µL	0,5µL
Água Milli-Q	34,5µL
Volume Final	50µL

Quadro 9: Protocolo da reação da PCR para produção do fragmento (d). Tampão da enzima *Pfu* (50mM Tris-Cl pH8.0, 50mM KCl, 1mM MgSO₄ e glicerol a 50%).

Etapas	Temperatura	Tempos
1	95°C	2 minutos
2	95°C	30 segundos
3	55°C	30 segundos
4	72°C	1'30''
5	24 repetições a partir do passo 2	
6	72°C	7 minutos

Quadro 10: Programa das reações (d) para produção do amiRNA.

Para a reação (e).

Componentes	Volume
PCR (d)	2,0 μ L
Oligonucleotídeo 10 μ M	2,0 μ L
Oligonucleotídeo 10 μ M	2,0 μ L
dNTP 2mM	5,0 μ L
Tampão da enzima 10X	5,0 μ L
Enzima <i>Pfu</i> 5U/ μ L	0,5 μ L
Água Milli-Q	33,5 μ L
Volume Final	50μL

Quadro 11: Protocolo da reação da PCR para produção do fragmento (e). Tampão da enzima *Pfu* (50mM Tris-Cl pH8.0, 50mM KCl, 1mM MgSO₄ e glicerol a 50%).

Etapas	Temperatura	Tempos
1	95°C	2 minutos
2	95°C	30 segundos
3	55°C	30 segundos
4	72°C	1'30''
5	24 repetições a partir do passo 2	
6	72°C	7 minutos

Quadro 12: Programa das reações (e) para produção do amiRNA.

3.8.2 Verificação do produto de PCR em gel de agarose e eluição do DNA

Os produtos das reações de PCR foram eletroforeticamente separados em gel de agarose 1% (USB), preparado com tampão TAE 0,5X (80mM Tris; 80mM ácido acético; 2mM EDTA pH 8,0) e brometo de etídeo (0.5µg/mL). O gel foi colocado na cuba de eletroforese i-Mupid®, imerso em TAE 0,5X e submetido a 100V por 30 minutos.

Para purificar o fragmento de DNA do gel, foi utilizado o Kit “*GFX PCR DNA and Gel Band Purification*” (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

As bandas desejadas foram cortadas do gel com o auxílio de uma lâmina de bisturi. Estas bandas foram colocadas em um tubo de microcentrifuga de 1,5mL. Para cada 10mg de gel foram adicionados 10µL de tampão de captura e os tubos incubados a 60°C (até que a agarose fosse completamente dissolvida). A amostra foi transferida para a coluna *GFX* acoplada a um tubo de microcentrifuga de 1,5mL e incubada por 1 minuto à temperatura ambiente. O sistema tubo/coluna foi então

centrifugado por 30 segundos a 20.000g e o líquido descartado. Foram adicionados 500 μ L de tampão de lavagem à coluna de purificação e posteriormente esta foi centrifugada por 30 segundos a 20.000g. A coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5mL. Foram adicionados 30 μ L de água Milli-Q a coluna. Após centrifugação, a solução contendo o DNA eluído do gel foi estimada através de eletroforese em gel de agarose 1%.

3.8.3 Preparação de bactérias eletrocompetentes e eletroporação

Bactérias *E. coli* DH5 α eletrocompetentes foram preparadas de acordo com protocolo descrito por Ausubel *et al.* (1992).

Para a eletroporação, foram utilizadas alíquotas de 40 μ L de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes e 20-100ng de DNA. As eletroporações foram realizadas em cubetas (Bio-Rad) de 1,8kV a 200 Ω e 25 μ F em um eletroporador (Eppendorf) como descrito por Ausubel *et al.*, (1992).

3.8.4 Preparação de *A. tumefaciens* competente

Uma colônia isolada de *A. tumefaciens* C58C1 pMP90 foi inoculada em 5mL de YEB líquido contendo 100 μ g/mL de Rf e 40 μ g/mL de Gm. Este pré-inóculo foi incubado a 28°C, sob agitação, por aproximadamente 16 horas e depois diluído em 100mL de meio YEB contendo os mesmos antibióticos já citados. A cultura de 100mL cresceu a 28°C, sob agitação, até a D.O._{600nm} de 0.5. Atingida a D.O., cultura foi centrifugada a 4°C por 8 minutos a 10.000g. O sobrenadante foi descartado e o

precipitado ressuspenso em 2mL de glicerol a 10% contendo 20mM de CaCl₂. Alíquotas de 100µL foram feitas e estocadas a -70°C.

3.8.5 Transformação de *A. tumefaciens* e seleção

A transformação de *A. tumefaciens* consiste numa brusca alternância de temperatura (caracterizando o choque térmico). Adicionou-se 1µg de DNA na alíquota de células competentes. O tubo de microcentrífuga foi colocado em nitrogênio líquido por 2 minutos. Posteriormente, o tubo foi incubado a 37°C por 5 minutos. As células foram transferidas para um tubo de 15mL contendo 1mL de YEB e incubado por 1 hora a 30°C sem agitação. Posteriormente, o tubo de 15mL foi incubado a 30°C por 2 horas sob agitação. Ao final do período, a suspensão celular foi plaqueada em YEB sólido contendo os antibióticos adequados.

3.8.6 Minipreparação de DNA plasmidial e digestão com enzimas de restrição

Para a confirmação da clonagem do inserto no vetor desejado, foram feitas minipreparações de DNA plasmidial usando o kit “GFX Plasmid Minipreparation” (GE Healthcare) e o protocolo utilizando lisozima.

- Kit “GFX Plasmid Minipreparation”

Uma colônia isolada da bactéria *E. coli* DH5α com o plasmídeo de interesse foi inoculada em 3mL de meio LB líquido, contendo os antibióticos específicos para cada clone.

O inóculo foi incubado a 37°C, sob agitação, por aproximadamente 16 horas para o crescimento da mesma. A cultura foi transferida para tubos de microcentrífuga de 1,5mL e centrifugada a 20.000g por 3 minutos. O meio LB foi descartado e as bactérias precipitadas foram ressuspensas, sob agitação, em 300µL da Solução I (100mM Tris-Cl pH 7.5, 10mM EDTA pH 8.0, 400µg/mL RNase I). Posteriormente, foram acrescentados 300µL da Solução II (NaOH 1M, SDS a 5,3%). Depois da lise bacteriana, 600µL da Solução III (Acetato de potássio 5M) foram adicionados para completa neutralização. O lisado foi centrifugado a 20.000g por 5 minutos e o sobrenadante transferido para uma coluna de purificação GFX acoplada a um tubo coletor de 2mL. A coluna foi centrifugada a 20.000g por 30 segundos e o líquido armazenado no tubo coletor descartado. Foram adicionados 400µL de “*Wash Buffer*” (50mM Tris-EDTA pH 8.0, etanol a 80%) na coluna e esta, juntamente com o tubo coletor, foram centrifugados a 20.000g por 1 minuto. A coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e 50µL de água Milli-Q foram adicionados. A coluna acoplada ao tubo de 1.5mL foi centrifugada a 20.000g por 1 minuto. A coluna foi descartada e o plasmídeo purificado permaneceu diluído em 50 µL de água Milli-Q.

O plasmídeo extraído foi digerido com enzimas de restrição para verificar a ligação do fragmento desejado no vetor (seguindo protocolos descritos por Sambrook e Colaboradores, 1989). Enzimas de restrição foram escolhidas e 1-2µg de DNA plasmidial foram digeridos com 3U de cada enzima para cada 1µg de DNA. Os tampões utilizados na digestão foram os recomendados para cada enzima pelo fabricante. A reação de digestão ocorreu durante 3-4 horas a 37°C e foi analisada posteriormente em gel de agarose 1%.

- Lisozima

Uma colônia isolada da bactéria *E. coli* DH5 α com o plasmídeo de interesse foi inoculada em 5mL de meio LB líquido contendo os antibióticos específicos para cada clone.

O inóculo foi incubado a 37°C, sob agitação, por aproximadamente 16 horas para o crescimento da mesma. A cultura foi transferida para tubos de microcentrífuga de 1,5mL e centrifugada a 20.000g por 3 minutos. O meio LB foi descartado e as bactérias precipitadas foram ressuspensas, sob agitação, em 175 μ L de tampão TEZ (50mM Tris-Cl pH 8.0, sacarose a 15%, 50mM EDTA pH 8.0). Posteriormente, adicionou-se 25 μ L de lisozima (10mg/mL) e incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a adição de 400 μ L de água destilada gelada, a cultura foi imediatamente submetida a um choque térmico a 72°C por 15 minutos. O lisado foi centrifugado a 20.000g por 8 minutos e o precipitado retirado com um palito de madeira. Ao sobrenadante foram adicionados 1/10 Volume Acetato de sódio 3M e 1 Volume de isopropanol. A mistura foi centrifugada a 20.000g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o plasmídeo precipitado foi lavado com uma solução de etanol a 70 %. Uma nova centrifugação foi realizada a 20.000g por 5 minutos. A solução de etanol foi descartada e o precipitado foi ressuspenso em 50 μ L de H₂O Milli-Q.

3.9 Plantas transgênicas

3.9.1 Obtenção de plantas AtAPC10OE

Após a obtenção das linhagens transformadas *in vitro* (geração T₀), as plantas superexpressando a subunidade AtAPC10 foi transferida para a terra até gerarem sementes por autofecundação (geração T₁). As sementes foram coletadas, esterilizadas e guardadas a 4°C. A partir da semeadura de 100 sementes de cada linhagem AtAPC10OE em MS/Km, foi possível determinar a segregação mendeliana (figura 12). Para verificar se o agente seletor estaria ou não influenciando no fenótipo, 50 sementes foram semeadas em MS sem antibiótico. A partir da placa MS/Km, 5 plantas de cada linhagem foram transferidas para o vaso contendo terra e vermiculita na casa *in vivo*. A autofecundação dessas plantas resultou em sementes correspondentes a geração T₂, Estas sementes foram esterilizadas, guardadas a 4°C e semeadas em meio MS/Km para determinar sua segregação (homozigotas ou hemizigotas). As sementes T₂ foram objetos de estudo deste trabalho.

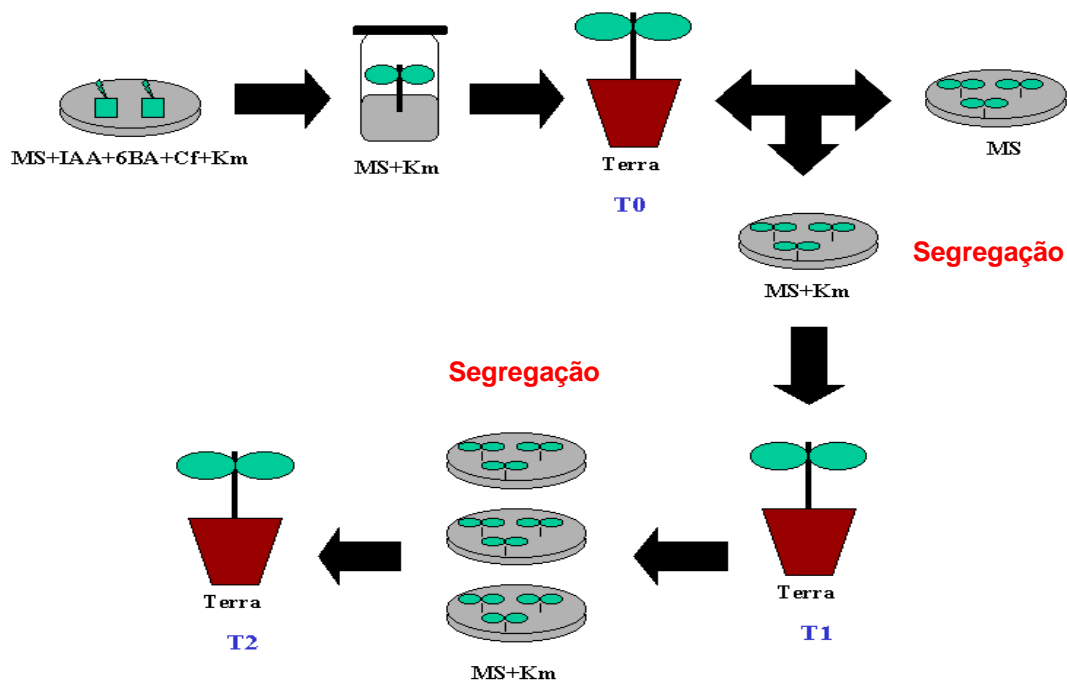


Figura 12: Esquema para obtenção de uma geração T₂. As plantas T₀ geram sementes por autofecundação. A segregação dessas sementes foi determinada (3:1) e as plantas passadas para a terra (geração T₁). As plantas da geração T₁ geram sementes por autofecundação (geração T₂). Plantas homocigotas e hemizigotas de cada linhagem foram objetos das análises.

3.9.2 Estresses salino e hídrico das plantas AtAPC10OE, AtCDC27aOE, 10/27aOE e SR1

As plantas AtAPC10OE, AtCDC27aOE, 10/27aOE e SR1 foram germinadas em meio MS, MS+NaCl 0,3% e MS+NaCl 0,7%. Após 10 dias de período *in vitro*, as plantas foram analisadas. Para acompanhar o crescimento radicular, as plantas AtAPC10OE, AtCDC27aOE, 10/27aOE e SR1 foram germinadas em meio MS, MS+NaCl 0,3% e MS+NaCl 0,7% em placas quadradas e, estas, posicionadas nas prateleiras da casa de vegetação na posição vertical (sob condições anteriormente mencionadas). Após 20 dias de período *in vitro*, as placas foram analisadas.

Para realizar o estresse hídrico, 10 plantas das linhagens transformadas AtAPC10OE, AtCDC27aOE, 10/27aOE e do controle SR1 foram separadas em dois

grupos. Um foi submetido ao tratamento de restrição hídrica e outro não teve seu regime hídrico alterado. O tratamento iniciou-se com a primeira medição do aparelho fotossintético.

3.9.3 Verificação de massa fresca e seca das plantas de tabaco

As folhas e o caule de cada tabaco foram coletados e imediatamente pesados em balança de precisão. Os resultados obtidos representavam os valores de massa fresca. Posteriormente, o material vegetal era incubado em estufa de secagem a 70°C por 3 dias. O material seco era pesado e os valores correspondiam à massa seca.

3.9.4 Análise estatística das plantas de tabaco

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 3 (GraphPad Software Incorporated). Cada análise estatística foi realizada com um número de amostras igual a 12 (plantas) por construção/linhagem. Os valores extremos obtidos (valor máximo e mínimo) foram descartados. Os experimentos foram realizados em duplicata. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e feito o teste Turkey para comparação de médias. O teste Turkey permite estabelecer a diferença mínima significativa, ou seja, a menor diferença de médias de amostras que deve ser tomada como estatisticamente significativa, em determinado nível.

3.9.5 Conteúdo relativo de água

Discos foliares (2 cm de diâmetro) das plantas submetidas ao estresse hídrico e controle foram excisados; e pesados em balança de precisão com 5 algarismos significativos. Após 3 dias em estufa a 50°C, os discos foliares foram novamente pesados. A diferença entre as medições indicaram a perda de água dos discos e manutenção do peso do material orgânico. Cada excisão foi realizada durante as medições do aparelho fotossintético.

3.10 Análise fotossintética

Os valores do rendimento quântico do fotossistema II (F_v/F_m), foram determinados em duas folhas de cada uma das quatro plantas (controle e transformadas), adaptadas ao escuro durante 1 h, utilizando um medidor de fluorescência modulada (MINI-PAM, Walz). O desempenho fotossintético em função de níveis crescentes de luz foi determinado utilizando a programação do mesmo equipamento, com níveis crescentes de luz durante 4 minutos, em oito estágios de 30 segundos cada. Ao final de cada nível de luz foi aplicado um pulso saturante (cerca de $6000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) para a determinação de parâmetros de fluorescência. O rendimento quântico efetivo do fotossistema II foi determinado conforme Genty *et al.* (1989) através da fórmula: $\phi = \Delta F/F'm = (F'm - F)/F'm$, onde F é a fluorescência da clorofila na amostra adaptada à luz e $F'm$ a máxima fluorescência da amostra adaptada à luz, com o pulso saturante. A taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) foi determinada da mesma forma utilizada por Lüttge *et al.* (1998): $\text{ETR} = 0,5 \cdot (\Delta F/F'm) \cdot \text{DFF}$. Segundo Lüttge *et al.* (1998), é de se esperar que a fotossíntese

não atinja o “estado estacionário” devido ao tempo muito pequeno de exposição a cada nível de luz mas o método permite rápidas medidas comparativas entre diferentes tratamentos. O excesso relativo de radiação fotossinteticamente ativa foi obtido como $(F_v/F_m - \Delta F/F'_m)/(F_v/F_m)$, segundo Bilger *et al.* (1995).

3.11 Identificação dos genes e localização cromossômica

Pesquisas em várias bases de dados foram realizadas para encontrar as subunidades do APC, CDC20 e CCS52 em *Arabidopsis*, arroz e poplar. A estratégia para a obtenção de cada gene nos genomas foi o seguinte: seqüências de *Arabidopsis*, anteriormente publicadas (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), foram obtidas no banco de dados TAIR8 (<http://www.arabidopsis.org>). As seqüências foram utilizadas para pesquisar nas bases de dados: *Oryza sativa* L. cv. Nipponbare - The Institute for Genomic Research (TIGR) (<http://rice.plantbiology.msu.edu>), *Populus trichocarpa* Nisqually-1 - DOE Join Genome Institute (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html), *Sorghum bicolor* BTx623 - DOE Join Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/Sorbi1/Sorbi1.home.html>), *Vitis Vinifera* PN40024 - Genoscope (http://www.genoscope.cns.fr/cgi-bin/blast_server/projet_ML/blast.pl), *Ostreococcus sp* RCC809 - DOE Join Genome Institute (http://genome.jgi-psf.org/OstRCC809_1/OstRCC809_1.home.html), *Volvox carteri* -- DOE Join Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/Volca1/Volca1.home.html>), *Chlorella sp.* NC64A - DOE Join Genome Institute (http://genome.jgi-psf.org/ChINC64A_1/ChINC64A_1.home.html) *Micromonas sp* NOUM17 (RCC299) - DOE Join Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/MicpuN3/MicpuN3.home.html>), *Physcomitrella patens* - DOE Join Genome Institute

(http://genome.jgi-psf.org/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html), *Selaginella moellendorffii* - DOE Joint Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/Selmo1/Selmo1.home.html>) e *Cyanidioschyzon merolae* (<http://merolae.biol.su-tokyo.ac.jp>). A busca por seqüências foi realizada através das ferramentas blastp e tblastn. Além disso, *Arabidopsis* os genes do APC e dos ativadores foram usados para pesquisa contra milho, *Medicago truncatula* e bases de dados de EST *Saccharum officinarum* no Gene Index DFCI (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>). Localizações cromossômicas das subunidades do APC e dos genes CDC20/CCS52 foram obtidas utilizando BLAST e outras ferramentas de localização genômica.

3.12 Identificação dos domínios de proteína

O banco de dados SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) foi usado para confirmar se cada seqüência de proteínas possui domínios e motivos conservados. O programa de pesquisa TPRpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/tpred>) foi utilizado para confirmar a presença do domínio TPR em seqüências específicas (Karpenahalli *et al.*, 2007).

3.13 Análise filogenética

As análises filogenéticas das subunidades TPR e ativadores CDC20 e CCS52 foram realizadas utilizando o método de Neighbor-Joining, presente no programa de análise genética e evolução molecular - MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). O alinhamento para a construção da árvore foi realizada usando ClustalW com o matriz

Gonnet de pontuação. A confiabilidade das árvores obtidas foi testada utilizando “bootstrap” com 2000 repetições.

3.14 Exon-intron e domínio TPR

A informação sobre exon-intron foi obtida a partir dos domínios TAIR, TIGR e bases de dados JGI. As seqüências dos domínios de repetição foram extraídas e alinhadas entre si usando o Smith-Waterman, uma ferramenta de alinhamento no pacote EMBOSS (Rice *et al.*, 2000; Björklund *et al.*, 2006). Isso gerou pontuações dos alinhamentos entre todos os domínios individuais.

CAPÍTULO I

Análise evolutiva do APC em plantas

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação das subunidades do APC e dos ativadores

Embora todas as previsões do número de genes estejam sujeitas a alterações, *A. thaliana* possui um genoma consideravelmente menor do que *Oryza sativa* (arroz) e *Populus trichocarpa* (poplar) (125Mb *A. thaliana*, 420Mb *O. sativa* e 485Mb *P. trichocarpa*) (Arabidopsis genome initiative, 2000; Goff *et al.*, 2002; Tuskan *et al.*, 2006; Sterck *et al.*, 2007). A duplicação e a fixação de genes em plantas são extensas e o número de famílias gênicas são geralmente maiores em plantas do que em animais (Cui *et al.*, 2006). As informações disponíveis sobre seqüências de genes relacionados com o ciclo celular vegetal levantam uma série de questões. Os genomas das plantas codificam todas as subunidades do APC e todos os tipos de ativadores? Será que os genes possuem uma estreita relação filogenética? O quanto são comparáveis os padrões de expressão dos genes do ciclo celular de diferentes espécies? Os genomas de Arabidopsis, arroz e poplar proporcionam uma excelente combinação para uma amplo estudo dos genes do APC e dos ativadores em planta.

A fim de realizar uma comparação do APC e ativadores entre as espécies, seqüências de Arabidopsis foram usadas para identificar possíveis ortólogos nos bancos de dados de genomas de arroz e poplar (The Institute for Genomic Research (TIGR) para arroz e Join Genome Institute (JGI) para poplar). As seqüências das subunidades do APC em Arabidopsis já foram publicadas e serviram de base para a busca por ortólogos (Capron *et al.*, 2003a, Fülöp *et al.*, 2005; Eloy *et al.*, 2006). Após exaustiva procura nos bancos de dados, alguns genes foram encontrados somente

em bancos de seqüências expressas (Expressed SequenIce Tag – EST) armazenadas no Gene Index DFCI. Posteriormente, a ferramenta SMART, para identificação de motivos, foi usada para identificar possíveis domínios em todas as proteínas candidatas (Schultz *et al.*, 2000). Usando esta estratégia, foi feita uma relação das seqüências de subunidades do APC e ativadores em dicotiledônea (poplar) e em monocotiledônea (arroz) (tabela 3). Todas as fases de leitura aberta (Open Reading Frame – ORF) das subunidades do APC e ativadores foram identificadas, e as respectivas proteínas traduzidas contêm os domínios conservados. Isto é um dos muitos exemplos para a conservação evolutiva da maquinaria do ciclo celular eucariótico (apenas o APC9 parece ser único em *S. cerevisiae*) (Passmore *et al.*, 2003; Page *et al.*, 2005).

Tabela 3.

Descrição do gene	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	Motivo das proteínas
Subunidades do APC		Números de acesso		
APC1	At5g05560	TC286185 ^a	Pt765590	Repetição de Rpn1/2
APC2	At2g04660	LOC_Os04g40830	Pt832637	Domínio Culina
APC3/CDC27a	At3g16320			Repetição de TPR
APC3/CDC27b	At2g20000	LOC_Os06g41750	Pt835890	Repetição de TPR
			Pt278795	Repetição de TPR
APC4	At4g21530	LOC_Os02g54490	Pt817758	Repetição de WD-40
APC5	At1g06590	LOC_Os12g43120	Pt592813	Repetição de TPR
APC6/CDC16	At1g78770	LOC_Os03g13370	Pt585761	Repetição de TPR
APC7	At2g39090	LOC_Os05g05720	Pt828004	Repetição de TPR
APC8/CDC23	At3g48150	LOC_Os02g43920	Pt834319	Repetição de TPR
		LOC_Os06g46540		Repetição de TPR
APC10	At2g18290	LOC_Os05g50360	Pt796785	Domínio Doc
APC11	At3g05870	LOC_Os03g19059	Pt292476	Domínio RING-H2
		LOC_Os07g22840		Domínio RING-H2
CDC26	TC308166 ^a	TC356501 ^a	TC118342 ^a	-
APC13	At1g73177	TC311476 ^a	Pt647861	-
			Pt660762	-
Ativadores				
CDC20_1	At4g33260	LOC_Os09g06680	Pt571123	Repetição de WD-40
CDC20_2	At4g33270	LOC_Os04g51110	Pt272847	Repetição de WD-40
CDC20_3	At5g26900	LOC_Os02g47180	Pt738273	Repetição de WD-40
CDC20_4	At5g27080		Pt256238	Repetição de WD-40
CDC20_5	At5g27570		Pt257786	Repetição de WD-40
CDC20_6	At5g27945			Repetição de WD-40
CCS52A1	At4g22910	LOC_Os03g03150	Pt415429	Repetição de WD-40
CCS52A1_2			Pt180625	Repetição de WD-40
CCS52A2	At4g11920			Repetição de WD-40
CCS52B			Pt820353	Repetição de WD-40
CCS52B_2	At5g13840	LOC_Os01g74146	Pt833809	Repetição de WD-40

^a Números de acesso do projeto Gene index (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>)

Dois homólogos de CDC27 foram identificados em *Arabidopsis* AtCDC27a e AtCDC27b (Blilou *et al.*, 2002). Em poplar, dois homólogos do CDC27 foram também identificados: PtCDC27_1 e PtCDC27_2. Entretanto, uma análise cuidadosa da seqüência depositada revelou um códon de terminação na posição 1471-1473. Este fragmento foi amplificado, seqüenciado e a presença do códon de terminação foi descartada (figura 13A). A expressão de ambos os genes em folha foi confirmado através de RT-PCR em tempo real (figura 13B). Nós também encontramos dois homólogos do CDC27 no genoma da briófito *Physcomitrella patens* (Rensing *et al.*, 2008). Entretanto, uma única cópia de CDC27 foi encontrada no genoma de arroz e em outras monocotiledôneas também. Por outro lado, o genoma de arroz possui duas cópias das subunidades OsCDC23 e OsAPC11. Examinamos outros genomas completos e encontramos dois genes CDC23 (VvCDC23_1 e VvCDC23_2) e APC11 (VvAPC11_1 e VvAPC11_2) em uva. Dois homólogos de APC13 foram encontrados em uva e poplar.

A**Seqüência do banco de dados do PtCDC27_2**

TTGAAGGAAGACATGAAGTTAAGTTACCTGGCTCAAGAACTGATATCAACTGATCGTTTAGC
 TCCTCAATCTTGXXXGTGTGCCATGGGAAATT

Seqüência genômica do PtCDC27_2 oriunda do seqüenciamento

TTGAAGGAAGAAATGAAGTTAAGTTACCTGGCTCAGGAACTGATATCAACTGATCGTTTAGC
 TCCTCAATCTTG~~GTA~~GTGTGCCATGGGAAATT

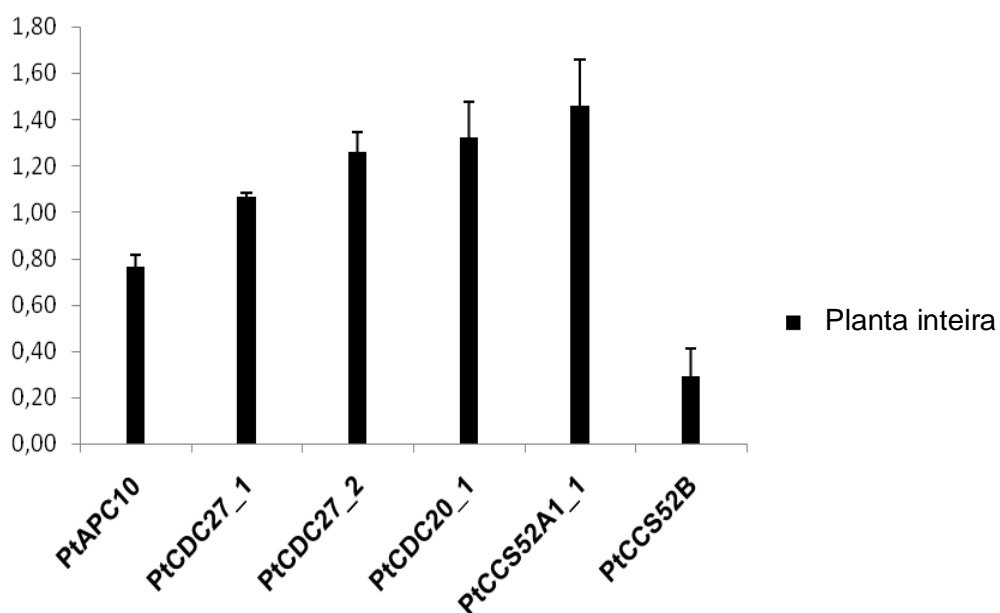
B

Figura 13: Confirmação da funcionalidade do PtCDC27_2. **A**, seqüência genômica correspondente ao locus do PtCDC27_2. Em vermelho está evidenciada a real trinca. **B**, RT-PCR em tempo real para detecção dos níveis de RNAm do PtCDC27_2, assim como dos PtCDC27_1, PtCDC20_1, PtAPC10, PtCCS52A1_1 e PtCCS52B

As estruturas de muitos genes possuem erros de anotação em seus respectivos bancos de dados. Comparando com bancos de EST de diversas plantas e usando ferramentas de bioinformática, foi possível identificar uma correta arquitetura para cada gene. A seqüência genômica do OsAPC1 não foi encontrada no banco de dados TIGR, mas a seqüência codificante (Coding Sequences - CDS) foi identificada no banco Gene Index (APÊNDICE IV). É possível que a maior subunidade do APC tenha sido alvo de uma quebra durante a anotação do genoma. Diversas seqüências genômicas precisaram de correção nas estruturas de exon-intron. OsAPC4 contém um intron na ORF genômica (APÊNDICE V). A região 3' do PtAPC4 e as regiões 5'-3' de PtAPC5 estavam incompletas. Entretanto, encontramos no banco de EST, fragmentos das regiões 3' de ambos os genes e fragmentos da região 5' de PtAPC5 (APÊNDICE V). Interessante, OsAPC5, OsCDC16 e OsAPC11_2 possuem uma divergente região 5' quando comparado com os ortólogos em Arabidopsis e poplar (APÊNDICES V e VI). A primeira metionina de OsCDC16 e OsAPC11_2 estão acima do códon consenso de iniciação dos genes CDC16 e APC11, mas somente OsCDC16 apresenta suporte por EST. O oposto ocorre com o OsAPC5, onde a primeira metionina está abaixo do códon consenso de iniciação. Os genes AtCDC26, OsCDC26, PtCDC26 e OsAPC13 foram identificados através do banco de EST.

Arabidopsis contém três genes CCS52 (CDH1 em plantas), AtCCS52A1, AtCCS52A2 e AtCCS52B; e cinco genes CDC20 (Fülöp *et al.*, 2005). Além desses, encontramos um homólogo do CDC20 (AtCDC20_6) no genoma de Arabidopsis. Este AtCDC20_6 (At5g27945) apresenta diferenças em comparação a estrutura de outros CDC20. O CDS não possui a seqüência C-box (elemento consenso DR(F/Y)IPxR) que foi identificado na região N-terminal do CDC20 e é conservado

em todos os ativadores, conhecidos, do APC (APÊNDICE VII). Talvez o AtCDC20_6 possa ser um pseudogene. O genoma de arroz possui três genes CDC20 e dois genes CCS52 comparado com os cinco CDC20 e quatro CCS52 em poplar; e cinco CDC20 e três CCS52 em Arabidopsis (tabela 3). A organização dos exons-introns dos ativadores foi analisada e encontramos alguns erros de anotação. AtCDC20_5, PtCDC20_5, PtCCS52A1 e PtCCS52A1_2 possuíam erros na região 5'. Usando ferramentas de bioinformática, nós detectamos que apenas o PtCDC20_5 não possui C-box. OsCDC20_1, AtCDC20_4, PtCDC20_2, PtCDC20_4 e PtCDC20_5 possuíam erros na região 3'. Esta região contém a seqüência IR (elemento consenso - Isoleucina e Arginina) que está presente na região C-terminal dos ativadores do APC e na subunidade APC10. Comparando com o banco de EST, todas as seqüências foram corrigidas e o elemento IR identificado (APÊNDICE VIII). Nos genes PtCCS52A1_2 e OsCDC20_2, alguns introns foram incorretamente incluídos. O oposto aconteceu com o gene OSCDC20_1, onde um exon estava ausente. Foram encontrados em Arabidopsis, arroz e poplar variantes de splicing alternativo dos genes dos ativadores, e isto pode representar em outra vertente de complexidade na organização e função do APC. Selecionamos uma única variante para futuras análises.

Duplicação de componentes da maquinaria de ciclo celular é raro em metazoários, mas isto é um fenômeno comum em plantas (Masuda *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2005; Shultz *et al.*, 2007). Foi proposto que duplicação, seguido por uma divergência de promotor e/ou regiões codificantes, leva a novas funções e especializações únicas no reino vegetal (Pérez-Pérez *et al.*, 2007; Lammens *et al.*, 2008). Além disso, a tabela 4 sugere que duplicações individuais das subunidades do APC não estão presentes em todas as plantas, pelo contrário,

elas podem ser restritas a espécies ou a um pequeno grupo de plantas relacionado filogeneticamente; e podem estar envolvidos na organização dos eventos de desenvolvimento restritos a este grupo.

Tabela 4.

Plantas	Subunidades do APC											
	APC1	APC2	CDC27	APC4	APC5	CDC16	APC7	CDC23	APC10	APC11	CDC26	APC13
Cr	1	1	1	1	1	1	NI	1	1	1	1	1
Vc	1	1	1	1	1	1	NI	1	1	1	NI	NI
Csp	1	1	1	1	1	1	NI	1	1	1	NI	NI
Msp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NI	NI
Osp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NI	NI
Cm	1	1	1	1	NI	1	NI	1	1	1	NI	NI
Pp	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sm	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bd	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1
Sb	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mt	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vv	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2
Cp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
At	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Os	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1
Pt	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2

Cr, *Chlamydomonas reinhardtii*; Vc, *Volvox carteri*; Csp, *Chlorella sp*; Msp, *Micromonas sp*; Osp, *Ostreococcus sp*; Cm, *Cyanidioschyzon merolae*; Pp, *Physcomitrella patens*; Sm, *Selaginella moellendorffii*; Bd, *Brachypodium distachyon*; Sb, *Sorghum bicolor*; Mt, *Medicago truncatula*; Vv, *Vitis vinifera*; Cp, *Carica papaya*; At, *Arabidopsis thaliana*; Os, *Oryza sativa*; Pt, *Populus trichocarpa*; Abbreviations: NI, não identificado.

4.2 Localização dos genes das subunidades do APC e dos ativadores

A estreita semelhança, e a presença de subunidades putativas e parálogas, alertou-nos para investigar a distribuição das subunidades e ativadores do APC nos genomas. Os genes do APC foram encontrados nos cinco cromossomos de Arabidopsis, em 10 dos 12 cromossomos de arroz e em 10 dos 19 cromossomos de poplar (e sete estão presentes em contigs ainda não montados em cromossomos - scaffolds) (figura 14).

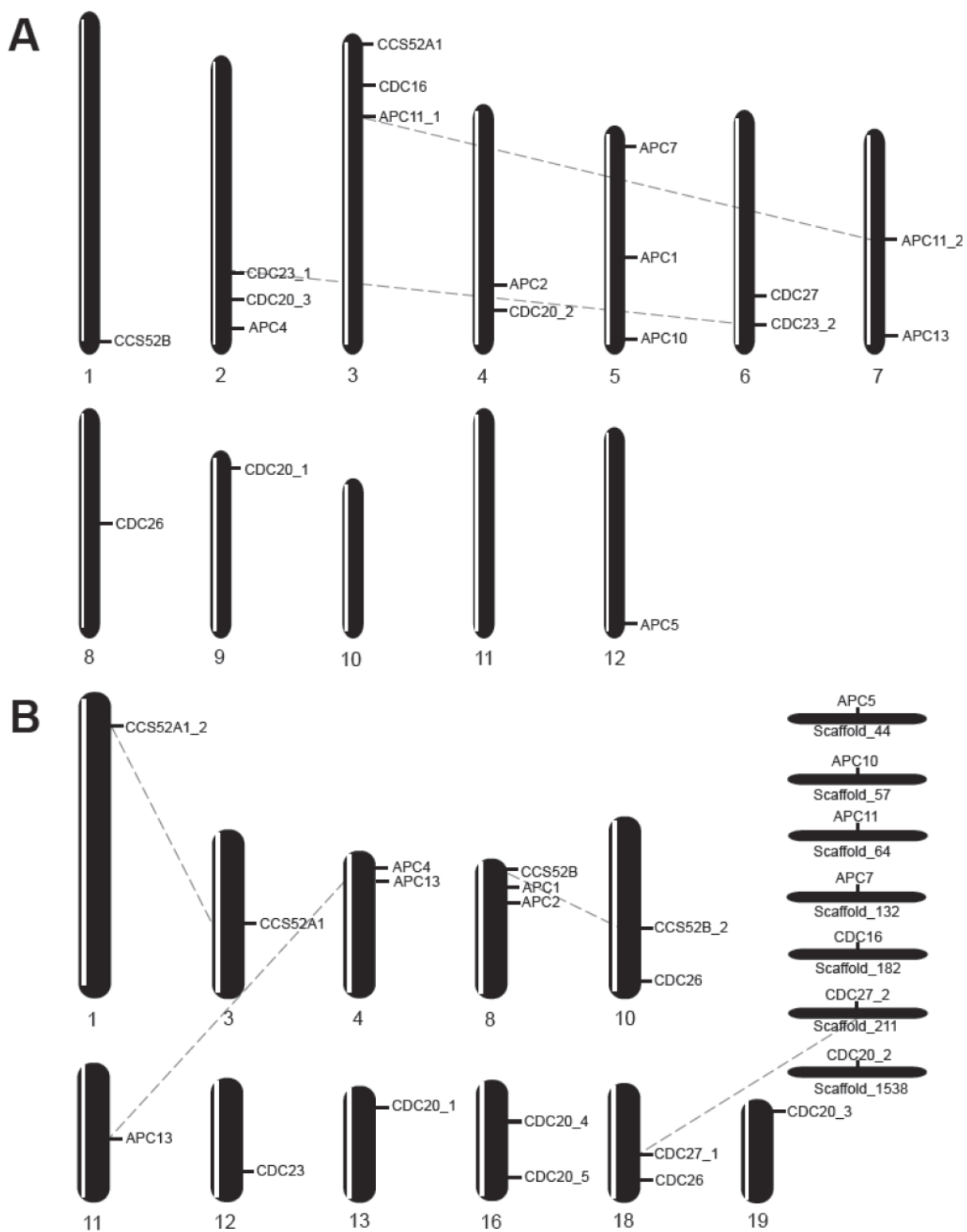


Figura 14: Localização cromossômica das subunidades do APC e ativadores em arroz e poplar. O número de cada cromossomo está indicado na base de cada cromossomo. Genes parálogos estão ligados por linhas tracejadas. **A**, posição cromossômica dos genes em arroz. **B**, posição cromossômica dos genes em poplar. Sete genes de poplar foram anotados em “scaffolds”.

Somente uma subunidade do APC está duplicada no genoma de *Arabidopsis*, AtCDC27a e AtCDC27b, e estão localizadas em cromossomos diferentes (três e dois respectivamente). Compartilham 47% de identidade e 64% de similaridade em aminoácidos. Um evento de duplicação antigo pode ter ocorrido em *Arabidopsis* neste caso, de acordo com a ferramenta Paralogons (Blanc *et al.*, 2003). Os genes CDC20 e CCS52 de *Arabidopsis* estão localizados nos cromossomos 4 e 5. AtCCS52A1 e AtCCS52A2 aparentam ser resultado de uma recente duplicação e AtCDC20_1 e AtCDC20_2 estão presentes no cromossomo quatro no arranjo em tandem (Fülöp *et al.*, 2005).

Os 19 genes das subunidades do APC e ativadores em arroz estão distribuídos entre todos os cromossomos, exceto nos cromossomos 10 e 11. Baseado em seqüências consenso, do genoma de arroz, informações de duplicações de segmentos foram usadas para identificar genes parálogos (utilizando o banco de dados TIGR). Cada par de parálogos localizados em regiões duplicadas possuem alta similaridade de seqüência. Duas subunidades, CDC23 e APC11, estão duplicadas. OsCDC23_1 e OsCDC23_2 estão localizadas nos cromossomos 2 e 6 respectivamente. As seqüências de aminoácidos compartilham similaridade, mas apenas 57% de identidade. Isto sugere que ocorreu um evento de duplicação no ancestral ou os dois genes estão evoluindo rapidamente. OsAPC11_1 e OsAPC11_2 estão localizados nos cromossomos 3 e 7 e compartilham 97% de identidade. Nenhuma evidencia foi encontrada de eventos de duplicação recente para ativadores em arroz.

Análise *in silico* do mapa cromossômico revelou que subunidades do APC e ativadores em poplar estão dispersos através do genoma. Parálogos estão localizados em cromossomos diferentes ou em "scaffolds". Pode ser, entretanto, que

os genes aparentemente relacionados sejam de fato alelos derivados de haplótipos não montados. Isto pode ter sido gerado por potenciais artefatos da montagem do genoma heterozigoto de poplar por “shotgun”. Porém, os aparentes co-ortólogos são divergentes em seqüência nucleotídica, assim como em genes que flanqueiam e foram identificados em blocos sintênicos, o que corrobora com a classificação de um “scaffold” em haplótipo. Duplicações de duas subunidades do APC foram identificadas; CDC27 e APC13. PtCDC27_1 está localizada no grupo VIII e PCDC27_2 no scaffold_211. Ambos são muito similares – 88% de identidade e 85% de similaridade em seqüências de aminoácidos. PtAPC13_1 é 95% idêntico ao PtAPC13_2 e estão localizados nos grupos IV e XI respectivamente. Os genes CCS52 de poplar são muito semelhantes, sugerindo um evento recente de duplicação. Os grupos III, I, VIII e X compartilham grandes blocos em completa colinearidade. PtCDC20_1 e PtCDC20_3 estão localizados em regiões cromossômicas que podem representar segmentos parálogos – grupos XIII e XIX. Outros genes CDC20 estão localizados no grupo XVI e scaffold_1538. A distribuição dispersa dos ativadores e das subunidades do APC está em conformidade com estudos prévios que descrevem eventos de duplicação em larga escala em poplar (Tuskan *et al.*, 2006).

4.3 Análise filogenética das subunidades do APC contendo o domínio TPR e dos ativadores

Uma questão importante é porque o APC é composto por diferentes subunidades, enquanto a maioria das E₃ ligases é composta por uma ou por poucas subunidades. Muitas das subunidades do APC são conservadas em todos os eucariotos e se mantêm associadas através do ciclo celular (van Leuken *et al.*, 2008; Peters, 2006). Parece provável, que a complexidade de domínios das subunidades está relacionada com a intrigante topologia do APC (Jin *et al.*, 2008, Herzog *et al.*, 2009). Um importante domínio encontrado em subunidades do APC é o TPR. O domínio TPR consiste de 3-16 repetições em tandem de 34 resíduos de aminoácidos, embora um domínio TPR individual possa estar disperso na seqüência da proteína (Blatch e Lásle, 1999). O domínio TPR parece agir como um domínio versátil de interação proteína-proteína e tem sido especulado que subunidades do APC contendo TPR formam um scaffold, onde as outras subunidades se aproximam para completar a montagem do complexo (D'Andrea *et al.*, 2003). Cinco subunidades possuem o domínio TPR: CDC27, APC5, CDC16, APC7 e CDC23. Seqüências de proteínas contendo TPR da alga vermelha primitiva *Cyanidioschyzon merolae*; algas verdes *Volvox carteri*, *Chlorella sp.*, *Micromonas sp* e *Ostreococcus sp*; a briófita *Physcomitrella patens*; a licófita *Selaginella moellendorffii*; as plantas terrestres *Vitis vinifera* e *Sorghum bicolor*; assim como, poplar arroz e *Arabidopsis* foram usadas para aumentar o conhecimento sobre os aspectos evolutivos do ciclo celular entre plantas terrestres e algas. Árvore filogenética foi construída utilizando o programa MEGA4 (optando pelo método neighbor-joining), empregando múltiplos alinhamentos contendo as seqüências dos genes: 15 CDC27, 11 APC5, 12 CDC16,

9 APC7 e 14 CDC23. Foram feitas as análises com 2 mil réplicas para assegurar a confiabilidade estatística (figura 15). Posteriormente, as 61 subunidades do APC foram divididas em 5 grupos de ortólogos. O cladograma obtido revela os genes OsCDC23 no mesmo ramo, localizado no mesmo grupo de *S. bicolor*. Os genes CDC23 de uva estão no mesmo grupo de poplar. O cladograma também mostra que os genes de uva e poplar estão presentes nos mesmos ramos em todos os grupos e isto pode revelar baixas taxas evolutivas em plantas lenhosas quando comparadas com plantas herbáceas. Por outro lado, o CDC27a de *Arabidopsis* está no mesmo grupo do CDC27b, mas eles se encontram em ramos separados. Esta divergência de seqüência e evolução podem refletir o ciclo de vida acelerado dessa planta. Interessante, os clados do APC5 e CDC16 não possuem genes duplicados. Não identificamos a seqüência do APC5 na alga vermelha *C. merolae*, porém esta subunidade não é muito conservada entre os diferentes organismos e é bem possível que a similaridade seja muito baixa para identificar por comparação via BLAST.

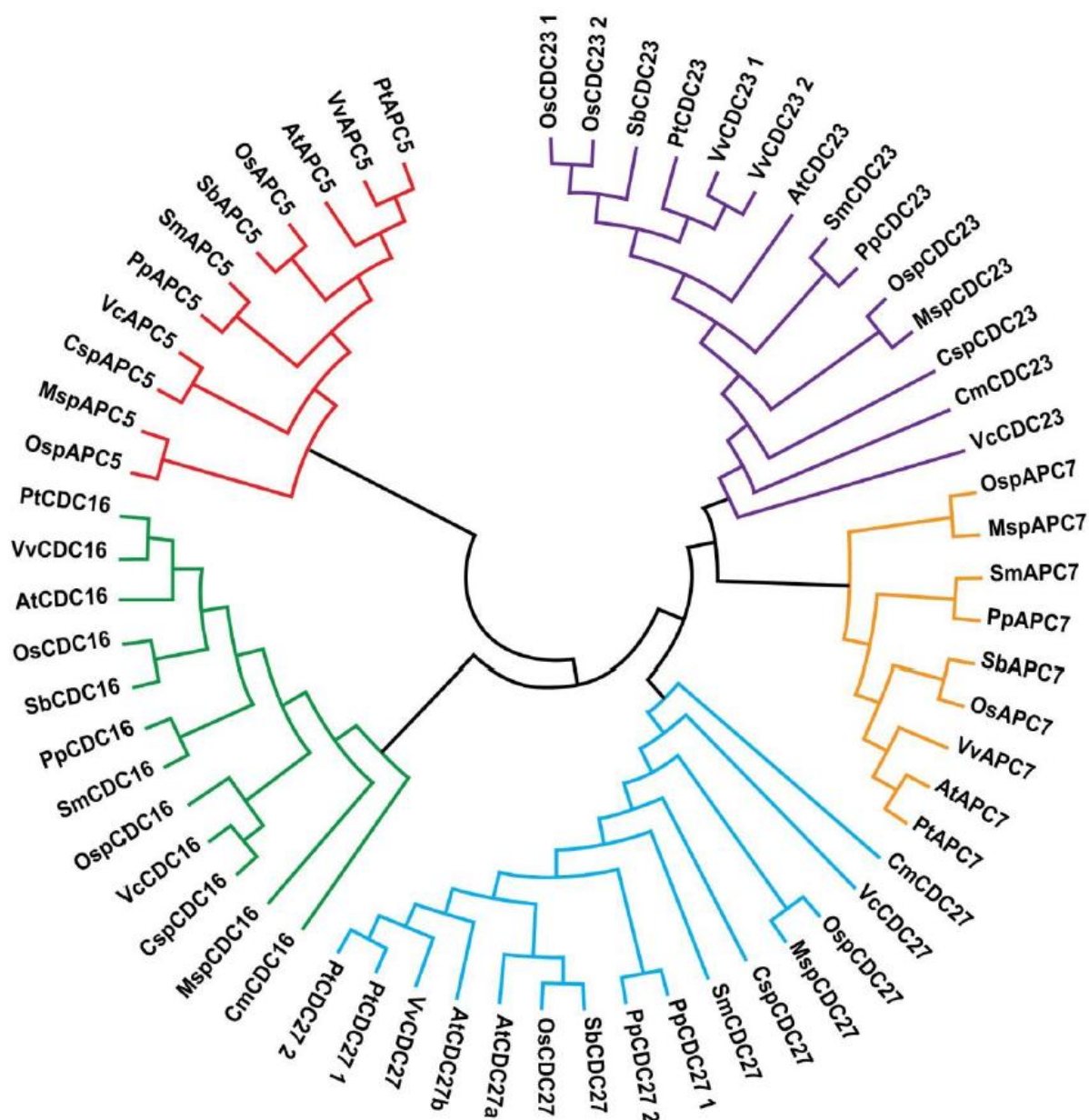


Figura 15: Análise filogenética das proteínas do APC contendo o domínio TPR em diversas espécies. As seqüências de proteínas foram alinhadas utilizando o programa MEGA4 (utilizando o programa ClustalW e a matriz de pontuação Gonnet). A árvore não enraizada foi gerada pelo programa MEGA4 utilizando o método Neighbor-Joining. Ramos com menos de 50% de suporte no bootstrapp foram condensados. As abreviações dos nomes das espécies são: At, *Arabidopsis thaliana*; Pt, *Populus trichocarpa*; Os, *Oryza sativa*; Vv, *Vitis vinifera*; Sb, *Sorghum bicolor*; Pp, *Physcomitrella patens*; Sm, *Selaginella moellendorffii*; Msp, *Micromonas sp*; Osp, *Ostreococcus sp*; Csp, *Chlorella sp*; Vc, *Volvox carteri*; Cm, *Cyanidioschyzon merolae*

O gene APC7 está ausente nas algas verdes *Chlorella sp* e *V. carteri*, assim como na alga vermelha *C. merolae*, mas está presente nas algas verdes *Ostreococcus sp* e *Micromonas sp*. Chlorophytes (ex: *V. carteri*) e Trebouxiophytes (ex: *Chlorella sp*), aparentemente, perderam o gene APC7, mas os Prasinophytes (ex: *Ostreococcus sp*, *Micromonas sp*) e as plantas terrestres mantiveram esta subunidade. Este dado sugere que um ancestral primitivo das classes Chlorophytes e Trebouxiophytes perderam o gene APC7 durante a evolução das algas verdes (figura 16). O gene APC7 também não é encontrado em leveduras e esta informação pode significar que a subunidade não é exigida para a função do APC em organismos unicelulares. É possível que o gene APC7 seja ser uma duplicação recente de outra subunidade TPR.

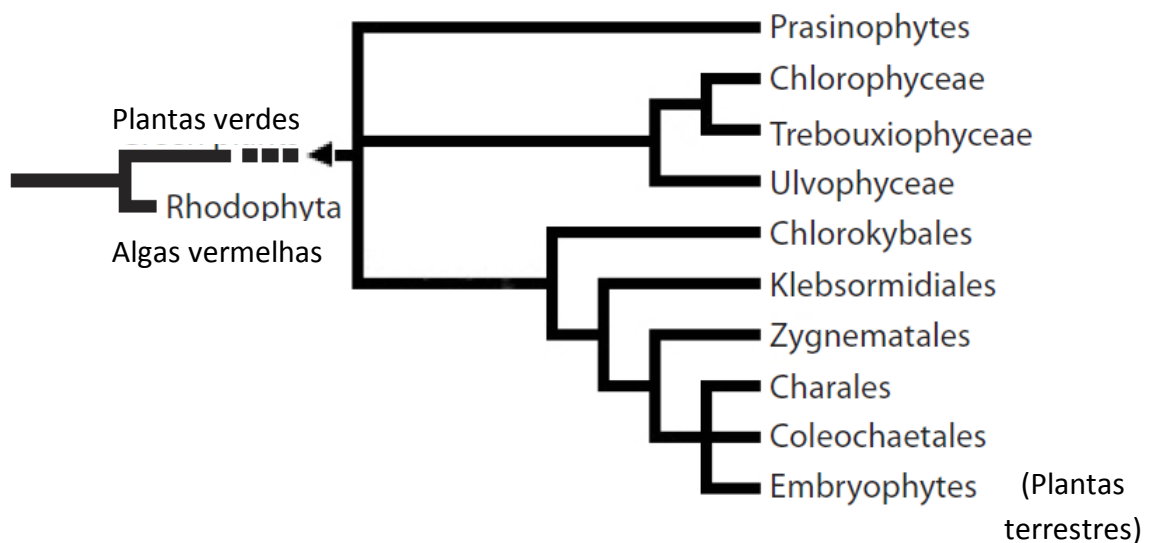


Figura 16: Relação filogenética entre plantas e algas. Evidência de um ancestral comum para os ramos compostos pelas Prasinophytes, Chlorophyceae e plantas terrestres. Representação da divergência inicial entre plantas verdes e algas vermelhas.

O genoma de *Arabidopsis* codifica seis genes CDC20 e três CCS52. Além disso, os genes CCS52 são divididos em tipos A e B com base na função e análise de seqüências (Fülöp *et al.*, 2005). Para obter maior conhecimento da evolução entre os ativadores de plantas terrestres e algas, análises filogenéticas foram feitas (figura 17). Usamos as seqüências de EST de *Zea mays*, *Medicago truncatula* e *Saccharum officinarum* para melhor estimar a divergência entre as seqüências de monocotiledôneas e dicotiledôneas. A árvore filogenética retratou três grandes grupos. Três genes, CmCDC20, CmCCS52 e SmCDC20_3 estão isolados dos outros e, deste modo, precisam ser tratadas como seqüências não conservadas. Um grande clado agrupou todos as seqüências CDC20 (exceto CmCDC20 e SmCDC20_3), enquanto outros dois clados incluem as seqüências de CCS52A e CCS52B (exceto CmCCS52). O clado CDC20 está dividido em duas subfamílias: uma com *S. moellendorfi* e *P. patens*; e outra com algas e plantas terrestres. O número de cópias de CDC20 varia de acordo com a espécie. *Arabidopsis* possui 6 cópias, arroz 3, poplar 5, uva 4, sorgo 3, *S. moellendorfi* 3 e *P. patens* 4. O clado CCS52A contém mais duplicações do que o clado CCS52B. Naquele clado estão todas os genes CCS52 de algas, duas cópias de PtCCS52A, AtCCS52A e SmCCS52; e três cópias de genes PpCCS52.

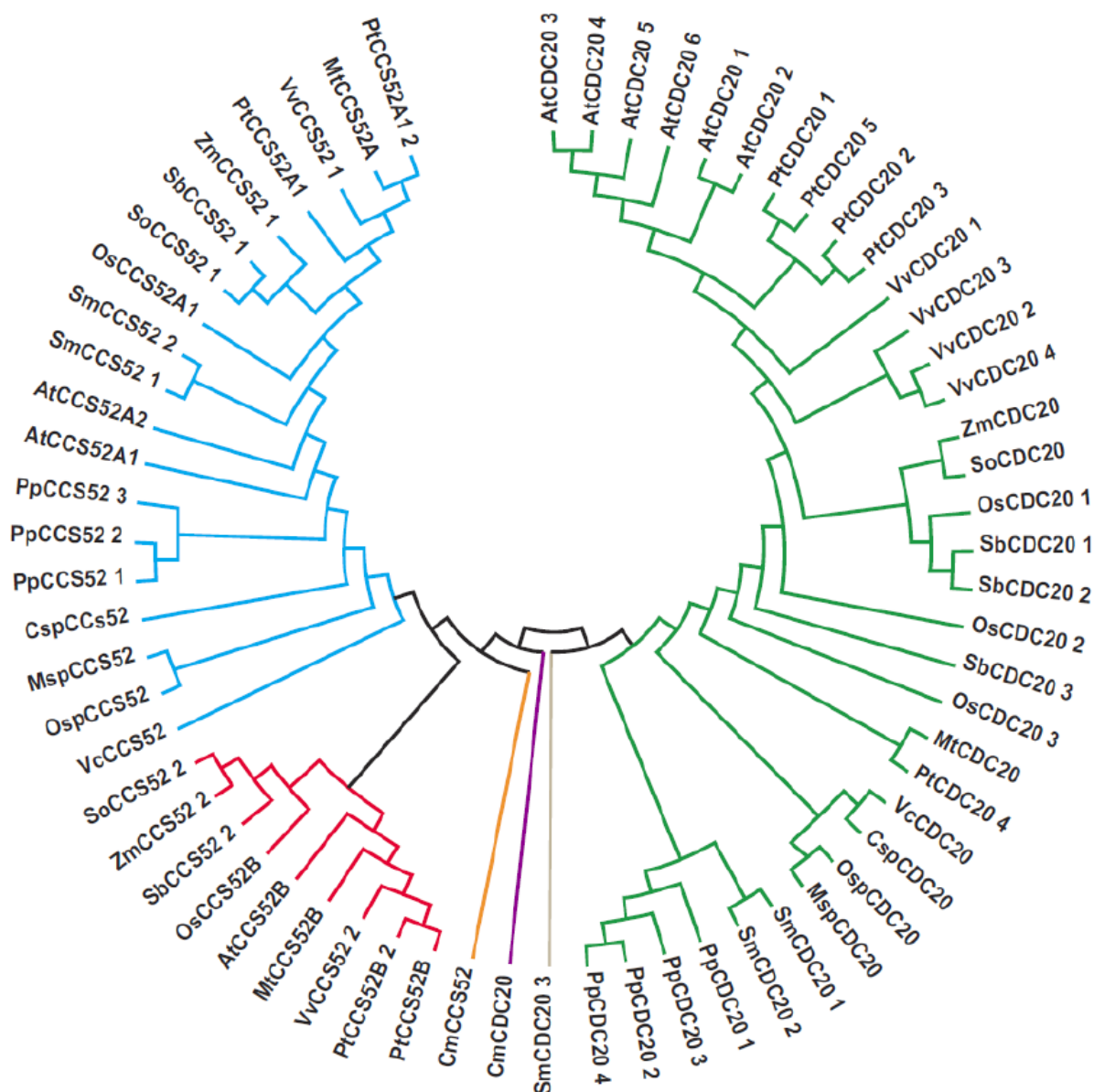


Figura 17: Análise filogenética das proteínas das proteínas CDC20 e CCS52 em diversas espécies. As seqüências de proteínas foram alinhadas utilizando o programa MEGA4 (utilizando o programa ClustalW e a matriz de pontuação Gonnet). A árvore não enraizada foi gerada pelo programa MEGA4 utilizando o método Neighbor-Joining. Ramos com menos de 50% de suporte no bootstrapp foram condensados. As abreviações dos nomes das espécies são: At, *Arabidopsis thaliana*; Pt, *Populus trichocarpa*; Os, *Oryza sativa*; Vv, *Vitis vinifera*; Zm, *Zea mays*; So, *Saccharum officinarum*; Sb, *Sorghum bicolor*; Mt, *Medicago truncatula*; Pp, *Physcomitrella patens*; Sm, *Selaginella moellendorffii*; Msp, *Micromonas sp*; Osp, *Ostreococcus sp*; Csp, *Chlorella sp*; Vc, *Volvox carterii*; Cm, *Cyanidioschyzon merolae*.

Curiosamente, somente uma cópia dos genes CDC20 e CCS52 (possivelmente um primitivo do tipo A) foi encontrada nos genomas das algas. A ausência de genes CCS52 do tipo B em alga, *P. patens* e *S. moellendorfi* é interessante porque estas espécies estão na base da evolução das plantas, onde a divergência entre tipo A e tipo B ainda não ocorreu ainda. Semelhante a *Arabidopsis*, poplar possui duas cópias de CCS52A, porém poplar possui uma cópia adicional do CCS52B. Análises da evolução gênica em poplar devem levar em conta o mais significativo evento na recente evolução do gênero: uma ampla duplicação do genoma que ocorreu, aproximadamente, a 65 milhões de anos atrás e permanece detectável em 92% do genoma (Tuskan *et al.*, 2006). Baseado em estimativas temporais de duplicação gênica e análise de microssintenia por homologia, o par CDC20 e CCS52 estão representados dentro de regiões que sofreram duplicação de segmentos e associados com um recente evento de duplicação em salicoide.

4.4 Comparação das proteínas contendo o domínio TPR em *A. thaliana*, *P. tricocharpa* e *O. sativa* e determinação da relação de ortologia

Progressos em genômica comparativa permitiram avaliar o impacto da evolução dos genomas e a evolução de genes sobre o aparecimento de novas funções biológicas e seus efeitos sobre a complexidade dos organismos (Patthy, 2003). A importância da duplicação de genes no fornecimento de um recente material genético para a evolução biológica tem sido reconhecida há décadas e ainda é amplamente estudada. A duplicação de genes gera redundância funcional, que permite que dois genes idênticos, resultantes da duplicação, acumule mutações com a pressão seletiva menos severa (Zhang, 2003; Babushok *et al.*,

2007). Funções diferenciadas ou novas funções podem ser alcançadas após um período de evolução. Duplicação de segmentos (duplicação em “tandem” de um segmento genômico) é a forma predominante para gerar genes redundantes (Lynch e Conery, 2000). Duplicação segmentar também pode acontecer em uma escala menor, resultando em duplicações de exons, ao invés de um gene inteiro (Moore *et al.*, 2008). Estes blocos de duplicação segmentar podem criar fragmentos de proteínas (referidos como domínio) que possuem estrutura e função (Vogel *et al.*, 2005).

O domínio TPR consiste de uma repetição de 34 resíduos que adotam uma conformação hélice-alça-hélice, que está associado com interações proteína-proteína (Wilson *et al.*, 2005). As subunidades CDC27, APC5, CDC16, APC7 e CDC23 possuem domínios TPR, mas o número total de repetições TPR e as posições de cada seqüência são variáveis. Embaralhamento de exons pode ser responsável por duplicações internas nas repetições e por este motivo decidimos investigar a organização exon-intron dos genes TPR em *Arabidopsis*, arroz e poplar (figura 18A) (Schmidt *et al.*, 2007). O número e as posições dos exons e introns nas seqüências genômicas são muito conservadas em algumas subunidades do APC. O gene CDC27 possui dois homólogos em *Arabidopsis* e poplar, e apenas uma cópia em arroz. Curiosamente, o gene CDC27 mantém 16 exons em monocotiledôneas e dicotiledôneas. Os genes APC5 e APC7 possuem uma cópia em todos os genomas e também mantém 20 e 18 exons, respectivamente, nos três genomas. Por outro lado, o gene CDC23 possui dois homólogos em arroz e apenas um em *Arabidopsis* e poplar, mas a informação mais importante é o menor número de exons, quando comparado com outros genes contendo TPR. O OsCDC23_2 possui 6 exons e AtCDC23, PtCDC23 e OsCDC23_1 possuem 4 exons. Examinando o gene CDC16,

identificamos 15 exons em poplar, 16 exons em Arabidopsis e 17 exons em arroz. Posteriormente, utilizando a previsão de domínio, comparamos a organização dos exons em todos os genes contendo TPR de Arabidopsis. Nove seqüências com repetições de TPR foram identificados em AtCDC27a e AtCDC16; duas em AtAPC5; e dez em AtAPC7 e AtCDC23 (figura 18B). AtCDC27b possui o mesmo número de domínios do AtCDC27a. O arranjo em “tandem” de domínios TPR ocorre, predominantemente, na região C-terminal das seqüências do AtCDC27a, AtCDC27b, AtCDC16, AtAPC7 e AtCDC23. AtAPC5 possui apenas dois domínios TPR, um no meio da seqüência e outro no C-terminal. Os resultados revelam que a topologia das repetições em “tandem” do domínio TPR em seqüências de proteínas está, pelo menos, parcialmente relacionada com a organização dos exons nos genes das subunidades contendo TPR.

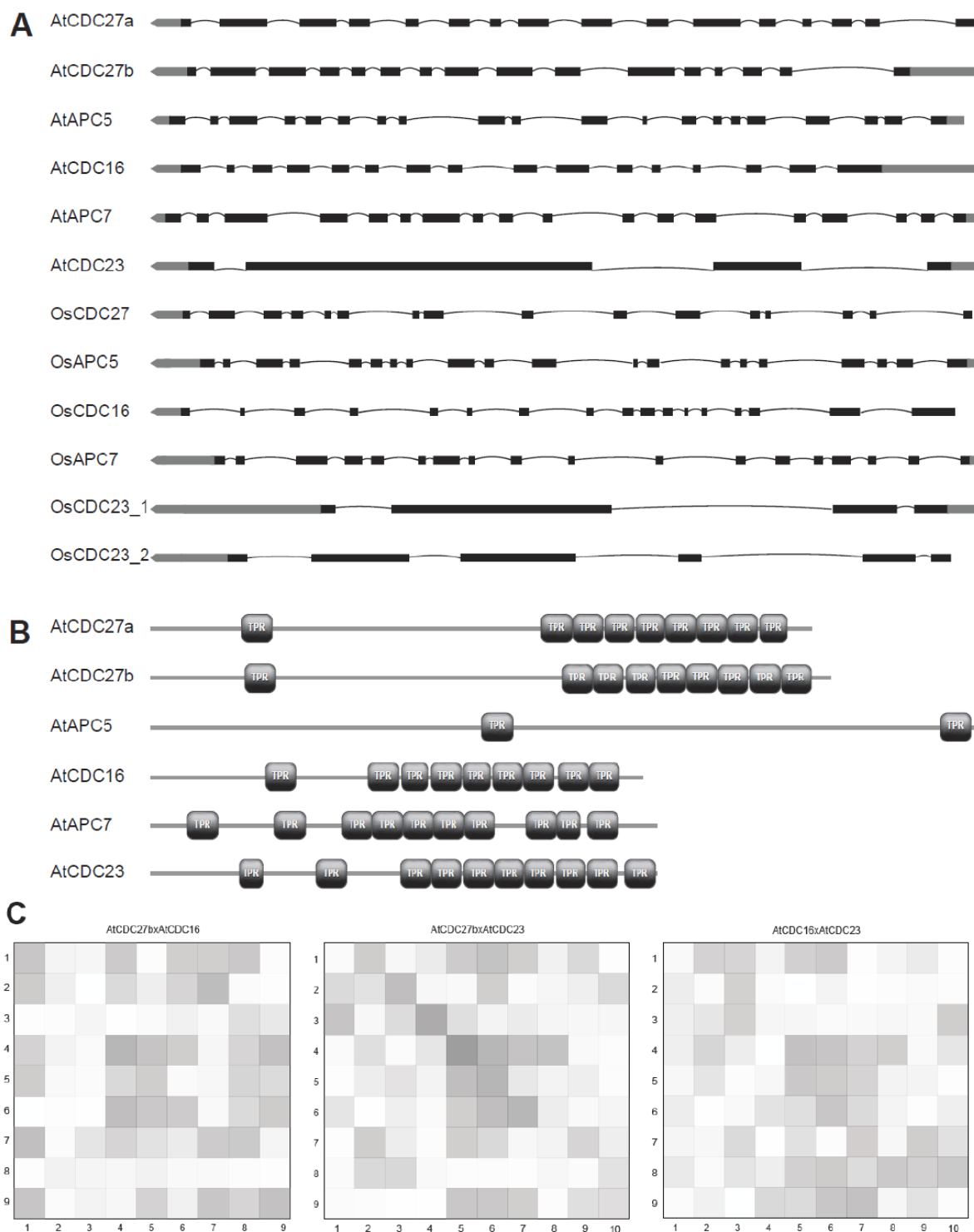


Figura 18: **A**, diagrama da estrutura de exon-intron dos genes das subunidades do APC contendo o domínio TPR em Arabidopsis e arroz. Exons e introns estão representados com caixas pretas e linhas cinza, respectivamente. As linhas cinza mais grossas correspondem a regiões não traduzidas. **B**, representação esquemática dos domínios TPR nas seqüências de proteínas das subunidades do APC. Domínios TPR e as seqüências completas das proteínas estão representados por caixas pretas e linhas cinza, respectivamente. **C**, padrão interno de duplicação dos domínios TPR das subunidades do APC. A intensidade das sombras reflete a pontuação do alinhamento, com as sombras mais escuras correspondendo a alta pontuação. Os números representados em cada eixo indicam os domínios na orientação N → C-terminal dentro da repetição.

Nas subunidades do APC, o arranjo em “tandem” de domínios TPR sugere que os elementos envolvidos numa duplicação foram seguidos por divergência da seqüência primária. Pelo fato das TPR possuírem elementos conservados nas estruturas de repetição que muitas vezes são divergentes ao nível das seqüências primárias, grupos de domínio TPR podem ter divergido por muito tempo e possuírem motivos consenso “fracos ou pobres”. Uma abordagem para investigar a evolução dos domínios TPR nas subunidades é a identificação dos padrões de duplicação de TPRs através de alinhamentos. Padrões distintos de repetição muitas vezes podem ser identificados, e por este motivo verificamos se as proteínas TPR de *Arabidopsis* reproduzem blocos de repetição interna. As seqüências de proteínas TPR foram alinhadas entre si ou em pares usando a metodologia descrita por Björklund *et al.*, (2006). As semelhanças entre todos os domínios contendo repetições em uma proteína foram analisados utilizando o algoritmo de Smith-Waterman para identificar padrões de duplicação dos alinhamentos (Rice *et al.*, 2000). A pontuação dos alinhamentos entre os domínios foram exibidos em uma matriz (figura 18C e APÊNDICE IX). Comparando-se as proteínas entre si, há semelhanças entre os domínios 4-6 do AtCDC27 e entre os domínios 5-9 do AtCDC16. AtAPC7 possui um padrão para os domínios 1-2, AtCDC23 possui padrões de similaridade para os domínios 6-8; e nenhum padrão foi encontrado para a AtAPC5. Comparando-se as proteínas em pares, podemos observar, na diagonal da matriz, uma correspondência entre os domínios 2-6 do AtCDC27 e 3-7 do AtCDC23. Há também indícios de similaridades nos pares AtCDC27 e AtCDC16; AtCDC16 e AtCDC23. Embora não existam padrões de duplicação inequívoca para qualquer uma das proteínas, os resultados sugerem que os domínios TPR nos genes do APC evoluíram pela

duplicação dos elementos centrais, ou que são maiores as restrições impostas para a mudança da seqüência principal dessas repetições.

4.5 Análise de expressão das subunidades do APC e dos ativadores

A duplicação de genes pode ser uma fonte de inovação para aumentar a complexidade do desenvolvimento das plantas. Padrões de expressão podem fornecer pistas importantes para a função do gene em condições específicas. Nós examinamos a expressão das subunidades do APC e genes ativadores em arroz, utilizando raiz e parte aérea de plantas jovens (5 dias); e bainha e lâmina de tecidos maduros (figura 19A). Como esperado, há elevados níveis de expressão gênica em tecidos com alta proliferação, embora haja mais RNAm na parte aérea do que nas raízes. No entanto, um padrão complexo é observado quando a sua expressão é examinada em lâmina madura. Em geral, há uma diminuição global na expressão de vários genes, como esperado. No entanto, o grau de redução é variável e pode refletir a especialização de subunidades e/ou ativadores. Níveis de RNAm de APC1, APC2, APC4, APC5, CDC16, CDC23_2, APC10, APC11_2, CDC26, e APC13 estão reduzidos em bainha e lâmina em relação a parte aérea. Por outro lado, os níveis de RNAm de APC11_2 e CDC27 estão reduzidos apenas na bainha, mas não na lâmina. Finalmente, não há redução dos níveis de RNAm do APC7 tanto em bainha quanto em lâmina. Em contraste, os níveis de expressão dos ativadores estão, marcadamente, reduzidos em folhas maduras. No entanto, embora os níveis de RNAm de CCS52A sejam mais baixos em bainha e lâmina, a diminuição é menos pronunciada. Em *Medicago*, o gene CCS52A tem sido implicado com o controle da endoreduplicação em nódulos (Vinardell *et al.*, 2003). Recentemente, foi descrito

que o gene CCS52A é importante para a manutenção da atividade do meristema de raízes de *Arabidopsis* (Vanstraelen *et al.*, 2009). Portanto, é possível que o CCS52A possa formar um complexo especializado com algumas das subunidades do APC e assumir uma função exclusiva em folhas maduras.

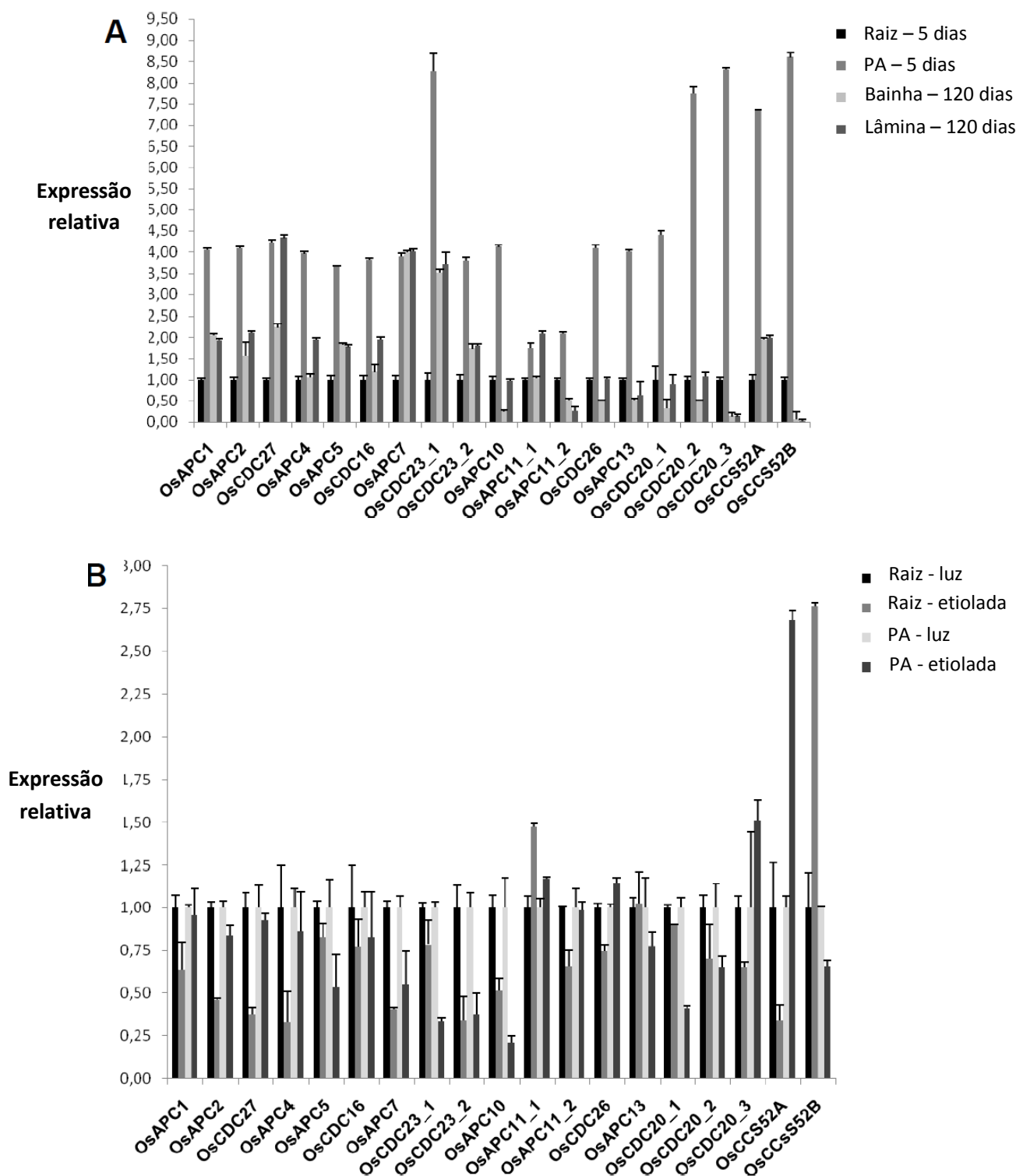


Figura 19: Perfil de expressão relativa das subunidades do APC e ativadores em arroz. O nível de transcritos está representado como a razão do valor absoluto do gene a ser estudado pelo valor do gene Os28S. As cores das barras estão indicadas no lado direito da figura. **A.** perfil de expressão dos genes das subunidades do APC e ativadores em diferentes tecidos. Níveis de expressão obtidos estão normalizados pelos dados de raiz. **B.** padrão de expressão das subunidades do APC e ativadores crescidos no escuro. Raiz e parte aérea crescidas no escuro e no claro foram normalizadas pelos respectivos controles. Abreviação: PA, parte aérea,

As respostas durante o crescimento vegetal no escuro fazem parte de uma mudança integrada no desenvolvimento de todos os órgãos da planta (Desnos *et al.*, 1996). Em *Arabidopsis*, células do hipocótilo sofrem até dois ciclos de endoreduplicação quando crescidas no claro, enquanto que um ciclo adicional pode ser observada, especificamente, durante o crescimento no escuro (Galbraith *et al.*, 1991; Gendreau *et al.*, 1997). O mecanismo de regulação da endoreduplicação é similar ao período de transição G₁-S do ciclo celular mitótico (Edgar e Orr-Weaver, 2001). A transição G₁-S é importante para a inativação da CDK, via proteólise da CYC mediada por APC^{CDH1}, que então mantém a instabilidade da CYC em G₁ e permite um novo ciclo de replicação do DNA, permitindo a montagem do complexo pré-replicativo (Diffley, 2004). Quase todas as subunidades do APC em arroz possuem padrões similares de expressão, tanto em raízes quanto em parte aérea (figura 19B). No entanto, os níveis de RNAm de OsAPC11_1 e OsCDC26 aumentaram no escuro. Curiosamente, os dois genes OsCDC23 são diferencialmente expressos nas raízes das plantas etioladas. Embora, os níveis de OsCDC23_1 não tenham mudado em raízes crescidas no escuro ou no claro, os níveis de OsCDC23_2 nas raízes é muito menor quando as plantas de arroz são crescidas no escuro. Da mesma forma, em raízes etioladas, os níveis de RNAm de OsAPC11_1 aumentaram, enquanto os níveis OsAPC11_2 diminuíram. Estes resultados sugerem que, após a duplicação dos genes, os genes APC11 e CDC23 estão assumindo funções especializadas em arroz.

Os ativadores OsCCS52A e OsCCS52B apresentaram altos níveis de RNAm no escuro e OsCDC20_3 mostrou um nível menor. Uma das hipóteses para os altos níveis de RNAm dos genes CCS52 é que o APC^{CCS52} atua como um regulador negativo do complexo CYCA2;3/CDKA;1 em *Arabidopsis* (Imai *et al.*, 2006). O

complexo CYCA2;3/CDKA;1 age como um regulador negativo da endoreduplicação e a ativação da APC por CCS52 pode aumentar a degradação da CYCA2;3 e, conseqüentemente, a progressão da endoreduplicação no escuro (Imai *et al.*, 2006).

Analizamos a expressão, em folhas, dos genes PtAPC10, PtCDC27_1, PtCDC20_1, PtCCS52A1_1 e PtCCS52B por real-time RT-PCR (figura 13B). Curiosamente, PtCCS52B apresentou menores níveis de RNAm em comparação com PtCCS52A1_1. Dados recentes sugerem que a MtCCS52B podem possuir funções específicas na progressão da fase M, alternativas ou complementares aos do MtCCS52A (Tarayre *et al.*, 2004). Assim, CCS52A poderia possuir papel importante nas fases posteriores a mitose, células em diferenciação (nas quais as degradações de alvos específicos do APC podem contribuir para a diferenciação celular), tecidos ou órgãos (Kondorosi e Kondorosi, 2004).

Esta análise evolutiva do APC culminou na elaboração de um manuscrito que já foi submetido a um periódico indexado (APÊNDICE XI)

CAPÍTULO II

Superexpressão da subunidade AtAPC10 em tabaco.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dados obtidos durante o doutorado que complementaram as análises realizadas no mestrado.

Durante o mestrado (defesa de dissertação de mestrado no período 2006/1 no Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro) foram realizados experimentos de superexpressão utilizando o sistema heterólogo de tabaco. O gene APC10 de *Arabidopsis* foi isolado, clonado num vetor de superexpressão e este utilizado para transformar plantas de tabaco (Lima, 2006). Os resultados obtidos foram muito interessantes. Plantas de tabaco superexpressando a subunidade AtAPC10 (APC10OE) são maiores que as plantas controle SR1. Estes dados foram congruentes com os resultados experimentais obtidos por outra dissertação de mestrado do grupo, onde plantas de tabaco foram transformadas com um vetor de superexpressão contendo a subunidade CDC27a (CDC27aOE) de *Arabidopsis* (Rodrigues, 2003). Ambas as plantas de tabaco transformadas com as construções de superexpressão são maiores que o controle e a possibilidade do cruzamento entre tais plantas foi testada. As plantas heterozigotas, oriundas deste cruzamento, apresentaram um efeito sinérgico no crescimento, culminando num aumento na altura das plantas quando comparadas aos seus parentais (10/27aOE). Diversas análises de biomassa, expressão relativa e interação foram realizadas nessas plantas (APC10OE, CDC27aOE e 10/27aOE), porém alguns experimentos, sugeridos para complementação dos dados para formalizar uma publicação, ficaram pendentes. Durante o doutorado, foram realizados experimentos de estresse salino, aumento de eficiência fotossintética. As figuras que representam os dados

experimentais gerados no mestrado estão disponíveis no APÊNDICE X (figuras do manuscrito para submissão)

- Estresse salino

Sementes de tabaco das construções APC10OE, CDC27aOE e 10/27aOE foram germinadas em meio MS (controle) e em MS contendo as concentrações 0,3% e 0,7% de NaCl. Dez dias após a germinação, as placas de cultura foram retiradas da sala de crescimento controlado e fotografadas (figura 20). Comparando os fenótipos das plantas crescidas em MS com as crescidas em MS+0.7% de NaCl, podemos identificar uma maior tolerância das plantas 10/27aOE ao estresse salino. As plantas APC10OE, aparentemente, possuem um fenótipo intermediário. Com base nestes dados, outra abordagem foi organizada para testar tal estresse, uma vez que a variação na tolerância poderia ser resultado de um crescimento inicial diferenciado dos transformantes. Ao invés das plantas serem germinadas diretamente em meio contendo NaCl, elas foram germinadas em meio MS e posteriormente transferidas para meio MS contendo NaCl nas concentrações anteriormente mencionadas. Os dados obtidos foram semelhantes aos realizados no experimento de germinação direta.

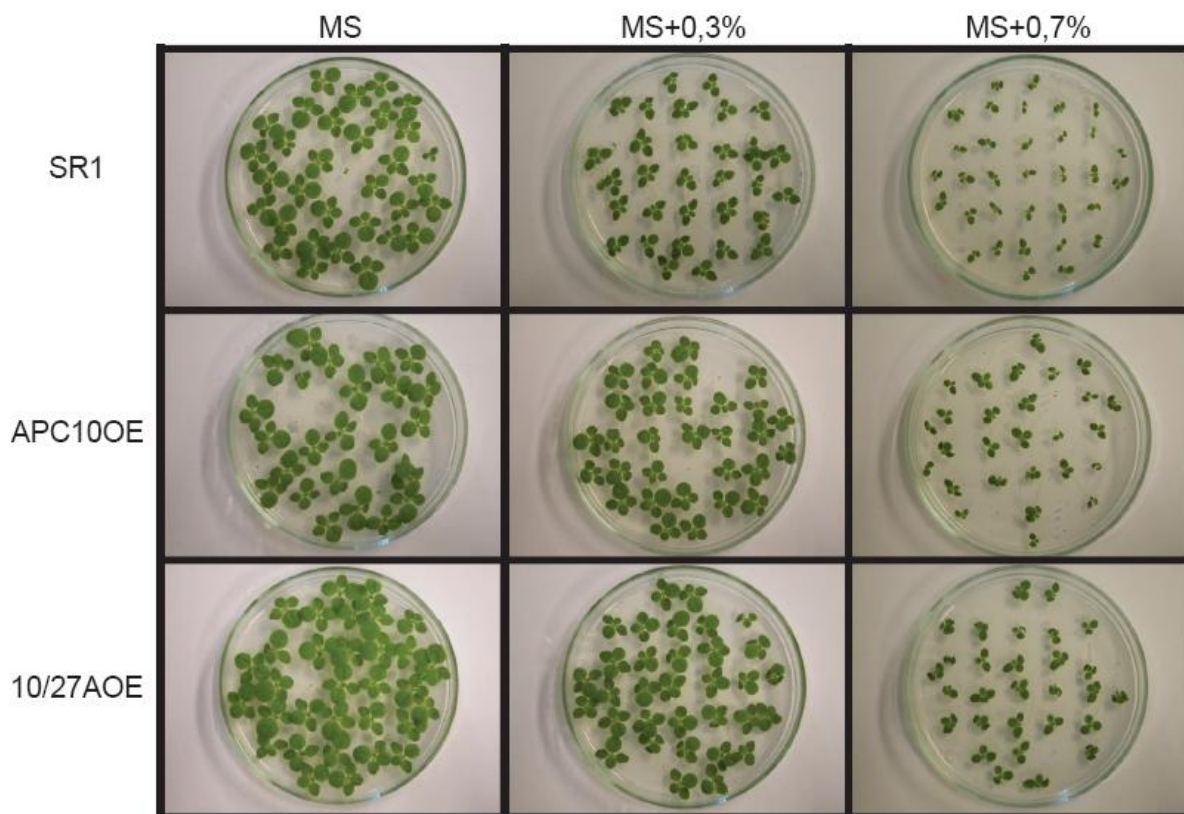


Figura 20: Plantas SR1, APC10OE e 10/27AOE germinadas em diferentes concentrações de NaCl. A, plantas germinadas em meio MS. **B,** plantas germinadas em meio MS com NaCl 0,3%. **C,** plantas germinadas em meio MS com NaCl 0,7%.

O crescimento radicular também foi alvo dos ensaios de germinação em meio salino. As plantas foram germinadas em placas, na posição vertical, e o comprimento das raízes medido (figuras 21 e 22). As plantas transformadas apresentaram o comprimento radicular maior que o controle, tanto em MS quanto em NaCl 0,7%, porém não houve uma diferença significativa entre os transformantes.

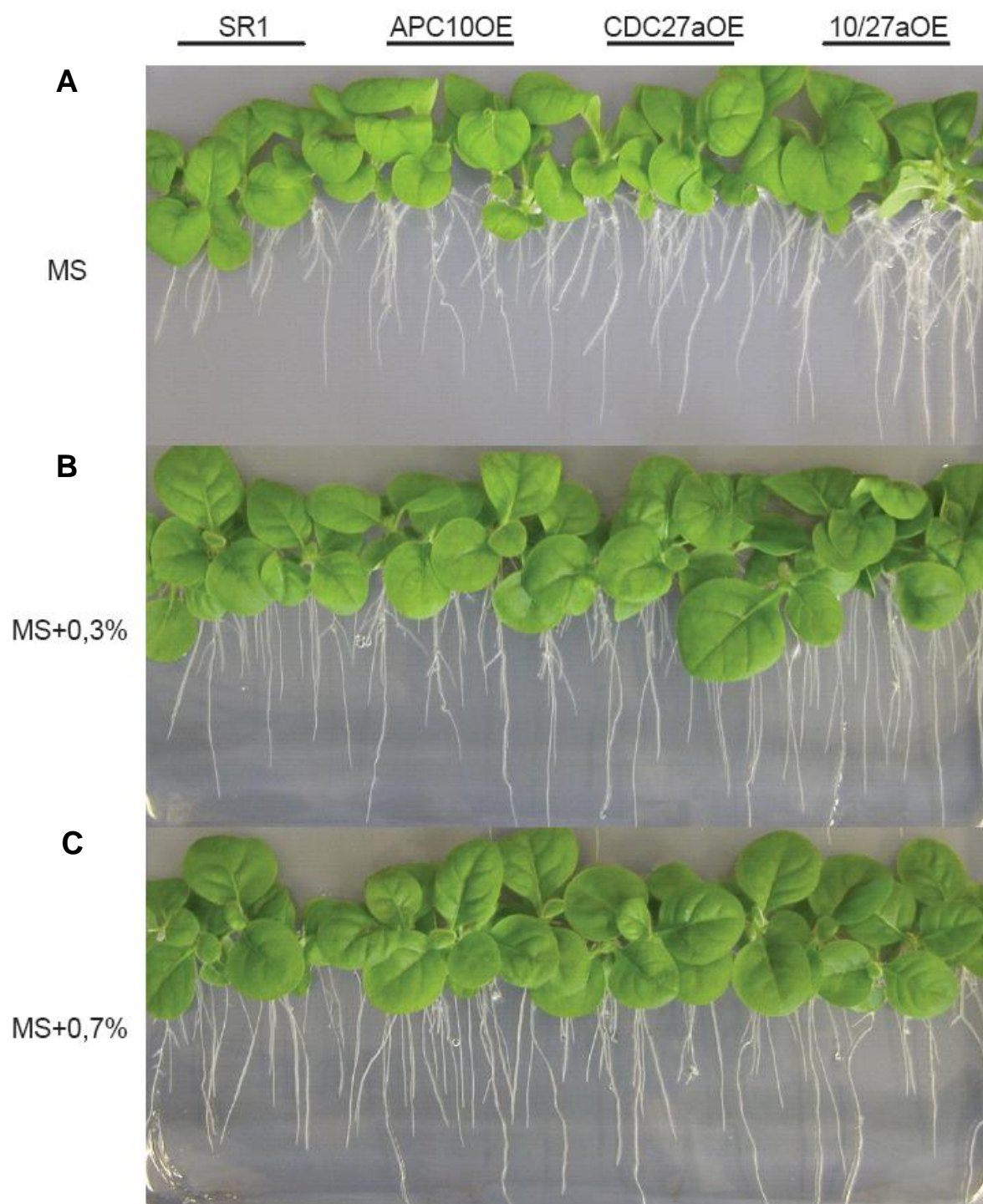


Figura 21: Plantas SR1, APC10OE, CDC27aOE e 10/27aOE germinadas, na posição vertical, em diferentes concentrações de NaCl . A, plantas germinadas em meio MS. B, plantas germinadas em meio MS com 0,3% de NaCl. C, plantas germinadas em meio MS com 0,7% de NaCl.

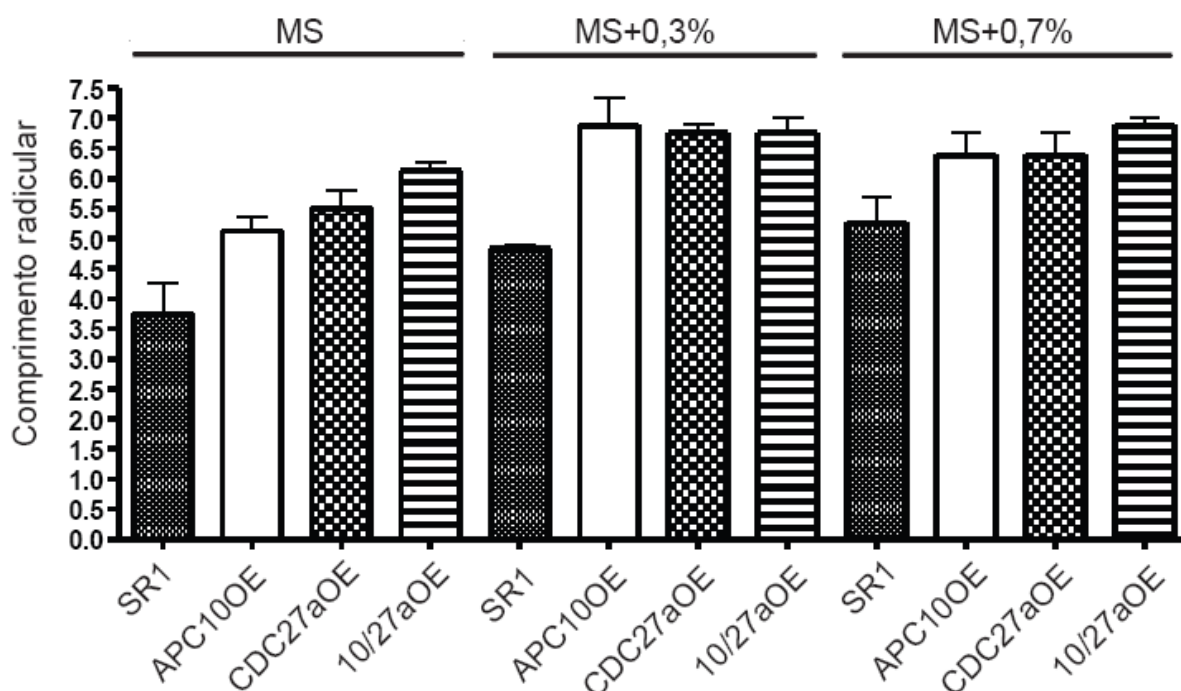


Figura 22: Comprimento radicular das plantas SR1, APC10OE, CDC27aOE e 10/27AOE submetidas ao estresse salino com NaCl.

- Análise fotossintética

A fotossíntese é a fonte primária dos carboidratos utilizados no crescimento e na manutenção da planta, e uma alteração na sua atividade pode levar a modificações no desenvolvimento vegetal. Para verificar se as plantas transformadas possuem alguma alteração na atividade fotossintética que garantam alguma vantagem sobre as plantas controle, analisamos as taxas de transferência de elétrons e o rendimento quântico. Além das análises fotoquímicas em plantas crescidas em condições normais, fizemos medições em plantas submetidas a estresse hídrico. Para validar o estresse hídrico, o conteúdo relativo de água de todas as plantas foi calculado. Para facilitar a leitura e interpretação dos dados, quando for mencionada a comparação entre planta com regime hídrico regular com

planta submetida ao estresse hídrico, usaremos a nomenclatura controle x tratamento. Para comparar as análises fotoquímicas, utilizaremos plantas transformadas x SR1.

Os perfis do transporte aparente de elétrons (ETR) foram semelhantes nas plantas analisadas (figura 23). No período final do experimento, as plantas controle apresentaram taxas superiores às plantas submetidas ao tratamento. Isto é justificável, pois de acordo com Baker (1993), tem sido demonstrado que plantas sujeitas a estresse hídrico moderado não apresentam decréscimo na atividade potencial do fotossistema II. Entretanto, sob estresse hídrico severo, as plantas freqüentemente apresentam um marcante efeito fotoinibitório, caracterizado por um decréscimo significativo no rendimento quântico. Nesse caso, o déficit hídrico, em combinação com altos níveis de irradiância, pode causar uma significativa redução na eficiência da fotossíntese. As plantas transformadas APC10OE e CDC27aOE apresentaram resultados similares (valores aproximados de 60 para controles e 40 para tratamento) e inferiores aos das plantas SR1, que apresentaram valores próximos de 80 para o controle e 40 para o tratamento. As plantas controle 10/27aOE apresentaram resultados semelhantes as plantas transformadas (± 60) e o pior resultado no tratamento, onde registraram valores próximos de 20. Curiosamente, as plantas transformadas possuem maior biomassa, porém este efeito não está diretamente atrelado ao aparelho fotossintético.

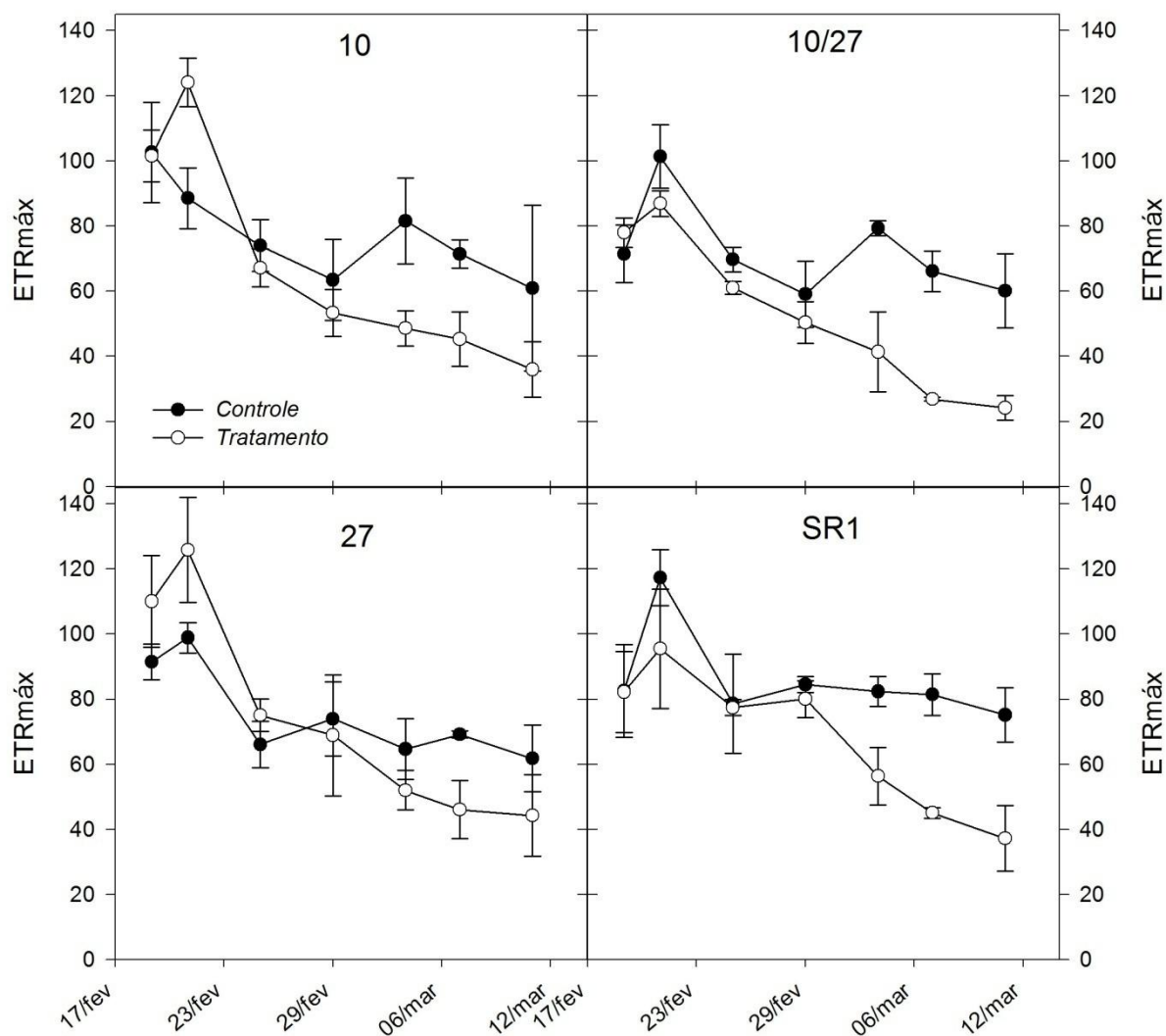


Figura 23: Efeito do estresse hídrico sobre o transporte aparente de elétrons nas plantas de tabaco. (ETR em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Plantas SR1, APC10OE (10), CDC27aOE (27) e 10/27aOE (10/27) foram submetidas ao tratamento de seca por 15 dias. Cada ponto representa a média de três repetições \pm desvio padrão.

O rendimento quântico das plantas SR1, submetidas ao tratamento, foi realizado e seus resultados utilizados para a construção do gráfico de perda de rendimento ao longo do tempo (figura 24). Validada a perda de rendimento, as plantas foram submetidas às medições (figura 25). A construção dos gráficos de rendimento quântico por radiação fotossinteticamente ativa (PAR) revela a perda de rendimento das plantas 10/27aOE submetidas ao tratamento (valor próximo de 0,004) em comparação as outras plantas, corroborando com os dados de ETR.

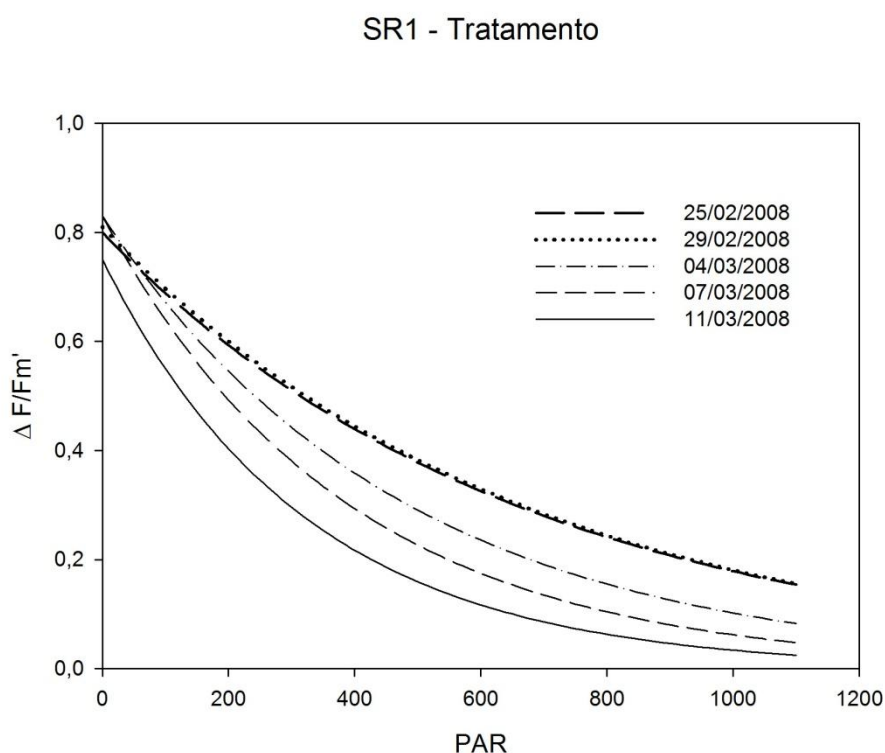


Figura 24: Rendimento quântico da planta controle ao longo do tratamento de estresse hídrico. Gráfico utilizando os valores de eficiência quântica fotoquímica máxima do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$) pela radiação fotossinteticamente ativa (PAR) durante o tratamento.

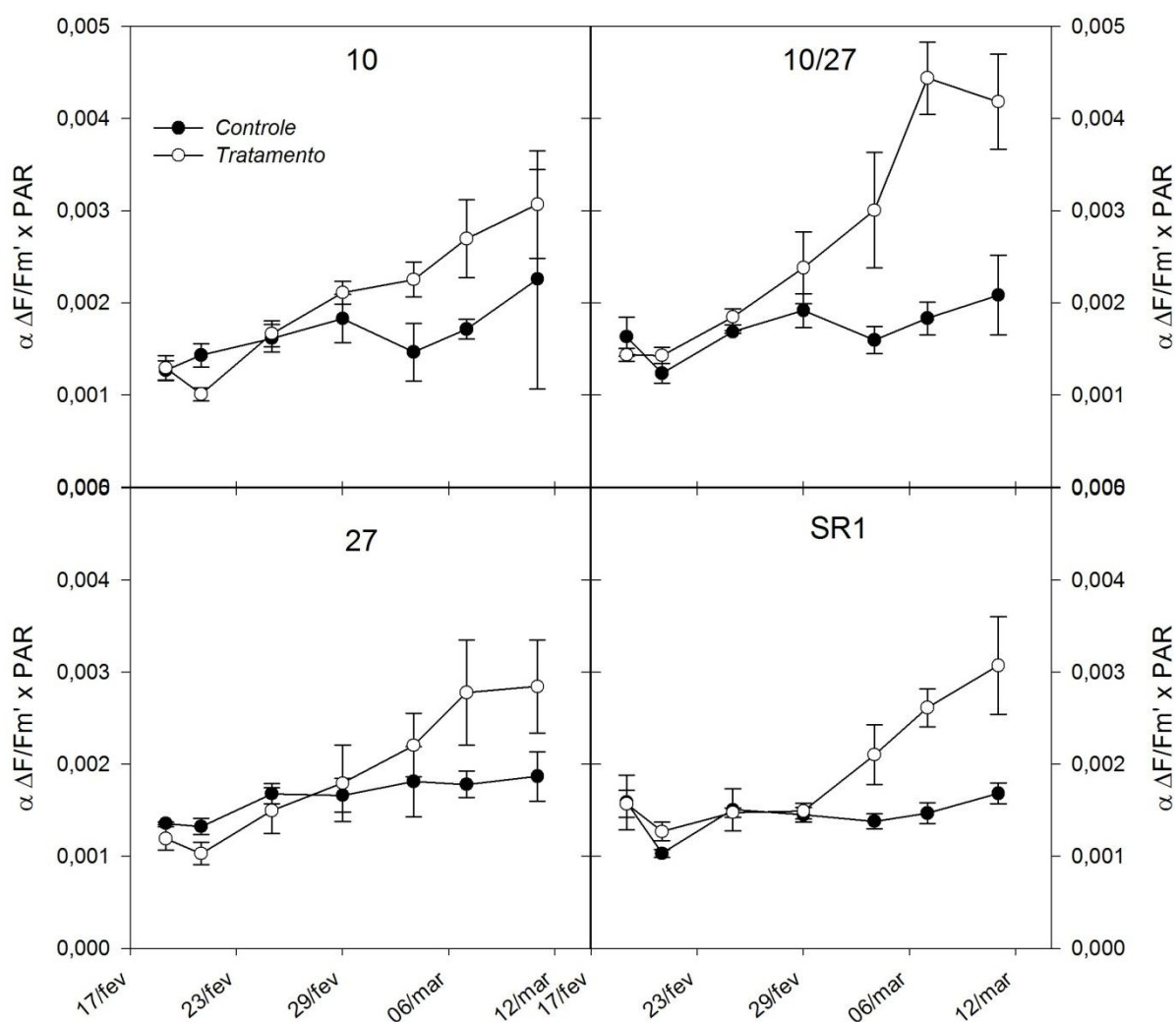


Figura 25: Efeito do estresse hídrico sobre a eficiência quântica fotoquímica máxima do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$) pela radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Plantas SR1, APC10OE (10), CDC27aOE (27) e 10/27aOE (10/27) foram submetidas ao tratamento de seca pelo período de 15 dias. Cada ponto representa a média de três repetições \pm desvio padrão.

O conteúdo relativo de água (CRA) nas plantas tratadas diminuiu durante o procedimento experimental, validando toda a análise (figuras 26 e 27). Não foram encontradas diferenças no CRA das plantas submetidas ao tratamento de estresse hídrico e que foram, posteriormente, irrigadas (figura 27E).

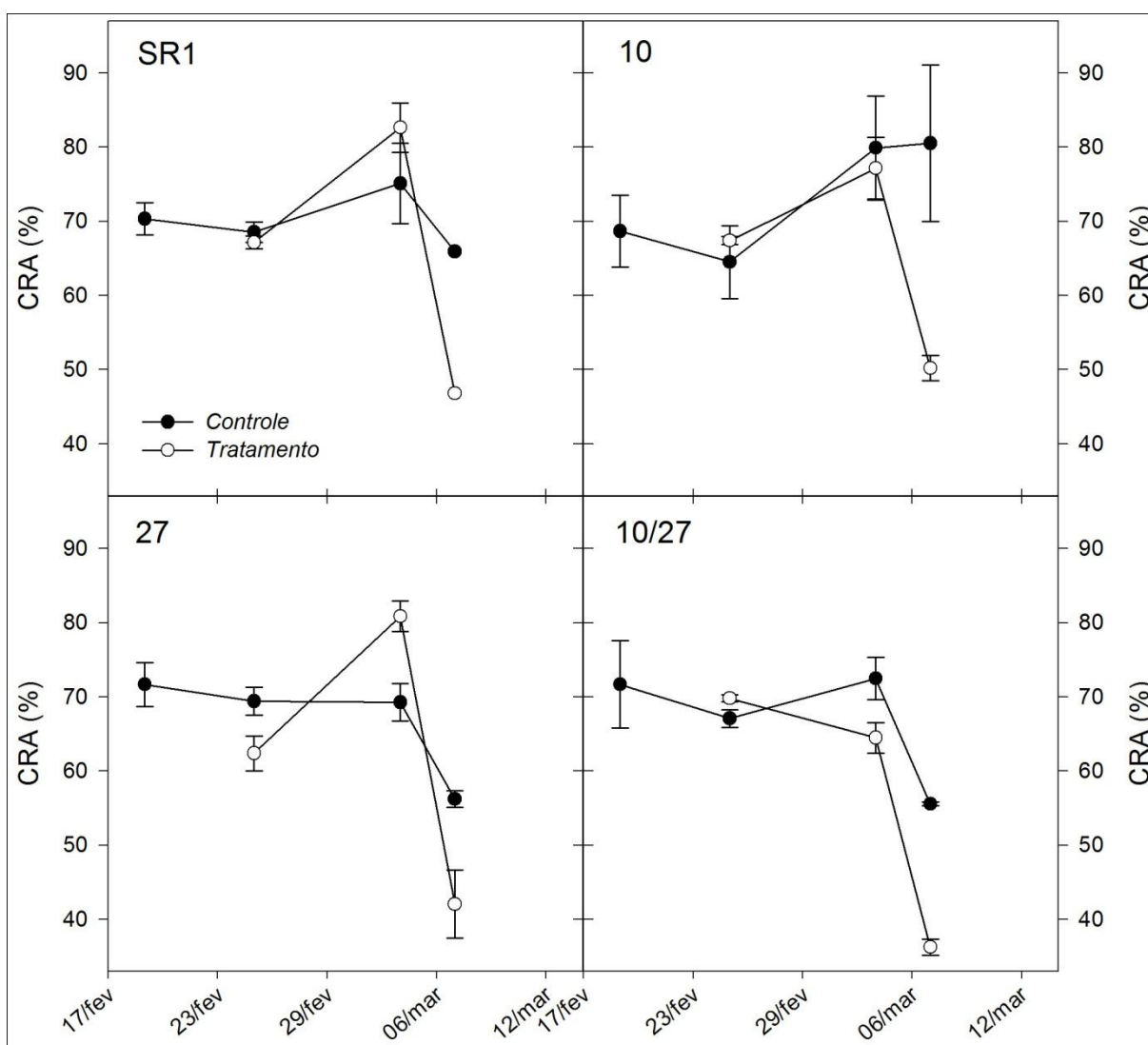


Figura 26: Verificação do conteúdo relativo de água durante o estresse hídrico. Plantas SR1, APC10OE (10), CDC27aOE (27) e 10/27aOE (10/27) foram submetidas ao tratamento de seca por 12 dias. Cada ponto representa a média de três repetições \pm desvio padrão. Abreviação: CRA, conteúdo relativo de água.

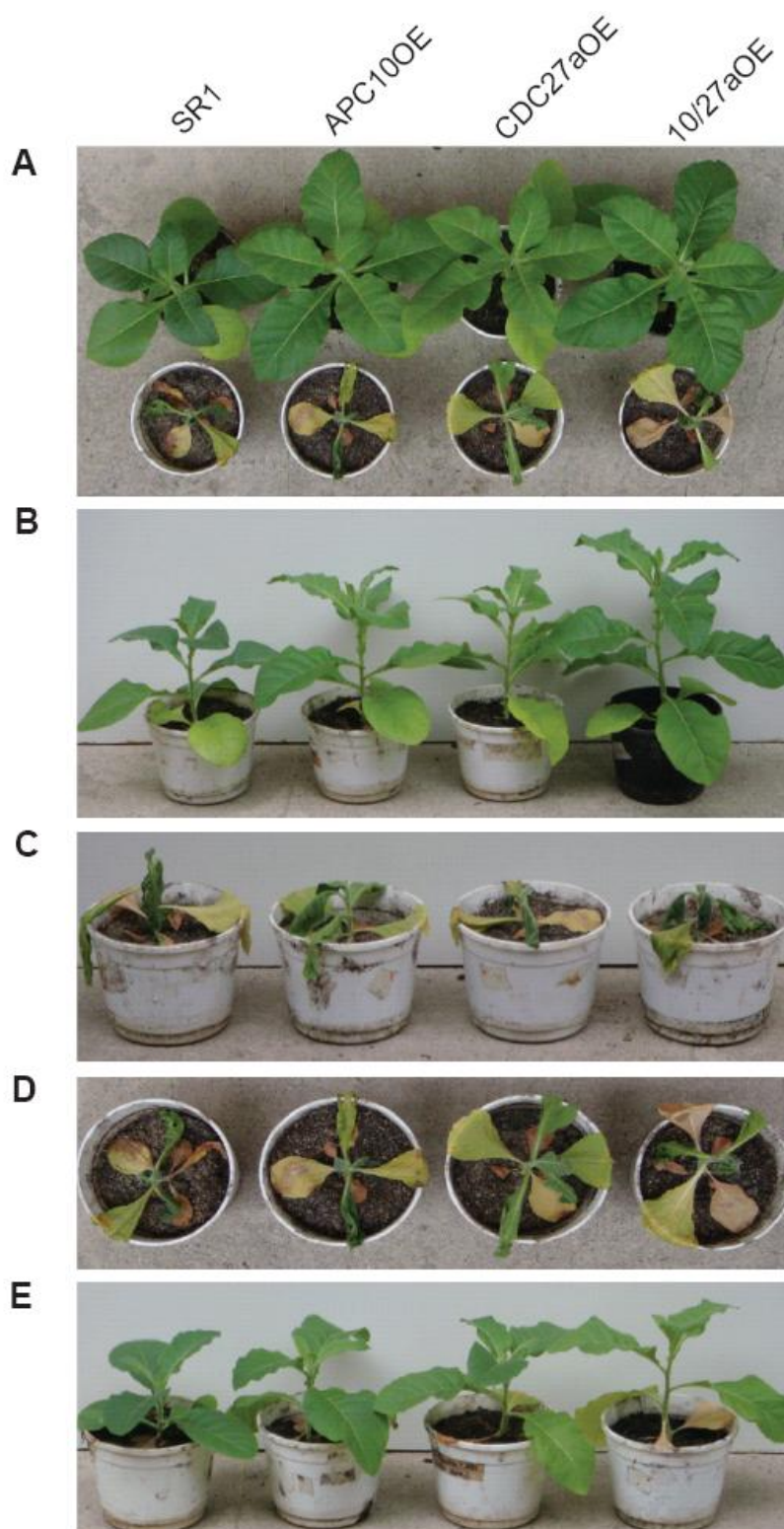


Figura 27: Estresse hídrico em plantas de tabaco. **A**, vista superior das plantas SR1, APC10OE, CDC27aOE e 10/27aOE no início do tratamento (acima) e ao término do tratamento (abaixo). **B**, vista lateral das plantas SR1, APC10OE, CDC27aOE e 10/27aOE antes do tratamento. **C** e **D**, vista lateral (C) e superior (D) das plantas SR1, APC10OE, CDC27aOE e 10/27aOE após o tratamento. **E**, vista lateral das plantas SR1, APC10OE, CDC27aOE e 10/27aOE submetidas ao tratamento e que foram, posteriormente, irrigadas.

CAPÍTULO III

Superexpressão do amiRNA-APC4 e amiRNA-APC5 em Arabidopsis

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise de plantas amiRNA-AtAPC4 e amiRNA-AtAPC5

Os microRNAs (miRNA) são uma nova classe de pequenas moléculas de RNA, que possuem aproximadamente 22 nucleotídeos no seu estado maduro e estão envolvidos no processo de regulação da expressão gênica na célula. Os miRNAs são capazes de inibir a produção de proteínas e esta característica foi alvo para o desenvolvimento de uma técnica onde fossem produzidos miRNAs específicos para genes alvo. Este miRNA produzido por reações de PCR seqüenciais e clonado em vetor de superexpressão dá origem ao miRNA artificial (amiRNA). Foram idealizadas duas construções de amiRNA para o gene AtAPC5 (5a e 5b) e uma para o gene AtAPC4 (4a), a fim de proporcionar reduções nos níveis de RNAm de ambos os genes em plantas de Arabidopsis. Como as duas construções do amiRNA-AtAPC5 reconhecem regiões diferentes do RNAm alvo, é possível e factível a reprodução de fenótipos distintos. Além deste fato, a ocorrência de gradientes de redução dos níveis de expressão do gene alvo em diferentes transformantes são normais, visto que a inserção do cassete em regiões aleatórias do genoma pode proporcionar um menor acesso por fatores de transcrição.

Plantas de Arabidopsis foram transformadas com as construções amiRNA-AtAPC4 e amiRNA-AtAPC5; e as gerações T₁ apresentaram fenótipos muito interessantes (figuras 28 e 29).

Algumas plantas amiRNA-AtAPC4 (4a) apresentaram uma área de roseta inferior ao controle e o mais intrigante, aparentaram alterações na mudança da fase vegetativa para reprodutiva. Durante esta mudança de fase, o eixo de inflorescência

não se desenvolveu corretamente (encurtamento) e surgiram sucessivas zonas geradoras de eixo de inflorescência (figura 28 (1), (4), (5) e (6)). A formação das flores era próxima da roseta, indicando que o encurtamento do eixo não afetou o desenvolvimento floral. Porém, o número de inflorescências foi reduzido, gerando poucas siliquas e sementes. Outros transformantes possuíram fenótipos mais drásticos ou com baixo grau de severidade. Plantas com fenótipo mais drástico não desenvolveram eixo de inflorescência, não floresceram e conseqüentemente não geraram sementes (figura 28 (5) e (6)). As plantas transformantes com baixo grau de severidade desenvolveram o eixo de inflorescência, mas o número de siliquas foi menor em comparação ao controle (figura 28 (2)).

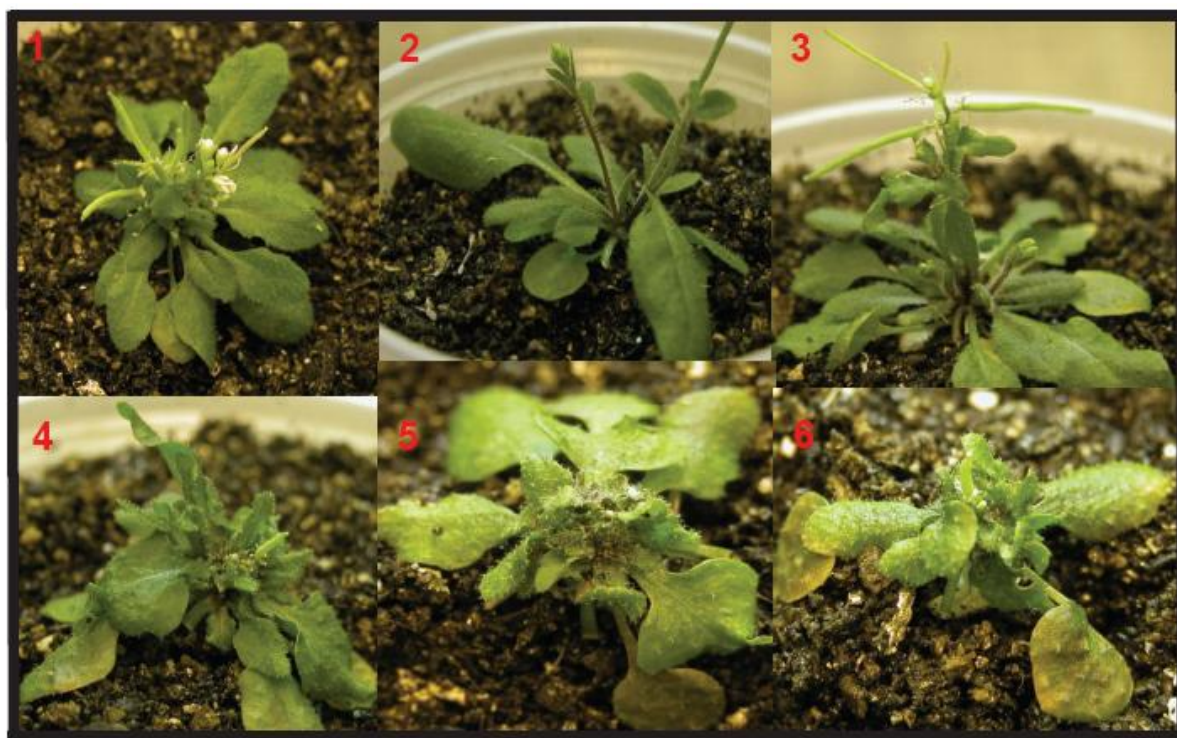


Figura 28: Diferentes linhagens da construção amiRNA-AtAPC4. Plantas transformadas foram germinadas *in vitro* em meio MS+Km e posteriormente transferidas para o solo. **1, 3 e 4,** transformantes com o fenótipo mais redundante nas análises. **2,** transformante com fenótipo menos severo. **5 e 6,** transformantes com fenótipos mais drásticos.

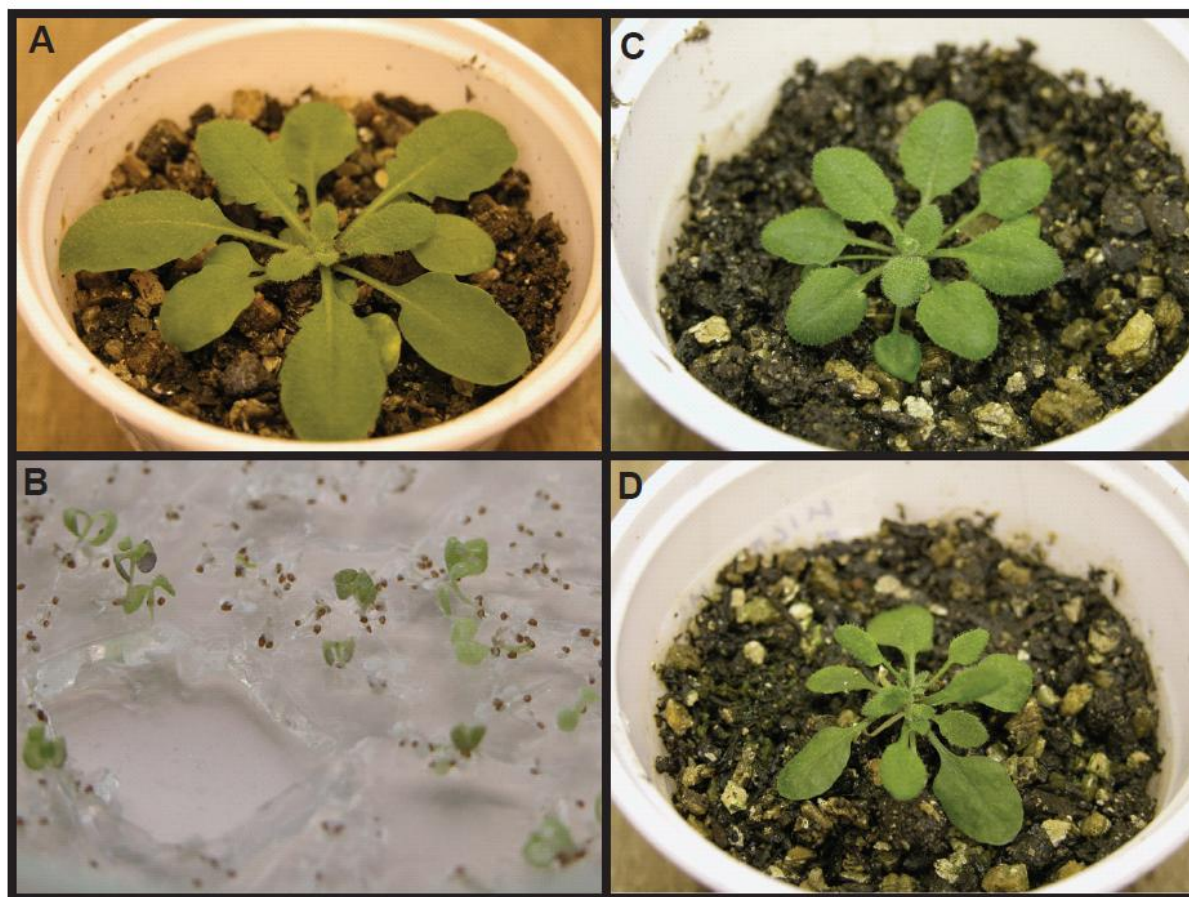


Figura 29: Diferentes linhagens da construção amiRNA-AtAPC5. A, Columbia germinada *in vitro* em meio MS e posteriormente transferida para o solo. B, plantas amiRNA-AtAPC5 (5a) da geração T₁ germinadas *in vitro* em meio MS+Km. C e D, plantas amiRNA-AtAPC5 (5b) da geração T₁ germinadas *in vitro* em meio MS+Km e posteriormente transferidas para o solo.

Nenhuma diferença de fenótipo foi encontrada dentro de cada população de transformantes amiRNA-AtAPC5 (5a) e (5b), porém plantas transformadas com a construção 5a apresentaram fenótipos distintos das plantas 5b.

Plantas amiRNA-AtAPC5 (5a) não conseguiram se desenvolver quando germinadas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Há germinação com abertura dos dois cotilédones e formação das folhas 1 e 2, mas as plantas permaneceram estagnadas em tal etapa do desenvolvimento (Figura 29). Plantas amiRNA-AtAPC5 5b possuem área de roseta inferior ao controle, formam eixo de inflorescência e número de siliquas próximo a Columbia.

As sementes T₂ das plantas amiRNA-AtAPC4 (4a) e amiRNA-AtAPC5 (5b) são viáveis. Foram germinadas em placas seletivas e a busca por algum mutante homozigoto iniciada. Os fenótipos drásticos das plantas amiRNA-AtAPC4 (4a) sugerem que um potencial homozigoto seja letal, mas a utilização de fenótipos menos drásticos podem ser de grande valia para estudo com homozigotos.

6.2 Análise de expressão das plantas amiRNA-AtAPC4 e amiRNA-AtAPC5

Para verificar se as plantas amiRNA-AtAPC4 (4a) e amiRNA-AtAPC5 (5b) estavam com os níveis de expressão dos genes AtAPC4 e AtAPC5 reduzidos, respectivamente, foi realizado uma análise por RT-PCR em tempo real (figura 30). Correlacionando os dados de expressão com os fenótipos das plantas, podemos afirmar que o aumento da severidade do fenotipo está ligado a redução dos níveis de RNAm dos genes das subunidades do APC. Este fato fica mais evidente quando analisamos as plantas amiRNA-AtAPC4 (4a). Os transformantes 4a_1, 4a_2 e 4a_6 apresentaram níveis alterados de RNAm de AtAPC4, nos quais o número de inflorescências ficou dentro da normalidade no mutante 4a_2, reduzido no 4a_1 e ausente no 4a_6. Nos transformantes amiRNA-AtAPC5 (5b) os níveis de RNAm ficaram abaixo da planta controle, mas dentro da população não encontramos uma grande diferença entre eles (figura 31). Isto vai de encontro aos fenótipos das plantas, onde não ficou evidenciada nenhuma diferença na população.

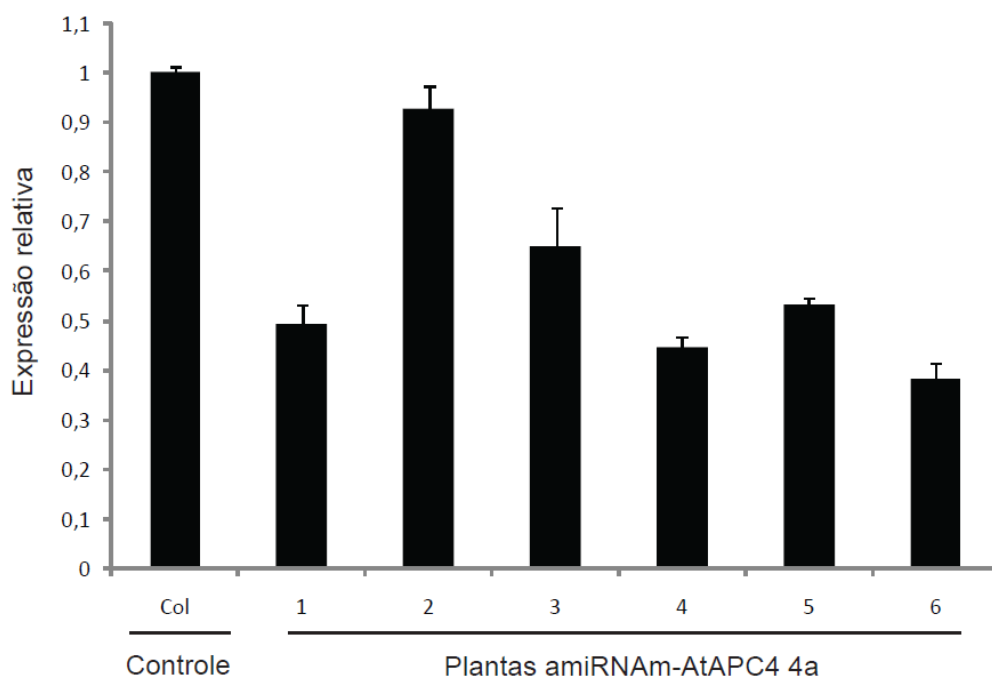


Figura 30: Perfil de expressão das plantas amiRNA-AtAPC4 na geração T₁. As plantas analisadas estão representadas na figura 26, respeitando a numeração. O nível de transcritos está representado como a razão do valor absoluto do gene a ser estudado pelo valor do gene AtUbiquitina. Valor atribuído ao controle corresponde aos 100% da expressão. Abreviação: Col, Columbia

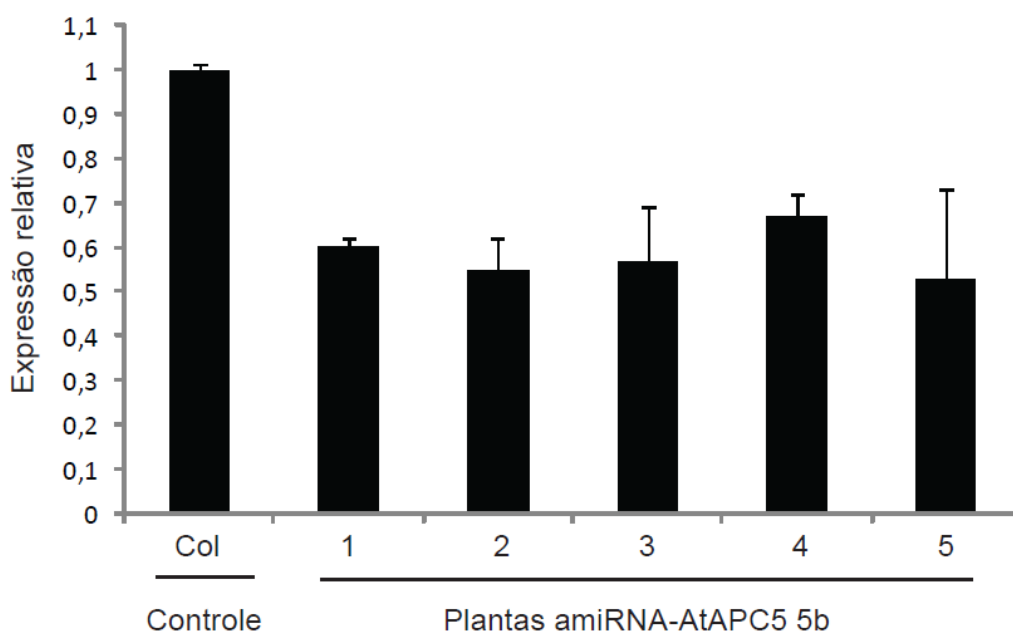


Figura 31: Perfil de expressão das plantas amiRNA-AtAPC5 5b na geração T₁. Algumas plantas analisadas estão representadas na figura 27, onde a planta em C corresponde a 1 e D corresponde a 2. O nível de transcritos está representado como a razão do valor absoluto do gene a ser estudado pelo valor do gene AtUbiquitina. Valor atribuído ao controle corresponde aos 100% da expressão. Abreviação: Col, Columbia

CAPÍTULO IV

Promotor do gene AtAPC5

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Estudo do promotor do gene AtAPC5

A interação do AtAPC5 com proteínas do complexo APC ou com proteínas que não estão envolvidas com a formação do complexo, desperta o interesse em saber exatamente qual a função dessa proteína nas células. A localização subcelular dessa proteína, bem como seus padrões de expressão durante o ciclo celular são etapas fundamentais para se entender qual é a possível função do AtAPC5 na divisão e diferenciação celular. Proteínas envolvidas com ciclo celular são extremamente reguladas, tanto nos seus níveis de transcrição (regulações transcricionais) como em seus níveis protéicos (regulações pós-traducionais), e seus níveis costumam alterar drasticamente de acordo com a fase do ciclo em que a célula se encontra.

O promotor do gene AtAPC5 foi isolado e clonado no vetor pKGWFS7. Tal vetor promove a fusão do promotor do gene alvo com os genes GFP (proteína fluorescente verde) e GUS (β -glucuronidase). A localização da expressão do gene AtAPC5 será visualizada através da fluorescência da GFP ou pela marcação (precipitado azul) proporcionada pela enzima GUS. Optamos pela marcação por GUS, pois de acordo com a literatura, as proteínas do ciclo celular possuem um tempo de vida curto ao longo do ciclo, o que dificultaria sua localização via fluorescência.

As plantas de *Arabidopsis* foram transformadas com a construção promAtAPC5-GUS e a geração T₃ homocigota selecionada para estudo. Após o procedimento experimental para realização da atividade da enzima GUS, plantas de

10 dias (após a germinação) foram encaminhadas para visualização em microscopia ótica interferencial/diferencial. Os resultados foram muito interessantes. Plantas transformadas apresentaram marcação em raiz, porém, predominantemente, em regiões comprometidas com o desenvolvimento de raízes laterais (marcação nos vasos é apenas residual) (figura 32). Após o surgimento da raiz lateral, a marcação fica mais forte em regiões meristemáticas das mesmas, diminuindo a intensidade à medida que a raiz entra em processo de alongamento (figura 32 (A), (B) e (C)). A raiz principal também possui marcação, mas com uma intensidade menor (figura 31 (D)).

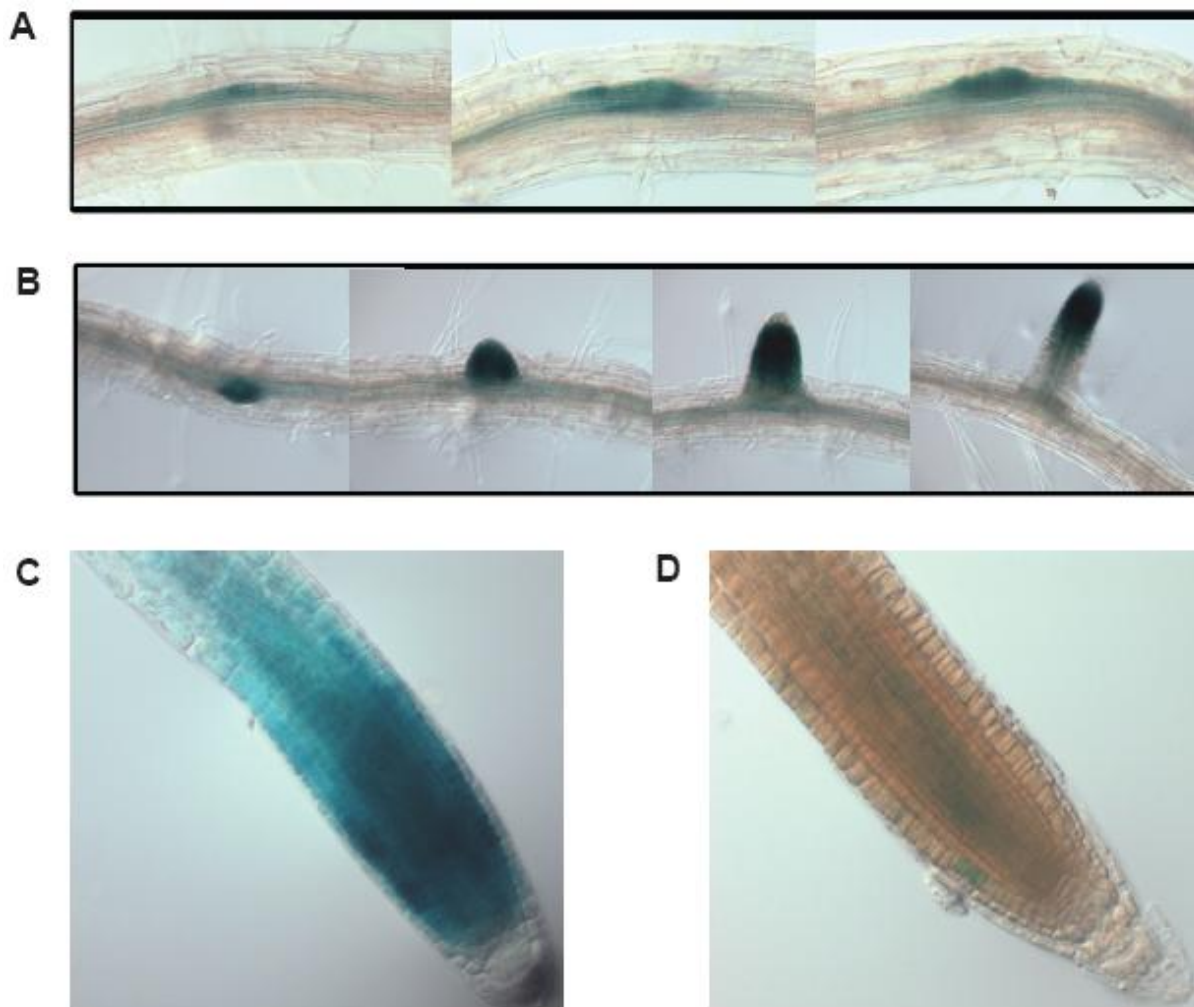


Figura 32: Padrão de expressão da construção *promAtAPC5-GUS* em *Arabidopsis*. A, expressão do GUS em células adjacentes ao tecido vascular. B, expressão do GUS em células do ápice da raiz em raízes laterais jovens. C, expressão do GUS em células do ápice da raiz em raízes laterais maduras. D, expressão do GUS em células da raiz principal.

8 CONCLUSÃO

Estudo evolutivo do APC

Através de análises de bioinformática dos genomas completos de *Arabidopsis*, arroz e poplar, identificamos genes ortólogos das subunidades do APC e ativadores. Além disso, estes genes foram identificados também em algas, briófitas, e outras monocotiledôneas e dicotiledôneas. Um aspecto distintivo entre estes genomas é a presença de padrões característicos de duplicação (tabela 4). Em *Arabidopsis*, apenas o gene CDC27 está duplicado. Arroz e poplar possuem duas subunidades duplicadas, CDC23/APC11 e CDC27/APC13, respectivamente. Entre os genomas de outras plantas, uva e *P. patens* possuem duas cópias dos genes CDC23 e CDC27, respectivamente; e uva possui duas cópias do gene APC13. As duas isoformas dos genes CDC23 e APC11 de arroz são diferencialmente expressas em plantas cultivadas no claro e no escuro. Em *Arabidopsis*, as cópias duplicadas do gene CDC27 apresentam diferenças significativas nas seqüências (em aminoácido), e parecem ter assumido funções especializadas, indicando uma possível ocorrência de subcomplexos do APC (Perez-Perez *et al.*, 2008). Embora as seqüências codificantes dos genes do arroz sejam bem conservadas, é possível que os seus elementos controladores tenham divergido e que eles estejam assumindo novas funções no APC durante o desenvolvimento da planta. Os parálogos normalmente apresentam diferentes funções, enquanto ortólogos podem manter a mesma função (Tatusov *et al.*, 1997). Tal como em leveduras, APC7 não está presente nas algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii*, *V. carteri* e *Chlorella spp.* A ausência desta subunidade na base da

evolução de animais e plantas terrestres sugere que esta subunidade pode ter surgido de um evento de duplicação de alguma subunidade do APC contendo o domínio TPR. Isto também sugere que o APC7 parece não ser essencial para a atividade do APC em organismos unicelulares. Curiosamente, poderia ser o caso também em metazoários, uma vez que mutantes nulos do APC7 em *Drosophila* são viáveis e férteis (Pal *et al.*, 2007).

Os ativadores CDC20 e CCS52 possuem muitas cópias em plantas. Isto está em nítido contraste com a situação encontrada em metazoários, onde apenas uma cópia de cada regulador está presente por genoma. Devido a duplicações, *Arabidopsis* contém três ativadores CCS52: CCS52A, CCS52A1 e CCS52B. Além disso, seis genes CDC20 foram encontrados, mas talvez o AtCDC20_6 seja um pseudogene, pois o importante motivo KEN-box está ausente (Pfleger e Kirschner, 2000; Burton e Salomão, 2001, Castro *et al.*, 2003). Em poplar, os genes CCS52A e CCS52B também são duplicados. Cinco genes CDC20 estão presentes em poplar, o mesmo número encontrado em *Arabidopsis*. Curiosamente, o genoma de arroz contém uma cópia dos genes CCS52A e CCS52B; e três cópias do gene CDC20. Isto sugere que a duplicação dos genes CCS52 ocorreu nas plantas dicotiledôneas após a separação das monocotiledôneas. Duplicações recentes dos genes CDC20 ocorreram também em *Arabidopsis* e poplar.

As plantas podem adotar processos alternativos de desenvolvimento que devem estar integrados a progressão do ciclo celular, crescimento vegetal e desenvolvimento em resposta a estímulos ambientais. Acredita-se que vários membros de uma família específica de genes, de um organismo em particular, são os produtos naturais gerados a partir da longa história evolutiva do organismo (Moore e Purugganan, 2005). O número de membros de uma família de genes

reflete uma sucessão de expansões e rearranjos genômicos, devido à duplicação extensa e diversificação que ocorreram no curso da evolução. As análises filogenéticas das proteínas das subunidades do APC e ativadores são muito esclarecedoras. O fato de todas as subunidades, exceto APC7, terem sido encontradas em todos os genomas de plantas analisadas, incluindo algas vermelhas, algas verdes e outros organismos primitivos, sugere que o conjunto completo de genes que codificam as subunidades do APC já estava presente no ancestral comum de plantas e animais. Os ativadores descendem de um ancestral comum e correspondem a estruturas bem conservadas. Em todas as espécies de algas analisadas, existe apenas uma cópia dos genes CDC20 e CCS52. As plantas terrestres apresentam um número superior de ativadores e este fato pode estar associado com a especificidade do substrato e/ou com a complexidade de seus programas de desenvolvimento.

Ao comparar as similaridades entre os diferentes domínios TPR dentro de uma proteína, é possível traçar a história evolutiva das duplicações internas. As pontuações dos alinhamentos, entre os domínios TPR, mostraram semelhanças limitadas entre as subunidades AtCDC27, AtCDC16, AtAPC7, AtCDC23 e AtAPC5. As seqüências das subunidades TPR divergiram muito ao longo do tempo e possuem motivos consenso pobres, e por isso não foi possível detectar padrões de duplicação inequívocos em qualquer uma das proteínas. No entanto, comparações dos pares gênicos indicaram maior similaridade entre os domínios centrais, principalmente entre CDC27 e CDC23; CDC27 e CDC16; e CDC23 e CDC16. Em todos os casos, as pontuações de similaridade entre a região TPR-4 do CDC16 e CDC27 e região TPR-5 da subunidade CDC23 são mais elevadas, sugerindo que a

evolução em tandem do domínio TPR provavelmente iniciou-se a partir da região central.

Anteriormente, nosso grupo mostrou que os genes das subunidades de Arabidopsis são diferencialmente expressos em plantas cultivadas no escuro ou sob luz. Quando as plantas de Arabidopsis foram cultivadas no escuro, apenas os genes AtAPC1, AtAPC2 e AtCDC16 aumentaram os níveis de RNAm (Eloy *et al.*, 2006). No entanto, perfis de expressão por RT-PCR em tempo real dos genes do APC e ativadores de arroz, mostraram modulação espacial da expressão dos genes que sofreram duplicação em diferentes tecidos (raiz e parte aérea). O RNAm do OsAPC11_1 acumula a níveis mais elevados nas raízes etioladas quando comparado com o RNAm do OsAPC11_2. O RNAm do OsCDC23_1 está presente nas raízes etioladas em quase o dobro dos níveis de OsCDC23_2. Estes dados sugerem que as subunidades duplicadas do APC em arroz poderiam participar de diferentes subcomplexos e que podem ter assumido novas funções especializadas durante a evolução.

A maioria das E₃ ligases é composta por um a dois polipeptídeos (Craig *et al.*, 2009). Em contraste, os reguladores do ciclo celular SCF e APC são formados por um maior número de subunidades. No entanto, para ambos os complexos, a atividade bioquímica pode ser alcançada apenas por duas subunidades, a proteína contendo o motivo culina, juntamente com uma proteína contendo o motivo RING-finger. Em ambos os casos, a especificidade ao substrato é definido pela subunidade adaptadora. O genoma humano contém 69 proteínas F-Box (o ativador do SCF) e 2 ativadores do APC, CDH1 e CDC20 (Frescas e Pagano, 2008; Pesin e Orr-Weaver, 2008). Nas plantas, complexos relacionados com o SCF estão envolvidos em muitos processos fisiológicos e cerca de 700 proteínas F-box foram

identificadas em *Arabidopsis* (Gagne *et al.*, 2002). O número de ativadores do APC também sofreu uma expansão nas linhagens de plantas superiores, apesar de mais modesto, o número varia de 2 para 8. O nosso grupo e mais outro grupo mostraram que a expressão diferencial de subunidades do APC pode ser uma fonte de complexidade na regulação do APC (Eloy *et al.*, 2006, Perez-Perez *et al.*, 2008). Os resultados obtidos sugerem que a duplicação de genes, seguida por divergência de seqüência e expressão diferencial, pode gerar outra via de regulação da proteólise mediada por ubiquitina. Esta possível regulação poderá utilizar complexos específicos do APC compostos por isoformas das subunidades duplicadas. Futuros estudos que empregam abordagens da genômica funcional serão necessárias para definir o impacto da duplicação ou variantes de splicing na progressão do ciclo celular em nível celular e nos processos de desenvolvimento das plantas.

Plantas de tabaco superexpressando AtAPC10, AtCDC27a e 10/27a

A subunidade APC10 contém um domínio DOC que está presente em outras proteínas envolvidas com os processos de ubiquitinação (Kominami, *et al.*, 1998). O APC10 de *Arabidopsis* possui mais de 75% de similaridade com o homólogo humano. Esta alta semelhança não se restringe à estrutura primária, uma vez que a modelagem molecular revelou estruturas terciárias muito parecidas (Marcelo Lima, em preparação) e resultados de complementação da cepa mutante DOC1^{ts} de *S. pombe* mostraram que o gene de *Arabidopsis* é um homólogo funcional do gene de levedura (Eloy, 2005). Tal subunidade foi escolhida para análise por existirem evidências do seu envolvimento na processividade do APC e no reconhecimento do substrato (Carroll e Morgan, 2002; Passmore, *et al.*, 2003). Plantas de tabaco

superexpressando a subunidade AtAPC10 e plantas híbridas superexpressando conjuntamente as subunidades AtAPC10 e AtCDC27a foram submetidas a diferentes tipos de estresse para verificar o potencial biotecnológico dos transformantes. Uma vez que, estas plantas já possuem características importantes, como aumentos na biomassa e na taxa de crescimento em comparação ao controle (Marcelo Lima, 2006).

O estresse salino afeta negativamente a produtividade agrícola em todo o mundo, quer seja a produção para subsistência ou para ganho econômico (Flowers e Yeo, 1995). A resposta das plantas à salinidade é constituída por numerosos processos que devem funcionar em coordenação para aliviar tanto a hiperosmolaridade celular quanto o desequilíbrio de íons. Além disso, os cultivos agrícolas devem ser capazes de produzir satisfatoriamente biomassa em campos com algum grau de salinidade (estabilidade de produção). Tolerância e estabilidade de produção são traços genéticos complexos que são difíceis de estabelecer, desde culturas submetidas a estresse salino contínuo, intermitente ou esporádico durante o desenvolvimento. No entanto, a genética molecular está proporcionando uma nova visão sobre a resposta das plantas à salinidade e busca identificar perfis genéticos tolerantes. Ao analisarmos as plantas AtAPC10OE, AtCDC27aOE e 10/27aOE; constatamos aumento da tolerância a NaCl 0,3% e 0,7%. Em NaCl 0,7%, após 10 dias, a planta controle possui, além dos dois cotilédones, apenas a primeira folha, enquanto as plantas transformadas possuem a primeira e a segunda folhas (figura 20). O comprimento radicular das plantas transformadas também é superior ao controle durante o tratamento, porém não houve um aumento significativo quando comparamos os crescimentos em NaCl 0,3% com 0,7%. Ao crescer num ambiente salino, a raiz tende a aumentar o seu comprimento na busca por um local com

menor desequilíbrio osmótico. Este fato foi claramente demonstrado quando verificamos aumento nas medições de raízes nas plantas transformadas e controle nos meios MS e MS+NaCl 0,3%. Não houve uma variação significativa nas medições das raízes quando as plantas foram germinadas nos meios salinos NaCl 0,3% e 0,7%. Com base nesses resultados, a utilização desses transformantes em ambientes salinos pode ser de grande importância econômica, porque com um crescimento mais rápido, as plantas transformadas podem atingir a maturidade produtiva num período inferior de tempo e, conseqüentemente, estarão submetidas ao estresse salino por um período inferior ao controle.

O estresse hídrico é conceituado como perda moderada de água, o que leva ao fechamento dos estômatos e limitação da troca gasosa. Um grave estresse hídrico pode resultar na redução da fotossíntese, alterações metabólicas e, finalmente, a morte da planta (Jaleel *et al.*, 2008). Tal estresse produz mudanças na relação dos principais pigmentos: clorofilas do tipo *a* e *b*, e carotenóides (Anjum *et al.*, 2003; Farooq *et al.*, 2009). A taxa fotossintética das plantas superiores em períodos de seca é afetada à medida que o conteúdo relativo de água das folhas diminui (Lawlor e Cornic, 2002). No entanto, o debate continua em aberto, pois se desconhece o principal motivo para a diminuição da taxa fotossintética: ou através de fechamento dos estômatos ou através de insuficiência metabólica (Lawson *et al.*, 2003; Anjum *et al.*, 2003). Verificar se as plantas transformadas possuem um aparato fotossintético mais eficiente e são menos suscetíveis a seca é de grande importância agrônômica, visto que regimes hídricos variados e aumento a exposição luminosa são fatores que estão diretamente associados ao local escolhido para o cultivo. As plantas AtAPC10OE, AtCDC27aOE, 10/27aOE e plantas controle foram submetidas a medições fotossintéticas durante um longo período de seca. Todas as

plantas diminuíram sua taxa fotossintética durante a seca, tanto nas medições de transporte aparente de elétrons quanto na eficiência quântica fotoquímica máxima. Estes dados estão de acordo com a literatura e sugerem que a superexpressão das subunidades AtAPC10 e AtCDC27a podem até alterar a progressão do ciclo celular, mas não alteram a maquinaria envolvida com a captação luminosa da planta. O aumento de biomassa verificado nessas plantas não está relacionado com a fase “clara” da fotossíntese e, portanto, a expansão da área foliar e o acréscimo do diâmetro caulinar podem estar ligados a alterações na organização tecidual. Plantas AtCDC27aOE possuem a estrutura do meristema re-organizada e células em tecidos não-meristemáticos com tamanhos alterados (Rojas *et al.*, 2009).

Redução da expressão dos genes AtAPC4 e AtAPC5 através da técnica de microRNA artificial

A subunidade APC4 parece ser a mais divergente das subunidades do APC. Não há homologia significativa entre os genes de *S. cerevisiae*, *Arabidopsis* e humano. Esta distância entre as seqüências poderia refletir a aquisição de funções ou interações especializadas em cada organismo. Reforçando esta hipótese, identificamos apenas nas proteínas de planta e humano um domínio tipo WD-40. O domínio WD-40 é encontrado em diversas proteínas de eucariotos, com funções que incluem módulos reguladores/adaptadores na transdução de sinal, montagem do citoesqueleto, processamento de RNAm, diferenciação celular e controle do ciclo celular. Os dois ativadores do APC, CDC20 e CCS52, fazem parte da família de proteínas que contém repetições de WD-40, e presumivelmente reconhecem o

motivo D-box encontrado na maior parte dos substratos do APC. Ambas as proteínas fazem parte da família WD e possuem papel fundamental na regulação da atividade e na especificidade dos substratos do APC (Vodermaier, 2001).

Entre o APC5 de *Arabidopsis* e seu homólogo humano há 39% de similaridade, e esta semelhança é distribuída por toda a proteína. Entretanto, o AtAPC5 contém um domínio TPR, o qual não se encontra em outros APC5 de vertebrados. Harkness e colaboradores (2002) mostraram que o APC5 possui um papel importante na montagem da cromatina. Os mesmos autores mostraram, em seguida, que defeitos na montagem da cromatina em mutantes do APC5 resultam em instabilidade genômica e conseqüente redução do tempo de vida em levedura. Uma pergunta em aberto é se a atividade do APC5 se dá através da modulação do complexo inteiro ou se o APC5 tem um papel independente. Outro resultado sugere que pelo menos em um caso, a segunda hipótese se confirma. Koloteva-Levine e colaboradores (2004) mostraram que o APC5 interage com a proteína ligadora da cauda poli-A e inibe a tradução a partir de sítios internos de entrada no ribossomo (IRES). Os autores verificaram que o APC5 é encontrado associado com complexos de alto peso molecular que não contém outras subunidades do APC, indicando um papel fora do complexo APC/E3 ligase para o APC5.

Uma forma de estudar a função dessas subunidades em plantas é através de alterações nos seus níveis normais de expressão (superexpressão ou pela redução da expressão). Construções de superexpressão já foram feitas, porém ainda estão em estágios iniciais de estudo. Já as análises da redução de expressão estão mais adiantadas e possibilitaram a geração de resultados preliminares. Para reduzir os níveis de expressão dos genes das subunidades APC4 e 5, optamos pela técnica do microRNA artificial (amiRNA), cuja técnica se tornou uma ferramenta poderosa para

silenciar genes em plantas; e vários vetores amiRNA foram desenvolvidos com base nas estruturas de precursores naturais Ath-miR159a, Ath-miR164b, Ath-miR172a, Ath-miR319a e Osa-miR528 (Zhao *et al.*, 2009). As plantas amiRNA-AtAPC4 da geração T₁ são viáveis, porém os fenótipos estão correlacionados com o grau de expressão residual do AtAPC4. Quanto maior o silenciamento do gene AtAPC4, mais evidentes são as diferenças entre as plantas transformadas e o controle. As plantas com a redução de, aproximadamente, 50% nos níveis de expressão possuem área de roseta inferior, ausência do eixo de inflorescência e folhas enrugadas (figuras 28 e 30). Algumas plantas apresentam regiões geradoras de eixo de inflorescência, mas ao longo do desenvolvimento, tais regiões não conseguem gerar o eixo e novos eixos surgem lateralmente. As plantas não florescem e, conseqüentemente, não formam sementes (figura 28, 5 e 6). Já as plantas 1 e 4 da figura 26 floresceram e conseguiram gerar sementes. Estas sementes também são viáveis e a geração T₂ está sob análise. Aparentemente, o fenótipo foi mantido e a busca por um homozigoto iniciada. Caso o homozigoto seja letal, não haverá sérios prejuízos ao estudo, visto que através do amiRNA podemos selecionar graus de expressão variados e fenótipos diversificados poderão suprir tal falta.

As plantas amiRNA-AtAPC5 (5b) também possuem fenótipo, porém não tão drásticos quanto ao amiRNA-AtAPC4 (figura 29 C e D). Apenas a redução na área da roseta e o número total de siliquas foram detectados. Apesar da análise do promotor do AtAPC5 indicar a expressão em zonas meristemáticas, não foram encontradas alterações significativas nas regiões apical e radicular. A ausência de alterações morfológicas nestas regiões podem estar relacionadas com níveis residuais do AtAPC5, pouca ou nenhuma atuação da subunidade em processos dependentes do holoAPC ou participação discreta em vias independentes do

holoAPC. O fenótipo encontrado nas plantas amiRNA-AtAPC5 (5a) podem ajudar na análise funcional da subunidade AtAPC5, caso fique demonstrado que os níveis de expressão do gene APC5 estejam ainda mais reduzidos nestas plantas (figura 29 B).

Análise da fusão promotor APC5 – GUS

A subunidade APC5 possui um motivo TPR com baixa homologia com as próprias subunidades TPR do APC e, portanto, sua presença neste subcomplexo permanece uma incógnita. Através de estudos por cromatografia, foi descrito que o APC5 poderia fazer uma ligação entre o subcomplexo TPR e o subcomplexo com atividade E₃ ligase APC2/11 (Vodermaier *et al.*, 2003). Pela importância do motivo TPR em interações protéicas e poucos estudos dessa subunidade em plantas, o promotor do gene APC5 foi isolado e utilizado para estudos de localização.

A fim de comparar o nível e a distribuição espaço-temporal da atividade GUS em plantas expressando a construção promAtAPC5-GUS, mantivemos as linhagens expressando níveis semelhantes de transcritos nos transformantes. A coloração histoquímica, em diferentes estágios de desenvolvimento de plantas expressando promAtAPC5-GUS, mostra uma distribuição desigual de células marcadas (figura 32). Estas áreas restritas são as regiões de intensa divisão celular, como os meristemas radiculares e apicais (dados complementares já discutidos em resultados e discussão). O padrão de coloração encontrado é muito semelhante ao da construção promCYCB-GUS, onde regiões similares são marcadas. Em raiz, a coloração de promCYCB-GUS é detectada com um padrão irregular, no meristema radicular, mas não na zona de alongamento (Planchais *et al.*, 2002). A coloração do GUS é mantida em um grupo de células associadas ao sistema vascular (primário,

secundário e terciário). Na parte aérea, limita-se a base do desenvolvimento da folha e hidatódios, mas nunca foi observada em outros tipos celulares totalmente diferenciados, incluindo tricomas ramificados (Boudolf *et al.*, 2004). A CYCB é tradicionalmente utilizada como marcador de divisão celular, por ser uma peça chave na transição da metáfase para anáfase. O APC também possui alta atividade neste período, onde atua na própria degradação da CYCB, mas pouco se sabe sobre o padrão espaço-temporal de suas subunidades. Dados gerados pelo grupo indicam que a construção *promAtAPC5* foi a única, até agora analisada, que possui um padrão de expressão semelhante ao da CYCB. Estas peculiaridades podem ajudar os próximos estudos sobre a atividade mitótica, pois apresentando um padrão similar ao da CYCB podemos sugerir o APC5 como um potencial marcador de divisão celular. Os níveis de expressão dos genes *AtAPC5* e *AtCYCB1;1* já foram analisados pelo grupo e os resultados demonstraram perfis semelhantes em raiz e níveis menores de *AtCYCB1;1* em folhas (Eloy *et al.*, 2006). Contudo a correlação entre o perfil de expressão com a atividade positiva do seu promotor não está diretamente atrelada, uma vez que a regulação dos transcritos pode mascarar os altos índices de expressão via GUS (Koo *et al.*, 2007).

9 PERSPECTIVAS

Os dados obtidos até o presente momento sobre as funções desempenhadas pelas subunidades AtAPC4, AtAPC5 e AtAPC10 ainda não são conclusivos. Além disso, as interações destas subunidades com outras proteínas de *A. thaliana* possibilitam futuras investigações.

Dentre os experimentos programados para o período de pós-doutorado, estão:

- Análise de proteínas, pré-selecionadas, que interagem com as subunidades AtAPC7, AtAPC10 e AtAPC11

- Obtenção da estrutura da proteína OsCandidato 1 e sua interação com a proteína OsAPC10. Comparação com o modelo de interação da AtCandidato 1 e AtAPC10;

- Análise do promotor do gene AtAPC4;
- Análise do promotor do gene AtAPC11;
- Análise de plantas superexpressando o amiRNA-AtAPC11
- Análises histológicas das plantas amiRNA-AtAPC4 e amiRNA-AtAPC5
- Finalização de manuscrito: Superexpressão da subunidade AtAPC10 em tabaco e seu apelo biotecnológico;

10 REFERÊNCIAS

- Akad,F., Teverovsky,E., David,A., Czosnek,H., Gidoni,D., Gera,A., and Loebenstein,G.** (1999) A cDNA from tobacco codes for an inhibitor of virus replication (IVR)-like protein. *Plant Mol.Biol.* **40**:969-976.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.** (1994) *Molecular Biology of The Cell - Third Edition* - Garland Publishing, Inc. New York & London.
- Anjum, F., Yaseen M., Rasul E., Wahid A. and Anjum S.** (2003) Water stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). II. Effect on chemical composition and chlorophyll contents. *Pakistan J. Agric. Sci.* **40**:45–49
- Antonio,C., Ferby,I., Wilhelm,H., Jones,M., Karsenti,E., Nebreda,A.R., and Vernos,I.** (2000) Xkid, a chromokinesin required for chromosome alignment on the metaphase plate. *Cell* **102**:425-435.
- Ardley,H.C. and Robinson,P.A.** (2005) E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem.* **41**:15-30.
- Arnason,T.G., Pisclevich,M.G., Dash,M.D., Davies,G.F., and Harkness,T.A.** (2005) Novel interaction between Apc5p and Rsp5p in an intracellular signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot.Cell* **4**:134-146.
- Assaad,F.F.** (2001) Plant cytokinesis. Exploring the links. *Plant Physiol* **126**:509-516.
- Ausubel, F.M. et al.** (1992) *Short Protocols in Molecular Biology*. 2ª. Editora John Wiley & Sons. Nova Iorque.
- Babushok,D.V., Ostertag,E.M., and Kazazian,H.H., Jr.** (2007) Current topics in genome evolution: molecular mechanisms of new gene formation. *Cell Mol.Life Sci.* **64**:542-554.
- Bai,C., Sen,P., Hofmann,K., Ma,L., Goebel,M., Harper,J.W., and Elledge,S.J.** (1996) SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**:263-274.
- Baker, N.R.** (1993) Light-use efficiency and photoinhibition of photosynthesis in plants under environmental stress. In *Water deficit plant responses from cell to community* (J.A.C. Smith & H. Griffiths, eds.). Bios Scientific Publ., Oxford, p.221-235.
- Barroco,R.M., De,V.L., Magyar,Z., Engler,G., Inze,D., and Mironov,V.** (2003) Novel complexes of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cell Mol.Life Sci.* **60**:401-412.

Bell,S.P. (2002) The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. *Genes Dev.* **16**:659-672.

Bentley,A.M., Williams,B.C., Goldberg,M.L., and Andres,A.J. (2002) Phenotypic characterization of *Drosophila* *ida* mutants: defining the role of APC5 in cell cycle progression. *J.Cell Sci.* **115**:949-961.

Bilger, W., Schreiber, U. and Bock, M. (1995) Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* **102**:425-432.

Binne,U.K., Classon,M.K., Dick,F.A., Wei,W., Rape,M., Kaelin,W.G., Jr., Naar,A.M., and Dyson,N.J. (2007) Retinoblastoma protein and anaphase-promoting complex physically interact and functionally cooperate during cell-cycle exit. *Nat.Cell Biol.* **9**:225-232.

Bjorklund,A.K., Ekman,D., and Elofsson,A. (2006) Expansion of protein domain repeats. *PLoS.Comput.Biol.* **2**:e114.

Blanc,G., Hokamp,K., and Wolfe,K.H. (2003) A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the *Arabidopsis* genome. *Genome Res.* **13**:137-144.

Blatch,G.L. and Lassle,M. (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**:932-939.

Blilou,I., Frugier,F., Folmer,S., Serralbo,O., Willemsen,V., Wolkenfelt,H., Eloy,N.B., Ferreira,P.C., Weisbeek,P., and Scheres,B. (2002) The *Arabidopsis* HOBbit gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes Dev.* **16**:2566-2575.

Boudolf,V., Barroco,R., Engler,J.A., Verkest,A., Beeckman,T., Naudts,M., Inze,D., and De,V.L. (2004a) B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**:945-955.

Boudolf,V., Vlieghe,K., Beemster,G.T., Magyar,Z., Torres Acosta,J.A., Maes,S., Van Der Schueren,E., Inze,D., and De,V.L. (2004b) The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**:2683-2692.

Breyne,P. and Zabeau,M. (2001) Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Curr.Opin.Plant Biol.* **4**:136-142.

Breyne,P., Dreesen,R., Vandepoele,K., De,V.L., Van,B.F., Callewaert,L., Rombauts,S., Raes,J., Cannoot,B., Engler,G., Inze,D., and Zabeau,M. (2002) Transcriptome analysis during cell division in plants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:14825-14830.

Burton,J.L. and Solomon,M.J. (2001) D box and KEN box motifs in budding yeast Hsl1p are required for APC-mediated degradation and direct binding to Cdc20p and Cdh1p. *Genes Dev.* **15**:2381-2395.

Capron,A., Okresz,L., and Genschik,P. (2003a) First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin-protein ligase. *Trends Plant Sci.* **8**:83-89.

Capron,A., Serralbo,O., Fulop,K., Frugier,F., Parmentier,Y., Dong,A., Lecureuil,A., Guerche,P., Kondorosi,E., Scheres,B., and Genschik,P. (2003b) The Arabidopsis anaphase-promoting complex or cyclosome: molecular and genetic characterization of the APC2 subunit. *Plant Cell* **15**:2370-2382.

Carroll,C.W. and Morgan,D.O. (2002) The Doc1 subunit is a processivity factor for the anaphase-promoting complex. *Nat.Cell Biol.* **4**:880-887.

Carroll,C.W., Enquist-Newman,M., and Morgan,D.O. (2005) The APC subunit Doc1 promotes recognition of the substrate destruction box. *Curr.Biol.* **15**:11-18.

Castro,A., Vigneron,S., Bernis,C., Labbe,J.C., and Lorca,T. (2003) Xkid is degraded in a D-box, KEN-box, and A-box-independent pathway. *Mol.Cell Biol.* **23**:4126-4138.

Chan,G.K. and Yen,T.J. (2003) The mitotic checkpoint: a signaling pathway that allows a single unattached kinetochore to inhibit mitotic exit. *Prog.Cell Cycle Res.* **5**:431-439.

Chan,G.K., Liu,S.T., and Yen,T.J. (2005) Kinetochore structure and function. *Trends Cell Biol.* **15**:589-598.

Corellou,F., Camasses,A., Ligat,L., Peaucellier,G., and Bouget,F.Y. (2005) Atypical regulation of a green lineage-specific B-type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiol* **138**:1627-1636.

Craig,A., Ewan,R., Mesmar,J., Gudipati,V., and Sadanandom,A. (2009) E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. *J.Exp.Bot.* **60**:1123-1132.

Cui,L., Wall,P.K., Leebens-Mack,J.H., Lindsay,B.G., Soltis,D.E., Doyle,J.J., Soltis,P.S., Carlson,J.E., Arumuganathan,K., Barakat,A., Albert,V.A., Ma,H., and DePamphilis,C.W. (2006) Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Res.* **16**:738-749.

D'Andrea,L.D. and Regan,L. (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem.Sci.* **28**:655-662.

de Jager,S.M., Maughan,S., Dewitte,W., Scofield,S., and Murray,J.A. (2005) The developmental context of cell-cycle control in plants. *Semin.Cell Dev.Biol.* **16**:385-396.

Desnos, T., Orbovic, V., Bellini, C., Kronenberger, J., Caboche, M., Traas, J., and Hofte, H. (1996) Procuste1 mutants identify two distinct genetic pathways controlling hypocotyl cell elongation, respectively in dark- and light-grown *Arabidopsis* seedlings. *Development* **122**:683-693.

Dewitte, W. and Murray, J.A. (2003) The plant cell cycle. *Annu.Rev.Plant Biol.* **54**:235-264.

Diffley, J.F. (2004) Regulation of early events in chromosome replication. *Curr.Biol.* **14**:R778-R786.

Doerner, P., Jorgensen, J.E., You, R., Steppuhn, J., and Lamb, C. (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* **380**:520-523.

Dong, Y., Bogdanova, A., Habermann, B., Zachariae, W., and Ahringer, J. (2007) Identification of the *C. elegans* anaphase promoting complex subunit Cdc26 by phenotypic profiling and functional rescue in yeast. *BMC.Dev.Biol.* **7**:19.

Doonan, J.H. and Kitsios, G. (2009) Functional evolution of cyclin-dependent kinases. *Mol.Biotechnol.* **42**:14-29.

Dube, P., Herzog, F., Gieffers, C., Sander, B., Riedel, D., Muller, S.A., Engel, A., Peters, J.M., and Stark, H. (2005) Localization of the coactivator Cdh1 and the cullin subunit Apc2 in a cryo-electron microscopy model of vertebrate APC/C. *Mol.Cell* **20**:867-879.

Edgar, B.A. and Orr-Weaver, T.L. (2001) Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* **105**:297-306.

Elledge, S.J. (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**:1664-1672.

Eloy, N.B. (2005) Caracterização do Complexo Promotor da Anáfase (APC) de *Arabidopsis thaliana*. Tese de Doutorado - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Eloy, N.B., Coppens, F., Beemster, G.T., Hemerly, A.S., and Ferreira, P.C. (2006) The *Arabidopsis* anaphase promoting complex (APC): regulation through subunit availability in plant tissues. *Cell Cycle* **5**:1957-1965.

Ezhevsky, S.A., Ho, A., Becker-Hapak, M., Davis, P.K., and Dowdy, S.F. (2001) Differential regulation of retinoblastoma tumor suppressor protein by G(1) cyclin-dependent kinase complexes in vivo. *Mol.Cell Biol.* **21**:4773-4784.

Farooq, M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D. and Basra S.M.A. (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron.Sustain. Dev.* **29**:185-212

Ferreira,P.C., Hemerly,A.S., Engler,J.D., Van,M.M., Engler,G., and Inze,D. (1994) Developmental expression of the arabidopsis cyclin gene *cyc1At*. *Plant Cell* **6**:1763-1774.

Flowers, T.J. and Yeo, A.R. (1995) Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Aust. J. Plant Physiol.* **22**:875-884.

Frescas,D. and Pagano,M. (2008) Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat.Rev.Cancer* **8**:438-449.

Fulop,K., Tarayre,S., Kelemen,Z., Horvath,G., Kevei,Z., Nikovics,K., Bako,L., Brown,S., Kondorosi,A., and Kondorosi,E. (2005) Arabidopsis anaphase-promoting complexes: multiple activators and wide range of substrates might keep APC perpetually busy. *Cell Cycle* **4**:1084-1092.

Furuta,T., Tuck,S., Kirchner,J., Koch,B., Auty,R., Kitagawa,R., Rose,A.M., and Greenstein,D. (2000) EMB-30: an APC4 homologue required for metaphase-to-anaphase transitions during meiosis and mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol.Biol.Cell* **11**:1401-1419.

Gagne,J.M., Downes,B.P., Shiu,S.H., Durski,A.M., and Vierstra,R.D. (2002) The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:11519-11524.

Galbraith,D.W., Harkins,K.R., and Knapp,S. (1991) Systemic Endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **96**:985-989.

Geley,S., Kramer,E., Gieffers,C., Gannon,J., Peters,J.M., and Hunt,T. (2001) Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J.Cell Biol.* **153**:137-148.

Gendreau,E., Traas,J., Desnos,T., Grandjean,O., Caboche,M., and Hofte,H. (1997) Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **114**:295-305.

Genty, B. Briantais, J.V. and Baker, N. R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica Biophysica Acta* **990**:87-92.

Glotzer,M., Murray,A.W., and Kirschner,M.W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**:132-138.

Goff,S.A., Ricke,D., Lan,T.H., Presting,G., Wang,R., Dunn,M., Glazebrook,J., Sessions,A., Oeller,P., Varma,H., Hadley,D., Hutchison,D., Martin,C., Katagiri,F., Lange,B.M., Moughamer,T., Xia,Y., Budworth,P., Zhong,J., Miguel,T., Paszkowski,U., Zhang,S., Colbert,M., Sun,W.L., Chen,L., Cooper,B., Park,S., Wood,T.C., Mao,L.,

- Quail,P., Wing,R., Dean,R., Yu,Y., Zharkikh,A., Shen,R., Sahasrabudhe,S., Thomas,A., Cannings,R., Gutin,A., Pruss,D., Reid,J., Tavtigian,S., Mitchell,J., Eldredge,G., Scholl,T., Miller,R.M., Bhatnagar,S., Adey,N., Rubano,T., Tusneem,N., Robinson,R., Feldhaus,J., Macalma,T., Oliphant,A., and Briggs,S.** (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* **296**:92-100.
- Golan,A., Yudkovsky,Y., and Hershko,A.** (2002) The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J.Biol.Chem.* **277**:15552-15557.
- Gordon,D.M. and Roof,D.M.** (2001) Degradation of the kinesin Kip1p at anaphase onset is mediated by the anaphase-promoting complex and Cdc20p. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**:12515-12520.
- Gorr,I.H., Boos,D., and Stemmann,O.** (2005) Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Mol.Cell* **19**:135-141.
- Hall,M.C., Torres,M.P., Schroeder,G.K., and Borchers,C.H.** (2003) Mnd2 and Swm1 are core subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* anaphase-promoting complex. *J.Biol.Chem.* **278**:16698-16705.
- Hames,R.S., Wattam,S.L., Yamano,H., Bacchieri,R., and Fry,A.M.** (2001) APC/C-mediated destruction of the centrosomal kinase Nek2A occurs in early mitosis and depends upon a cyclin A-type D-box. *EMBO J.* **20**:7117-7127.
- Harkness,T.A., Davies,G.F., Ramaswamy,V., and Arnason,T.G.** (2002) The ubiquitin-dependent targeting pathway in *Saccharomyces cerevisiae* plays a critical role in multiple chromatin assembly regulatory steps. *Genetics* **162**:615-632.
- Heichman,K.A. and Roberts,J.M.** (1996) The yeast CDC16 and CDC27 genes restrict DNA replication to once per cell cycle. *Cell* **85**:39-48.
- Hemerly,A.S., Ferreira,P., de Almeida,E.J., Van,M.M., Engler,G., and Inze,D.** (1993) cdc2a expression in Arabidopsis is linked with competence for cell division. *Plant Cell* **5**:1711-1723.
- Hemerly,A., Engler,J.A., Bergounioux,C., Van,M.M., Engler,G., Inze,D., and Ferreira,P.** (1995) Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO J.* **14**:3925-3936.
- Hemerly, A.S., Ferreira, P.C.G., Van Montagu, M., Inzé, D.** (1999) Cell cycle control and plant morphogenesis: is there an essential link? *BioEssay.* **21**: 29-37.
- Hershko,A. and Ciechanover,A.** (1998) The ubiquitin system. *Annu.Rev.Biochem.* **67**:425-479.

- Herzog,F., Primorac,I., Dube,P., Lenart,P., Sander,B., Mechtler,K., Stark,H., and Peters,J.M.** (2009) Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex. *Science* **323**:1477-1481.
- Hildebrandt,E.R. and Hoyt,M.A.** (2001) Cell cycle-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* spindle motor Cin8p requires APC(Cdh1) and a bipartite destruction sequence. *Mol.Biol.Cell* **12**:3402-3416.
- Hochstrasser,M.** (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu.Rev.Genet.* **30**:405-439.
- Hoyt,M.A.** (2001) A new view of the spindle checkpoint. *J.Cell Biol.* **154**:909-911.
- Hwang,L.H. and Murray,A.W.** (1997) A novel yeast screen for mitotic arrest mutants identifies DOC1, a new gene involved in cyclin proteolysis. *Mol.Biol.Cell* **8**:1877-1887.
- Imai,K.K., Ohashi,Y., Tsuge,T., Yoshizumi,T., Matsui,M., Oka,A., and Aoyama,T.** (2006) The A-type cyclin CYCA2;3 is a key regulator of ploidy levels in Arabidopsis endoreduplication. *Plant Cell* **18**:382-396.
- Jaleel, C.A., Gopi R., Sankar B., Gomathinayagam M. and Panneerselvam R.** (2008) Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. *Comp.Rend. Biol.* **331**: 42–47
- Jeganathan,K.B., Malureanu,L., and van Deursen,J.M.** (2005) The Rae1-Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation. *Nature* **438**:1036-1039.
- Jin,L., Williamson,A., Banerjee,S., Philipp,I., and Rape,M.** (2008) Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell* **133**:653-665.
- Jorgensen,P.M., Graslund,S., Betz,R., Stahl,S., Larsson,C., and Hoog,C.** (2001) Characterisation of the human APC1, the largest subunit of the anaphase-promoting complex. *Gene* **262**:51-59.
- Joubes,J., Chevalier,C., Dudits,D., Heberle-Bors,E., Inze,D., Umeda,M., and Renaudin,J.P.** (2000) CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol.Biol.* **43**:607-620.
- Joubes,J., De,S.K., Verkest,A., Inze,D., and De,V.L.** (2004) Conditional, recombinase-mediated expression of genes in plant cell cultures. *Plant J.* **37**:889-896.
- Joubes,J., Lemaire-Chamley,M., Delmas,F., Walter,J., Hernould,M., Mouras,A., Raymond,P., and Chevalier,C.** (2001) A new C-type cyclin-dependent kinase from tomato expressed in dividing tissues does not interact with mitotic and G1 cyclins. *Plant Physiol* **126**:1403-1415.

- Juang, Y.L., Huang, J., Peters, J.M., McLaughlin, M.E., Tai, C.Y., and Pellman, D.** (1997) APC-mediated proteolysis of Ase1 and the morphogenesis of the mitotic spindle. *Science* **275**:1311-1314.
- Karpenahalli, M.R., Lupas, A.N., and Soding, J.** (2007) TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences. *BMC Bioinformatics*. **8**:2.
- King, R.W., Peters, J.M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., and Kirschner, M.W.** (1995) A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* **81**:279-288.
- Koloteva-Levine, N., Pinchasi, D., Pereman, I., Zur, A., Brandeis, M., and Elroy-Stein, O.** (2004) The Apc5 subunit of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacts with poly(A) binding protein and represses internal ribosome entry site-mediated translation. *Mol. Cell Biol.* **24**:3577-3587.
- Kominami, K., Seth-Smith, H., and Toda, T.** (1998) Apc10 and Ste9/Srw1, two regulators of the APC-cyclosome, as well as the CDK inhibitor Rum1 are required for G1 cell-cycle arrest in fission yeast. *EMBO J.* **17**:5388-5399.
- Kondorosi, E. and Kondorosi, A.** (2004) Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Lett.* **567**:152-157.
- Koo, J., Kim, Y., Kim, J., Yeom, M., Lee, I.C., and Nam, H.G.** (2007) A GUS/luciferase fusion reporter for plant gene trapping and for assay of promoter activity with luciferin-dependent control of the reporter protein stability. *Plant Cell Physiol* **48**:1121-1131.
- Kotani, S., Tanaka, H., Yasuda, H., and Todokoro, K.** (1999) Regulation of APC activity by phosphorylation and regulatory factors. *J. Cell Biol.* **146**:791-800.
- Kramer, E.R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Peters, J.M.** (2000) Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol. Biol. Cell* **11**:1555-1569.
- Kuppusamy, K.T., Ivashuta, S., Bucciarelli, B., Vance, C.P., Gantt, J.S., and Vandenbosch, K.A.** (2009) Knockdown of CELL DIVISION CYCLE16 reveals an inverse relationship between lateral root and nodule numbers and a link to auxin in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **151**:1155-1166.
- Kwee, H.S. and Sundaresan, V.** (2003) The NOMEGA gene required for female gametophyte development encodes the putative APC6/CDC16 component of the Anaphase Promoting Complex in *Arabidopsis*. *Plant J.* **36**:853-866.
- Lamb, J.R., Michaud, W.A., Sikorski, R.S., and Hieter, P.A.** (1994) Cdc16p, Cdc23p and Cdc27p form a complex essential for mitosis. *EMBO J.* **13**:4321-4328.

Lammens, T., Boudolf, V., Kheibarshekan, L., Zalmas, L.P., Gaamouche, T., Maes, S., Vanstraelen, M., Kondorosi, E., La Thangue, N.B., Govaerts, W., Inze, D., and De, V.L. (2008) Atypical E2F activity restrains APC/CCCS52A2 function obligatory for endocycle onset. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**:14721-14726.

Lawlor, D.W. and Cornic, G. (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* **25**:275-294.

Lawson, T., Oxborough, K., Morison, J.I., and Baker, N.R. (2003) The responses of guard and mesophyll cell photosynthesis to CO₂, O₂, light, and water stress in a range of species are similar. *J.Exp.Bot.* **54**:1743-1752.

Leno, G.H., Downes, C.S., and Laskey, R.A. (1992) The nuclear membrane prevents replication of human G2 nuclei but not G1 nuclei in *Xenopus* egg extract. *Cell* **69**:151-158.

Lima, M.F. (2006) Análise de tabacos transgênicos superexpressando as subunidades APC5 e APC10 de *Arabidopsis thaliana*. Dissertação de Mestrado - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Lindon, C. and Pines, J. (2004) Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J.Cell Biol.* **164**:233-241.

Littlepage, L.E. and Ruderman, J.V. (2002) Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev.* **16**:2274-2285.

Logemann, J., Schell, J., and Willmitzer, L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal.Biochem.* **163**:16-20.

Luttge, U., Haridasan, M., Fernandes, G.W., Mattos, E.A., Trimborn, P., Franco, A.C., Caldas, L.S. and Ziegler, H. (1998) Photosynthesis of mistletoes in relation to their hosts at various sites in tropical Brazil. *Trees* **12**:167-174.

Lynch, M. and Conery, J.S. (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* **290**:1151-1155.

Lyndon, R.F. and Francis, D. (1992) Plant and organ development. *Plant Mol.Biol.* **19**:51-68.

Marrocco, K., Thomann, A., Parmentier, Y., Genschik, P., and Criqui, M.C. (2009) The APC/C E3 ligase remains active in most post-mitotic *Arabidopsis* cells and is required for proper vasculature development and organization. *Development* **136**:1475-1485.

Masuda,H.P., Ramos,G.B., de Almeida-Engler,J., Cabral,L.M., Coqueiro,V.M., Macrini,C.M., Ferreira,P.C., and Hemerly,A.S. (2004) Genome based identification and analysis of the pre-replicative complex of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **574**:192-202.

Matyskiela,M.E., Rodrigo-Brenni,M.C., and Morgan,D.O. (2009) Mechanisms of ubiquitin transfer by the anaphase-promoting complex. *J.Biol.* **8**:92.

Menges,M., de Jager,S.M., Gruissem,W., and Murray,J.A. (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J.* **41**:546-566.

Meyerowitz,E.M. (2002) Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* **295**:1482-1485.

Mironov,V., V, De,V.L., Van,M.M., and Inze,D. (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- the nexus. *Plant Cell* **11**:509-522.

Mo,M., Fleming,S.B., and Mercer,A.A. (2009) Cell cycle deregulation by a poxvirus partial mimic of anaphase-promoting complex subunit 11. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106**:19527-19532.

Moore,A.D., Bjorklund,A.K., Ekman,D., Bornberg-Bauer,E., and Elofsson,A. (2008) Arrangements in the modular evolution of proteins. *Trends Biochem.Sci.* **33**:444-451.

Moore,R.C. and Purugganan,M.D. (2005) The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. *Curr.Opin.Plant Biol.* **8**:122-128.

Morgan,D.O. (1995) Principles of CDK regulation. *Nature* **374**:131-134.

Morgan,D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **13**:261-291.

Mori,Y., Yamamoto,T., Sakaguchi,N., Ishibashi,T., Furukawa,T., Kadota,Y., Kuchitsu,K., Hashimoto,J., Kimura,S., and Sakaguchi,K. (2005) Characterization of the origin recognition complex (ORC) from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.). *Gene* **353**:23-30.

Murray,A.W. (1993) Cell cycle. Sunburnt fission yeast. *Nature* **363**:302.

Nakagami,H., Kawamura,K., Sugisaka,K., Sekine,M., and Shinmyo,A. (2002) Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell* **14**:1847-1857.

Nguyen,H.G., Chinnappan,D., Urano,T., and Ravid,K. (2005) Mechanism of Aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: identification of an aneuploidy-promoting property. *Mol.Cell Biol.* **25**:4977-4992.

Nurse,P. (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**:503-508.

Page,A.M., Aneliunas,V., Lamb,J.R., and Hieter,P. (2005) In vivo characterization of the nonessential budding yeast anaphase-promoting complex/cyclosome components Swm1p, Mnd2p and Apc9p. *Genetics* **170**:1045-1062.

Pal,M., Nagy,O., Menesi,D., Udvardy,A., and Deak,P. (2007) Structurally related TPR subunits contribute differently to the function of the anaphase-promoting complex in *Drosophila melanogaster*. *J.Cell Sci.* **120**:3238-3248.

Pardee,A.B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**:603-608.

Park,K.H., Choi,S.E., Eom,M., and Kang,Y. (2005) Downregulation of the anaphase-promoting complex (APC)⁷ in invasive ductal carcinomas of the breast and its clinicopathologic relationships. *Breast Cancer Res.* **7**:R238-R247.

Passmore,L.A., McCormack,E.A., Au,S.W., Paul,A., Willison,K.R., Harper,J.W., and Barford,D. (2003) Doc1 mediates the activity of the anaphase-promoting complex by contributing to substrate recognition. *EMBO J.* **22**:786-796.

Passmore,L.A. (2004) The anaphase-promoting complex (APC): the sum of its parts? *Biochem.Soc.Trans.* **32**:724-727.

Passmore,L.A., Booth,C.R., Venien-Bryan,C., Ludtke,S.J., Fioretto,C., Johnson,L.N., Chiu,W., and Barford,D. (2005) Structural analysis of the anaphase-promoting complex reveals multiple active sites and insights into polyubiquitylation. *Mol.Cell* **20**:855-866.

Patthy,L. (2003) Modular assembly of genes and the evolution of new functions. *Genetica* **118**:217-231.

Perez-Perez,J.M., Serralbo,O., Vanstraelen,M., Gonzalez,C., Criqui,M.C., Genschik,P., Kondorosi,E., and Scheres,B. (2008) Specialization of CDC27 function in the Arabidopsis thaliana anaphase-promoting complex (APC/C). *Plant J.* **53**:78-89.

Pesin,J.A. and Orr-Weaver,T.L. (2008) Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **24**:475-499.

Peters,J.M., King,R.W., Hoog,C., and Kirschner,M.W. (1996) Identification of BIME as a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science* **274**:1199-1201.

Peters, J.M. (2002) The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* **9**:931-943.

Peters, J.M. (2006) The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:644-656.

Pfleger, C.M. and Kirschner, M.W. (2000) The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* **14**:655-665.

Pickart, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:503-533.

Pidoux, A.L. and Allshire, R.C. (2000) Centromeres: getting a grip of chromosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:308-319.

Planchais, S., Perennes, C., Glab, N., Mironov, V., Inze, D., and Bergounioux, C. (2002) Characterization of cis-acting element involved in cell cycle phase-independent activation of *Arabidopsis thaliana* *CycB1;1* transcription and identification of putative regulatory proteins. *Plant Mol. Biol.* **50**:111-127.

Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J.P., Segers, G., De, V.L., Barroco, R.P., Casteels, P., Van, M.M., Inze, D., and Mironov, V. (2001) A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *J. Biol. Chem.* **276**:36354-36360.

Prinz, S., Hwang, E.S., Visintin, R., and Amon, A. (1998) The regulation of Cdc20 proteolysis reveals a role for APC components Cdc23 and Cdc27 during S phase and early mitosis. *Curr. Biol.* **8**:750-760.

Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin, I., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S., Yamaguchi, K., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., Anterola, A., Aoki, S., Ashton, N., Barbazuk, W.B., Barker, E., Bennetzen, J.L., Blankenship, R., Cho, S.H., Dutcher, S.K., Estelle, M., Fawcett, J.A., Gundlach, H., Hanada, K., Heyl, A., Hicks, K.A., Hughes, J., Lohr, M., Mayer, K., Melkozernov, A., Murata, T., Nelson, D.R., Pils, B., Prigge, M., Reiss, B., Renner, T., Rombauts, S., Rushton, P.J., Sanderfoot, A., Schween, G., Shiu, S.H., Stueber, K., Theodoulou, F.L., Tu, H., Van de Peer, Y., Verrier, P.J., Waters, E., Wood, A., Yang, L., Cove, D., Cuming, A.C., Hasebe, M., Lucas, S., Mishler, B.D., Reski, R., Grigoriev, I.V., Quatrano, R.S., and Boore, J.L. (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**:64-69.

Rice, P., Longden, I., and Bleasby, A. (2000) EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* **16**:276-277.

Robbens, S., Khadaroo, B., Camasses, A., Derelle, E., Ferraz, C., Inze, D., Van de Peer, Y., and Moreau, H. (2005) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in the unicellular green alga *Ostreococcus tauri*. *Mol. Biol. Evol.* **22**:589-597.

Rodrigues, R.L. (2003) Superexpressão da subunidade Cdc27a do APC (Complexo promotor da anáfase) de *Arabidopsis thaliana* em tabaco (*Nicotiana tabacum*). Dissertação de Mestrado - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Rojas,C.A., Eloy,N.B., Lima,M.F., Rodrigues,R.L., Franco,L.O., Himanen,K., Beemster,G.T., Hemerly,A.S., and Ferreira,P.C. (2009) Overexpression of the Arabidopsis anaphase promoting complex subunit CDC27a increases growth rate and organ size. *Plant Mol.Biol.* **71**:307-318.

Saze,H. and Kakutani,T. (2007) Heritable epigenetic mutation of a transposon-flanked Arabidopsis gene due to lack of the chromatin-remodeling factor DDM1. *EMBO J.* **26**:3641-3652.

Schmidt,E.E. and Davies,C.J. (2007) The origins of polypeptide domains. *Bioessays* **29**:262-270.

Schultz,J., Copley,R.R., Doerks,T., Ponting,C.P., and Bork,P. (2000) SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res.* **28**:231-234.

Schwab,R., Ossowski,S., Riester,M., Warthmann,N., and Weigel,D. (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**:1121-1133.

Serralbo,O., Perez-Perez,J.M., Heidstra,R., and Scheres,B. (2006) Non-cell-autonomous rescue of anaphase-promoting complex function revealed by mosaic analysis of HOBBIT, an Arabidopsis CDC27 homolog. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103**:13250-13255.

Sherr,C.J. and Roberts,J.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**:1501-1512.

Shimotohno,A., Umeda-Hara,C., Bisova,K., Uchimiya,H., and Umeda,M. (2004) The plant-specific kinase CDKF;1 is involved in activating phosphorylation of cyclin-dependent kinase-activating kinases in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**:2954-2966.

Shpungin,S., Liberzon,A., Bangio,H., Yona,E., and Katcoff,D.J. (1996) Association of yeast SIN1 with the tetratricopeptide repeats of CDC23. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:8274-8277.

Shteinberg,M. and Hershko,A. (1999) Role of Suc1 in the activation of the cyclosome by protein kinase Cdk1/cyclin B. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **257**:12-18.

Shultz,R.W., Tatineni,V.M., Hanley-Bowdoin,L., and Thompson,W.F. (2007) Genome-wide analysis of the core DNA replication machinery in the higher plants Arabidopsis and rice. *Plant Physiol* **144**:1697-1714.

- Sikorski,R.S., Boguski,M.S., Goebel,M., and Hieter,P.** (1990) A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell* **60**:307-317.
- Sikorski,R.S., Michaud,W.A., Wootton,J.C., Boguski,M.S., Connelly,C., and Hieter,P.** (1991) TPR proteins as essential components of the yeast cell cycle. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **56**:663-673.
- Stals,H., Casteels,P., Van,M.M., and Inze,D.** (2000) Regulation of cyclin-dependent kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol.Biol.* **43**:583-593.
- Stemmann,O., Zou,H., Gerber,S.A., Gygi,S.P., and Kirschner,M.W.** (2001) Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* **107**:715-726.
- Sterck,L., Rombauts,S., Vandepoele,K., Rouze,P., and Van de Peer,Y.** (2007) How many genes are there in plants (... and why are they there)? *Curr.Opin.Plant Biol.* **10**:199-203.
- Stewart,S. and Fang,G.** (2005a) Anaphase-promoting complex/cyclosome controls the stability of TPX2 during mitotic exit. *Mol.Cell Biol.* **25**:10516-10527.
- Stewart,S. and Fang,G.** (2005b) Destruction box-dependent degradation of aurora B is mediated by the anaphase-promoting complex/cyclosome and Cdh1. *Cancer Res.* **65**:8730-8735.
- Stillman,B.** (1996) Cell cycle control of DNA replication. *Science* **274**:1659-1664.
- Sudakin,V., Ganoth,D., Dahan,A., Heller,H., Hershko,J., Luca,F.C., Ruderman,J.V., and Hershko,A.** (1995) The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol.Biol.Cell* **6**:185-197.
- Sullivan,J.A., Shirasu,K., and Deng,X.W.** (2003) The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nat.Rev.Genet.* **4**:948-958.
- Tamura,K., Dudley,J., Nei,M., and Kumar,S.** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol.Biol.Evol.* **24**:1596-1599.
- Tanaka-Matakatsu,M., Thomas,B.J., and Du,W.** (2007) Mutation of the Apc1 homologue shattered disrupts normal eye development by disrupting G1 cell cycle arrest and progression through mitosis. *Dev.Biol.* **309**:222-235.
- Tang,Z., Li,B., Bharadwaj,R., Zhu,H., Ozkan,E., Hakala,K., Deisenhofer,J., and Yu,H.** (2001) APC2 Cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. *Mol.Biol.Cell* **12**:3839-3851.

Tarayre,S., Vinardell,J.M., Cebolla,A., Kondorosi,A., and Kondorosi,E. (2004) Two classes of the CDh1-type activators of the anaphase-promoting complex in plants: novel functional domains and distinct regulation. *Plant Cell* **16**:422-434.

Tatusov,R.L., Koonin,E.V., and Lipman,D.J. (1997) A genomic perspective on protein families. *Science* **278**:631-637.

Teodoro,J.G., Heilman,D.W., Parker,A.E., and Green,M.R. (2004) The viral protein Apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53. *Genes Dev.* **18**:1952-1957.

The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**:796-815.

Thornton,B.R., Ng,T.M., Matyskiela,M.E., Carroll,C.W., Morgan,D.O., and Toczyski,D.P. (2006) An architectural map of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* **20**:449-460.

Townsley,F.M., Aristarkhov,A., Beck,S., Hershko,A., and Ruderman,J.V. (1997) Dominant-negative cyclin-selective ubiquitin carrier protein E2-C/UbcH10 blocks cells in metaphase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:2362-2367.

Turnell,A.S., Stewart,G.S., Grand,R.J., Rookes,S.M., Martin,A., Yamano,H., Elledge,S.J., and Gallimore,P.H. (2005) The APC/C and CBP/p300 cooperate to regulate transcription and cell-cycle progression. *Nature* **438**:690-695.

Tuskan,G.A., Difazio,S., Jansson,S., Bohlmann,J., Grigoriev,I., Hellsten,U., Putnam,N., Ralph,S., Rombauts,S., Salamov,A., Schein,J., Sterck,L., Aerts,A., Bhalerao,R.R., Bhalerao,R.P., Blaudez,D., Boerjan,W., Brun,A., Brunner,A., Busov,V., Campbell,M., Carlson,J., Chalot,M., Chapman,J., Chen,G.L., Cooper,D., Coutinho,P.M., Couturier,J., Covert,S., Cronk,Q., Cunningham,R., Davis,J., Degroeve,S., Dejardin,A., Depamphilis,C., Detter,J., Dirks,B., Dubchak,I., Duplessis,S., Ehling,J., Ellis,B., Gendler,K., Goodstein,D., Gribskov,M., Grimwood,J., Groover,A., Gunter,L., Hamberger,B., Heinze,B., Helariutta,Y., Henrissat,B., Holligan,D., Holt,R., Huang,W., Islam-Faridi,N., Jones,S., Jones-Rhoades,M., Jorgensen,R., Joshi,C., Kangasjarvi,J., Karlsson,J., Kelleher,C., Kirkpatrick,R., Kirst,M., Kohler,A., Kalluri,U., Larimer,F., Leebens-Mack,J., Leple,J.C., Locascio,P., Lou,Y., Lucas,S., Martin,F., Montanini,B., Napoli,C., Nelson,D.R., Nelson,C., Nieminen,K., Nilsson,O., Pereda,V., Peter,G., Philippe,R., Pilate,G., Poliakov,A., Razumovskaya,J., Richardson,P., Rinaldi,C., Ritland,K., Rouze,P., Ryaboy,D., Schmutz,J., Schrader,J., Segerman,B., Shin,H., Siddiqui,A., Sterky,F., Terry,A., Tsai,C.J., Uberbacher,E., Unneberg,P., Vahala,J., Wall,K., Wessler,S., Yang,G., Yin,T., Douglas,C., Marra,M., Sandberg,G., Van de Peer,Y., and Rokhsar,D. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**:1596-1604.

Umeda,M., Shimotohno,A., and Yamaguchi,M. (2005) Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants. *Plant Cell Physiol* **46**:1437-1442.

van, L.R., Clijsters, L., and Wolthuis, R. (2008) To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim.Biophys.Acta* **1786**:49-59.

Vandepoele, K., Raes, J., De, V.L., Rouze, P., Rombauts, S., and Inze, D. (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**:903-916.

Vanstraelen, M., Baloban, M., Da, I.O., Cultrone, A., Lammens, T., Boudolf, V., Brown, S.C., De, V.L., Mergaert, P., and Kondorosi, E. (2009) APC/C-CCS52A complexes control meristem maintenance in the Arabidopsis root. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106**:11806-11811.

Verkest, A., Weinl, C., Inze, D., De, V.L., and Schnittger, A. (2005) Switching the cell cycle. Kip-related proteins in plant cell cycle control. *Plant Physiol* **139**:1099-1106.

Vinardell, J.M., Fedorova, E., Cebolla, A., Kevei, Z., Horvath, G., Kelemen, Z., Tarayre, S., Roudier, F., Mergaert, P., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (2003) Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* **15**:2093-2105.

Vodermaier, H.C. (2001) Cell cycle: Waiters serving the Destruction machinery. *Curr.Biol.* **11**:R834-R837.

Vodermaier, H.C., Gieffers, C., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, F., and Peters, J.M. (2003) TPR subunits of the anaphase-promoting complex mediate binding to the activator protein CDH1. *Curr.Biol.* **13**:1459-1468.

Vodermaier, H.C. (2004) APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr.Biol.* **14**:R787-R796.

Vogel, C., Teichmann, S.A., and Pereira-Leal, J. (2005) The relationship between domain duplication and recombination. *J.Mol.Biol.* **346**:355-365.

Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., DePamphilis, C.W., and Ma, H. (2004) Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol* **135**:1084-1099.

Wang, J., Dye, B.T., Rajashankar, K.R., Kurinov, I., and Schulman, B.A. (2009) Insights into anaphase promoting complex TPR subdomain assembly from a CDC26-APC6 structure. *Nat.Struct.Mol.Biol.* **16**:987-989.

Wang, Z., Yu, R., and Melmed, S. (2001) Mice lacking pituitary tumor transforming gene show testicular and splenic hypoplasia, thymic hyperplasia, thrombocytopenia, aberrant cell cycle progression, and premature centromere division. *Mol.Endocrinol.* **15**:1870-1879.

- Wassmann,K. and Benezra,R.** (2001) Mitotic checkpoints: from yeast to cancer. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **11**:83-90.
- Wendt,K.S., Vodermaier,H.C., Jacob,U., Gieffers,C., Gmachl,M., Peters,J.M., Huber,R., and Sondermann,P.** (2001) Crystal structure of the APC10/DOC1 subunit of the human anaphase-promoting complex. *Nat.Struct.Biol.* **8**:784-788.
- Wilson,C.G., Kajander,T., and Regan,L.** (2005) The crystal structure of Nlpl. A prokaryotic tetratricopeptide repeat protein with a globular fold. *FEBS J.* **272**:166-179.
- Yamada,H., Kumada,K., and Yanagida,M.** (1997) Distinct subunit functions and cell cycle regulated phosphorylation of 20S APC/cyclosome required for anaphase in fission yeast. *J.Cell Sci.* **110 (Pt 15)**:1793-1804.
- Yamaguchi,M., Kato,H., Yoshida,S., Yamamura,S., Uchimiya,H., and Umeda,M.** (2003) Control of in vitro organogenesis by cyclin-dependent kinase activities in plants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**:8019-8023.
- Yamamoto,A., Guacci,V., and Koshland,D.** (1996) Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* **133**:85-97.
- Yamano,H., Gannon,J., Mahbubani,H., and Hunt,T.** (2004) Cell cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in *Xenopus* egg extracts. *Mol.Cell* **13**:137-147.
- Yamashita,Y.M., Nakaseko,Y., Kumada,K., Nakagawa,T., and Yanagida,M.** (1999) Fission yeast APC/cyclosome subunits, Cut20/Apc4 and Cut23/Apc8, in regulating metaphase-anaphase progression and cellular stress responses. *Genes Cells* **4**:445-463.
- Yee,D. and Goring,D.R.** (2009) The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. *J.Exp.Bot.* **60**:1109-1121.
- Yoon,H.J., Feoktistova,A., Wolfe,B.A., Jennings,J.L., Link,A.J., and Gould,K.L.** (2002) Proteomics analysis identifies new components of the fission and budding yeast anaphase-promoting complexes. *Curr.Biol.* **12**:2048-2054.
- Zachariae,W. and Nasmyth,K.** (1999) Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* **13**:2039-2058.
- Zhang, J.** (2003) Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol. Evol.* **18**:292-298
- Zhao,T., Wang,W., Bai,X., and Qi,Y.** (2009) Gene silencing by artificial microRNAs in *Chlamydomonas*. *Plant J.* **58**:157-164

Zhao, W.M. and Fang, G. (2005) Anillin is a substrate of anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) that controls spatial contractility of myosin during late cytokinesis. *J. Biol. Chem.* **280**:33516-33524.

APÊNDICES

APÊNDICE I

Lista de oligonucleotídeos utilizados para RT-PCR em tempo real.

Os28S forward (F) 5' GCGAAGCCAGAGGAAACT 3',

Os28S reverse (R) 5'GACGAACGATTTGCACGTC 3',

OsActin F 5' CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA 3',

OsActin R 5' CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA 3',

OsAPC1F 5' CTTGAGCTCTGCTTGCATCT 3',

OsAPC1 R 5' GCTTACAGCCATCTGCAGTC 3',

OsAPC2 F 5' AATGCTGGGGACAATCTTCT 3',

OsAPC2 R 5' TAATGGGTCTGCTTCCACAG 3',

OsCDC27 F 5' AGCGACTTGCTACCTTCACA 3',

OsCDC27 R 5' TTGACAGGACACAAGGCTTC 3',

OsAPC4 F 5' CGACAAGGATGGCCTGTTAT 3',

OsAPC4 R 5' GAAGCGCTTGAAAATTCCTG 3',

OsAPC5 F 5' TTCGTTGGTCTATGCAACCT 3',

OsAPC5 R 5' AACGGAACTTCTCTTCAGC 3',

OsCDC16 F 5' ACAGGAGGAGGGTGATCAAG 3',

OsCDC16 R 5' GATTTTGCTTGCGTGAAGAA 3',

OsAPC7 F 5' AGACTTCAGGGGAGCTCAAG 3',

OsAPC7 R 5' TTGAGAGCTTTTGCAGACTGA 3',

OsCDC23_1 F 5' CGCTGAAGCTTAATCGAAAGT 3',

OsCDC23_2 R 5' GACCAAGACCATAACCAAGCA 3',

OsCDC23_2 F 5' CAGTTCTGGTGAATCTGTCA 3',

OsCDC23_2 R 5' CAAGATGTGCACTAGCAAGGA 3',

OsAPC10 F 5' TGATCCCCGAGAAACATTC 3',

OsAPC10 R 5' GAAGTGAAGTGAAATGGCTGAT 3',

OsAPC11_1 F 5' CCAGGATGAAACCTGTGGTA 3',

OsAPC11_1 R 5' GTTTGAGAATTGACCCACTTGA 3',

OsAPC11_2 F 5' AAACATGCGGCATATGCA 3',

OsAPC11_2 R 5' AAGTGGCGTAGATGTCTGAGAA 3',

OsCDC26 F 5' ATCGGCCTCCCTACCAT 3',

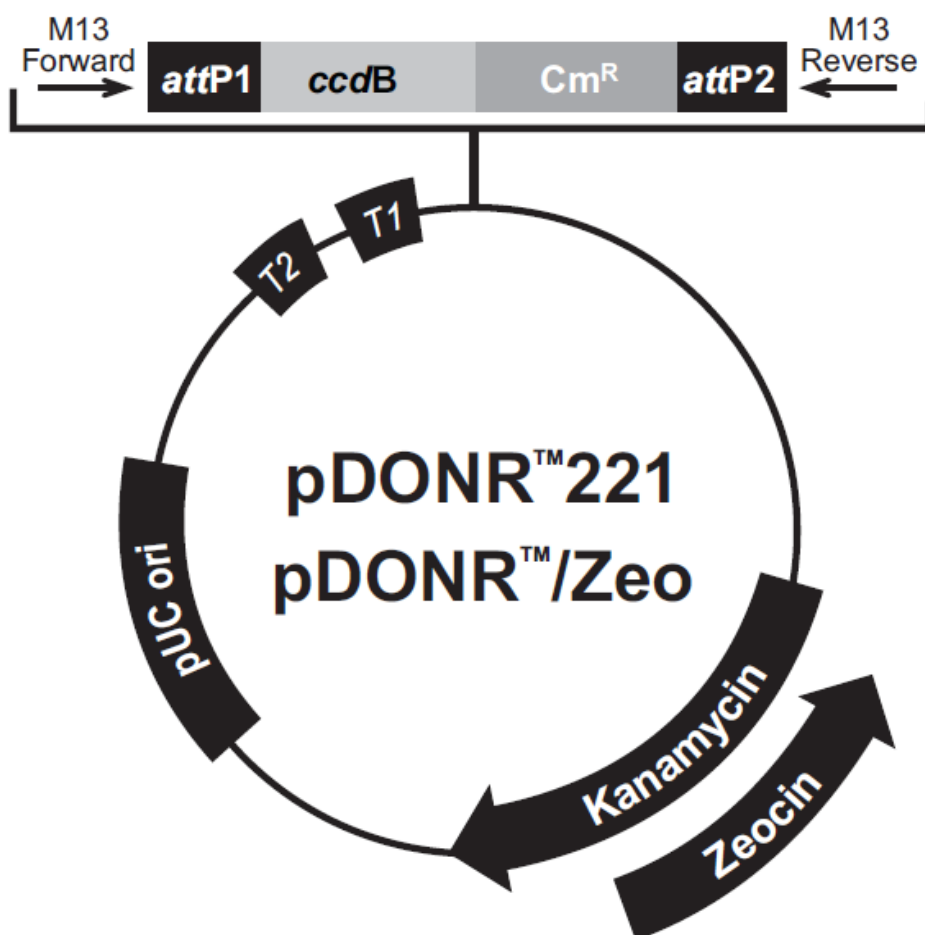
OsCDC26 R 5' GAGGAGAGGCTAGGGTTTGG 3',

OsAPC13 F 5' TTGTGCTGGTTGGCTTTC 3',
 OsAPC13 R 5' CGTCCTCATCGACATCGT 3',
 OsCDC20_1 F 5' ATGATCGGTGCATCAGGTT 3',
 OsCDC20_1 R 5' GGCAAAGAACACGAGCAGT 3',
 OsCDC20_2 F 5' CCTGTCCGGAATAAACCTGT 3',
 OsCDC20_2 R 5' CACTCGATCTCATCGGAGAA 3',
 OsCDC20_3 F 5' TTCACATTTGGGATGTGTCC 3',
 OsCDC20_3 R 5' TACCACCACCTCCAGTTGC 3',
 OsCCS52A F 5' GCCCCAGGAAGATCCCTA 3',
 OsCCS52A R 5' TGCTGCATGCATTCCATAA 3',
 OsCCS52B F 5' GTCACCAAGCTCTGCGATT 3',
 OsCCS52B R 5' TCCTCCCATGTTCTAATCC 3',
 PtActin F 5' GGTCAAGGCTGGGTTTGCT 3',
 PtActin R 5' TCGCCAACATAGGCATCTTTT 3',
 PtAPC10 F 5' ATGACCCTAGGGAAACATTT 3',
 PtAPC10 R 5' AAAAGGCTGATGCGGAAAAG 3',
 PtCDC27_1 F 5' TGGCCTTCCAAACCTGTCAT 3',
 PtCDC27_1 R 5' GGCATGCTAAGATTGGAACCA 3',
 PtCDC27_2 F 5' AGCCGGATGTTATTTGCAAAA 3',
 PtCDC27_2 R 5' ATGCCGCTTCAGCTTCATTT 3',
 PtCDC20_1 F 5' TTTATTCCAAACCGGTCAGC 3',
 PtCDC20_2 R 5' TCGGTTTCATGTTCAAGGATTC 3',
 PtCCS52A F 5' TTCCCCCTCGAGACCTATTT 3',
 PtCCS52A R 5' CATTGGGATTGCCTCCTTC 3',
 PtCCS52B F 5' CGTATCATCACCCAGAGCAA 3',
 PtCCS52B R 5' TCGTTGCCTCCTTCTTTAACA 3'
 AtAPC4 forward RT 5' CGCCTGGAAAGCCTGTTACT 3'
 AtAPC4 reverse RT 5' CCCAACAGCTATGGCTTTGC 3'
 AtAPC5 forward RT 5' GAATGTTGTTGTCGTTGCA 3'
 AtAPC5 reverse RT 5' TGACAACTCCCTCGAACGAT 3'
 Ubi14 forward RT 5' TCACTGGAAAGACCATTACTCTTGAA 3'
 Ubi14 reverse RT 5' AGCTGTTTTCCAGCGAAGATG 3'

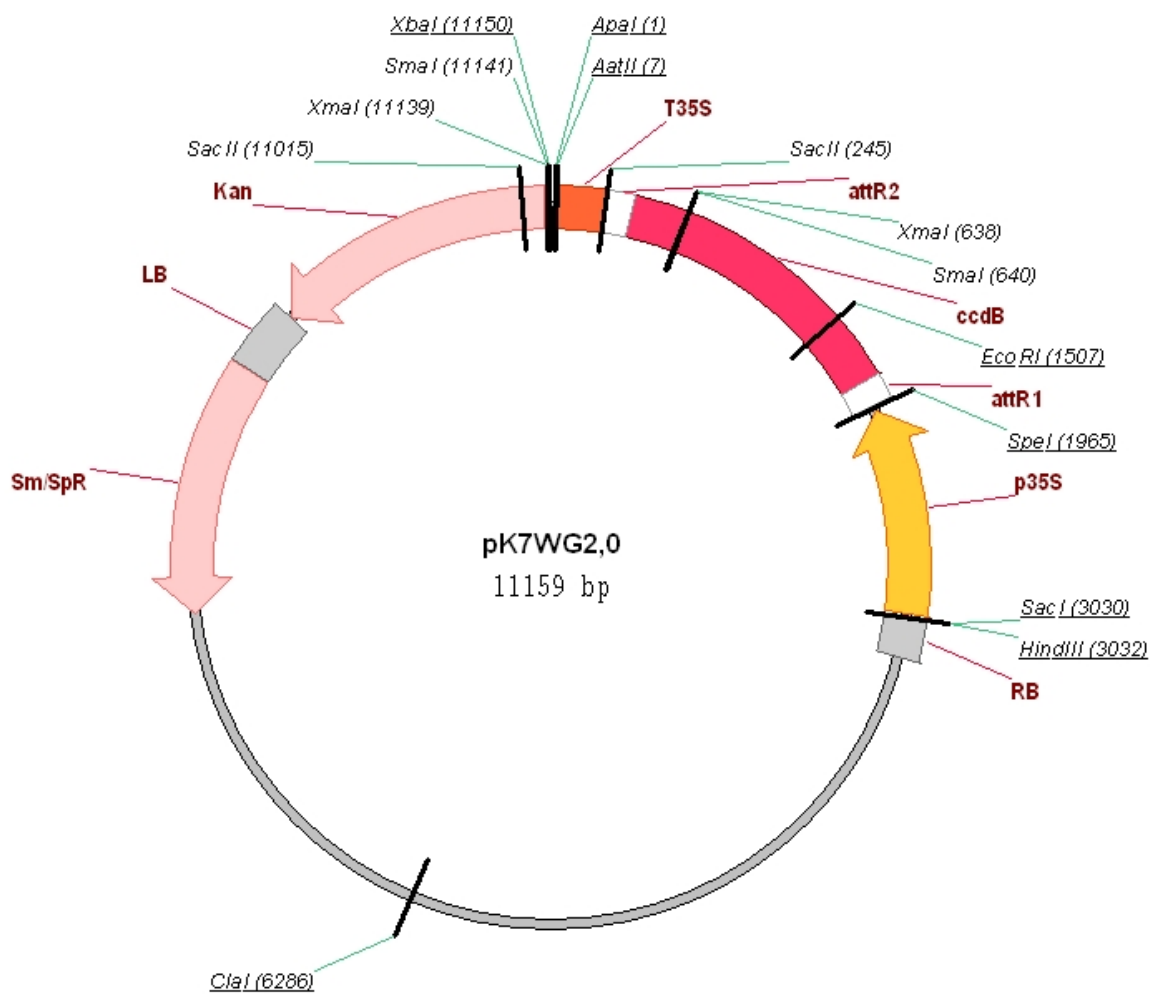
APÊNDICE II

Mapas dos vetores utilizados neste trabalho.

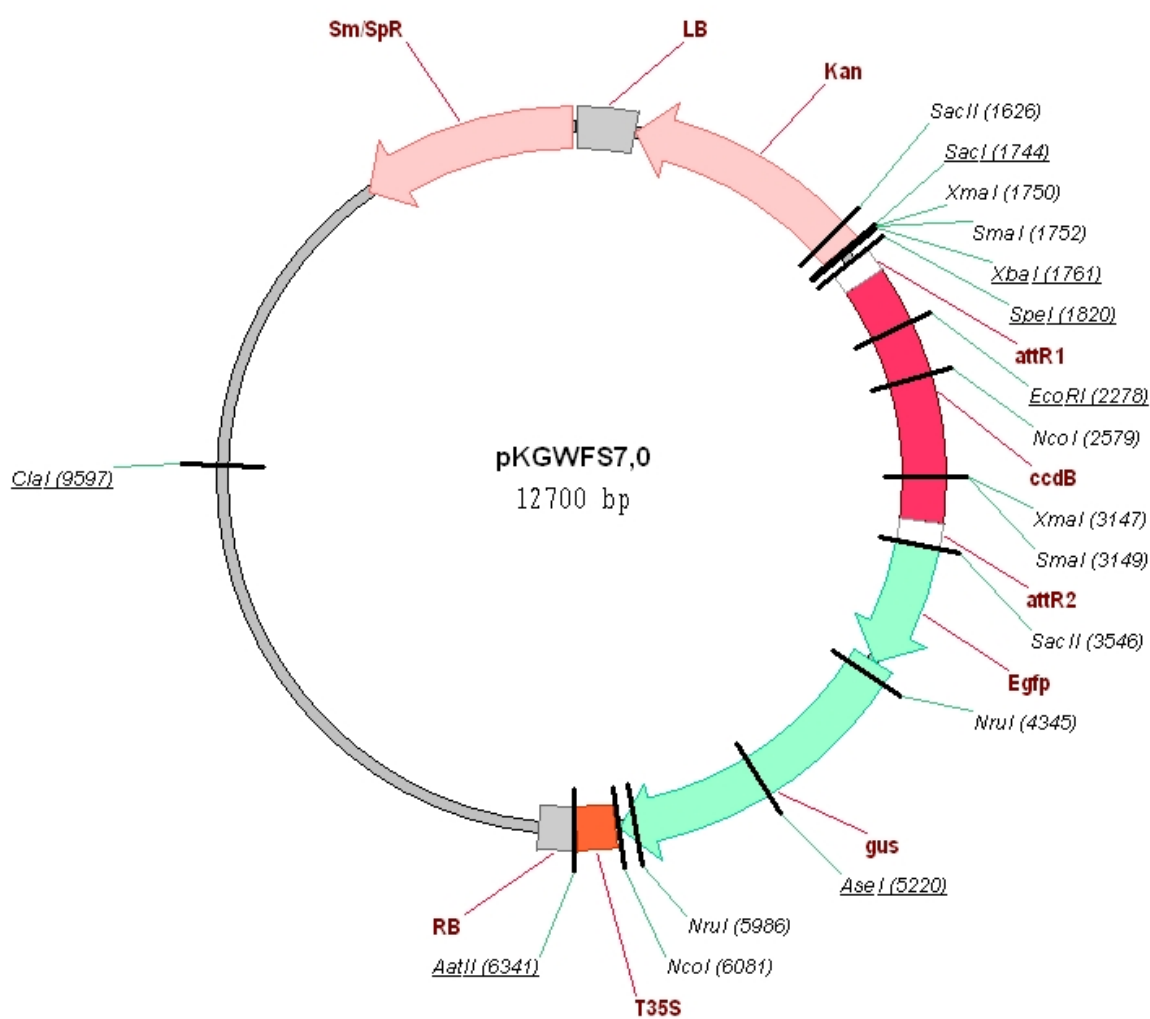
- pDONR221 - vetor de entrada



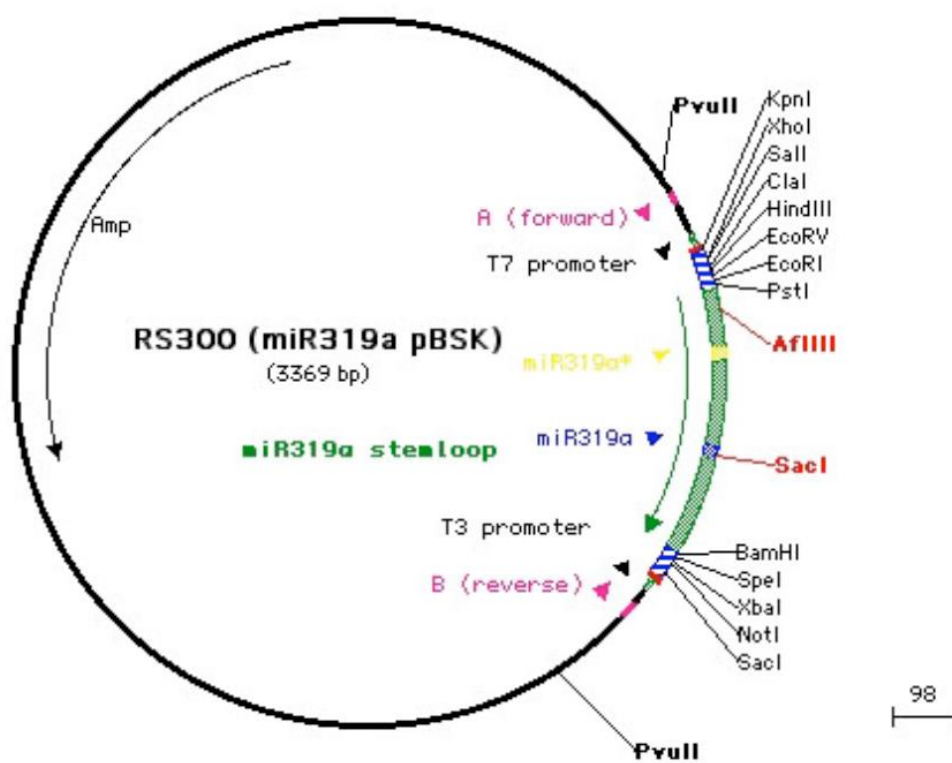
- pK7WG2 - vetor de destino (superexpressão em plantas)



- pKGWFS7 - vetor de destino (análise de promotor em plantas)



- pRS300 - vetor de destino (amiRNA em plantas)



APÊNDICE III

Lista de clones de destino gerados para este trabalho.

Clones de Entrada	Vetor	Característica	Experimento	Nome
promAtAPC5	pKGWFS7	Análise promotor	GUS	pAtAPC5
AtAPC10	pK7WG2	Superexpressão	Superexpressão em plantas	AtAPC10 sup
amiRNA-AtAPC4	pK7WG2	Superexpressão	Superexpressão em plantas	amiAtAPC4
amiRNA-AtAPC5	pK7WG2	Superexpressão	Superexpressão em plantas	amiAtAPC5

APÊNDICE IV

Seqüência parcial do gene OsAPC1 do banco Gene Index. Um EST foi descoberto no banco Gene Index (acima). A região codificante está sublinhada e o códon de terminação está marcada em vermelho. A seqüência traduzida está abaixo.

>TC286185

TGCTCAGCAAGACCTGTGGCAATACAGACACCCAATAATCTAGTGTGTCTGATCAGGATCTACAACAGCAACAACATATGGAACCTTTGCACAAA
 GAACAACAGCTTTACCTTTTGGGCGTGGGGCTTTTACTTTAGCTACAACCTACACACTGTTAACAGAGGCTCTGGTTTTCCCAAAGCTTGT
 GGCTGGTCGGTTGCCTGCACAACAGAATGCAACAGTTAATCTTGACCTAAGTACTAGAAGCGTCTCAGAATTCAAATCTTGGGCTGAGTTTCAC
 AATGGTGTGCTGCTGGGCTCAGGCTTGCCTTTTTCAGGAGAAAATGTTAAGAACCTGGATACAATATAATAGACCTTCTGAACCAAAATTTTA
 CTCATGCTGGTCTGCTTCTTGCATTTGGTTTGCATGAACATCTACGAGTTTTAATATGACCGACGCTTACCAGATATCTCTCCAGGAGCATGA
 TATACTAGACTTGGTTTGTACTTGGTTTGGCTGCATCTAATAGGGGACAATGCACCCGGCAATTCAAAGATGCTCTATTTTTCATGTCCCT
 TCCCGGCATCCATCTTCTACGCCAGAGTTGGAATTACCTACTCTTCTGCAGTCAGCAGCAGTGTATGGGAATTGGACTTCTCTATGAAGGGTCTAG
 CACATGCATTAACCATGAAAATTTCTTCTGGGTGAGATTGGCCGAAGAAGTGGTGGTGATAATGTGCTAGAAAAGAGAAGGCTATGCTGTGCTGC
 AGGCTCTGCATTAGGACTTGTGCTTAGTTCGTGGAAGCAATGCTTTCGGATTCTGGACACTTTTCTGGACCGGCTTTTTGAATACATTTGGC
 AGTAAAGAAGTCTACCATGAAAAACACTTAAATGCAGCAATAGCTGTGATGAGCAAAGTGGCAACACCCGGACAGATGATGGAAGGAGCACAAA
 TAAATGTTGATGTTACTGCACCTGGAGCAATAATTGCTCTAGCCTTGATAATTCTGAAAGCAGAGTCAGAAGAAAATGTCAGCTAGACTCAGTGT
 TCCCAATAGTCACTTTGATCTGCAGTATGTGAGACCTGATTTTGTAAATGCTTCGCATGTAGCACGGAATTTAATATTGTGGAACAGAATACAA
 CCTACCAAGATTGGGTTGAGTCTCAAGTTCCTTCAATTTGTCACCTTTGGTGTTCCTCAATACGAGTCAAGAGGCTATGGACAGTGTGAATTGG
 ATAGCGAAGTCTGTTTCAAGCTTATGTTAATATTGTCACCTGGAGCATGCATTGCACCTTGGTCTCAAATATGCTGGCAGTAGAAAATAGTGTATGC
 CCAAGAACTACTCTACGCTTATGCCGTCCATTTTCTCAATGAGATCAAACACATATCTATTCAGACTGCAAGCATAATTGCCAAAGGGATTGTTG
 CAGCATGTTGATCGTGGAACTCTTGGCTCTGCTTGCATCTTATTGTTCTCTCTATCACTGGTAAATGGCAGGATCTGGACATTTACAAACTT
 TCCGCTTACTGCGTTATCTGAGGGGAAGAAGTCTGCAGAAGGACAAGTAAATTTAGGACTGCAGATGGCTGTAAGCTTGGCTATAGGATTTCTT
 ATTCCTTGGAGGTGCTACACACACATTTCTCAACTTCAAATAGTGCAGTTGCCGCATTAATCACTACCCCTTTACCCACGTTTTGCCTACTGGACCA
 AATGATAATCGCTGTCATCTCCAGGCATTCAGGCATCTGTATGTAATAGCTACAGAACCTCGATGGATTACAGACAGTAGATGTTGACACAGGAC
 TTCCGGTGTATTGCTCTTGAAGTGACAGTTGCTGAAACGGAGTATTATGACGAGACTAATTAAGTGTGAAGTGACACCTTGTCTTCTGCCAGA
 GCGCTCAGTGTGAAGAACATTCGAGTTTGTGGACCCAGATATTGGTCTCAGGTGATTACACTTACACCTGAAGATAAGCCATGGTGGAAATCT
 GGAGACAGGACTGACCCATTCATGGTGGAGTACTCTATATAAAACGGAAAGTTGGATCTTGTTCCTACTCAGATGATCCAATTGGATGCCAAT
 CTTTGGCTTTCTCGAGCAATGCATGAGGTTTGTGATACACCATCCACGAGCTGCAGTAATCAGGCAACAGTGTACTCTGATGTTCACTTAGAGT
 CGATCAGTTAGTAAGCACATTTTCTGCTAATCCAAGCTTGATAGCTTTTGGCAAACTGTGTTGTGCTAGTATGGAAGGACAGGCGCAATGGCAGT
 TTTGAAGATTCTGCTCTCAAATACTTTATGAATGTATGAGCAAGGATGACCCAGCACTATGTCAGGTGTATATAAGTTTTTACACAATAATTG
 AGACAATGTTGGGAGCATCTAAAGATTGGACATTTTCTTCTGATTTCTTTTCTTTTCCAGCTTGAAGGTTGCATCAGCCTATAATGAAGC
 ACTGATTGATGGTAGAATTACAACCTGGAGGCATTATTCAGTCCACATTTTGGAACTACTTATGAAGCGCATAGAGTACATCTTCCGAGAATTG
 CCGAACCTGCATGACAGCTTCAATCAATTACCTGAACAAAGGCAAAATGGCCTGATGCACAAAACGAAGCAGTCTCCTTTCTTGGTATCTCCAGT
 GGTACAGCATCCCACTCCCATATTTGTGTCATCCGCAATGAAAAGGTGAAGCCAGAACCTCGGACCAGCTTGTCCATGCTCCCGCTTCTTCCG
 GCTCTGCTGCCAACACACATCTCGTGGGCTCATGGAGATTGAGAAGCTTACATGACTCATGGTCCAGGGGCTTGGACCTTGCAC**TGA**AAA
 TGCAAGAAACGTTTAGCAACGAGTGAAGCCGATTGTGACTGGACTGAATAGTATCAGGGCTCATTGTTCTTACTACTAGTAAGGATCATACCTA
 AGTGTGGAATGCCAAGGCTTTGTGTGGAGGCCTCAATCATGTGATCCTACCTTGAATGCTCATATGGCATCTGATATTGACCCATGATC
 CTGTTGCATTTAGATGTAAGTGTCCATTTTGGCTTTAGAATAGGAATGACCGAATGAGTGGCCCTAGTTTGGACCTTTGATAACTGCTACATTT
 GGGCTCAATGCAACATGGGTTCCAGTGTATGCCGACCGGTTTCAATAAACTGGTGGTTACGAATTGAGCTATAATAGAGCACATTTTGTCTTCT
 CAGGCTAAAAANAA

>OsAPC1

CSARPVAIQTTPNPNFSVSDQDLQQQLWNFAQRRTTALPFRGAFITLATTYLLTEALVFPKLVLAGRLPAQQNATVNLDLSTRSVSEFKSWAEFH
 NGVAAGRLAPFQEKMLRTWIQYNRPSEPNFTHAGLLAFGLHEHLRVLMTDAYRYSQEHDIRLGLLLGLAASNRGTMHPAISKMLYFHV
 SRHPSSTPELELPTLLQSAAVMIGLLYEGSAHALTMKILLGEIGRRSGGDNVLEREGYAVAAGSALGLVALGRGSNAFGFMDTFLDRLFEYIG
 SKEVYHEKHLNAAIAADEQSGNTGQMMEGAQINVDVTPAGAI IALALIFLKAESSEIAARLSVPNSHFDLQYVRPDFVMLRIVARNLILLWNRIQ
 PTKDWVESQVPSFVNFVSNSTQEAMDSDELDEALFQAYVNIIVTGACIALGLKLYAGSRNSDAQELLYAYAVHFLNEIKHISIQTASILPKGLL
 QHVDRGTLELCLHLIVLSLSLVMAGSGHLQTFRLRLYLRGRSSAEGQVNYGLQMAVSLAIGFLFLGGGHTFTSTNSAVAALLITLYPRLPTGP
 NDNRCHLQAFRHLVIATEPRWIQTVDVDTGLPVYCPLEVIVAEETBYDETNICEVTPCLLPERSVLKNIRVCGPRYWSQVITLTPEDKPPWKS
 GDRTPFNNGVLYIKRKVGSYSDDPIGCQSLLSRAMHEVCDTPSTSCSNQANSATRSSLRVDQLVSTFANPSLIAFAKLCCQSWKDRRNGS
 FEEFCSQILYECMSKDRPALLOVYISFYTI IETMWEHLKIGHFPFSDSLFLSSLKVASAYNEALIDGRITTTGGIIQSTFLESMLKRIEYIFAE
 PNLHDSFINYLNGKWPDAQNEAVLLSWYLQWYSIPPPHIVSSAIEKVKPRTRTSLSMLPLLRLLLPPTHVLVGLMEIEKLMTHGHEGLTLH*

AtAPC4 FTTISRKISCMKLLPLCPLQLSTTQTPT--TIPMSLSFYKNELSDDTPCQSGYTDYISFQ 614
 PtAPC4 FTTISRKMLCEDLLPLFLPSSSSSASVSMaipmsiSYYSQAVSSNQTCQHSFVDYVCFQ 603
 OsAPC4 FTTISSQIHCQELLPlyPITSSVDLSSST--CILTsvsfykDEDSQNSGSSYSLTDYICFK 623
 ***** : : * .***** * : * :.. * *:*:*.: *.: .. .**:*:*:

AtAPC4 VPDETFPEISNCIGIAKGYKQNSNNEKNGYTSLEAVLLSVPNGYTCVDLSLYKDKELVLL 674
 PtAPC4 VPDEFFSDIANCIGVIRGFTHDLSSKNGYTSLEAVLLYVPAGYECVDLSLYKDSQIVLL 663
 OsAPC4 IPDGSLN-LKNCIGVIKDFSNSSASG----PSSSGFLLHIPDEYECVDVSLYKDSQIVVL 678
 : : : ***: :..... . * ...** : * * **:*:*****.:*:*:

AtAPC4 LNKNTDSEGSGEACMMVVQTGDlafisISGSSSLNQWELEDLKGSIVNLEMENEK-VRK 733
 PtAPC4 LNGASASSESSGDACMMIVQASELPIFISISRFTDLNLWNLyQLKDSTVQLQMEne----K 719
 OsAPC4 Lser-sYSDGPGSSyIVMLQMenFSFVPLSRMFPsNIYSVQELSAQELQLDtdyGKKVRS 737
 * . : *:.**.: :*: * :*:**:* * :. :*. . :*: : .

AtAPC4 VPHSVIAPLAVSASRGVACVFAERRRALVYILEEDEDEEISDEK--- 777
 PtAPC4 VPHSVIAPLAVSASRGVACVFAARKRALVYILEEDE-EEVPDTE--- 762
 OsAPC4 IPHAVSTPLAVSASRGVACVFSSRRHALVYILDEDEDEDEDESSDME 784
 :*:* :*****: *:*:*****:* * : : .

APC5

AtAPC5 MAGLTRTAGAFavTPhkiSvCILLQIYAPSAQMSLPPFPSSVAQHNRGLGLYLLSLT---K 57
 PtAPC5 -----AFALTPHKVSVCLLLQTYALPAQTTPFPFPSSVSQHNRLGLYLLALTKMLQ 51
 OsAPC5 -----

AtAPC5 SCDDIFEPKLEKLINQLREVGEEMDAWLTdHLtnrfSSLASpDDLlNFFNDMRGILGSLD 117
 PtAPC5 SYDDILEPKLEELNLQlKEISGSLGHwLIDHLtSRlSSLSAPDDLFSFFTEMRGILGGLD 111
 OsAPC5 -----

AtAPC5 SGVvQDDQIILDpNSNLGMFVRRcILAFNLLSfEGVChLFSSIEDYCKEAHSSFAQFGAP 177
 PtAPC5 SVVMEDNQVILDPNSNLGLFLRRcILTFNLLSfEGLChLLTNIGSYCKEAMSS----- 164
 OsAPC5 -----MTfEGVChLLANLVEYcNSADTS----- 23
 :*:*:*:*: :. :*:* * *

AtAPC5 NNNLESliQYDQMDMenYAMDKPTEEIEFQKTASGIvPFHLHTPDslMKATEGLLHNRKE 237
 PtAPC5 SndLEtLSEYENMDLENFMFGKvNEEIEARkQASERvPFHLHGPKALSGLVEGIID---- 220
 OsAPC5 YDLAEDEDfNSEMEMSNfMDTN-----MHVRDGVFDKYNQGYAPRSHMVD----- 68
 : * :*:*:*:*: : : . . : : . . :

AtAPC5 TSRTSKKDTEATPVARASTSTLEESLVDESFLRtNLQIQGFLMEQADAIEIHGSSSSSFS 297
 PtAPC5 SSKHGDKCGETSAYVHPPGNELRDVPYGEIflRtnwQvQGYLMEQADAIeGCRHDSsFS 280
 OsAPC5 -SSSLVHAPASLHDfEeANMFkADNLGPTCLRSRWQLEAYLNQqADILE--KDPSSVP 125
 * . : : : . : . * : * :*:*:* * * * . * * .

AtAPC5 SSSIESFLDQLQKLAPeLHR-----VHFLRYLNKLHSDDYFAALDN 338
 PtAPC5 LNSfELVLRQIKKLAPeLIQ-----VHFLRYLNSLYHDDYFAALDN 321
 OsAPC5 LNSFNATMSQLQKLAPeLHRNCEBFLVtMvYFDLYStCQVfLQYLNALThDDYVAALDN 185
 .*:*: : *:*:***** : *:*:* * * * . * * * *

AtAPC5 LLRYFDYSAGTEG-FDLVPPSTGCSMYGRYEIGLLCLGMHFRFGHPNLALeVLTEAVRV 397
 PtAPC5 LHRYFDYSAGAEG-FDSAPSSSGNSSGRYEIGLIYLGMHLHFHGPKQALeVLTEAVRF 380
 OsAPC5 LHRYFDYSAGMQGLFSRTASPFQDIIVGKYESALlCLGNLHCYFGHPKKALEAFTEAVRV 245
 * * * * * * * * : * * : * * . * : * * * * : * * * : * * * * .

AtAPC5 SQQLSNDTCLAYTLAAMSNLlSEMGIAStSGVLGSSySP--VTSTASSLSVQQRVYILLK 455
 PtAPC5 SQQQSNESCLAYTLAAICNVLSEfGCSSSAGVLGTSfSP--ITSMdTSLSVGQQLFVLLR 438
 OsAPC5 SQMNNDdSCLAYILGAISNLlSKIGMSStVGTIGSPYSLGNnIGLGTPLSIQQQLLVLLK 305
 ** :*:*:***** *:*:*:*:*:* * : * :*:*:*:* . :*:*: * : * * :

AtAPC5 ESLRRADSLKLRRLVAsNHLAMAKfELM-----HVQRPLLSFGPKASMRHKTC 503
 PtAPC5 ESLKRAESLKLKRLVAsNHLALAKFDLLtSYLFQLYFDLQHVQRPLLSFGPKASMKLRtF 498
 OsAPC5 RSLKRADTLKLTSLlSFDHLsLAKFDLk-----HVQRPLVsfGPNASTKLRtC 353
 .*:*:*:*:* * : : *:*:*:*:* * * * * * * * * * * : : *

AtAPC5 PVSvCK-----EIRLGAHLISDFSSesStMTID-GSLSSAWLKDlQ 543
 PtAPC5 PINVCKVfGAFGDSIYSfSPISLLQELRLCSHLISefGSesStMTTD-GVfStTWLNNlP 557
 OsAPC5 PADvCK-----NLRlSSRVLTDFGTDGLSANSNDNGSfSTSWLRNlS 394
 * . * * * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```

AtAPC5      KPWGPPVISPDSGS---RKSSTFFQLCDHLVSIIPGSVSQLIGASYLLRATSWELYGSAPM 600
PtAPC5      KSMDSPLLPQENAH---RNNCDAHRFFFTQLSSVPKSVLQLLGSSYIMRSTAWEMYGSAPL 614
OsAPC5      AASNSWCSSSKKSGKLLTNDFDNFHFAQPSPIPASVLQLAGSAYLLRATAWEHYGSAPM 454
      . . . . . :. :. :. :.* ** ** *::*:**:* ** ** ** :
      . . . . . :. :. :. :.* ** ** *::*:**:* ** ** ** :

AtAPC5      ARMNTLVYATLFGDSSSSSDAELAYLKLQHLALYKGYKDAFAALKVAEEKFLTVSKSKV 660
PtAPC5      ARINSLVYATCFADASSSSDAASVHAKLIQHLAVFRGYKGAFALKVAEEKFLTVSKSVI 674
OsAPC5      VRMNSLVYATCFADAASSELSLAYVKLIQHLATFKGYSAAFSAALKLAEEKFPLSANSHI 514
      .*:*:***** *.*:*:***: .: ***** :*:*. **:***:***** :*: *
      .*:*:***** *.*:*:***: .: ***** :*:*. **:***:***** :*: *

AtAPC5      LLLKLQLLHERALHCGNLKLAQRICNELGGLASTAMGVDMELKVEASLREARTLLAAKQY 720
PtAPC5      LLVKLQLLHECALHRGNLKLAAQQVCDELGVLASSVSGVDKDLKTEASLRHARTLLAANQF 734
OsAPC5      QLLKMQLLHERALHRGHLKVAQQICDEFVLSSSVSGVDIELKTEARLRHARTLLAAKQF 574
      *.:*:***** ** *:***:***:*. :*. :*. ** :*. ** ** .*****:*.
      *.:*:***** ** *:***:***:*. :*. :*. ** :*. ** ** .*****:*.

AtAPC5      SQAANVAHSLFCTCHKFNLQIEKASVLLLLLAEIHKKSGNAVLGLPYALASISFCQSFNLD 780
PtAPC5      SQAANVAHSLFCMCYKFNMQVNATVLLLLLAEIHKKSGNAVLGLPYALASISFCQSFNLD 794
OsAPC5      SQAANVANSFLSTCYKYNMQVENASVLLLLLAEIQKNSDNAVLGLPYALASQSFCQSFNLD 634
      **** *:***. *:***:***:*. :*. :*. *****:*. :*. ***** ***** *:***
      **** *:***. *:***:***:*. :*. :*. *****:*. :*. ***** ***** *:***

AtAPC5      LLKASATLTLAELWLGLGSNHTKRALDLLHGAFPMILGHGGLELRARAYIFEANCYLSDP 840
PtAPC5      LLKASATLTLAELWLSLGSNHAKRALTLIHGALPMILGHGGLELQARAQITEAKCYLSDP 854
OsAPC5      LLEASATLTLTELWLALGSTHAKRALSLVCQSLPMILGHGGLELRARAHIVLAKCYLSDP 694
      **:*****:***.***.**:*** * : :*****:*** * *:*****
      **:*****:***.***.**:*** * : :*****:*** * *:*****

AtAPC5      SSS-----VSTSDTVLDSLQASDELQALEYHELAAEASYLMAMVYDKLGRL 888
PtAPC5      SYS-----GSTLSSPFLDLLRQASDELQVLEYHELAAEFYLMAMVYDKLGRL 902
OsAPC5      KFSEKPVPLCPFIMAVSEDPASVLDPLNQAEDLEVLEYHEMAEAYYLKAMVYNNLGKL 754
      . * * . . . . * *.*:*:***:*. :*. :*. *****:*** ** * *:***:*.
      . * * . . . . * *.*:*:***:*. :*. :*. *****:*** ** * *:***:*.

AtAPC5      DEREAAASLFKKHIIALENPQDVEQNMA- 916
PtAPC5      ERREEAAASFKEHMMALENPQD----- 924
OsAPC5      DEREAAASFKHEHTLALENPYNEEDSLAC 783
      :.*****: **:* :***** :
      :.*****: **:* :***** :
  
```

APÊNDICE VI

Comparação da região 5' dos genes CDC16 e APC11_2 em Arabidopsis, poplar e arroz. Sequências adicionais estão destacadas em amarelo.

CDC16

PtCDC16	-----	
AtCDC16	-----	
OsCDC16	MPLSAASINRASYQVLLLLAAAAVSTTGGDGNTAPGNATATATTGGDDTEMYICYLCTGR	60
PtCDC16	-----	
AtCDC16	-----	
OsCDC16	NPILIRRCPIYWDYCHLNCFDAPSTAAAADDVAAVPVASPAAPARRVGGVPRETLEDEE	120
PtCDC16	-----	
AtCDC16	-----	
OsCDC16	CYVMKLYENGSYVIVTTLGCSQTASCLLSCGGDLAADGEEALAAAHAPAGAVGVSPPWRM	180
PtCDC16	-----MREEQIEKLRGVVRDCVSKHLY	22
AtCDC16	-----MREEEIEKIRGVVRDCVSKHLY	22
OsCDC16	WDTKFGFPPAAPPTAAAAQKNPKRRREAEAEGEVAAE MREEEAVERLRGVVRDSVGKHL	240
	**** *:*:*****.*.****	
PtCDC16	SSAIFFADKVAAFNDPADIYMQAQALFLGRHYRRAYHLLNASKIVLRDLRFRYLAACKL	82
AtCDC16	SSAIFFADKVAALTNPSDIYMQAQALFLGRHYRRAFHLLNASKIVLRDLRFRYLAACKL	82
OsCDC16	ASAIFLADKVAATGDPADVMLAQALFLGRHFRALHILNSSK-LLRDLRFRFLAAKCL	299
	:****:***** *.**:*:* *****:*** *:***:*** :*****:*****	
PtCDC16	EELKEWDQCLLMLGDAKVDEHGDVYDTKDCNVMYLDKDSEDREINISAAATCFLRGRAYEA	142
AtCDC16	EELKEWDQCLLMLGDAKVDDGIVYDAKDGNDVDFDKDGEDREINISSAICFLRGKAYGA	142
OsCDC16	EELKEWHQCLIIIGDAKIDEHGNVVDQDDGSDIYFDKDAEDHEINIKAAICFLRGKAYEA	359
	*****.***:*:*****:*:* * * * . : :***.*:*****.* *****:** *	
PtCDC16	LENRALARQWYKAAIKADPLCYEAELECLIENHMLTCEEETRLSSSLQFGPEDGWLSSFY	202
AtCDC16	LQNRSQARQWYKAAIKADPLCYEAELECLIESHMLTSEEESSLLSSLQFSPEDGWLSSFY	202
OsCDC16	LDNCDLARQWYKAAVKADPLCYEAELECLVDNYMLTCEEESELSSSLKFGKEDGWLSAFY	419
	: *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
PtCDC16	CLIKKYEKKSVEAKFREVEKESCNPNPSSPSIKHTLKNNDTLLTCKAEYFNQCGEYQKC	262
AtCDC16	CLIKKYDKESTVELKFKLENETSGS--VSGSSMITLANNTDLLACKAEYHQCEYQKC	260
OsCDC16	CLIRKHEKEYIVEAKFKFERESCII--SSLSSGLTLKNNIDVLACKAEYHQSGEYQKC	477
	:*:*:* * * **:*:*:*.. * * * * * :*:**:*. *****	
PtCDC16	FELTSSESELYLLFHSLEKDPFHLKCTLVHIAAAMELGNSENELYLMASNLVKDYQPQKAL	322
AtCDC16	FELTA-----ALLEKDPFHLKCTLVHIAAAMELGNSENELYLMACNLVKDYPSKAL	310
OsCDC16	FELTS-----ALLERDPFHLKCTLVHIAAAMELGHSDNDLYILACNLVKDYQPQKAL	527
	:*: **:*****:*****:*****:*****:*****.* **	
PtCDC16	SWFAVGCYCYCIKKYDQSRRYFSKATSLEGTFPAPAWIGFGNAYAAQEEDQAMSAYRTAA	382
AtCDC16	SWFAVGCYCYCIKKYAEARRYFSKATGIDGSFSPARIGYGNFAAQEEDQAMSAYRTAA	370
OsCDC16	SWFAVGCYCYCIKKYDQARRYFGKATGLDGTFPAPAWIGTGIAYAAQEEDQAMAAFRATA	587
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
PtCDC16	RLFPGCHLPTLYIGMEYMRTHSYKLAEQFFMQAKAICPSDPLVYNELGVVAYNMKEYNKS	442
AtCDC16	RLFPGCHLPTLYIGMEYMRTHSYKLADQFFMQAKAICPSDPLVYNELGVVAYHMKEYGKA	430
OsCDC16	RLFPGCHLPTLYMGMQYLRMHNFKLAEQFFTQAKSICPSDPLIYNEMGVVAYNMKEYQKA	647
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***** *	
PtCDC16	VLWFEEKTLKHIP-SLSQLWEPTIVNLAHAYRKLKIYHEAISYERALTLSRSLSTYAGL	501
AtCDC16	VRWFEEKTLAHIPTALTESWEPTVNLAHAYRKLKRDREAISSYERALTLSKSLSTYSGL	490
OsCDC16	VQWFELTLEHTSSSLNEMWEPTLVNLGHALRKLKQKAISSYEEKALTFTKSLSAFAGL	707
	* * * * * . :*: *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
PtCDC16	AYTYHLQ-----ALWLKPDQFCTEMLSLALVDEGRRGTDPKIEFR	542
AtCDC16	AYTYHLQGNFSAAISYYHKALWLKPDQFCTEMLNVALMDECQNGVDSKVELC	543
OsCDC16	AYTYHMDKFEAAITYYHKALWLKPDQFSTDMLTALALESSCQITARTR----	756
	***** *****.*:**:* * . : . . :	

APC11

```

AtAPC11      -----MKVKILRWHAVASWTWDAQDETCGICRMA 29
PtAPC11      -----MKVKLLQWHAVASWTWDAQDETCGICRMA 29
OsAPC11_1    -----MKVKILQWHSVASWTWDAQDETCGICRMA 29
OsAPC11_2    MQVGGTAAAAAEVSMYSYRETRREEEKRRGTMKVKILQWHGVASWTWNAQDETCGICRMA 60
                ****:*:* . *****:*****

AtAPC11      FDGCCPDCKLPGDDCPLIWGACNHAFHLHCILKWVNSQTSQAHCPMCRREWQFKE 84
PtAPC11      FDGCCPDCKLPGDDCPLIWGACNHAFHLHCILKWVNSQTSQAHCPMCRREWQFKE 84
OsAPC11_1    FDGCCPDCKFPGDDCPLIWGACNHAFHLHCILKWVNSQTSPLCPMCRREWQFKG 84
OsAPC11_2    FDGCCPDCKFPGDDCPLIWGACNHAFHLHCILKWVNSQTSPLCPMCRREWQFKG 115
                *****:*****:*****:***** . *****

```


APÊNDICE VIII

Correção das seqüências dos ativadores do APC. Destaques em cinza são os motivos conservados de interação com o APC (CSM, C-box, IR-tail e CBM). Diferenças estão destacadas em amarelo.

Antes do suporte do EST: Ativadores CDC20 e CCS52

```

OsCDC20_2 -----MDA-GSHSISSEKSSRYVAPRQP---LQEAGSR-PYMPSLSTASRNPSA- 44
OsCDC20_3 -----MDA-GSHSISSEKS-HGLAPRPP---LQEAGSR-PYMPSLSTASRNPSA- 43
OsCDC20_1 -----MEAPGSGSVPTAKR-RRLVPRPPPVPLEVAGARGPYMPPLCIKSKNPSA- 48
PtCDC20_4 -----
AtCDC20_3 -----MDSGMRATCTVPEHFLPRKLS- 21
AtCDC20_4 -----MDS---DTCTVPDHFLPRKLS- 18
AtCDC20_5 -----
AtCDC20_6 -----MMK- 3
AtCDC20_1 -----MDAGLN-----RCPLQEHFLPRKNS- 20
AtCDC20_2 -----MDAGMNTSSHYKTQARCPLEHFLPRKPS- 30
PtCDC20_1 -----MDAGINSSSSLKAQSRFPLQQQFLPRMNS- 30
PtCDC20_3 -----MDAGSMNTSSSLKAQSRFPLQQQFLPRTNS- 30
PtCDC20_2 -----MDAGSLNSSSYMKAQSRFPLQEQFLHRKNS- 30
PtCDC20_5 -----
AtCCS52A1 ---MEEEDPTASNVITNSNSSMRNLS PAMNTPVVSLESR----INRLINANQSQSPSP- 52
AtCCS52A2 ---MEEDESTTP---KKKSDSQLNLPSPMNRPTVSLESR----INRLIDSNHYHSPS-- 47
PtCCS52A1 -----PSPSSSEH----VNRLINSNHYISPS-- 22
PtCCS52A1_2 -----TPSPSSSKH----VNRLINSNHYISPS-- 23
OsCCS52A1 MDHHHHHLLPPPPRSPMENSASSKPPTPASTPSSRLAAP----SSRVSSAAPHSPSSS 56
PtCCS52B ---MDSTPRRKSG---LNLPSGMNETSLRLETFSSSSSFRAVTCVSSPRAISSLSPSKT 54
PtCCS52B_2 ---MDSTPRRKSG---LNLPSGMNETSLRLETFSSSSSFRAVTCVSSPRAISSLSPSKT 54
AtCCS52B ---MASPQSTKTG---LNLPAQMNTSLRLETFSSS-----FRGISSLSPSK- 42
OsCCS52B ---MATDASPKPAPRLNVPVAMAG-GLRLDPVAVSP-----ARLLLDVPKTPSPSK- 48

OsCDC20_2 -----KCYGDRFIPDRSAMDMMAHYLLTE-----PRKDKEN-AAA 79
OsCDC20_3 -----KCYGDRFIPDRSAMDMMAHYLLTE-----PKKDKEN-AAA 78
OsCDC20_1 -----KCYGDRFIPDRSAMDMMAHYLLTE-----PKKEKENTDML 84
PtCDC20_4 -----LDRFIPNRSAMDMDFAHYMLTE-----GRKAKES---- 29
AtCDC20_3 -----KQNLDRFIPNRSAKDFDFANYALTQ-----GSKRN-LDEV 56
AtCDC20_4 -----KQNLDRFIPNRSAMDMDFANYALTQ-----GRKRN-VDEIT 53
AtCDC20_5 -----MDFDFANYALTQ-----GRKRN-VDEVT 22
AtCDC20_6 -----SIALALCLTHHSPMVLSIVDYGDSQ-----EKTIDSLWKKP 39
AtCDC20_1 -----KENLDRFIPNRSAMNFDYAHFALTEERK-----G-KDQS-ATVS 57
AtCDC20_2 -----KENLDRFIPNRSAMNFDYAHFALTEGRK-----G-KDQT-AAVS 67
PtCDC20_1 -----KENLDRFIPNRSAMDMYAHFMLTEGRK-----G-KENP--TVN 66
PtCDC20_3 -----KENLDRFIPNRSAMDMYARFMLTEGRK-----G-KENP--TVN 66
PtCDC20_2 -----KDNLDRFIPNRSAMDLDYAHYMLTQGRK-----GGKENPTATVN 69
PtCDC20_5 -----
AtCCS52A1 ---SSLRSIYSDRFIPSRSGSNFALFDLSPSPS-----KDGKEDGAGSYA 95
AtCCS52A2 -----KPIYSDRFIPSRSGSNFALFDLASSSPNK-----KDGKEDGAGSYA 88
PtCCS52A1 -----RPIYSDRFIPCRSSSNFALFNISLPSPSATAGSSPG-----DGGKEDNPAY 70
PtCCS52A1_2 -----RPIYSDRFIPCRSSSNFALFNISFPQPSATAGISPG-----CGGKEDNPSAYA 71
OsCCS52A1 APTPASRTVYSDRFIPSRAGSNLALFDLAPSPSHHDAAAAASPGAPPPSGSTPASSPYC 116
PtCCS52B -----SSCSDRFIPCRSSSRLHTFGLVEKG-----SPVKEGGNEAYA 91
PtCCS52B_2 -----SSCSDRFIPCRSSSRLQTFGLIEKG-----SPVKEGGNEAYA 91
AtCCS52B -----STCSDRFIPCRSSSRLHAFDLQDKEPT-----TPVKEGGNEAYS 81
OsCCS52B -----TTYSDRFIPCRSSSRLHNFALDRDRA-----SPSSTTDAPYS 87

```


OsCDC20_2 SPAKEAYR-----KLLAEKILNNRT-----RILSFRNKPPPEPESILTE-L 118
 OsCDC20_3 SPSKEVYR-----RLLAEKLLNNRT-----RILAFRNKPPPEPENVS---A 115
 OsCDC20_1 SPAAEAYK-----RLLAEKLLNNRS-----RILAFRNKPPPEPEGIVQQLL 124
 PtCDC20_4 PPSQSLYQ-----KLLAEAFNMNGR-----RILAFKNKPPPTLVDPPIP--L 67
 AtCDC20_3 SASRKAY-----MTQLAVVMNQNR-----RILAFRNKPKS----LLSTN 92
 AtCDC20_4 SASRKAY-----MTQLAVVMNQNR-----RILAFRNKPKA----LLSSN 89
 AtCDC20_5 SASRKAY-----MTQLAEAMNQNR-----RILAFRNKPKA----LLSSN 58
 AtCDC20_6 HGSDLTWSG---FSRVGVTEAYFAV-----PVDHFLTNPSS----LRLS- 76
 AtCDC20_1 SPSKEAYR-----KQLAETMNLNHT-----RILAFRNKPPQAPVELLPSNH 97
 AtCDC20_2 SPSKEAYR-----KQLAETMNLNHT-----RILAFRNKPPQAPVELLPSNH 107
 PtCDC20_1 SPSREAYR-----KQLAESLNMNR-----RILAFKNKPPAPVELMPQDH 106
 PtCDC20_3 SPSREAYR-----KQLADSLNMNR-----RILAFKNKPPAPVELMPQDH 106
 PtCDC20_2 SPSREAYR-----KQLAEALNLRN-----RILAFKNKPPPTPVELIPRDH 109
 PtCDC20_5 -----
 AtCCS52A1 TLLRAAMFGPETPEKRDIT-GFSSS-----RNIFRFKTEETH--RSLN--SF 136
 AtCCS52A2 SLLKTALFGPVTPEKSDVVGNGFSPS-----GNIFRFKTEQ--RSLN--LY 130
 PtCCS52A1 ALLRNALFGPQTPDKKDWGTGAAG-----RNIFRYKTETR--QSMH--SL 111
 PtCCS52A1_2 ALLRNALFGPQTPDKKDWGAGAAG-----QNIFRYKMETR--QSLH--SL 112
 OsCCS52A1 ALLRAALFGPTTPDRVASASACSSSSSAGASPVGSPATGNIFRFKAEVP--RNAKRALF 174
 PtCCS52B RLLKSELFGSDFGS-FSSPAGGQGLSS-----PNKNMLRFKTDHS--GPNSPFSP 139
 PtCCS52B_2 RLLKSELFGSDFGS-FSSPAGGQGLGS-----PSKNMLRFKTDHS--GPNSPYSP 139
 AtCCS52B RLLKSELFGSDFASPLSPAGGQGSASSP-----MSPCTNMLRFKTDRSNNSPSPFSP 135
 OsCCS52B RLLRAEIFGPDSPS----PAPSS-----PNTNLFREFKTDHP--SPKSPFAA 127

OsCDC20_2 RA-----DAASIQAKPAKQRRYIPQSAERT----- 143
 OsCDC20_3 AD-----TASTHQAKPAKQRRYIPQSAERT----- 140
 OsCDC20_1 YE-----TLTSSQTKPARKCRHIPQSSERT----- 149
 PtCDC20_4 FS-----SSSVHSSKPVKQRRHIPQRPEMT----- 92
 AtCDC20_3 HS-----DSPHQNPVKVPRRYIPQNSERV----- 117
 AtCDC20_4 HS-----DSPHQNPVKVPRRYIPQNSERV----- 114
 AtCDC20_5 HS-----DPPHQQPI SVKPRRYIPQNSERV----- 83
 AtCDC20_6 QT-----YCRRGSSSYVETEKVEEEDRDDF----- 101
 AtCDC20_1 S-----ASLHQQPKSVKPRRYIPQTSERT----- 121
 AtCDC20_2 S-----ASLHQQPKSVKPRRYIPQTSERT----- 131
 PtCDC20_1 SHHHHQPKTAKPRRHIPQTSERT----- 129
 PtCDC20_3 SHHHHQPKTAKPRRHIPQTSERT----- 129
 PtCDC20_2 LS-----SSLHYQAKPTKPRRYIPQTSERT----- 134
 PtCDC20_5 -----
 AtCCS52A1 SPFGVD---DDSPGVSHSGPVKAPRKVPRSPYKV----- 167
 AtCCS52A2 PPFDS---VVS-GVSPS-PVKSPRKLLRSPYKV----- 159
 PtCCS52A1 SPFGFD---GLSGPGVSNVAIKAPRKVSRSPYKV----- 142
 PtCCS52A1_2 SPFGFD---DMSDLGVSNVAIKTPRKVSRSPYKV**GVLVNWCHILTLFLRFDEIWIWIFIGIF** 168
 OsCCS52A1 SDGDDE---GVLFFGVFTTRGTGPRKIPRSPYKV----- 205
 PtCCS52B SILGHD---SGISSESSTPPKPRKVPKTPHKV----- 169
 PtCCS52B_2 SILGHD---SGISSESSTTPKPRKVPKTPHKV----- 169
 AtCCS52B SILGND---NGHSSDSSPPKPRKVPKTPHKV----- 165
 OsCCS52B SAAATAGHYDCTAGSAESSTPRKPRKVPKTPHKV----- 162

OsCDC20_2 -----LDAPELVDDYYLNLDDWGSNNVLSIALGNSVYLWDATNSSTSELVTVDE 192
 OsCDC20_3 -----LDAPDLVDDYYLNLDDWGSKNVLSIALGDTVYLWDASSGSTSELVTVDE 189
 OsCDC20_1 -----LDAPGIVDDFYLNILDWGCKNVMSIALGNTLYLWNSADGSIMDLVTIDE 198
 PtCDC20_4 -----LDAPDIVDDFYLNLLDWNVLAIALGTVYLWNASNSSISEVVTVDE 141
 AtCDC20_3 -----LDAPGLRDDFYLNLLDWSANVLAIALGDTVYLWDASSGSTSELVTIDE 166
 AtCDC20_4 -----LDAPGLMDDFYLNLLDWSANVLAIALGDTVYLWDASSGSTSELVTIDE 163
 AtCDC20_5 -----LDAPGIADDFYLNLLDWSNNVLAIALGDTVYLWDASSGSTYKLVTVIDE 132
 AtCDC20_6 -----LKQVWFLTDNLVFFVVDIEEYIVIEQLGDTVYLWDASSCYTSKLVTVIDE 150
 AtCDC20_1 -----LDAPDIVDDFYLNLLDWSANVLAIALDHTVYLWDASTGSTSELVTIDE 170
 AtCDC20_2 -----LDAPDIVDDFYLNLLDWSANVLAIALDHTVYLWDASTGSTSELVTIDE 180
 PtCDC20_1 -----LDAPDLVDDFYLNLLDWSNNVLAIALGSTVYLWDASDGSTSELVTVDD 178
 PtCDC20_3 -----LDAPDLVDDFYLNLLDWSNNVLAIALGSTVYLWDASDGSTSELVTVDD 178
 PtCDC20_2 -----LDAPDLVDDFYLNLLDWSKNVLAIALENTVYLWDASNGSTSELVTVGD 183
 PtCDC20_5 -----
 AtCCS52A1 -----LDAPALQDDFYLNLDVWSAQNVLAVGLGNCVYLWNACSSKVTKLCDLGA 216
 AtCCS52A2 -----LDAPALQDDFYLNLDVWSAQNVLAVGLGNCVYLWNACSSKVTKLCDLGV 208
 PtCCS52A1 -----LDAPALHDDFYLNLDVWSAHNVLAVGLGTCVYLWNACSSKVTKLCDLGN 191
 PtCCS52A1_2 **LLIDPAFCFYV**LDAPALQDDFYLNLDVWSAHNVLAVGLGNCVYLWNACSSKVTKLCDLGN 228
 OsCCS52A1 -----LDAPALQDDFYLNLDVWSAHNIALVGLGNCVYLWNACSSKVTKLCDLGV 254
 PtCCS52B -----LDAPSLQDDFYLNLDVWSQNVLAVGLGTCVYLWLTASNSKVTRLCDLGP 218
 PtCCS52B_2 -----LDAPSLQDDFYLNLDVWSQNVLAVGLGTCVYLWLTASNSKVTRLCDLGP 218
 AtCCS52B -----LDAPSLQDDFYLNLDVWSQNVLAVGLGTCVYLWLTASNSKVTKLCDLGP 214
 OsCCS52B -----LDAPSLQDDFYLNLDVWSQNTLAVGLGNCVYLWASNCKVTKLCDLGP 211

OsCDC20_2 DNGPVTSSVSWAPDGRHIAVGLNNSDDVQLWDTSSNRLRLTRMGVHDSRVGSLAWNNNHLTT 252
OsCDC20_3 DSGPITSVSWAPDGQHVAVGLNNSDIQLWDTSSNRLRLTRLGVHESRVGSLAWNNNHLTT 249
OsCDC20_1 DDGPITSVSWSCDGQWIAVGLNNSDIQLWDTSSNRLRLTLHGQVHQS RVGSLAWNNHLTT 258
PtCDC20_4 EDGFPVTSISWAPDGRHLAVGLDNSNVQLWDSATNQMLRTRLGGHRLRVTSLAWNNHLLTT 201
AtCDC20_3 DKGFPVTSINWTQDGLDLAVGLDNEVQLWDCVSNRQVRTLGGHESRVGSLAWDNHHLTT 226
AtCDC20_4 DKGFPVTSINWTQDGLDLAVGLDNEVQLWDFVSNRQVRTLIGGHEESRVGSLAWNNHLTT 223
AtCDC20_5 EEGFPVTSINWTQDGLDLAIGLDNNEVQLWDCVSNRQVRTLGGHESRVGSLAWNNHLTT 192
AtCDC20_6 ENGFPVTSINWTQDGLDLAVGLDNEVQVWDCVSNRHVRTLRGGHESRVGSLAWNNHLTT 210
AtCDC20_1 EKGFVTSINWAPDGRHVAVGLNNEVQLWDSASNRQLRRLTKGGHQS RVGSLAWNNHLTT 230
AtCDC20_2 EKGFVTSINWAPDGRHVAVGLNNEVQLWDSASNRQLRRLTKGGHQS RVGSLAWNNHLTT 240
PtCDC20_1 EDGPITSVNWAPDGRHIAIGLNNSHIQLWDSASNRQLRRLTKGGHRSRVGSLAWNNHLTT 238
PtCDC20_3 EDGPVTSVNWAPDGRHIAIGLNNSHIQLWDSASNRQLRRLTKGGHRSRVGSMANNHLTT 238
PtCDC20_2 EVGFPVTSVNWAPDGLHLAIGLNNNSVQLWDSASCKQLRNLRGCHRSRVGSMANNHLTT 243
PtCDC20_5 -----
AtCCS52A1 EDS-VCSVGWALRGTHLAVGTSTGKVQIWDASRCKRTRTMEG-HRLRVGALAWGSSVLS 274
AtCCS52A2 DET-VCSVGWALRGTHLAIIGTSSGTQVQIWDVLRCKNIRTMEG-HRLRVGALAWSSVLS 266
PtCCS52A1 DDG-VCSVGWAHRGTHLAVGTSNGKVQIWDASRCKRIRIMEG-HRLRVGALAWSSMLLS 249
PtCCS52A1_2 DDG-VCSVGWAHRGTHLAIIGTSGNKVQIWDASRCKRIRIMEG-HRLRVGALAWSSMLLS 286
OsCCS52A1 DDN-VCSVGWAQRGTHLAVGTNQKVQVWDATRCKRIRITMES-HRMRVGALAWNSLLLS 312
PtCCS52B NDS-VCSVQWTRREGSYISIGTHLQVQVWDGTQCKRVRTMGG-HQTRTGVLANNSRRLAS 276
PtCCS52B_2 NDS-VCSLQWTRREGSYISIGTHLQVQVWDGTQCKRVRTMGG-HQTRTSVLAWNSRRLAS 276
AtCCS52B NDS-VCSVQWTRREGSYISIGTSHGQVQVWDGTQCKRVRTMGG-HQTRTGVLANNSRILSS 272
OsCCS52B RDS-VCAVHWTRREGSYLAIGTSLGDVQIWDSSRCKRIRINMGG-HQTRTGVLANSSRILSS 269

OsCDC20_2 GGMDGKIVNNDVIRIRNHVVQTYQGHQEQVCGLKWSGSGQQLASGGNDNLLHIWD-VSMAS 311
OsCDC20_3 GGMDGNIVNNDVIRIRNHVVQTYQGHQEQVCGLKWSGSGQQLASGGNDNLLHIWD-VSMAS 308
OsCDC20_1 GGMDGNIVNNDVIRIRNHVVQTYQGHQEQVCGLRWSGSGQQLASGGNDNLLHIWD-VSMAS 317
PtCDC20_4 GGKDAKIVNNDVIRIRIHVESYEGHRQEVCGLKWSASGQQLASGGNDNLLFIWD-RFMS 260
AtCDC20_3 GGMDGKIVNNDVIRIRSSIVETYLGHTEEVCGLKWSESGNKQASGGNDNVVHIWD-RSLAS 285
AtCDC20_4 GGMDGKIVNNDVIRIRSSIVETYLGHTEEVCGLKWSESGKKLASGGNYNVVHIWDHRSVAS 283
AtCDC20_5 GGMDGKIVNNDVIRIRSSIVETYLGHTEEVCGLKWSESGKKLASGGNDNVVHIWDHRSVAS 252
AtCDC20_6 GGMDGKIVNNDVIRIRSSIGTYVGHTEEVCGLKWSESGKKLASGGNDNVVHIWD-RSLAS 269
AtCDC20_1 GGMDGLIINNDVIRIRSPIVETYRGTQEVCGLKWSGSGQQLASGGNDNVVHIWD-RSVAS 289
AtCDC20_2 GGMDGLIINNDVIRIRSPIVETYRGTQEVCGLKWSGSGQQLASGGNDNVVHIWD-RSVAS 299
PtCDC20_1 GGMDGQIINNDVIRIRSHIVETYRGTQEVCGLKWSASGQQLASGGNDNLLHIWD-RSTAL 297
PtCDC20_3 GGMDGQIINNDVIRIRSHIVETYRGTQEVCGLKWSASGQQLASGGNDNLLHIWD-RSTAL 297
PtCDC20_2 GGMDGKIINNDVIRIRSHIVETYRGTQEVCGLKWSASGQQLASGGNDNLLHIWD-RSVAS 302
PtCDC20_5 -----
AtCCS52A1 GSRDKSILQRDIRQEDHVSKLAGHKSEVCGLKWSYDNRELASGGNDNRLFVWN---QHS 331
AtCCS52A2 GSRDKSILQRDIRQEDHVSKLKGKSEICGLKWSYDNRELASGGNDNRLFVWN---QHS 323
PtCCS52A1 GSRDKSILQRDIRAQEDFVSKLSGHKSEVCGLKWSYDNRELASGGNDNRLFVWN---QHS 306
PtCCS52A1_2 GSRDKSILQRDIRAREDFVSKLSGHKSEVCGLKWSYDNRELASGGNDNRLFVWN---QHS 343
OsCCS52A1 GSRDKSILHHDIRAQDDYISRLAGHKSEVCGLKWSYDNRELASGGNDNRLFVWN---QHS 369
PtCCS52B GSRDRHILQHDLRISDYSVKLIGHKSEVCGLKWSHDDRELASGGNDNQLLVWN---QHS 333
PtCCS52B_2 GSRDRNILQHDLRVSSDHSVSKLIGHKSEVCGLKWSHDDRELASGGNDNQLLVWN---QHS 333
AtCCS52B GSRDRNILQHDIRVQSDFVSKLVGHKSEVCGLKWSHDDRELASGGNDNQLLVWN---NHS 329
OsCCS52B GSRDKNILQHDIRVPSDYISKFSGHRSEVCGLKWSHDDRELASGGNDNQLLVWN---QRS 326

OsCDC20_2 SMPSAGRTQWLHRLLEDHLAAVKALAWCPFQSNLLASGGGSDRICKFWNTHGTACLSID 371
OsCDC20_3 SVPSAGRNQWLHRLLEDHTAAVKALAWCPFQSNLLATGGGSDRICKFWNTHGTACLSVD 368
OsCDC20_1 SNLSLGHNRWLHRFRGDHLAAVKALAWCPFQSNLLASGGGGDDRICKFWNTHGTGLCLNSVD 377
PtCDC20_4 SNSPR---HWLHKLEDHTAAVKALAWCPFQSNLLASGGGGDRHICKFWNTQTGTCLNSVD 317
AtCDC20_3 SKQTR---QWLHRFEEHTAAVRALAWCPFQASLLATGGGVGDGKIKFWNTHGTACLSVE 342
AtCDC20_4 SKPTR---QWLHRFEEHTAAVRALAWCPFQATLLATGGGVGDGKIKFWNTHGTACLSVE 340
AtCDC20_5 SNPTR---QWLHRFEEHTAAVRALAWCPFQASLLATGGGVGDGKIKFWNTHGTACLSVE 309
AtCDC20_6 SNPTR---QWLHRFEEHTAAVRALAWCPFQASLLATGGGVGDGKIFWNTHGTACLSVE 326
AtCDC20_1 SNSTT---QWLHRLEEHTSAVKALAWCPFQANLLATGGGGDRTIKFWNTHGTACLSVD 346
AtCDC20_2 SNSTT---QWLHRLEEHTSAVKALAWCPFQANLLATGGGGDRTIKFWNTHGTACLSVD 356
PtCDC20_1 SNSAT---QWLHRLEDHTSAVKALAWCPFQGNLLASGGGGDKSICKFWNTHGTACLSID 354
PtCDC20_3 SNSAT---QWLHRLEDHTSAVKALAWCPFQGNLLASGGGGDKSICKFWNTHGTACLSID 354
PtCDC20_2 SNSAT---QWFHRLLEEHTSAVKALAWCPFQGNLLASGGGGDRSICKFWNTHGTACLSID 359
PtCDC20_5 -----HTSAVKALAWCPFQGNLLASGGGGDRSICKFWNTHGTACLSID 44
AtCCS52A1 TQP-----VLKYSEHTAAVKAIAWSPHVHGLLASGGGTADRCIRFWNTTNTNHLNSID 384
AtCCS52A2 TQP-----VLRFCHEAAVKAIAWSPHHFGLLASGGGTADRCIRFWNTTNTNHLNCVD 376
PtCCS52A1 TQP-----VLKYCEHTAAVKAIAWSPHLHGLLASGGGTADRCIRFWNTTNTNHLNSID 359
PtCCS52A1_2 SQP-----VLKYCDHTAAVKAIAWSPHLHGLLASGGGTADRCIRFWNTTNTNHLNSID 396
OsCCS52A1 AHP-----VLKYTEHTAAVKAIAWSPHLHGLLASGGGTADRCIRFWNTTNTNHLNSVD 422
PtCCS52B QLP-----ILKLTEHTAAVKAIAWSPHQSGLLASGGGTADRCIRFWNTTNGHQLNYVD 386
PtCCS52B_2 QLP-----VLTLEHTAAVKAIAWSPHQSGLLASGGGTADRCIRFWNTTNGHQLNHVD 386
AtCCS52B QQP-----ILKLTEHTAAVKAIAWSPHQSLLASGGGTADRCIRFWNTTNGNQLNSID 382
OsCCS52B QQP-----ILRLEHTAAVKAIAWSPHQQGLLASGGGTADRCIRFWNTVNGNMLNSVD 379

* :*:*:*:*. * ***:** * *.**** .. * .:

```

OsCDC20_2 TGSQVCSLVWNKNERELLSHGFAQNQLTLWKYPSMVKMAELTGHTSRVLFTAQVIFCSI 431
OsCDC20_3 TGSQVCALLWNKNERELLSHGFTQNQLTLWKYPSMVKMAELTGHTSRVLFMAQ----- 422
OsCDC20_1 TGS-----QNSLALWKYPSMVKLAELEDHTARVLCIAQ----- 410
PtCDC20_4 TGSQVCALQWNKHERELLSHGFTENQLILWKYPSMVKMAELSGHTSPVLFMTQ----- 371
AtCDC20_3 TGSQVCSLLWSQSERELLSHGFTQNQLTLWKYPSMSKMAELNGHTSRVLFMAQ----- 396
AtCDC20_4 TGSQVCSLLWSQSERELLSHGFTQNQLTLWKYPSMSKMAELNGHTSRVLFMAQ----- 394
AtCDC20_5 TGSQVCSLLWSKSERELLSHGFTQNQLTLWKYPSMVKMAELNGHTSRVLFMAQ----- 363
AtCDC20_6 TGSQVCSLLWSKSERELLSHGFTQNQLTLWKYPSMVKMAELNGHTSRVLFMAQ----- 380
AtCDC20_1 TGSQVCSLLWSKNERELLSHGFTQNQLTLWKYPSMVKMAELTGHTSRVLYMAQ----- 400
AtCDC20_2 TGSQVCSLLWSKNERELLSHGFTQNQLTLWKYPSMVKMAELTGHTSRVLYMAQ----- 410
PtCDC20_1 TGSQVCSLLWNKNERELLSHGFTQNQLTVWKYPSMVKMAELTGHTSRVLYMAQ----- 408
PtCDC20_3 TGSQVCSLLWNKNERELLSHGFTQNQLTVWKYPSMVKMAELTGHTSRVLYMAQ----- 408
PtCDC20_2 TGSQVCALLWNKNERELLSHGFTQNQLVLWKYPSMLKMAELTGHTSRVLYMAQ----- 413
PtCDC20_5 TGSQVCALLWNKNERELLSHGFTQNQLVLWKYPSMLKMAELTGHTSRVLYMAQ----- 98
AtCCS52A1 TCSQVCNLAWSKNVNELVSTHGYSQNQIIVWKYPTMSKIATLTGHTYRVLYLAV----- 438
AtCCS52A2 TNSQVCNLVWSKNVNELVSTHGYSQNQIIVWKYPTMSKLATLTGHSYRVLYLAV----- 430
PtCCS52A1 TGSQVCNLVWSKNVNELVSTHGYSQNQIIVWRYPTMSKLATLTGHTYRVLYLAI----- 413
PtCCS52A1_2 TGSQVCNLVWSKNVNELVSTHGYSQNQIILWRYPTMSKLATLTGHTFRVLYLAI----- 450
OsCCS52A1 TGSQVCNLVWSKNVNELVSTHGYSQNQIIVWRYPTMSKLATLTGHTYRVLYLAI----- 476
PtCCS52B TGSQVCNLAWSKNVNELVSTHGYSQNQIMVWKYPSLSKVATLVGHSLRVLYLAM----- 440
PtCCS52B_2 TGSQVCNLAWSKNVNELVSTHGYSQNQIMVWKYPSLSKVATLVGHSMRVLYLAM----- 440
AtCCS52B TGSQVCNLAWSKNVNEIVSTHGYSQNQIMLWKYPSMSKVATLTGHSMRVLYLAT----- 436
OsCCS52B TGSQVCNLAWSKNVNELVSTHGYSQNQIMVWKYPSMSKVATLTGHTLRVLYLAM----- 433
* * * * * : * . : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :

```

```

OsCDC20_2 YLPFKLTNIALNRLLITCLVVIQSPDGLTVASAAADETLRFWNVFG-APEAPKTATK-- 488
OsCDC20_3 -----SPDGCTVASAAADETLRFWNVFG-SPEAPKPAAK-- 455
OsCDC20_1 -----SPDGFTVASVAADETLRLWKIFE-TSEDAKPVFKTF 445
PtCDC20_4 -----SPDGYTVASAAGDETLRFWNVFG-NPKAAK----- 400
AtCDC20_3 -----SPNGCTVASAAGDENLRLWNVFGEPPKTTKKAAS-- 430
AtCDC20_4 -----SPNGCTVASAAGDENLRLWNVFGEPPKTTKKAAS-- 428
AtCDC20_5 -----SPDGCTVASAAGDETLRLWNVFGEPPKTTKKAAS-- 397
AtCDC20_6 -----SPDGCTVASAAGDETLRLWNVFGEPPKTTKKAAS-- 414
AtCDC20_1 -----SPDGCTVASAAGDETLRFWNVFG-VPETAKKAAP-- 433
AtCDC20_2 -----SPDGCTVASAAGDETLRFWNVFG-VPETAKKAAP-- 443
PtCDC20_1 -----SPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG-VPEVAAKAAP-- 441
PtCDC20_3 -----SPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG-VPEIAAKAAP-- 441
PtCDC20_2 -----SPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG-VPEVAK----- 442
PtCDC20_5 -----SPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG----- 120
AtCCS52A1 -----SPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SPKSQNTD---- 469
AtCCS52A2 -----SPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SPKSQSRE---- 461
PtCCS52A1 -----SPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SPKSQNTD---- 444
PtCCS52A1_2 -----SPDGQTIIVTGAGDETLRFWSVFP-SPKSQNTD---- 481
OsCCS52A1 -----SPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SPKSQSSDSL-- 509
PtCCS52B -----SPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SMKTQTPV--- 471
PtCCS52B_2 -----SPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SMKTQTPV--- 471
AtCCS52B -----SPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SVKMQTPV--- 467
OsCCS52B -----SPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SMKTQAPV--- 464
* * * * * : * . : * * * * * : * * * * * : * * * * * :

```

```

OsCDC20_2 -----GSHTGMFNNSNHIHR----- 504
OsCDC20_3 -----ASHTGMFNNSFNHLR----- 469
OsCDC20_1 VLVFQDNVRVGPWGTDCSYFQDLIALVVTMVTGSQKL----- 482
PtCDC20_4 -----
AtCDC20_3 -----KKYPELFSHVNSLR----- 444
AtCDC20_4 -----KNYLELFSHVNSLRWCLVSFASGIDVLGKSNIHNSCD 466
AtCDC20_5 -----KKYTDPFHAVNHIR----- 411
AtCDC20_6 -----KKYTEPFHAVNHIR----- 428
AtCDC20_1 -----KVAEPPFSHVNRIR----- 447
AtCDC20_2 -----KAVSEPPFSHVNRIR----- 457
PtCDC20_1 -----KANPEPFSHLNRLR----- 455
PtCDC20_3 -----KANPEPFSHLNRLR----- 455
PtCDC20_2 -----
PtCDC20_5 -----
AtCCS52A1 -----SEIGSSFFGRRTIR----- 483
AtCCS52A2 -----SEIGALSFGRRTIR----- 475
PtCCS52A1 -----SEIGASSLGRRTIR----- 458
PtCCS52A1_2 -----SEIGASSLGRRTIR----- 495
OsCCS52A1 -----SSIGATSFVRSYIR----- 523
PtCCS52B -----KDTGLWSLGRTOIR----- 485
PtCCS52B_2 -----KDTGLWSLGRTOIR----- 485
AtCCS52B -----KDTGLWSLGRTOIR----- 481
OsCCS52B -----RDIGLWSFSRSHIR----- 478

```

Após o suporte do EST: Ativadores CDC20 e CCS52

```

AtCDC20_1 -----MDAGLN-----RCPLQEHFLPRKNS 20
AtCDC20_2 -----MDAGMNTSSHYK-----TQARCPLQEHFLPRKPS 30
PtCDC20_1 -----MDAGSLNSSSYMK-----AQSFRFLQEQFLHRKNS 30
PtCDC20_5 -----
PtCDC20_2 -----MDAGSINSSSLK-----AQSFRFLQEQFLPRMNS 30
PtCDC20_3 -----MDAGSMNTSSSLK-----AQSFRFLQEQFLPRMNS 30
AtCDC20_3 -----MDSG-----MRATCTVPEHFLLPRKLS 21
AtCDC20_4 -----MDS-----DTCTVPDHFLLPRKLS 18
AtCDC20_5 -----MMNTSSHLK-----AQASCPVVEHFLLPRKLS 26
AtCDC20_6 -----MMKS-----IALALCLTHHSPMVL 20
PtCDC20_4 -----MDSSTTTTR-----MFHPRSALRENPPQRKKS 28
OsCDC20_1 -----MDA-GSHSISSEKSHG-LAPRPP---LQEAGSR-PYMPSSLT 36
OsCDC20_2 -----MDA-GSHSISSEKSSRYVAPRQP---LQEAGSR-PYMPSSLT 37
OsCDC20_3 -----MEAPGSGSVPTAKRRR-LVPRPPPVPLEVAGARGPYMPLCI 41
AtCCS52A1 -----MEEEDPTASNVITNSNSSMRNLSAMNTPVVSLESR----INRLINANQSQSP 50
AtCCS52A2 -----MEEDESTTP----KKKSDSQLNLPPSMNRPTVSLESR----INRLIDSNHYSHP 46
PtCCS52A1 -----MADPMISQSTQSKLNIAASTTPRRHHHLHLENPTSPSSSKH----VNRLINSNHYSHP 55
PtCCS52A1_2 -----MADPTMSFPNQSQLNVAASTTQRRQHHLNLES LAPSPSSSEH----VNRLINSNHYSHP 55
OsCCS52A -----MDHHHHHLPPPPRSPMENSASSKPPTPASTPSSRLAAAPSSR----VSSAAPHSPSSS 56
PtCCS52B -----MDSTPRRKSG---LNLPSGMNETSLRLETFSSSSSFRAVTCVSSPRAISSLSSP 51
PtCCS52B_2 -----MDSTPRRKSG---LNLPSGMNETSLRLETFSSSSSFRAVTCVSSPRAISSLSSP 51
AtCCS52B -----MASPQSTKTG---LNLPAAGMNTSLRLETFSSS-----FRGISSLSSP 40
OsCCS52B -----MATDASPKPAPPRNLNVPAMAG-GLRLDPAVASP-----ARLLLDVPKTPSP 46

AtCDC20_1 KENL-----DRFIPNR-SAMNFDYAHFALTEERKG-----KDQS-ATVSSPSKE 62
AtCDC20_2 KENL-----DRFIPNR-SAMNFDYAHFALTEGRKG-----KDQT-AAVSSPSKE 72
PtCDC20_1 KENL-----DRFIPNR-SAMDLDYAHYMLTQGRKGG-----KENPTATVNSPSRE 74
PtCDC20_5 -----
PtCDC20_2 KENL-----DRFIPNR-SAMDMDYAHFMLTEGRKG-----KENP--TVNSPSRE 71
PtCDC20_3 KENL-----DRFIPNR-SAMDMDYARFMLTEGRKG-----KENP--TVNSPSRE 71
AtCDC20_3 KQNL-----DRFIPNR-SAKDFDFANYALTQGSKR-----NLDEVTSASRK 61
AtCDC20_4 KQNL-----DRFIPNR-SAMDFDFANYALTQGRKR-----NVDEITSASRK 58
AtCDC20_5 KENF-----DRFIPNR-SAMDFDFANYALTQGRKR-----NVDEVTSASRK 67
AtCDC20_6 -----IVDYGDSQEKTIID---SLWKKP-----HGSDLTWSG-- 48
PtCDC20_4 YENVSLQNYILDRFIPNR-SAMDMDFAHYMLTEGRKA-----KESPPSQS 72
OsCDC20_1 ASRNPSAKCYGDRFIPDR-SAMDMDMAHYLLTEPKKD-----KEN-AAASPSKE 83
OsCDC20_2 ASRNPSAKCYGDRFIPDR-SAMDMDMAHYLLTEPKRD-----KEN-AAASPAKE 84
OsCDC20_3 KSKNPSAKCYGDRFIPDR-SAMDMDMAYFLLTEPKKE-----KENTDMLSPAE 89
AtCCS52A1 SPSSLSRSIYSDRFIPSR---SGSNFALFDLSPSPS-----KDGKEDGAG 92
AtCCS52A2 S-----KPIYSDRFIPSR---SGSNFALFDLASSSPNK-----KDGKEDGAG 85
PtCCS52A1 S-----RPIYSDRFIPCR---SSSNFALFNISFPQPSATAGISPG-----CGKEDNPS 101
PtCCS52A1_2 S-----RPIYSDRFIPCR---SSSNFALFNISLPSPSATAGSSPG-----DGGKEDNPN 101
OsCCS52A APTPASRTVYSDRFIPSR---AGSNLALFDLAPSPSHHDAAAAASPGAPPPSGSTPASS 113
PtCCS52B SKT----SSCSDRFIPCR---SSSRLHTFGLVEKG-----SPVKEGGNE 88
PtCCS52B_2 SKT----SSCSDRFIPCR---SSSRLQTFGLIEKG-----SPVKEGGNE 88
AtCCS52B SK-----STCSDRFIPCR---SSSRLHAFDLQDKEPT-----TPVKEGGNE 78
OsCCS52B SK-----TTYSDRFIPCR---SSSRLHNFALLDRDRA-----SPSSTDDA 84

```

AtCDC20_1 AYRKQLAETMNLN-----HTRILAFRNKPQAPVELLP 94
 AtCDC20_2 AYRKQLAETMNLN-----HTRILAFRNKPQAPVELLP 104
 PtCDC20_1 AYRKQLAEALNLN-----RTRILAFRNKPPTFVELIP 106
 PtCDC20_5 -----
 PtCDC20_2 AYRKQLAESLNMN-----RTRILAFRNKPPAPVELMP 103
 PtCDC20_3 AYRKQLADSLNMN-----RTRILAFRNKPPAPVELMP 103
 AtCDC20_3 AYMTQLAVVMNQ-----RTRILAFRNKPKS----LL 89
 AtCDC20_4 AYMTQLAVVMNQ-----RTRILAFRNKPKA----LL 86
 AtCDC20_5 AYMTQLAEAMNQ-----RTRILAFRNKPKA----LL 95
 AtCDC20_6 --FSRVGVTEAYF-----AVPVDHFLTNPSS----LR 74
 PtCDC20_4 LYQKLLAEAFNMN-----GRRILAFRNKPPPTLVDPPI 104
 OsCDC20_1 VYRRLLAEKLLNN-----RTRILAFRNKPPPEPENVS- 114
 OsCDC20_2 AYRKLLEAKILLN-----RTRILSFRNKPPEPESILT 116
 OsCDC20_3 AYRKLLEAKILLN-----RSRILAFRNKPPPEPEGIVQ 121
 AtCCS52A1 SYATLLRAAMFGPETPEKRDIT-GFSSS-----RNI FRFKTETH--RSLN- 134
 AtCCS52A2 SYASLLKTALFGPVTPEKSDVVGNGFSPS-----GNI FRFKTETQ--RSLN- 128
 PtCCS52A1 AYAALLRNALFGPQTPDKKDWGAGAAG-----QNI FRYKMETR--QSLH- 143
 PtCCS52A1_2 AYAALLRNALFGPQTPDKKDWGTGAAG-----RNI FRYKTETR--QSMH- 143
 OsCCS52A PYCALLRAALFGPTTPDRVASSASACSSSSSAGASPVGSPATGNI FRFKAEPV--RNAKR 171
 PtCCS52B AYARLLKSELFGSDFGS-FSSPAGGQGGSS-----PNKNMLRFKTDHS--GPNSP 136
 PtCCS52B_2 AYARLLKSELFGSDFGS-FSSPAGGQGGSS-----PSKNMLRFKTDHS--GPNSP 136
 AtCCS52B AYSRLLKSELFGSDFASPLSPAGGQGSASSP-----MSPCTNMLRFKTDHSNSPSSP 132
 OsCCS52B PYSRLLRAEIFGPDSPS-----PAPSS-----PNTNLF RFKTDHP--SPKSP 124

AtCDC20_1 SNHS-----ASLHQQPKSVKPRRYIPQTSERTLDAPDIVDDFYLNLLDWGSANV 143
 AtCDC20_2 SNHS-----ASLHQQPKSVKPRRYIPQTSERTLDAPDIVDDFYLNLLDWGSANV 153
 PtCDC20_1 RDHLS-----SSLHYQAKPTKPRRYIPQTSERTLDAPDLVDDFYLNLLDWGSKNV 156
 PtCDC20_5 -----
 PtCDC20_2 QDH-----SHHHHQPKTAKPRRHIPQTSERTLDAPDLVDDFYLNLLDWGSSNV 151
 PtCDC20_3 QDH-----SHHHHQPKTAKPRRHIPQTSERTLDAPDLVDDFYLNLLDWGSSNV 151
 AtCDC20_3 STNHS-----DSPHQNPKPVKPRRYIPQNSERVLDA PGLRDDFSLNLLDWGSANV 139
 AtCDC20_4 SSNHS-----DSPHQNPKSVKPRRYIPQNSERVLDA PGLMDDFYLNLLDWGSANV 136
 AtCDC20_5 SSNHS-----DPPHQQPI SVKPRRYIPQNSERVLDA PGIADDFYLNLLDWGSSNV 145
 AtCDC20_6 LS-QT-----IYCRRGSSVYVETEKVEEEDRDDFLKQVWFLTDNLVFFVDFIEEYI 123
 PtCDC20_4 LFS-----SSSVHSSKPVKPRRHIPQRPEMTLDAPDIVDDFYLNLLDWGNNNV 152
 OsCDC20_1 --AAD-----TASTHQAKPAKQRRYIPQSAERTLDAPDLVDDFYLNLLDWGSKNV 162
 OsCDC20_2 E-LRA-----DAASIQAQPAKQRRYIPQSAERTLDAP ELVDDFYLNLLDWGSSNV 165
 OsCDC20_3 QLLYE-----TLTSSQTPARKCRHIPQSSERTLDAPDLVDDFYLNLLDWGCKNV 171
 AtCCS52A1 -SFSPPFGVD---DSDPGVSHSGPVKAPRKVPRSPYKVLDA PALQDDFYLNLLVDWSAQNV 189
 AtCCS52A2 -LYPPFDS---VVS-GVSPS-PVKSPRKILRSPYKVLDA PALQDDFYLNLLVDWSAQNV 181
 PtCCS52A1 -SLSPFGFD---DMSDLGVSNAIKTPRKVRSRSPYKVLDA PALQDDFYLNLLVDWSSHN 198
 PtCCS52A1_2 -SLSPFGFD---GLSGPGVSNVAIKAPRKVRSRSPYKVLDA PALHDDFYLNLLVDWSSHN 198
 OsCCS52A ALFSDGDDE---GVLFPGVFTTRGTGPRKIPRSPYKVLDA PALQDDFYLNLLVDWSSHNI 227
 PtCCS52B FSPSILGHD----SGISSESSTPKPRKVPKTPHKVLDAPSLQDDFYLNLLVDWSSQNV 191
 PtCCS52B_2 YSPSILGHD----SGISSESSTPKPRKVPKTPHKVLDAPSLQDDFYLNLLVDWSSQNV 191
 AtCCS52B FSPSILGND----NGHSSDSSPPKPRKVPKTPHKVLDAPSLQDDFYLNLLVDWSSQNV 187
 OsCCS52B FAASAAATAGHYDCTAGSAESSTPRKPRKVPKTPHKVLDAPSLQDDFYLNLLVDWSSQNT 184

AtCDC20_1 LAIALDHTVYLWDASTGSTSELVTIDEKGPVTSINWAPDGRHVAVGLNNSVQLWDSAS 203
 AtCDC20_2 LAIALDHTVYLWDASTGSTSELVTIDEKGPVTSINWAPDGRHVAVGLNNSVQLWDSAS 213
 PtCDC20_1 LAIALENTVYLWDASNGSTSELVTIVGDEVPVTSVNWAPDGLHLAIGLNNSVQLWDSAS 216
 PtCDC20_5 -----
 PtCDC20_2 LAIALGSTVYLWDASDGSTSELVTVDDEDPITSVNWAPDGRHIAIGLNNSHIQLWDSAS 211
 PtCDC20_3 LAIALGSTVYLWDASDGSTSELVTVDDEDPVTSVNWAPDGRHIAIGLNNSHIQLWDSAS 211
 AtCDC20_3 LAIALGDTVYLWDASSGSTSELVTIDEKGPVTSINWTDGLDLAVGLDNSEVQLWDCVS 199
 AtCDC20_4 LAIALGDTVYLWDASSGSTSELVTIDEKGPVTSINWTDGLDLAVGLDNSEVQLWDFVS 196
 AtCDC20_5 LAIALGDTVYLWDASSGTYKLVITIDEKGPVTSINWTDGLDLAIGLDNSEVQLWDCVS 205
 AtCDC20_6 VIEQLGDTVYLWDASSCYTSKLVITIDEKGPVTSINWTDGLDLAVGLDNSEVQWDCVS 183
 PtCDC20_4 LAIALGTVYLWNASNSSISEVTVVDEEDGPVTSISWAPDGRHLAVGLDNNSVQLWDSAT 212
 OsCDC20_1 LSIALGDTVYLWDASSGSTSELVTVDDESGPITSVSWAPDGHVAVGLNNSDIQLWDTSS 222
 OsCDC20_2 LSIALGNSVYLWDATNSSTSELVTVDDENGPVTSVSWAPDGRHIAVGLNNSDVQLWDTSS 225
 OsCDC20_3 MSIALGNTLYLWNASDGSIMDLVITIDEKGPVTSVSWSCDQWIAVGLNNSDIQLWDTSS 231
 AtCCS52A1 LAVGLGNCVYLWNASCKVTKCLDLGAEDS-VCSVGWALRGTHLAVGTSTGKQVQIWDASR 248
 AtCCS52A2 LAVGLGNCVYLWNASCKVTKCLDLGVDET-VCSVGWALRGTHLAIGTSSGTQVQIWDVLR 240
 PtCCS52A1 LAVGLGNCVYLWNASCKVTKCLDLGNDDG-VCSVGWAHRGTHLAIGTSSGKQVQIWDASR 257
 PtCCS52A1_2 LAVGLGTCVYLWNASCKVTKCLDLGNDDG-VCSVGWAHRGTHLAVGTSSGKQVQIWDASR 257
 OsCCS52A LAVGLGNCVYLWNASCKVTKCLDLGVDDN-VCSVGWAQRGTHLAVGTNQKQVQVWDATR 286
 PtCCS52B LAVGLGTCVYLWNASNSKVTRLCDLGPNDV-VCSVQWTRREGSYISVGTSLGQVQVWDGTQ 250
 PtCCS52B_2 LAVGLGTCVYLWNASNSKVTRLCDLGPNDV-VCSLQWTRREGSYISIGTSLGQVQVWDGTQ 250
 AtCCS52B LAVGLGTCVYLWNASNSKVTRLCDLGPNDV-VCSVQWTRREGSYISIGTSHGQVQVWDGTQ 246
 OsCCS52B LAVGLGNCVYLWNASCKVTKCLDLGPRDS-VCAVHWTREGSYLAIGTSLGQVQIWDSSR 243

AtCDC20_1 NRQLRTLKGGHRSRVGSLAWNNHILTTGGMDGLIINNDVIRIRSPIVETYRGHTQEVCGLK 263
 AtCDC20_2 NRQLRTLKGGHRSRVGSLAWNNHILTTGGMDGLIINNDVIRIRSPIVETYRGHTQEVCGLK 273
 PtCDC20_1 CKQLRNLRGCHRSRVGSMAWNNHILTTGGMDGKIINNDVIRIRSHIVETYRGHQEQEVCGLK 276
 PtCDC20_5 -----
 PtCDC20_2 NRQLRTLKGGHRSRVGSLAWNNHILTTGGMDGQIINNDVIRIRSHIVETYRGHTQEVCGLK 271
 PtCDC20_3 NRQLRTLKGGHRSRVGSMWNNHILTTGGMDGQIINNDVIRIRSHIVETYRGHTQEVCGLK 271
 AtCDC20_3 NRQVRTLRGGHRSRVGSLAWNDHILTTGGMDGKIVNNDVIRIRSSIVETYLGHTTEEVCGLK 259
 AtCDC20_4 NRQVRTLRGGHRSRVGSLAWNNHILTTGGMDGKIVNNDVIRIRSSIVGTYLGHTEEVCGLK 256
 AtCDC20_5 NRQVRTLRGGHRSRVGSLAWNNHILTTGGMDGKIVNNDVIRIRSSIVETYLGHTTEEVCGLK 265
 AtCDC20_6 NRHVRTLRRGGHRSRVGSLAWNNHILTTGGMDGKIVNNDVIRIRSSIIGTYVGHTEEVCGLK 243
 PtCDC20_4 NQMLRTLRRGGHRLRVTSLAWNNHLLTTGGKDAKVINNDVIRIHEHIVESYEGHRQEVCGLK 272
 OsCDC20_1 NRLLRTLGRVHRSRVGSLAWNNHILTTGGMDGNIVNNDVIRIRNHVVQTYQGHQEVCGLK 282
 OsCDC20_2 NRLLRMTMRGVHDSRVGSLAWNNHILTTGGMDGKIVNNDVIRIRNHVVQTYQGHQEVCGLK 285
 OsCDC20_3 NRMLRTLHGVHQS RVGSLAWNNHILTTGGMDGNIVNNDVIRIRNHVVHIRYRGHEDEVCGLR 291
 AtCCS52A1 CKRTRTMEG-HRLRVGALAWGSSVLSGSRDKSILQRDIRCEDHVS KLKAGHKSEVCGLK 307
 AtCCS52A2 CKNIRTMEG-HRLRVGALAWSSVLSGSRDKSILQRDIRAQEDHVS KLKAGHKSEVCGLK 299
 PtCCS52A1 CKRIRTMEG-HRLRVGALAWSSMLSSGSRDKSILQRDIRAREDFVSKLSGKSEVCGLK 316
 PtCCS52A1_2 CKRIRIMEG-HRLRVGALAWSSMLSSGSRDKSILQRDIRAQEDFVSKLSGKSEVCGLK 316
 OsCCS52A CKRIRTMES-HRMRV GALAWNSLLSSGSRDKSILHHDIRAQDDYISRLAGHKSEVCGLK 345
 PtCCS52B CKRVRTMGG-HQTRTGVLAWSRSLSSGSRDRNILQHDLRVSSDHVSKLIGHKSEVCGLK 309
 PtCCS52B_2 CKRVRTMGG-HQTRT SVLAWNSRSLASGSRDRNILQHDLRVSSDHVSKLIGHKSEVCGLK 309
 AtCCS52B CKRVRTMGG-HQTRTGVLAWSRSLSSGSRDRNILQHDLRVQSDVSKLVGHKSEVCGLK 305
 OsCCS52B CKRIRNMGG-HQTRTGVLAWSRSLSSGSRDRNILQHDLRVPSDYISKFSGHRSEVCGLK 302

AtCDC20_1 WSGSQQLASGGNDNVVHIWD-RSVASSNSTT---QWLHRLEEHTSAVKALAWCFQANL 319
 AtCDC20_2 WSGSQQLASGGNDNVVHIWD-RSVASSNSTT---QWLHRLEEHTSAVKALAWCFQANL 329
 PtCDC20_1 WSASGQQLASGGNDNIHIWD-RSVASSNSAT---QWFHRLLEEHTSAVKALAWCFQGNL 332
 PtCDC20_5 -----HIWD-RSVASSNSAT---QWFHRLLEEHTSAVKALAWCFQGNL 39
 PtCDC20_2 WSASGQQLASGGNDNIHIWD-RSTALSNSAT---QWLHRLEDHTSAVKALAWCFQGNL 327
 PtCDC20_3 WSASGQQLASGGNDNIHIWD-RSTALSNSAT---QWLHRLEDHTSAVKALAWCFQGNL 327
 AtCDC20_3 WSESGNKQASGGNDNVVHIWD-RSLASSKQTR---QWLHRFEEHTAAVRAALAWCFQASL 315
 AtCDC20_4 WSESGKKLASGGNDNVVHIWDHRSVASSKPTR---QWLHRFEEHTAAVRAALAWCFQATL 313
 AtCDC20_5 WSESGKKLASGGNDNVVHIWDHRSVASSNPTR---QWLHRFEEHTAAVRAALAWCFQASL 322
 AtCDC20_6 WSESGKKLASGGNDNVVHIWD-RSLASSNPTR---QWLHRFEEHTAAVRAALAWCFQASL 299
 PtCDC20_4 WSASGQQLASGGNDNLLFIWD-RFMASSNSPR---HWLHKLEDHTAAVKAALAWCFQSNL 328
 OsCDC20_1 WSGSQQLASGGNDNLLHIWD-VSMASSVPSAGRQWLHRLEDHTAAVKAALAWCFQSNL 341
 OsCDC20_2 WSGSQQLASGGNDNLLHIWD-VSMASSMPSAGRTQWLHRLEDHTAAVKAALAWCFQSNL 344
 OsCDC20_3 WSGSQQLASGGNDNLVHIWD-VSMASSNLSLGHNRWLHRFGDHLAAVKAALAWCFQSNL 350
 AtCCS52A1 WSYDNRELASGGNDNRLFVWNQHSQP-----VLKYSEHTAAVKAIAWSPHVLGL 357
 AtCCS52A2 WSSDNRELASGGNDNRLFVWNQHSQP-----VLRFCHEAAVKAIAWSPHFFGL 349
 PtCCS52A1 WSYDNRELASGGNDNRLFVWNQHSQP-----VLKYCDHTAAVKAIAWSPHLLGL 366
 PtCCS52A1_2 WSYDNRELASGGNDNRLFVWNQHSQP-----VLKYCEHTAAVKAIAWSPHLLGL 366
 OsCCS52A WSYDNRELASGGNDNRLFVWNQHSQP-----VLKYTEHTAAVKAIAWSPHLLGL 395
 PtCCS52B WSHDDRELASGGNDNQLLVWNQHSQLP-----ILKLTEHTAAVKAIAWSPHQSGL 359
 PtCCS52B_2 WSHDDRELASGGNDNQLLVWNQHSQLP-----VLTLTEHTAAVKAIAWSPHQSGL 359
 AtCCS52B WSHDDRELASGGNDNQLLVWNQHSQLP-----ILKLTEHTAAVKAIAWSPHQSSL 355
 OsCCS52B WSHDDRELASGGNDNQLLVWNQHSQLP-----ILRLTEHTAAVKAIAWSPHQSSL 352

* : * : * : * : * : *

AtCDC20_1 LATGGGGGDRTIKFWNTHTGACLNSVDTGSQVCSLLWSKNERELSSHGFTQNQLTLWKY 379
 AtCDC20_2 LATGGGGGDRTIKFWNTHTGACLNSVDTGSQVCSLLWSKNERELSSHGFTQNQLTLWKY 389
 PtCDC20_1 LASGGGGGDRSIKFWNTHTGACLNSIDTGSQVCALLWNKNERELSSHGFTQNQLVWLWKY 392
 PtCDC20_5 LASGGGGGDRSIKFWNTHTGACLNSIDTGSQVCALLWNKNERELSSHGFTQNQLVWLWKY 99
 PtCDC20_2 LASGGGGGDKSIKFWNTHTGACLNSIDTGSQVCSLLWNKNERELSSHGFTQNQLTVWKY 387
 PtCDC20_3 LASGGGGGDKSIKFWNTHTGACLNSIDTGSQVCSLLWNKNERELSSHGFTQNQLTVWKY 387
 AtCDC20_3 LATGGGVGDGKIKFWNTHTGACLNSVETGSQVCSLLWSQSERELSSHGFTQNQLTLWKY 375
 AtCDC20_4 LATGGGVGDGKIKFWNTHTGACLNSVETGSQVCSLLWSQSERELSSHGFTQNQLTLWKY 373
 AtCDC20_5 LATGGGVGDGKIKFWNTHTGACLNSVETGSQVCSLLWSKSERELSSHGFTQNQLTLWKY 382
 AtCDC20_6 LATGGGVGDGKIKFWNTHTGACLNSVETGSQVCSLLWSKSERELSAHGFTQNQLTLWKY 359
 PtCDC20_4 LASGGGGDRHIKFWNTQTGTCLNSVDTGSQVCALQWNKHERELSSHGFTENQLILWKY 388
 OsCDC20_1 LATGGGSDRCIKFWNTHTGACLNSVDTGSQVCALLWNKNERELSSHGFTQNQLTLWKY 401
 OsCDC20_2 LASGGGSDRCIKFWNTHTGACLNSIDTGSQVCSLVWNKNERELSHGFAQNQLTLWKY 404
 OsCDC20_3 LASGGGDDRCIRFWNTHTGCLNSVDTGSQVCGLLWNKNEKELLSAHGYVQNSLALWKY 410
 AtCCS52A1 LASGGGTADRCIRFWNTTNTNHLSCIDTGSQVCNLAWSKNVNELVSTHGYSQNQIIVWKY 417
 AtCCS52A2 LASGGGTADRCIRFWNTTNTNHLNVDVTSQVCNLAWSKNVNELVSTHGYSQNQIIVWKY 409
 PtCCS52A1 LASGGGTADRCIRFWNTTNTNHLSCIDTGSQVCNLAWSKNVNELVSTHGYSQNQIILWRY 426
 PtCCS52A1_2 LASGGGTADRCIRFWNTTNTNHLSCMDTGSQVCNLAWSKNVNELVSTHGYSQNQIIVWRY 426
 OsCCS52A LASGGGTADRCIRFWNTTNTNHLNVDVTSQVCNLAWSKNVNELVSTHGYSQNQIIVWRY 455
 PtCCS52B LASGGGTADRCIRFWNTTNGHQLNYVDVTSQVCNLAWSKNVNELVSTHGYSQNQIMVWKY 419
 PtCCS52B_2 LASGGGTADRCIRFWNTTNGHQLNHVDVTSQVCNLAWSKNVNELVSTHGYSQNQIMVWKY 419
 AtCCS52B LASGGGTADRCIRFWNTTNGNQLNSIDTGSQVCNLAWSKNVNEIVSTHGYSQNQIMLWKY 415
 OsCCS52B LASGGGTADRCIRFWNTVNGMLNSVDTGSQVCNLAWSKNVNEIVSTHGYSQNQIMVWKY 412

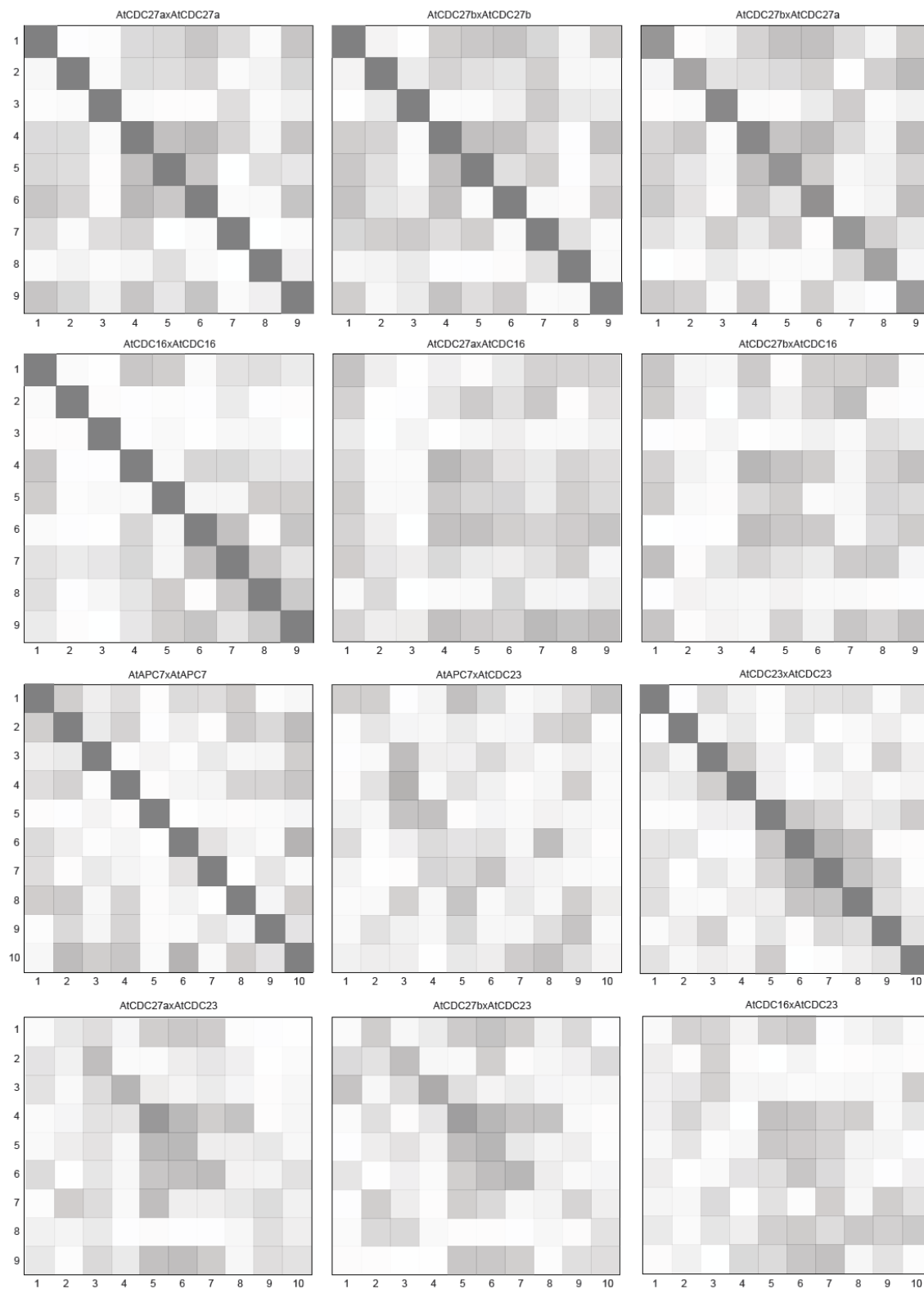
* : * : * : * : * : *

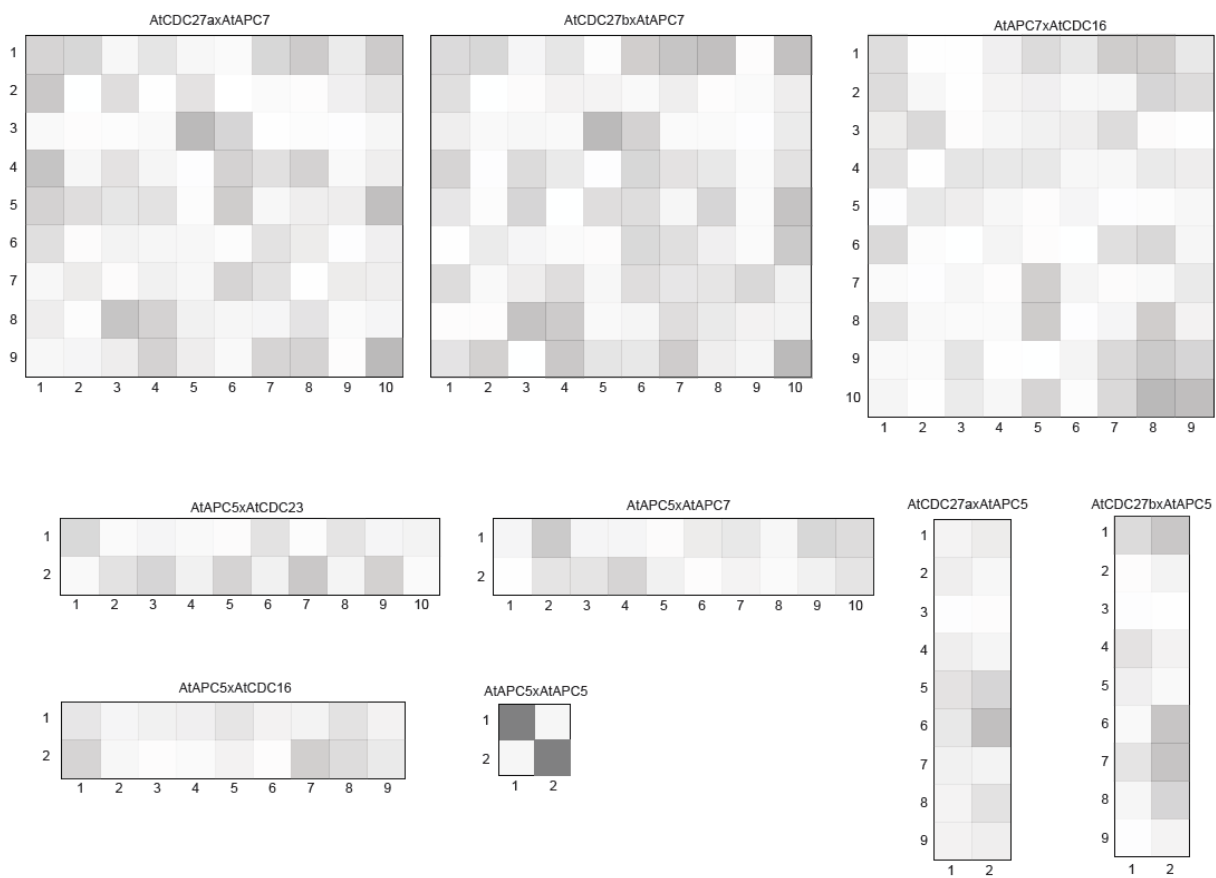
AtCDC20_1 PSMVKMAELTGHTSRVLYMAQSPDGCTVASAAGDETLRFWNVFG-VPETAKKAAPKAVAE 438
 AtCDC20_2 PSMVKMAELTGHTSRVLYMAQSPDGCTVASAAGDETLRFWNVFG-VPETAKKAAPKAVSE 448
 PtCDC20_1 PSMMLKMAELTGHTSRVLYMAQSPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG-VPEVA-KAAPKANPE 450
 PtCDC20_5 PSMMLKMAELTGHTSRVLYMAQSPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG-VPEVA-KAAPKANPE 157
 PtCDC20_2 PSMVKMAELTGHTSRVLYMAQSPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG-VPEVA-KAAPKANPE 446
 PtCDC20_3 PSMVKMAELTGHTSRVLYMAQSPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG-VPEVA-KAAPKANPE 446
 AtCDC20_3 PSMVKMAELTGHTSRVLYMAQSPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG-VPEVA-KAAPKANPE 446
 AtCDC20_4 PSMVKMAELTGHTSRVLYMAQSPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG-VPEVA-KAAPKANPE 446
 AtCDC20_5 PSMVKMAELTGHTSRVLYMAQSPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG-VPEVA-KAAPKANPE 446
 AtCDC20_6 PSMVKMAELTGHTSRVLYMAQSPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG-VPEVA-KAAPKANPE 446
 PtCDC20_4 PSMVKMAELTGHTSRVLYMAQSPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG-VPEVA-KAAPKANPE 446
 OsCDC20_1 PSMVKMAELTGHTSRVLYMAQSPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG-VPEVA-KAAPKANPE 446
 OsCDC20_2 PSMVKMAELTGHTSRVLYMAQSPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG-VPEVA-KAAPKANPE 446
 OsCDC20_3 PSMVKMAELTGHTSRVLYMAQSPDGCTVATAAGDETLRFWNVFG-VPEVA-KAAPKANPE 446
 AtCCS52A1 PTMSKIATLTGHTYRVLVLAISPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SPKSQNTD--SEIGS 474
 AtCCS52A2 PTMSKLATLTGHTYRVLVLAISPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SPKSQNTD--SEIGS 466
 PtCCS52A1 PTMSKLATLTGHTYRVLVLAISPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SPKSQNTD--SEIGS 483
 PtCCS52A1_2 PTMSKLATLTGHTYRVLVLAISPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SPKSQNTD--SEIGS 483
 OsCCS52A PTMSKLATLTGHTYRVLVLAISPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SPKSQNTD--SEIGS 514
 PtCCS52B PSLSKVATLVGHSLRVLYLAMPSPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SMKTQTPV--KDTGL 476
 PtCCS52B_2 PSLSKVATLVGHSLRVLYLAMPSPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SMKTQTPV--KDTGL 476
 AtCCS52B PSMKSVATLTGHSMRVLYLAMPSPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SMKTQTPV--KDTGL 472
 OsCCS52B PSMKSVATLTGHSMRVLYLAMPSPDGQTIIVTGAGDETLRFWNVFP-SMKTQTPV--KDTGL 469
 *:: ** * .*: ** : **:* *::: *.**.*.*.*.*:

AtCDC20_1 PFSHVNR--IR 447
 AtCDC20_2 PFSHVNR--IR 457
 PtCDC20_1 PFSRFNR--IR 459
 PtCDC20_5 PFSRFNR--IR 166
 PtCDC20_2 PFSHLNR--LR 455
 PtCDC20_3 PFSHLNR--IR 455
 AtCDC20_3 LFSHVNS--LR 444
 AtCDC20_4 LFSHVNS--LR 442
 AtCDC20_5 PFAHVN--IR 451
 AtCDC20_6 PFAHVN--IR 428
 PtCDC20_4 PFAVNSH--FR 455
 OsCDC20_1 MFNSFNH--LR 469
 OsCDC20_2 MFNSNHIH--IR 474
 OsCDC20_3 MFNSFSH--IR 478
 AtCCS52A1 SFFGRTT--IR 483
 AtCCS52A2 LSFGRTT--IR 475
 PtCCS52A1 SSLGRTT--IR 492
 PtCCS52A1_2 SSLGRTT--IR 492
 OsCCS52A TSFVRSY--IR 523
 PtCCS52B WSLGRTQ--IR 485
 PtCCS52B_2 WSLGRTQ--IR 485
 AtCCS52B WSLGRTQ--IR 481
 OsCCS52B WSFRSH--IR 478
 . :*

APÊNDICE IX

Padrões de duplicação dos domínios TPRs das subunidades do APC em Arabidopsis. A intensidade dos sombreamentos reflete a pontuação, com o sombreamento mais escuro para as mais altas pontuações. Os números em cada eixo indicam a orientação dos domínios na orientação N→C terminal.

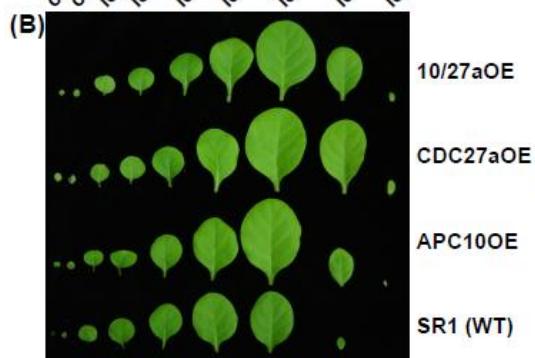




APÊNDICE X



SR1 (WT) APC10OE_1.2 APC10OE_6.1 APC10OE_7.1
cot 1 cot 2 leaf 1 leaf 2 leaf 3 leaf 4 leaf 5 leaf 6 leaf 7



10/27aOE CDC27aOE APC10OE SR1 (WT)



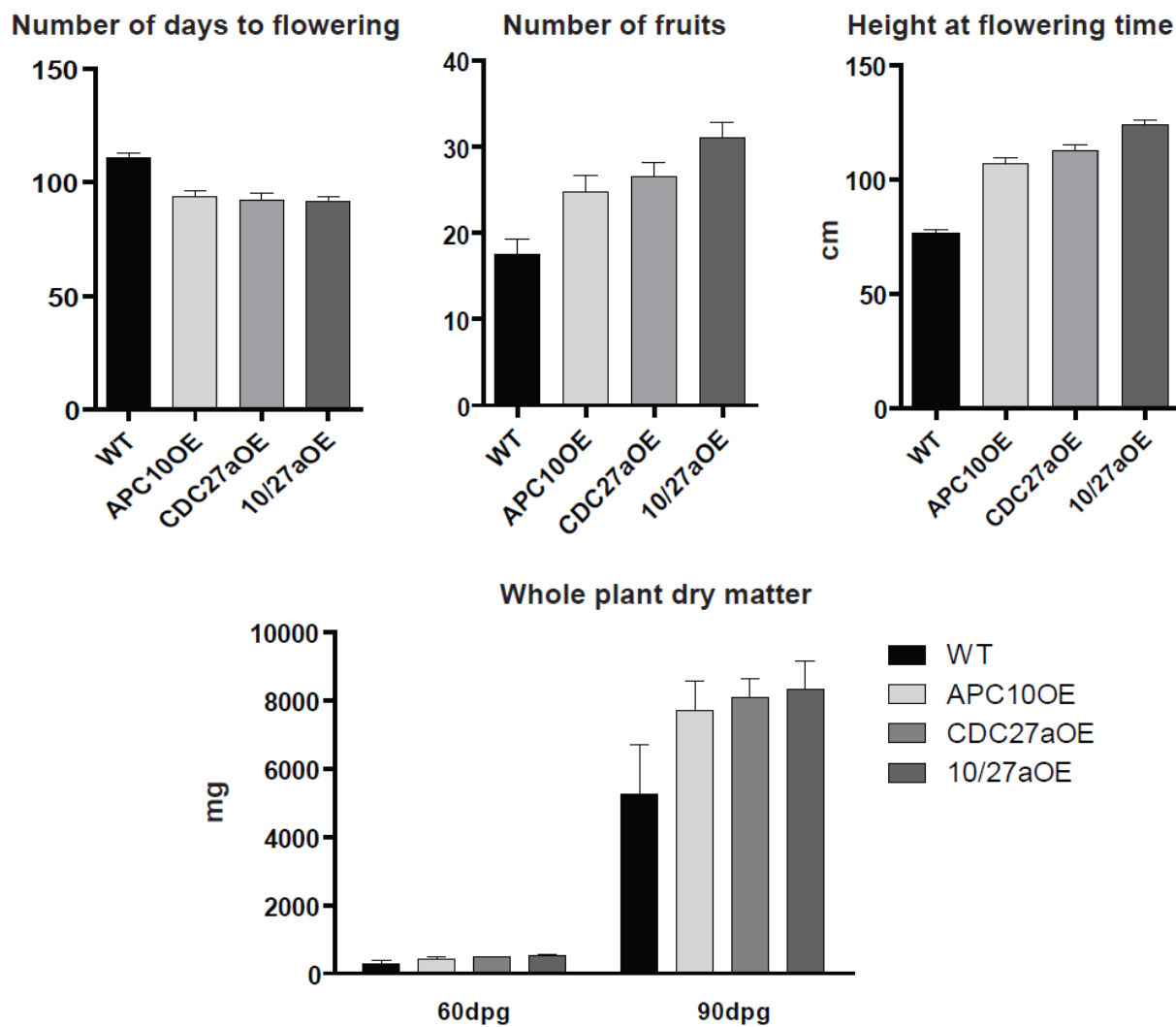
SR1 (WT) 10/27aOE CDC27aOE APC10OE

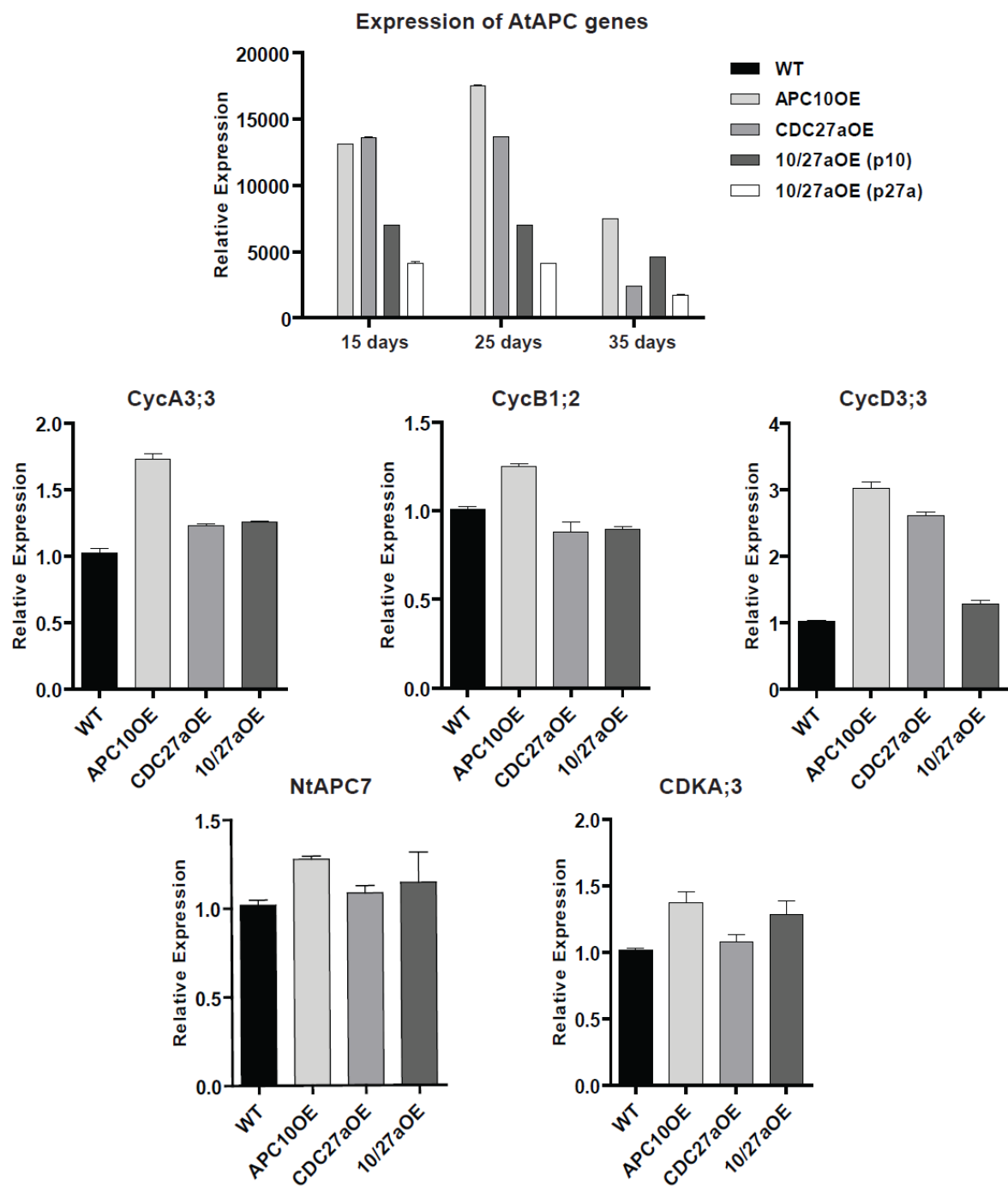


SR1 (WT) 10/27aOE CDC27aOE APC10OE



10/27aOE CDC27aOE APC10OE SR1 (WT)





APÊNDICE XI - figuras suplementares do manuscrito estão nos apêndices da tese.

Genomic evolution and complexity of the Anaphase-promoting Complex (APC) in land plants

Marcelo F. Lima^{1,2}, Núbia B. Eloy^{1,2}, Rauan Sagit³, Cristian Rojas^{1,2}, Thiago B Carvalho^{1,2}, Livia Vargas^{1,2}, Arne Elofsson³, Adriana S. Hemerly^{1,2}, Paulo C.G. Ferreira^{1,2}

¹ Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Instituto de Bioquímica Médica, CCS, Cidade Universitária – Ilha do Fundão, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

² Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Diretoria de Pesquisa Científica, Rua Pacheco Leão 915, CEP 22460-030, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³ Stockholm Bioinformatics Center, Center for Biomembrane Research, Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University, 106, 91, Stockholm, Sweden

The orderly progression through mitosis is regulated by the Anaphase-Promoting Complex (APC), a large multiprotein E₃ ubiquitin ligase that targets key cell-cycle regulators for destruction by the 26S proteasome. The APC is composed of at least 11 subunits and associates with additional regulatory activators in mitosis and during interphase. Despite extensive research on APC and activator functions in the cell cycle, only a few these components have been characterized functionally in plants. Here, we describe an in-depth search for APC subunits and activator genes in the Arabidopsis, rice and poplar genomes, and among available sequences from other plant genomes. Phylogenetic analyses indicate that some APC subunits and activator genes have experienced more gene duplication events in plants than in animals. Expression patterns of paralogs subunits and activators in rice suggest that this duplication, rather than complete redundancy, reflects specialization. The subunit APC7 is not present in some green algae species and these data, together with its absence from early metazoan lineages, could mean that APC7 is not required for APC function in unicellular organisms and it may be a result of duplication of another tetratricopeptide (TPR) subunit. Analyses of TPR evolution suggest that duplications of subunits started from the central domains. The increased complexity of the APC genic structural, tied to the diversification of expression paths suggests that land plants developed sophisticated mechanisms of APC regulation to cope with the sedentary life style associated with environmental exposures.

INTRODUCTION

Cell proliferation is controlled by universally conserved molecular machinery in which the key players are cyclin-dependent kinases (CDK) and cyclins (reviewed in Joubès et al., 2000). Eukaryotes have therefore evolved elaborate mechanisms for CDK regulation. An irreversible mechanism of CDK down-regulation is destruction of cyclin subunits (Furuno et al., 1999; Gong et al., 2007). At the G₁- to S-phase and metaphase to anaphase transitions, CDKs are irreversibly inactivated by ubiquitin-mediated proteolysis of cognate cyclins (den Elzen and Pines, 2001). Degradation of protein substrates through the ubiquitin-proteasome pathway involves the activity of different E3 ligases, among them the anaphase-promoting complex (APC). The APC was first identified based on its role in facilitating the multiubiquitination of A- and B-type cyclins, thereby targeting them for proteasome-mediated destruction during mitosis (Irniger et al., 1995; King et al., 1995; Sudakin et al., 1995; Tugendreich et al., 1995). APC is a multiprotein complex conserved from plants to man and contains at least 11 core subunits (Yoon et al., 2002). The APC is regulated in part by two associated proteins, CDC20 and CCS52/CDH1, and both these proteins can activate the APC with proper timing and provide substrate specificity (Zachariae et al., 1998; Kramer et al., 2000). The APC is activated at metaphase/anaphase transition by the CDC20 protein and later in telophase and G₁ by the CDH1 protein. Substrates that have a destruction box (D-box), KEN-box or A-box motifs are recognized and ubiquitinated by the APC (Pfleger and Kirschner, 2000; Glotzer et al., 1991; Littlepage et al., 2002).

The APC has important functions in mitosis, meiosis, G₁-S-phase and in post-mitotic differentiated cells (Reimann et al., 2001; Miller et al., 2006). The mitosis-specific activator CDC20 is itself an APC substrate. Other targets of APC/C degradation are: Cyclins A and B; protein kinases Plk1, CDC5, Aurora A and B; regulators of DNA replication Geminin, CDC6; and the anaphase inhibitor Securin (reviewed in Baker et al., 2007). The proteolytic events triggered by the APC are required to release sister chromatid cohesion during anaphase, to control the exit from mitosis and to prevent premature entry into S-phase (King et al., 1995; Peters, 2002; Jeganathan et al., 2005).

Although the role of the APC in controlling cell-cycle progression has been extensively investigated, recent work has shown the unexpected presence of APC subunits in differentiated tissues, in particular in the nervous system of vertebrates (reviewed in Kim and

Bonni, 2007). In plants, the expression of several APC subunits has been detected in differentiated tissues of *Arabidopsis* (Eloy et al, 2006; Serralbo et al, 2006). In addition, while both CDC27a and CDC27b genes are essential during gametogenesis, the CDC27b subunit has been implicated also in postembryonic differentiation at the meristems (Pérez-Pérez et al., 2008). Besides, it has been shown that reduced levels of APC6 and APC10 subunits in *Arabidopsis* lead to plants with several defects in vascular development (Marroco et al., 2009). These results indicate that, while the overall structure of the APC is conserved among eukaryotes, this E3 ligase may have assumed specialized functions in the diverse kingdoms. Gene duplication and retention in plants has been extensive and gene families are generally larger in plants than in animals (Cui et al., 2006). Nevertheless, almost all studies on the APC function in plants have been carried out in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Comparative genomic analyses can provide valuable insights into the organization of cell cycle machinery and the evolution of these protein complexes.

In this article, we describe broad searches for the predicted sequences of the APC subunits and the activators CDC20/CCS52 in plant sequences databases. Our results indicate that land plants and green algae orthologs have an ancient evolutionary origin. We present phylogenetic analysis of TPR subunits and activators, and their orthologs from other plants. The evolution of *Arabidopsis* TPR domain suggests that tandem regions could have been created from duplication of internal sequence domains. Overall, our data support the proposal that APC subunits and activators have been conserved in the course of evolution. However, while other eukaryotes like fungi and metazoans, have only one copy of each APC subunit and its regulators, gene duplication of different subunits have occurred in *Arabidopsis*, rice and poplar, and in other plant genomes as well. In *Arabidopsis*, duplication of the CDC27 subunit led to substantial sequence divergence and specialization (Pérez-Pérez et al., 2007). An attractive premise is that gene duplication of APC subunits may result in the formation of APC subcomplexes that evolved to assume restricted specialized roles during plant development. This hypothesis is supported by the observation that the two copies of rice CDC23 and APC11 genes are differentially expressed in plant tissues or when grown under either dark or light-mediated developmental programs.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of APC subunits and activator genes

In order to carry out the cross-species comparison of the APC and activators, the Genomic Research (TIGR) Rice genome database and DOE Joint Genome Institute (JGI) Poplar genome database. The sequences of the Arabidopsis APC subunits have been published (Capron et al., 2003; Fülöp et al., 2005; Eloy et al., 2006). After exhaustive data mining, some genes were found only in the EST database Gene Index DFCI. Subsequently, the SMART motif identification tool was used to identify predicted domains in all these candidate proteins (Schultz et al., 2000). Using this strategy, we report the APC/activators in the dicotyledonous poplar and the monocotyledon rice (Table I). All APC subunits and activators were found, and they contained the predicted conserved domains, providing one of many examples for the evolutionary conservation of the eukaryotic cell-cycle machinery (Passmore et al., 2003; Page et al., 2005).

Two *CDC27* homologs have been identified in Arabidopsis *AtCDC27a* and *AtCDC27b* (Blilou et al., 2002). In poplar, two homologs of *CDC27* were also identified: *PtCDC27_1* and *PtCDC27_2*. However, a careful inspection of the *PtCDC27_2* deposited sequence revealed a stop codon TAG at nucleotide position 1471-1473. This fragment was amplified and sequenced and the presence of the stop codon was discarded. The expression of both genes in leaves was confirmed by real-time RT-PCR (Supplemental Fig. S1 A and B). We also found two homologs of *PpCDC27* in the bryophyte *Physcomitrella patens* genome (Rensing et al., 2008). However, only one copy of *CDC27* was found in the rice genome and in the other monocot plants as well. On the other hand, the rice genome has two *OsCDC23* and *OsAPC11* subunits. We examined other complete genomes and found two *CDC23* (*VvCDC23_1* and *VvCDC23_2*) and *APC11* (*VvAPC11_1* and *VvAPC11_2*) genes in grapevine (Jailon et al., 2007). Two homologs of *PtAPC13* were found in the poplar genome, a feature that has not been reported in any other eukaryotic species so far.

The structures of many predicted genes were considerably misannotated. Comparing EST databases from plant species and using bioinformatic tools, it was possible to identify the correct gene sequences. The genomic sequence of *OsAPC1* was not found in the TIGR database, but a partial CDS was identified in the Gene Index database (Supplemental Fig. S2). Most likely, the largest subunit of the APC had come apart by misannotation. Diverse exon-intron structures needed correction in the genomics sequences. *OsAPC4* may contain an intron in the genomic ORF (Supplemental Fig. S3). The 3' region of predicted *PtAPC4* and the 5'-3' regions of *PtAPC5* were incomplete. However, we found fragments from 3' regions of both genes and fragments from the 5' region of *PtAPC5* in the EST database (Supplemental Fig. S3). Interestingly, *OsAPC5*, *OsCDC16* and *OsAPC11_2* have a divergent 5' region compared to Arabidopsis and poplar genes (Supplemental Figs. S3 and S4). The first methionine of *OsCDC16* and *OsAPC11_2* are upstream from a consensus start codon in *CDC16* and *APC11* genes, but only in *CDC16* there is EST support. The opposite occurs with *OsAPC5*, where the first methionine is downstream from the consensus start codon. The APC genes *AtCDC26*, *OsCDC26*, *PtCDC26* and *OsAPC13* were identified in ESTs databases.

Arabidopsis contains three *CCS52* genes, *AtCCS52A1*, *AtCCS52A2* and *AtCCS52B*; and five *CDC20* genes (Fülöp et al., 2005). In addition, we found another *CDC20* homolog in the Arabidopsis genome. This *AtCDC20_6* (At5g27945) showed major differences from conserved structures of other *CDC20*; the CDS does not have the C-box sequence element (consensus DRF/YIPXR) that was first identified in the N-terminal region of *CDC20*, although it is conserved in all known APC/C co-activators (this was confirmed by re-sequencing - Supplemental Fig. S5), and therefore *AtCDC20_6* could be a pseudogene. The rice genome has three predicted *CDC20* genes and two *CCS52* genes compared to five *CDC20* and four *CCS52* genes in the poplar genome and to five *CDC20* and three *CCS52* in Arabidopsis genome (Table I). Exon-intron organization of activators was analyzed and we found some annotation errors. *AtCDC20_5*, *PtCDC20_5*, *PtCCS52A1* and *PtCCS52A1_2* have errors in the 5' region. Using bioinformatics tools, we found that only *PtCDC20_5* is without a C-box. *OsCDC20_1*, *AtCDC20_4*, *PtCDC20_2*, *PtCDC20_4* and *PtCDC20_5* had mistakes in the 3' region. This region contains the IR-tail sequence element (consensus IR) that occupies the C terminus of APC activators and the APC subunit APC10. Comparing with EST databases, all sequences were deduced and the IR-tail was identified (Supplemental Fig. S6). In *PtCCS52A1_2* and *OsCDC20_2* genes, some introns were incorrectly included. The opposite happened in the *OsCDC20_1* gene, where one exon was absent. Alternative splicing variants were found in the Arabidopsis, rice and poplar APC/activator genes (data

not shown) and could represent another layer of complexity in the organization and function of the APC. We selected only a single variant for further analysis.

Duplication of components of the cell-cycle machinery is rare in metazoans but it is a widespread phenomenon in plants (Masuda et al., 2004; Wang et al., 2004, Mori et al., 2005; Shultz et al., 2007) .It has been proposed that duplication, followed by sequence divergence of promoter and/or coding regions, leads to novel and specialized functions unique to the plant kingdom (Pérez-Pérez et al., 2007; Lammens et al., 2008). Still, Table 2 shows that duplications of individual subunits of the APC are not present in all plants; on the contrary, they may be restricted to a species or to small group of phylogenetically related plants and may be involved in the organization of developmental events unique to this group.

Chromosomal location of genes for APC subunits and activator

The close similarity and presence of putative subunits and paralogs prompted us to investigate the genome distribution of plant APC/activators. APC genes were found on five of the five Arabidopsis chromosomes, 10 of the 12 rice chromosomes and 10 of the 19 poplar chromosomes (and seven in scaffolds) (Fig. 1).

Only one APC subunit is duplicated in the Arabidopsis genome, *AtCDC27a* and *AtCDC27b*, and they are located on different chromosomes, 3 and 2 respectively; they share 47% identity and 64% protein similarity. A duplication event is predicted to have occurred in this case according to the tool Paralogons in Arabidopsis (Blanc et al., 2003). Arabidopsis *CDC20* and *CCS52* genes are located on chromosomes 4 and 5. *AtCCS52A1* and *AtCCS52A2* appear to be the result of a recent duplication and *AtCDC20_1* and *AtCDC20_2* are present in tandem on chromosome four (Fülöp et al., 2005).

The nineteen rice APC and activator genes are distributed among all chromosomes, except chromosomes 10 and 11. Based on the sequence consensus, rice genome, segmental duplication information from the TIGR database was used to identify paralog genes. Each pair of paralogs located in the corresponding segmental duplication regions share high

sequence similarity. Two subunits – *CDC23* and *APC11* - are duplicated. *OsCDC23_1* and *OsCDC23_2* are located on chromosomes 2 and 6 respectively. The sequences share low but still significant homologies - 57% identity – suggesting either an ancient duplication event or that the two genes are evolving quickly. *OsAPC11_1* and *OsAPC11_2* are located on chromosome 3 and 7, and share 97% identity. No evidence was found of recent duplication events for activators in rice.

In-silico chromosome mapping revealed that poplar APC/activators are scattered throughout the genome. Paralogs are also located on different chromosomes or scaffolds. It is possible, however, that some of the apparently closely related genes are in fact alleles from unassembled haplotypes, which are potential artifacts from shotgun assembly of this highly heterozygous genome. However, the apparent co-orthologs are divergent at the nucleotide level, as well as in the flanking gene order, and they are identified in the syntenic blocks which argue against the classification of the scaffold as a haplotype. Duplications of two APC subunits were identified; *CDC27* and *APC13*. *PtCDC27_1* is located on linkage group VIII and *PtCDC27_2* on scaffold_211. Both are very similar to each other - 88% identity and 85% similarity for the amino-acid sequences. *APC13_1* is 95% identical to *APC13_2* and they are located on linkage groups IV and XI respectively. Poplar *CCS52* genes are closely related, suggesting a recent genomic duplication event. Linkage groups III and I and VIII and X share large megabase-blocks in complete co-linearity. *PtCDC20_1* and *PtCDC20_3* are located in chromosomal regions that might represent paralog segments – linkage groups XIII and XIX. Other *CDC20* genes are located on linkage group XVI and scaffold_1538. The scattered distribution of APC/activators is in good agreement with previous studies that described large-scale duplication events in poplar (Tuskan et al., 2006)

Phylogenetic analysis of APC TPRs subunits and activators proteins

An important question is why the APC is composed of many different subunits, while most E3 ligases are composed of one to three subunits. Most of the APC subunits are conserved in all eukaryotes and remain tightly associated throughout the cell cycle (van Leuken et al., 2008; Peters, 2006). It seems probable that the complexity of multiprotein domains is related to the intricate topology of APC (Jin et al, 2008; Herzog et al, 2009). One important domain in the APC subunits is TPR. The TPR domain consists of 3–16 tandem repeats of 34 amino-acids residues, although individual TPR domains can be dispersed in the protein sequence

(Blatch and Lásle, 1999). TPRs appear to act as versatile protein-protein interaction domains and it has been hypothesized that the TPR-containing proteins in the APC form a scaffold on which the other subunits assemble (D'Andrea et al., 2003). Five APC subunits contain TPR domains: CDC27, APC5, CDC16, APC7 and CDC23. TPR-containing sequences of primitive red algae *Cyanidioschyzon merolae*; green algae *Volvox carteri*, *Chlorella sp.*, *Micromonas sp* and *Ostreococcus sp*; the bryophyte *Physcomitrella patens*; the lycophyte *Selaginella moellendorffii*; the land plants *Vitis vinifera* and *Sorghum bicolor*, and the poplar, rice and Arabidopsis sequences were used to gain insight into the evolutionary relationship between land plants and algae. The phylogenetic tree was constructed with the MEGA4 neighbor-joining method, employing multiple alignments of 15 *CDC27*, 11 *APC5*, 12 *CDC16*, 9 *APC7* and 14 *CDC23* genes, with bootstrap analysis of 2,000 replicates to ensure statistical reliability (Fig. 2). Subsequently, the 61 APC subunits were divided into five phylogenetic groups of ortholog genes. The cladogram obtained shows the *OsCDC23* genes in the same branch, located in the same group as *S. bicolor*. Grapevine *CDC23* genes are in the same group as poplar. The cladogram also shows that the poplar and grapevine genes are in the same branches in every group, and this could reveal slow evolutionary rates in woody plants when compared with herbaceous plants. On the other hand, while Arabidopsis *CDC27a* is in the same group of *CDC27b*, it is in a separate branch, and sequence divergence and evolution may reflect the accelerated life cycle of this plant. Interestingly, the *APC5* and *CDC16* clades do not contain duplicated genes. We have not identified an *APC5* sequence in red algae *C. merolae*; however, this subunit sequence is not so well conserved among different organisms, and it is possible that the similarity is too low to be identified by BLAST comparison.

The *APC7* gene is absent in green algae *Chlorella sp* and *V. carteri*, as well as in the red alga *C. merolae*, but it is present in green algae *Ostreococcus sp* and *Micromonas sp*. Chlorophytes (e.g., *V. carteri*) and Trebouxiophytes (e.g., *Chlorella sp*) have apparently lost the *APC7* gene, but the Prasinophytes (e.g., *Ostreococcus sp*, *Micromonas sp*) and land plants retain this TPR subunit. These data also suggest that the primitive ancestor of Chlorophyceae and Trebouxiophyceae classes lost *APC7* gene during green algae evolution (Supplemental Fig. S7). The *APC7* gene is also not found in the yeasts, and it could mean that it is not required for APC function in unicellular organisms and it could be a recent duplication of another TPR subunit.

The Arabidopsis genome codes for six *CDC20* genes and three *CCS52* genes. In addition, *CCS52* genes have been divided into two types (A and B) on the basis of function and sequence analysis (Fülop et al., 2005). To gain an understanding of the evolutionary relationship between activators from land plants and algae, phylogenetic analysis was performed for activators from plants and algae genomes (Fig. 3). We used EST sequences from *Zea mays*, *Medicago truncatula* and *Saccharum officinarum* to better estimate divergence of monocot and dicot sequences. The phylogenetic tree reveals three major class groups. Three genes, *CmCDC20*, *CmCCS52* and *SmCDC20_3*, are isolated from the others and thus need to be treated as unconserved sequences. One clade groups all *CDC20* sequences (except *CmCDC20* and *SmCDC20_3*), while two other clades included the *CCS52A* and *CCS52B* sequences (except *CmCCS52*). The *CDC20* clade is divided into two subfamilies: one with *S. moellendorfi* and *P. patens* and another with algae and land plants. The number of *CDC20* copies varies according to species. Arabidopsis has 6 copies, rice 3, poplar 5, grapevine 4, sorghum 3, *S. moellendorfi* 3 and *P. patens* 4. The *CCS52A* clade contains more duplications than the *CCS52B* clade. All algae *CCS52* genes, two copies of *PtCCS52A*, *AtCCS52A* and *SmCCS52*, and three copies of *PpCCS52* genes grouped into the *CCS52A* branch.

Curiously, only one copy of the *CDC20* and *CCS52* (possibly a primitive A-type) genes was found in algae genomes. The absence of *CCS52B* type genes in algae, *P. patens* and *S. moellendorfi* is interesting because these species are at the base of plant evolution where divergence into A-type and B-type has not occurred yet. Like Arabidopsis, poplar has two copies of *CCS52A*; however poplar has an additional copy of *CCS52B*. Analyses of poplar gene evolution must take into account the most significant event in the recent evolution of the genus: a genome-wide duplication event that occurred approximately 65Mya and is still detectable over approximately 92% of the genome (Tuskan et al., 2006). Based on the age estimates of duplicate genes and homology microsynteny analysis, *CDC20* and *CCS52* gene pairs are represented within segmental duplication regions associated with the recent salicoid duplication event.

Comparison of Arabidopsis, rice and poplar TPRs proteins and determination of orthology relationships

Progress in comparative genomics allows assessing the impact of genome evolution and gene evolution on the appearance of novel biological functions and their effect on organismic

complexity (Patthy, 2003). The importance of gene duplication in supplying raw genetic material for biological evolution has been recognized for decades and is still extensively studied. Gene duplication generates functional redundancy, which allows two identical genes resulting from the duplication to accumulate mutations with relaxed selection pressure (Zhang, 2003; Babushok et al., 2007). Differentiated or novel function may be achieved after a period of evolution. Segmental duplication (tandem duplication of a genomic segment) is the most prevalent way to generate redundant genes (Lynch and Conery, 2000). Segmental duplication can also happen on a smaller scale, resulting in duplicated exons, rather than an entire gene (Moore et al., 2008). These segmental duplication blocks can create protein fragments (referred to as domain) that have structure and function (Vogel et al., 2005).

The TPR domain consists of a 34-residue repeat that adopts a helix-turn-helix conformation, which is associated with protein-protein interactions (Wilson et al, 2005). The subunits CDC27, APC5, CDC16, APC7 and CDC23 have TPR domains, but the total number of TPR repeats and the position in each sequence is variable. Exon shuffling may be responsible for internal duplications in repeats and we decided to investigate the exon-intron organization of TPR genes in Arabidopsis, rice and poplar (Fig. 4A) (Schmidt et al., 2007). The number and position of exons and introns in the genomic sequences are remarkably conserved in some of the APC subunit genes. The CDC27 gene has two homologs in Arabidopsis and poplar, and only one in rice. Interestingly, the CDC27 gene maintains 16 exons in monocot and dicots. The APC5 and APC7 genes have one copy in all genomes and also maintain 20 and 18 exons respectively, in the three genomes. On the other hand, the CDC23 gene has two homologs in rice and only one in Arabidopsis and poplar, but the most significant information is the lower number of exons when compared with other TPR-containing genes. The *OsCDC23_2* has 6 exons and *AtCDC23*, *PtCDC23* and *OsCDC23_1* have 4 exons. Examining the CDC16 gene we identify 15 exons in poplar, 16 exons in Arabidopsis and 17 exons in rice. We next compared the exon organization of all TPR genes from Arabidopsis using domain prediction. Nine TPR repeat sequences were identified in *AtCDC27a* and *AtCDC16* sequences, two in *AtAPC5* and ten in the *AtAPC7* and *AtCDC23* sequences (Fig. 4B). *AtCDC27b* has the same number of domains as *AtCDC27a*. Tandem arrangement of TPR domains occurs predominantly at the C-terminal of *AtCDC27a*, *AtCDC27b*, *AtCDC16*, *AtAPC7* and *AtCDC23* sequences. *AtAPC5* has only two TPR domains, one in the middle of the sequence and another at the C-terminal. The results show that TPR tandem repeat topology on protein sequences is at least partially related with the exon organization of TPR subunit genes.

In the APC subunits, the tandem arrangement of TPR domains suggests that the elements evolved by duplication followed by primary sequence divergence. Because TPR are conserved structure repeat elements which are often divergent at the primary sequence level, TPR domain sequences can diverge a great deal over time and have poor consensus motifs. An approach to investigate the evolution of TPR domains in the subunits is to identify patterns of TPR duplication from the alignments. Distinct patterns of repetition can often be distinguished, and we tested whether the Arabidopsis TPR proteins have defined internal repetition blocks. The sequences of TPR proteins were aligned to each other or in pairs using the methodology described in Björklund et al., (2006). The pairwise sequence similarities between all repeating domains in a protein were examined using the Smith-Waterman algorithm to identify patterns of duplication from the alignments (Rice et al., 2000). The alignment scores between the domains were displayed in a matrix (Fig. 4C and in Supplemental Fig. S8). Comparing the proteins to themselves, there are similarities among domains 4-6 in *AtCDC27*; and among domains 5-9 in *AtCDC16*. *AtAPC7* has a pattern for domains 1-2, *AtCDC23* has patterns of similarities for domains 6-8; and no pattern was found to for *AtAPC5*. Comparing the proteins in pairs, we can observe a diagonal match between *AtCDC27* domains 2-6 and *AtCDC23* domains 3-7. There are also indications of similarities for the pairs *AtCDC27* and *AtCDC16*, *AtCDC16* and *AtCDC23*. Although there are no unambiguous duplication patterns for any of the proteins, the results suggest that TPR domains in the APC genes have evolved by duplication of the central elements, or that higher constraints are imposed to changes in the primary sequence of these repeats.

Expression analysis of APC subunits and activators genes

Gene duplication can be a source of innovation for the increased developmental complexity of plants. Expression patterns can provide important clues for gene function under specific conditions. We examined the expression of the APC subunit and activators genes in 5-day old rice roots and shoots, and in sheath and blade of mature tissues (Fig.5A). As expected, there are higher levels of gene expression in tissues with high proliferation rates, although there is more mRNA in shoots than in roots. However, a complex pattern is observed when their expression is examined in mature blade. In general, there is a general decrease in expression for several genes, as expected. However, the degree of reduction is variable and could reflect specialization of subunits and or activators. Levels of *APC1*, *APC2*, *APC4*,

APC5, *CDC16*, *CDC23_2*, *APC10*, *APC11_2*, *CDC26*, and *APC13* mRNA levels are reduced in both sheath and blade compared to aerial part. On the other hand, *APC11_2* and *CDC27* mRNA levels are reduced only in the sheath, but not in the blade. Finally, there is no reduction of *APC7* mRNA levels in both sheath and blade. In contrast, expression levels of activator genes are markedly reduced in mature leaves. However, although *CCS52A* mRNA levels are lower in both sheath and blade, the diminution is less pronounced. In *Medicago*, the *CCS52A* gene has been implicated in control of endoreduplication in nodules (Vinardell et al., 2003). Recently, the *CCS52A* gene is important for maintenance of meristem activity in roots of *Arabidopsis* (Vanstraelen et al., 2009). Therefore, it is possible that the *CCS52A* could form a specialized complex with some of the APC subunits and assume a unique function in mature leaves.

Growth response to dark is part of an integrated developmental change throughout all the plant organs (Desnos et al., 1996). In *Arabidopsis*, hypocotyl cells undergo up to two rounds of endoreduplication in light-grown seedlings, whereas an additional round can be observed specifically during dark-grown development (Galbraith et al., 1991; Gendreau et al., 1997). The endoreduplication regulatory mechanism is thought to be common to the G₁-S transition of the mitotic cell cycle (Edgar et al., 2001). G₁-S transition is important for CDK inactivation by cyclin proteolysis, mediated by APC^{CDH1}, which then maintains cyclin instability in G₁ and enables a new round of DNA replication by allowing the assembly of pre-replication complex (pre-RCs) (Diffley, 2004). Almost all rice APC subunits have similar expression patterns, both in roots and shoots (Fig. 5B). However, *OsAPC11_1* and *OsCDC26* mRNA levels increased in darkness. Interestingly, the two *OsCDC23* genes are differentially expressed in etiolated roots. While, *OsCDC23_1* mRNA levels do not change in roots grown in the dark or light, *OsCDC23_2* mRNA in roots is much lower when rice plants are grown in the dark. Similarly, in etiolated roots *OsAPC11_1* mRNA levels increased while *OsAPC11_2* levels decreased. These results suggest that, following gene duplication, the APC11 and CDC23 genes assumed specialized functions in rice.

The activators *OsCCS52A* and *OsCCS52B* exhibited high levels of mRNA in darkness and *OsCDC20_3* showed a lower level. One hypothesis for the high mRNA levels of *CCS52* genes is that the APC^{CCS52} acts as a negative regulator of CYCA2;3/CDKA;1 complex in *Arabidopsis* (Imai et al., 2006). The CYCA2;3/CDKA;1 complex acts as a negative regulator of endocycle and the APC activation by *CCS52* may increase CYCA2;3 degradation and consequently the progression of endocycle in darkness (Imai et al., 2006).

We analyzed the expression in leaves of *PtAPC10*, *PtCDC27_1*, *PtCDC20_1*, *PtCCS52A1_1* and *PtCCS52B* genes by real-time RT-PCR (Supplemental Fig. S1). Interestingly, *PtCCS52B* exhibited lower mRNA levels compared with *PtCCS52A1_1*. Recent data suggest that the *MtCCS52B* may have specific roles in M-phase progression, alternative or complementary to those of *MtCCS52A* (Tarayre et al., 2004). Thus, *CCS52A* might have major roles in post-mitotic, differentiating cells, in which degradation of specific APC targets could contribute to differentiation of given cell types, tissues, or organs (Kondorosi and Kondorosi, 2004).

CONCLUSION

Through genome-wide bioinformatics analyses of the complete genomes of Arabidopsis, rice and poplar, we identified ortholog genes of APC subunits and activators. In addition, their occurrence was demonstrated in algae, bryophyte and other monocotyledonous and dicotyledonous species as well. A distinctive feature of these genomes is the presence of characteristic duplication patterns (Supplemental table SI). In Arabidopsis, only the *CDC27* gene is duplicated. Rice and poplar have two duplicated subunits, *CDC23-APC11* and *CDC27-APC13* respectively. Among other plant genomes, grape and *P. patens* have two copies of the *CDC23* and *CDC27* genes, respectively, and grape has two copies of the *APC13* gene. The two isoforms of *CDC23* and *APC11* genes in rice are differentially expressed in light- and dark grown plants. In Arabidopsis, the duplicated copies of the *CDC27* gene exhibit significant sequence differences, and seem to have assumed specialized functions, indicative of the occurrence of APC subcomplexes (Pérez-Pérez et al., 2007). While the coding sequences of the rice genes are quite conserved, it is possible that their controlling elements have diverged and that they are assuming new functions in the APC during plant development. Paralogs usually display different functions, whereas orthologs may retain the same function (Tatusov et al., 1997). As in yeasts, *APC7* is not present in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*, *V. carteri* and *Chlorella spp.* The absence of this subunit at the root of animal and land-plant evolution suggests that this subunit may have appeared after a gene duplication event in a TPR-containing subunit gene, and it may not be essential for APC activity in unicellular organisms. Curiously, it might be the case also in later metazoans, once *Drosophila APC7* knocked down flies and null mutants are viable and fertile (Pál et al., 2007).

The activators CDC20 and CCS52 have many copies in plants. This is in sharp contrast with the situation in metazoans, where only one copy of each regulator is present per genome. Due to the duplications, Arabidopsis contains three CCS52 activators; CCS52A, CCS52A1 and CCS52B. In addition, six CDC20 genes were found, but AtCDC20_6 is probably a pseudogene because the important motif KEN-box is absent (Pfleger and Kirschner, 2000; Burton and Solomon, 2001; Castro et al., 2003). In poplar, the CCS52A and CCS52B genes are also duplicated. Five CDC20 genes are present in poplar, the same number found in Arabidopsis. Interestingly, rice contains one copy of the CCS52A and CCS52B genes; and three copies of CDC20 genes. This suggests that the duplication of the CCS52 genes occurred in dicotyledonous plants after the separation from monocotyledons. Recent duplication of the CDC20 genes has occurred also in Arabidopsis and poplar.

Plants can adopt dramatically different alternative developmental pathways and must integrate cell-cycle progression, growth and development in response to environmental cues. It is believed that multiple members of a specific gene family of a particular organism are the natural products generated from the long evolutionary history that the organism experienced (Moore and Purugganan, 2005). The number of members of a gene family reflects a succession of genomic rearrangements and expansions due to extensive duplication and diversification that occurred in the course of evolution. Phylogenetic analysis of the APC subunits and activator proteins is very illuminating. The fact that all subunit types except APC7, were found in all plant genomes analyzed, including red algae, green algae and other primitive organisms, suggests that the complete set of genes encoding the APC subunits was already present in the common ancestor of plants and animals. The activators descend from a common ancestor and correspond to well-conserved structures. In all algae species analyzed, there is only one copy of CDC20 and CCS52 genes. Land plants have amplified the number of activators and this fact may be associated with substrate specificity and or with the complexity of their developmental programs.

By comparing the similarity between different TPR domains within one protein it might be possible to trace the evolutionary history of the internal duplications. The alignment scores between domains showed limited similarities among TPR subunits of AtCDC27, AtCDC16, AtAPC7, AtCDC23 and AtAPC5. The sequence of TPR subunits can diverge a great deal over time and they have poor consensus motifs, and therefore it was not possible to detect unambiguous duplication patterns for any of the proteins. Nevertheless pairwise comparisons indicated greater similarity for the central domains, especially between CDC27 and CDC23,

CDC27 and CDC16, and CDC23 and CDC16. In all cases, the similarity scores between TPR subunits 4 in CDC16 and CDC27, and TPR subunit 5 in CDC23 are higher, suggesting that the TPR tandem evolution most likely started from the middle domains. Because the primary amino acid sequence of TPR subunits tends to diverge, the higher degree of similarity among the central subunits may also indicate that stronger evolutionary constraints are applied to these regions.

Previously, we have shown that the Arabidopsis subunit genes are differentially expressed according to whether the plants are grown in the dark or under light. When Arabidopsis plants were grown in the dark, only *AtAPC1*, *AtAPC2* and *AtCDC16* increased mRNA levels (Eloy et al., 2006). However, real-time RT-PCR expression profiles of rice APC and activator genes showed spatial modulation of gene expression of the duplicated subunit genes in different tissues (root and aerial parts) of plants grown under different light treatment. *OsAPC11_1* mRNA accumulates to higher levels in etiolated roots when compared with *OsAPC11_2* mRNA, and *OsCDC23_1* mRNA is present in etiolated roots at almost twice the levels of *OsCDC23_2*. These data suggest that the duplicated rice APC subunits could participate in different APC subcomplexes and that they may have assumed new specialized functions as they diverged during evolution.

Most E3 ligases are composed by one to two polypeptides (Graig et al., 2009). In contrast, the cell cycle regulators SCF and APC are formed by a larger number of subunits. However, for both complexes, biochemical activity can be achieved by only two subunits, a Cullin related proteins together with a RING finger protein. In both cases, substrate specificity is defined by the adaptor subunit. The human genome contains 69 F-Box proteins – the SCF activator - and 2 APC activators, CDH1 and CDC20 (Frescas and Pagano, 2008; Pesin and Orr-Weaver, 2008). In plants, SCF-related complexes are involved in many physiological processes and approximately 700 F-box proteins have been identified in Arabidopsis (Cagne et al., 2002). The number of APC activators have also suffered an expansion in the higher plant lineages, though a more modest one, the number varying from 9 in poplar and Arabidopsis to 6 in rice. We and others have shown that differential expression of APC subunits could be a source of complexity in regulation of the APC (Eloy et al, 2006, Perez Perez et al., 2008). The results present here suggest that gene duplication, followed by sequence divergence and differential expression, could be that another tier of regulation of ubiquitin-mediated proteolysis mediated by specific APC complexes composed by particular subunit isoforms. Future studies employing functional genomics approaches will be required

to define the impact of duplications or splicing variants on cell-cycle progression at the cellular level and the associated plant developmental processes at the whole-organism level.

MATERIALS AND METHODS

Gene Identification and Chromosomal Location

Searching of multiple databases was performed to find members of APC, CDC20 and CCS52 in Arabidopsis, rice and polar. The strategy to obtain each gene in a genome was the following; Arabidopsis sequences have been published (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), but additional searches were carried out against the TAIR8 database (<http://www.arabidopsis.org>). The sequences obtained were then used as queries to search against the following databases: *Oryza sativa* L. cv. Nipponbare - The Institute for Genomic Research (TIGR) (<http://rice.plantbiology.msu.edu>), *Populus trichocarpa* Nisqually-1 - DOE Join Genome Institute (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html), *Sorghum bicolor* BTx623 - DOE Join Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/Sorbi1/Sorbi1.home.html>), *Vitis Vinifera* PN40024 - Genoscope (http://www.genoscope.cns.fr/cgi-bin/blast_server/projet_ML/blast.pl), *Ostreococcus* sp RCC809 - DOE Join Genome Institute (http://genome.jgi-psf.org/OstRCC809_1/OstRCC809_1.home.html), *Volvox carteri* - DOE Join Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/Volca1/Volca1.home.html>), *Chlorella* sp. NC64A - DOE Join Genome Institute (http://genome.jgi-psf.org/ChINC64A_1/ChINC64A_1.home.html) *Micromonas* sp NOUM17 (RCC299) - DOE Join Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/MicpuN3/MicpuN3.home.html>), *Physcomitrella patens* - DOE Join Genome Institute (http://genome.jgi-psf.org/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html), *Selaginella moellendorffii* - DOE Join Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org/Selmo1/Selmo1.home.html>) and *Cyanidioschyzon merolae* (<http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp>) databases using the BLASTP and TBLASTN programs. In addition, Arabidopsis APC and activator sequences were used to search against *Zea mays*, *Medicago truncatula* and *Saccharum officinarum* EST databases at Gene Index DFCI (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>). Chromosomal locations of APC subunits and CDC20/CCS52 genes were obtained using the BLAST server and additional physical localization tools of each genomic browser.

Identification of Protein Domains

The SMART database (<http://smart.embl-heidelberg.de>) was used to confirm whether each predicted proteins sequence maintains conserved domains and motifs. The TPRpred

(<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/tpred>) search program was used to confirm the TPR domain in specific sequences (Karpenahalli et al., 2007).

Phylogenetic Analysis

Phylogenetic analysis of TPR subunits and activators CDC20 and CCS52 was carried out using the Neighbor-Joining method in the Molecular Evolutionary Genetics Analysis software package - MEGA4 (Tamura et al., 2007). Alignment for tree construction was done using ClustalW with the Gonnet scoring matrix. Reliability of the obtained trees was tested using bootstrapping with 2,000 replicates.

Exon-intron and TPR Domain

Exon-intron information was obtained from TAIR, TIGR and JGI databases. The sequences of the repeating domains were extracted and aligned to each other using the Smith-Waterman alignment tool in the EMBOSS package and default parameters (Rice et al., 2000; Björklund et al., 2006). This gave pairwise alignment scores between all individual domains in a repeat (Figure 4 and supplemental S8).

Plant Materials

Rice seeds (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) were disinfected with 5% sodium hypochlorite for 20 min and thoroughly washed with water. For darkness treatment, seedlings were grown hydroponically (0.5X Hoagland's solution) in a greenhouse at 25–28°C for 2 weeks. The control group was grown with a photoperiod of 12 h light/ 12 h dark and the etiolated group was grown in darkness. For auxin treatment, seedlings were grown in Petri dishes (0.5X Hoagland's solution agar) in the greenhouse at 25–28°C for 2 weeks. Seedlings were transferred to new Petri dishes and incubated for 2 and 8 h in either water or 2 µM NAA solution. Harvested seedlings were frozen in liquid nitrogen immediately and stored at -70°C until RNA isolation. Leaf poplar RNA was provided by Rodrigo T. Lourenço (Forest Biotechnology Group, North Carolina State University).

Gene Expression Analysis

Oryza sativa japonica subspecies was used to prepare all generic material. Total RNA was extracted from materials according to Longemann et al. (1987). After treatment with RNase-free DNase I (0.5u/µg RNA), total RNA (2.5µg) was transcribed using random hexamer primers according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). The cDNA was amplified using Taqman® Reverse Transcription Reagent kit (Perkin-Elmer Applied Biosystem) on the GeneAmp 9700 thermocycler (Applied Biosystems) under standard conditions. Transcript levels were determined by qRT-PCR using

a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). For poplar gene expression analysis, cDNA synthesis and qRT-PCR were performed as described for rice. The data were first normalized to the level of expression of *Os28S*, *OsActin* and *PtActin* for each RNA sample. Primers used for real-time RT-PCR were designed in gene specific region using Primer Express V3.0. Gene primer sequences used in the qRT-PCR analysis are listed: *Os28S* forward (F) 5' GCGAAGCCAGAGGAAACT 3', *Os28S* reverse (R) 5'GACGAACGATTTGCACGTC 3', *OsActin* F 5' CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA 3', *OsActin* R 5' CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA 3', *OsAPC1F* 5' CTTGAGCTCTGCTTGCATCT 3', *OsAPC1* R 5' GCTTACAGCCATCTGCAGTC 3', *OsAPC2* F 5' AATGCTGGGGACAATCTTCT 3', *OsAPC2* R 5' TAATGGGTCTGCTTCCACAG 3', *OsCDC27* F 5' AGCGACTTGCTACCTTCAACA 3', *OsCDC27* R 5' TTGACAGGACACAAGGCTTC 3', *OsAPC4* F 5' CGACAAGGATGGCCTGTTAT 3', *OsAPC4* R 5' GAAGCGCTTGAAAATTCCTG 3', *OsAPC5* F 5' TTCGTTGGTCTATGCAACCT 3', *OsAPC5* R 5' AACGGGAACCTTCTCTTCAGC 3', *OsCDC16* F 5' ACAGGAGGAGGGTGATCAAG 3', *OsCDC16* R 5' GATTTTGCTTGCGTGAAGAA 3', *OsAPC7* F 5' AGACTTCAGGGGAGCTCAAG 3', *OsAPC7* R 5' TTGAGAGCTTTTGCAGACTGA 3', *OsCDC23_1* F 5' CGCTGAAGCTTAATCGAAAGT 3', *OsCDC23_2* R 5' GACCAAGACCATACCAAGCA 3', *OsCDC23_2* F 5' CAGTTCTGGTGGAAATCTGTCA 3', *OsCDC23_2* R 5' CAAGATGTGCACTAGCAAGGA 3', *OsAPC10* F 5' TGATCCCCGAGAAACATTC 3', *OsAPC10* R 5' GAAGTGAAGTGAATGGCTGAT 3', *OsAPC11_1* F 5' CCAGGATGAAACCTGTGGTA 3', *OsAPC11_1* R 5' GTTTGAGAATTGACCCACTTGA 3', *OsAPC11_2* F 5' AAACATGCGGCATATGCA 3', *OsAPC11_2* R 5' AAGTGGCGTAGATGTCTGAGAA 3', *OsCDC26* F 5' ATCGGCCTCCCTACCAT 3', *OsCDC26* R 5' GAGGAGAGGCTAGGGTTTGG 3', *OsAPC13* F 5' TTGTGCTGGTTGGCTTTC 3', *OsAPC13* R 5' CGTCCTCATCGACATCGT 3', *OsCDC20_1* F 5' ATGATCGGTGCATCAGGTT 3', *OsCDC20_1* R 5' GGCAAAGAACACGAGCAGT 3', *OsCDC20_2* F 5' CCTGTCCGGAATAAACCTGT 3', *OsCDC20_2* R 5' CACTCGATCTCATCGGAGAA 3', *OsCDC20_3* F 5' TTCACATTTGGGATGTGTCC 3', *OsCDC20_3* R 5' TACCACCACCTCCAGTTGC 3', *OsCCS52A* F 5' GCCCCAGGAAGATCCCTA 3', *OsCCS52A* R 5' TGCTGCATGCATTCCATAA 3', *OsCCS52B* F 5' GTCACCAAGCTCTGCGATT 3', *OsCCS52B* R 5' TCCTCCCATGTTCCCTAATCC 3', *PtActin* F 5' GGTC AAGGCTGGGTTTGGCT 3', *PtActin* R 5' TCGCCAACATAGGCATCTTTT 3', *PtAPC10* F 5' ATGACCCTAGGGAAACATTT 3', *PtAPC10* R 5' AAAAGGCTGATGCGGAAAAG 3', *PtCDC27_1* F 5' TGGCCTTCCAAACCTGTCAT 3', *PtCDC27_1* R 5' GGCATGCTAAGATTGGAACCA 3', *PtCDC27_2* F 5' AGCCGGATGTTATTTGCAAAA 3', *PtCDC27_2* R 5' ATGCCGCTTCAGCTTCATTT 3', *PtCDC20_1* F 5' TTTATTCCAAACCGGTCAGC 3', *PtCDC20_2* R 5' TCGGTTTCATGTTCAAGGATTC 3', *PtCCS52A* F 5' TTCCCCCTCGAGACCTATTT 3', *PtCCS52A* R 5' CATTGGGATTGTCCTCCTTC 3', *PtCCS52B* F 5' CGTATCATCACCCAGAGCAA 3', *PtCCS52B* R 5' TCGTTGCCTCCTTCTTTAACA 3'. Data were analyzed using 7500 SDS software V1.4 (Applied Biosystems).

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure S1. *PtCDC27_2* sequencing and poplar genes expression.

Supplemental Figure S2. OsAPC1 EST.

Supplemental Figure S3. OsAPC4, PtAPC4 and AtAPC4; OsAPC5, PtAPC5 and AtAPC5 sequence alignments.

Supplemental Figure S4. OsCDC16 and OsAPC11_2 N-terminal regions.

Supplemental Figure S5. *AtCDC20_6* sequencing.

Supplemental Figure S6. Activator alignments.

Supplemental Figure S7. Green algae phylogenetic tree.

Supplemental Figure S8. TPR matrices.

Supplemental Table SI. APC subunits copies in plants.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Dr. Martha Sorenson for critical reading of the manuscript and Rodrigo T. Lourenço for providing the poplar RNA samples. We are also thankful to Cropdesign (Belgium) for technical training. M.F.L. is indebted to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) and BELSPO (Belgian Science Policy) for graduate and postdoctoral fellowships. P.C.G.F and A.S.H receive support from CNPq research grants.

LITERATURE CITED

Babushok D.V., Ostertag E.M., Kazazian H.H. Jr. (2007). Current topics in genome evolution: molecular mechanisms of new gene formation. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 542-554.

Baker D.J., Dawlaty M.M., Galardy P., van Deursen J.M. (2007). Mitotic regulation of the anaphase-promoting complex. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 589-600.

Björklund A.K., Ekman D., Elofsson A. (2006). Expansion of protein domain repeats. *PLoS Comput. Biol.* **2**, e114.

Blanc G., Hokamp K., Wolfe K.H. (2003) A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the Arabidopsis genome. *Genome Res.* **13**, 137-144.

Blatch G.L., Lässle M. (1999). *The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions.* *Bioessays* **21**, 932-939.

Bliou I., Frugier F., Folmer S., Serralbo O., Willemsen V., Wolkenfelt H., Eloy N.B., Ferreira P.C., Weisbeek P., Scheres B. (2002). The Arabidopsis HOBBIT gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes Dev.* **16**, 2566-2575.

Burton J.L., Solomon M.J. (2001) D box and KEN box motifs in budding yeast Hsl1p are required for APC-mediated degradation and direct binding to Cdc20p and Cdh1p. *Genes Dev.* **15**, 2381-2395.

Gagne J.M., Downes B.P., Shiu S.H., Durski A.M., Vierstra R.D. (2002) The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**, 11519-11524

Capron A., Okrész L., Genschik P. (2003). First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin-protein ligase. *Trends Plant Sci.* **8**, 83-89.

Carroll C.W., Morgan D.O. (2002). The Doc1 subunit is a processivity factor for the anaphase-promoting complex. *Nat. Cell. Biol.* **4**, 880-887

Castro A., Vigneron S., Bernis C., Labbé J.C., Lorca T. (2003) Xkid is degraded in a D-box, KEN-box, and A-box-independent pathway. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4126-4138.

Ciechanover A., Heller H., Katz-Etzion R., Hershko A. (1981). Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **78**, 761-765.

Cui L., Wall P.K., Leebens-Mack J.H., Lindsay B.G., Soltis D.E., Doyle J.J., Soltis P.S., Carlson J.E., Arumuganathan K., Barakat A., Albert V.A., Ma H., dePamphilis C.W. (2006). Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Res.* **16**, 738-749.

D'Andrea L.D., Regan L. (2003). TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 655-662.

den Elzen N., Pines J. (2001). Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J. Cell Biol.* **153**, 121-136.

Desnos T., Orbović V., Bellini C., Kronenberger J., Caboche M., Traas J., Höfte H. (1996). Procuste1 mutants identify two distinct genetic pathways controlling hypocotyl cell elongation, respectively in dark- and light-grown Arabidopsis seedlings. *Development* **122**, 683-693.

Diffley J.F. (2004). Regulation of early events in chromosome replication. *Curr. Biol.* **14**, R778-786.

Edgar B.A., Orr-Weaver T.L. (2001). Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* **105**, 297-306.

Eloy N.B., Coppens F., Beemster G.T., Hemerly A.S., Ferreira P.C. (2006). The Arabidopsis anaphase promoting complex (APC): regulation through subunit availability in plant tissues. *Cell Cycle* **5**, 1957-1965.

Fülöp K., Tarayre S., Kelemen Z., Horváth G., Kevei Z., Nikovics K., Bakó L., Brown S., Kondorosi A., Kondorosi E. (2005). Arabidopsis anaphase-promoting complexes: multiple activators and wide range of substrates might keep APC perpetually busy. *Cell Cycle* **4**, 1084-1092.

Furuno N., den Elzen N., Pines J. (1999). *Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase.* *J. Cell. Biol.* **147**, 295-306.

Galbraith D.W., Harkins K.R., Knapp S. (1991). Systemic endopolyploidy in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* **96**, 985-989.

Gendreau E., Traas J., Desnos T., Grandjean O., Caboche M., Höfte H. (1997). Cellular basis of hypocotyl growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* **114**, 295-305.

Glotzer M., Murray A.W., Kirschner M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138.

Gmachl M., Gieffers C., Podtelejnikov A.V., Mann M., Peters J.M. (2000). The RING-H2 finger protein APC11 and the E2 enzyme UBC4 are sufficient to ubiquitinate substrates of the anaphase-promoting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 8973-8978.

Goff S.A., Ricke D., Lan T.H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H., Hadley D., Hutchison D., Martin C., Katagiri F., Lange B.M., Moughamer T., Xia Y., Budworth P., Zhong J., Miguel T., Paszkowski U., Zhang S., Colbert M., Sun W.L., Chen L., Cooper B., Park S., Wood T.C., Mao L., Quail P., Wing R., Dean R., Yu Y., Zharkikh A., Shen R., Sahasrabudhe S., Thomas A., Cannings R., Gutin A., Pruss D., Reid J., Tavtigian S., Mitchell J., Eldredge G., Scholl T., Miller R.M., Bhatnagar S., Adey N., Rubano T., Tusneem N., Robinson R., Feldhaus J., Macalma T., Oliphant A., Briggs S. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* **296**, 92-100.

Gong D., Pomerening J.R., Myers J.W., Gustavsson C., Jones J.T., Hahn A.T., Meyer T., Ferrell J.E. Jr. (2007). Cyclin A2 regulates nuclear-envelope breakdown and the nuclear accumulation of cyclin B1. *Curr. Biol.* **17**, 85-91.

Graig A., Ewan R., Mesmar J., Gudipati V., Sadanandom A. (2009) E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. *J. Exp. Bot.* **60**, 1123-1132

Hershko A., Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479.

Hershko A., Heller H., Elias S., Ciechanover A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* **258**, 8206-8214.

Herzog F., Primorac I., Dube P., Lenart P., Sander B., Mechtler K., Stark H., Peters J.M. (2009). Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex. *Science* **323**, 1477-1481.

Imai K.K., Ohashi Y., Tsuge T., Yoshizumi T., Matsui M., Oka A., Aoyama T. (2006). The A-type cyclin CYCA2;3 is a key regulator of ploidy levels in Arabidopsis endoreduplication. *Plant Cell* **18**, 382-396.

Irniger S., Piatti S., Michaelis C., Nasmyth K. (1995). Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* **81**, 269-278

Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A., Legeai F., Huguency P., Dasilva C., Horner D., Mica E., Jublot D., Poulain J., Bruyère C., Billault A., Segurens B., Gouyvenoux M., Ugarte E., Cattonaro F., Anthouard V., Vico V., Del Fabbro C., Alaux M., Di Gaspero G., Dumas V., Felice N., Paillard S., Juman I., Moroldo M., Scalabrin S., Canaguier A., Le Clainche I., Malacrida G., Durand E., Pesole G., Laucou V., Chatelet P., Merdinoglu D., Delledonne M., Pezzotti M., Lecharny A., Scarpelli C., Artiguenave F., Pè M.E., Valle G., Morgante M., Caboche M., Adam-Blondon A.F., Weissenbach J., Quétier F., Wincker P.; French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**, 463-467.

Jansson S., Douglas C.J. (2007). Populus: a model system for plant biology. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 435-458.

Jeganathan K.B., Malureanu L., van Deursen J.M. (2005). The Rae1-Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation. *Nature* **438**, 1036-1039.

Jin L., Williamson A., Banerjee S., Philipp I., Rape M. (2008). Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell* **133**, 653-665.

- John P.C.L., Zhang K., Dong C., Diederich L., Wightman F.** (1993) p34cdc2 related proteins in control of cell cycle progression, the switch between division and differentiation in tissue development, and stimulation of division by auxin and cytokinin. *Aust. J. Plant Physiol.* **20**, 503–526
- Joubès J., Chevalier C., Dudits D., Heberle-Bors E., Inzé D., Umeda M., Renaudin J.P.** (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol Biol.* **43**, 607-620.
- Karpenahalli M.R., Lupas A.N., Söding J.** (2007). TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences. *BMC Bioinformatics* **3**, 8:2.
- Kim A.H., Bonni A.** (2007). Thinking within the D box: initial identification of Cdh1-APC substrates in the nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* **34**, 281-287.
- King R.W., Peters J.M., Tugendreich S., Rolfe M., Hieter P., Kirschner M.W.** (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* **81**, 279-288.
- Kondorosi E., Kondorosi A.** (2004). Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Lett.* **567**, 152-157.
- Kraft C., Vodermaier H.C., Maurer-Stroh S., Eisenhaber F., Peters J.M.** (2005). The WD40 propeller domain of Cdh1 functions as a destruction box receptor for APC/C substrates. *Mol. Cell.* **18**, 543-553.
- Kramer E.R., Scheuringer N., Podtelejnikov A.V., Mann M., Peters J.M.** (2000). Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1555-1569.
- Lamb J.R., Michaud W.A., Sikorski R.S., Hieter P.A.** (1994). *Cdc16p, Cdc23p and Cdc27p form a complex essential for mitosis. EMBO J.* **13**, 4321-4328.
- Lammens T., Boudolf V., Kheibarshekan L., Zalmas L.P., Gaamouche T., Maes S., Vanstraelen M., Kondorosi E., La Thangue N.B., Govaerts W., Inzé D., De Veylder L.** (2008). Atypical E2F activity restrains APC/CCCS52A2 function obligatory for endocycle onset. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **105**, 14721-14726.
- Leverson J.D., Joazeiro C.A., Page A.M., Huang H., Hieter P., Hunter T.** (2000). The APC11 RING-H2 finger mediates E2-dependent ubiquitination. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 2315-2325.
- Littlepage L.E., Ruderman J.V.** (2002). Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev.* **16**, 2274-2285.

Lynch M., Conery J.S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* **290**, 1151-1155.

Marrocco K., Thomann A., Parmentier Y., Genschik P., Criqui M.C. (2009). The APC/C E3 ligase remains active in most post-mitotic *Arabidopsis* cells and is required for proper vasculature development and organization. *Development* **136**, 1475-1485.

Masuda H.P., Ramos G.B., de Almeida-Engler J., Cabral L.M., Coqueiro V.M., Macrini C.M., Ferreira P.C., Hemery A.S. (2004). Genome based identification and analysis of the pre-replicative complex of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **574**, 192-202.

Menges M., Pavesi G., Morandini P., Bögre L., Murray J.A. (2007). Genomic organization and evolutionary conservation of plant D-type cyclins. *Plant Physiol.* **145**, 1558-1576.

Miller J.J., Summers M.K., Hansen D.V., Nachury M.V., Lehman N.L., Loktev A., Jackson P.K. (2006). Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes Dev.* **20**, 2410-2420.

Moore A.D., Björklund A.K., Ekman D., Bornberg-Bauer E., Elofsson A. (2008). Arrangements in the modular evolution of proteins. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 444-451.

Moore R.C., Purugganan M.D. (2005) The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 122-128

Mori Y., Yamamoto T., Sakaguchi N., Ishibashi T., Furukawa T., Kadota Y., Kuchitsu K., Hashimoto J., Kimura S., Sakaguchi K. (2005). Characterization of the origin recognition complex (ORC) from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.). *Gene* **353**, 23-30.

Nguyen H.G., Chinnappan D., Urano T., Ravid K. (2005). Mechanism of Aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: identification of an aneuploidy-promoting property. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4977-4992.

Page A.M., Aneliunas V., Lamb J.R., Hieter P. (2005). In vivo characterization of the nonessential budding yeast anaphase-promoting complex/cyclosome components Swm1p, Mnd2p and Apc9p. *Genetics* **170**, 1045-1062.

Pál M., Nagy O., Ménesi D., Udvardy A., Deák P. (2007). Structurally related TPR subunits contribute differently to the function of the anaphase-promoting complex in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Sci.* **120**, 3238-3248.

Passmore L.A., McCormack E.A., Au S.W., Paul A., Willison K.R., Harper J.W., Barford D. (2003). Doc1 mediates the activity of the anaphase-promoting complex by contributing to substrate recognition. *EMBO J.* **22**, 786-796.

Patthy L. (2003). Modular assembly of genes and the evolution of new functions. *Genetica* **118**, 217-231.

Pérez-Pérez J.M., Serralbo O., Vanstraelen M., González C., Criqui M.C., Genschik P., Kondorosi E., Scheres B. (2008). Specialization of CDC27 function in the Arabidopsis thaliana anaphase-promoting complex (APC/C). *Plant J.* **53**, 78-89.

Pesin J.A., Orr-Weaver T.L. (2008) Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **24**, 475-499.

Peters J.M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* **9**, 931-943.

Peters J.M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 644-656.

Pfleger C.M., Kirschner M.W. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* **14**, 655-665.

Reimann J.D., Freed E., Hsu J.Y., Kramer E.R., Peters J.M., Jackson P.K. (2001). Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* **105**, 645-655.

Rensing S.A., Lang D., Zimmer A.D., Terry A., Salamov A., Shapiro H., Nishiyama T., Perroud P.F., Lindquist E.A., Kamisugi Y., Tanahashi T., Sakakibara K., Fujita T., Oishi K., Shin-I T., Kuroki Y., Toyoda A., Suzuki Y., Hashimoto S., Yamaguchi K., Sugano S., Kohara Y., Fujiyama A., Anterola A., Aoki S., Ashton N., Barbazuk W.B., Barker E., Bennetzen J.L., Blankenship R., Cho S.H., Dutcher S.K., Estelle M., Fawcett J.A., Gundlach H., Hanada K., Heyl A., Hicks K.A., Hughes J., Lohr M., Mayer K., Melkozernov A., Murata T., Nelson D.R., Pils B., Prigge M., Reiss B., Renner T., Rombauts S., Rushton P.J., Sanderfoot A., Schween G., Shiu S.H., Stueber K., Theodoulou F.L., Tu H., Van de Peer Y., Verrier P.J., Waters E., Wood A., Yang L., Cove D., Cuming A.C., Hasebe M., Lucas S., Mishler B.D., Reski R., Grigoriev I.V., Quatrano R.S., Boore J.L. (2008). The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**, 64-69.

Rice P., Longden I., Bleasby A. (2000) EMBOSS: The European molecular biology open software suite. *Trends Genet.* **16**, 276-277.

- Robbens S., Khadaroo B., Camasses A., Derelle E., Ferraz C., Inzé D., Van de Peer Y., Moreau H.** (2005). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in the unicellular green alga *Ostreococcus tauri*. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 589-597.
- Schmidt E.E., Davies C.J.** (2007). The origins of polypeptide domains. *Bioessays* **29**, 262-270.
- Schranz M.E., Song B.H., Windsor A.J., Mitchell-Olds T.** (2007). Comparative genomics in the Brassicaceae: a family-wide perspective. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 168-175.
- Schultz J., Copley R.R., Doerks T., Ponting C.P., Bork P.** (2000) SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucl. Acids Res.* **28**, 231-234
- Schwab M., Neutzner M., Möcker D., Seufert W.** (2001). Yeast Hct1 recognizes the mitotic cyclin Clb2 and other substrates of the ubiquitin ligase APC. *EMBO J.* **20**, 5165-5175.
- Schwickart M., Havlis J., Habermann B., Bogdanova A., Camasses A., Oelschlaegel T., Shevchenko A., Zachariae W.** (2004). Swm1/Apc13 is an evolutionarily conserved subunit of the anaphase-promoting complex stabilizing the association of Cdc16 and Cdc27. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3562-3576.
- Serralbo O., Pérez-Pérez J.M., Heidstra R., Scheres B.** (2006). Non-cell-autonomous rescue of anaphase-promoting complex function revealed by mosaic analysis of HOBBIT, an Arabidopsis CDC27 homolog. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 13250-13255.
- Shultz R.W., Tatineni V.M., Hanley-Bowdoin L., Thompson W.F.** (2007). Genome-wide analysis of the core DNA replication machinery in the higher plants Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.* **144**, 1697-1714.
- Sterck L., Rombauts S., Vandepoele K., Rouzé P., Van de Peer Y.** (2007). How many genes are there in plants (... and why are they there)? *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 199-203.
- Sudakin V., Ganoth D., Dahan A., Heller H., Hershko J., Luca F.C., Ruderman J.V., Hershko A.** (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell.* **6**, 185-197.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596-1599.
- Tang Z., Li B., Bharadwaj R., Zhu H., Ozkan E., Hakala K., Deisenhofer J., Yu H.** (2001). APC2 Cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 3839-3851.

Tarayre S., Vinardell J.M., Cebolla A., Kondorosi A., Kondorosi E. (2004). Two classes of the CDh1-type activators of the anaphase-promoting complex in plants: novel functional domains and distinct regulation. *Plant Cell* **16**, 422-434.

The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815

Thornton B.R., Ng T.M., Matyskiela M.E., Carroll C.W., Morgan D.O., Toczyski D.P. (2006). An architectural map of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* **20**, 449-460.

Tugendreich S., Tomkiel J., Earnshaw W., Hieter P. (1995). CDC27Hs colocalizes with CDC16Hs to the centrosome and mitotic spindle and is essential for the metaphase to anaphase transition. *Cell* **81**, 261-268.

Tuskan G.A., Difazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., Schein J., Sterck L., Aerts A., Bhalerao R.R., Bhalerao R.P., Blaudez D., Boerjan W., Brun A., Brunner A., Busov V., Campbell M., Carlson J., Chalot M., Chapman J., Chen G.L., Cooper D., Coutinho P.M., Couturier J., Covert S., Cronk Q., Cunningham R., Davis J., Degroeve S., Déjardin A., Depamphilis C., Detter J., Dirks B., Dubchak I., Duplessis S., Ehlting J., Ellis B., Gendler K., Goodstein D., Gribskov M., Grimwood J., Groover A., Gunter L., Hamberger B., Heinze B., Helariutta Y., Henrissat B., Holligan D., Holt R., Huang W., Islam-Faridi N., Jones S., Jones-Rhoades M., Jorgensen R., Joshi C., Kangasjärvi J., Karlsson J., Kelleher C., Kirkpatrick R., Kirst M., Kohler A., Kalluri U., Larimer F., Leebens-Mack J., Leplé J.C., Locascio P., Lou Y., Lucas S., Martin F., Montanini B., Napoli C., Nelson D.R., Nelson C., Nieminen K., Nilsson O., Pereda V., Peter G., Philippe R., Pilate G., Poliakov A., Razumovskaya J., Richardson P., Rinaldi C., Ritland K., Rouzé P., Ryaboy D., Schmutz J., Schrader J., Segerman B., Shin H., Siddiqui A., Sterky F., Terry A., Tsai C.J., Uberbacher E., Unneberg P., Vahala J., Wall K., Wessler S., Yang G., Yin T., Douglas C., Marra M., Sandberg G., Van de Peer Y., Rokhsar D. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**, 1596-604.

Tutusov R.L., Koonin E.V., Lipman D.J. (1997). A genomic perspective on protein families. *Science* **278**, 631-637

van Leuken R., Clijsters L., Wolthuis R. (2008) To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim. Biophys. Acta.* **1786**, 49-59.

Vanstraelen M., Baloban M., Da Ines O., Cultrone A., Lammens T., Boudolf V., Brown S.C., De Veylder L., Mergaert P., Kondorosi E. (2009) APC/C-CCS52A complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 11806-11811.

Vinardell J.M., Fedorova E., Cebolla A., Kevei Z., Horvath G., Kelemen Z., Tarayre S., Roudier F., Mergaert P., Kondorosi A., Kondorosi E. (2003) Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* **15**, 2093-2105.

Vodermaier H.C., Gieffers C., Maurer-Stroh S., Eisenhaber F., Peters J.M. (2003). TPR subunits of the anaphase-promoting complex mediate binding to the activator protein CDH1. *Curr. Biol.* **13**, 1459-1468.

Vogel C., Teichmann S.A., Pereira-Leal J. (2005). The relationship between domain duplication and recombination. *J. Mol. Biol.* **346**, 355-365.

Wang G., Kong H., Sun Y., Zhang X., Zhang W., Altman N., DePamphilis C.W., Ma H. (2004). Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol.* **135**, 1084-1099.

Wilson C.G., Kajander T., Regan L. (2005). The crystal structure of Nlpl. A prokaryotic tetratricopeptide repeat protein with a globular fold. *FEBS J.* **272**, 166-179.

Yoon H.J., Feoktistova A., Wolfe B.A., Jennings J.L., Link A.J., Gould K.L. (2002). Proteomics analysis identifies new components of the fission and budding yeast anaphase-promoting complexes. *Curr. Biol.* **12**, 2048-2054.

Yu J., Hu S., Wang J., Wong G.K., Li S., Liu B., Deng Y., Dai L., Zhou Y., Zhang X., Cao M., Liu J., Sun J., Tang J., Chen Y., Huang X., Lin W., Ye C., Tong W., Cong L., Geng J., Han Y., Li L., Li W., Hu G., Huang X., Li W., Li J., Liu Z., Li L., Liu J., Qi Q., Liu J., Li L., Li T., Wang X., Lu H., Wu T., Zhu M., Ni P., Han H., Dong W., Ren X., Feng X., Cui P., Li X., Wang H., Xu X., Zhai W., Xu Z., Zhang J., He S., Zhang J., Xu J., Zhang K., Zheng X., Dong J., Zeng W., Tao L., Ye J., Tan J., Ren X., Chen X., He J., Liu D., Tian W., Tian C., Xia H., Bao Q., Li G., Gao H., Cao T., Wang J., Zhao W., Li P., Chen W., Wang X., Zhang Y., Hu J., Wang J., Liu S., Yang J., Zhang G., Xiong Y., Li Z., Mao L., Zhou C., Zhu Z., Chen R., Hao B., Zheng W., Chen S., Guo W., Li G., Liu S., Tao M., Wang J., Zhu L., Yuan L., Yang H. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* **296**, 79-92.

Zachariae W., Schwab M., Nasmyth K., Seufert W. (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* **282**, 1721-1724.

Zhang J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol. Evol.* **18**, 292–298

Table I.				
Gene Description	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	Protein Motifs
APC Subunits	Access number			
APC1	At5g05560	TC286185 ^a	Pt765590	Rpn1/2 repeats
APC2	At2g04660	LOC_Os04g40830	Pt832637	Cullin domain
APC3/CDC27a	At3g16320			TPR repeats
APC3/CDC27b	At2g20000	LOC_Os06g41750	Pt835890	TPR repeats
			Pt278795	TPR repeats
APC4	At4g21530	LOC_Os02g54490	Pt817758	WD-40 repeats
APC5	At1g06590	LOC_Os12g43120	Pt592813	TPR repeats
APC6/CDC16	At1g78770	LOC_Os03g13370	Pt585761	TPR repeats
APC7	At2g39090	LOC_Os05g05720	Pt828004	TPR repeats
APC8/CDC23	At3g48150	LOC_Os02g43920	Pt834319	TPR repeats
		LOC_Os06g46540		TPR repeats
APC10	At2g18290	LOC_Os05g50360	Pt796785	Doc domain
APC11	At3g05870	LOC_Os03g19059	Pt292476	RING-H2 domain
		LOC_Os07g22840		RING-H2 domain
CDC26	TC308166 ^a	TC356501 ^a	TC118342 ^a	-
APC13	At1g73177	TC311476 ^a	Pt647861	-
			Pt660762	-
Activators				
CDC20_1	At4g33260	LOC_Os09g06680	Pt571123	WD-40 repeats
CDC20_2	At4g33270	LOC_Os04g51110	Pt272847	WD-40 repeats
CDC20_3	At5g26900	LOC_Os02g47180	Pt738273	WD-40 repeats
CDC20_4	At5g27080		Pt256238	WD-40 repeats
CDC20_5	At5g27570		Pt257786	WD-40 repeats
CDC20_6	At5g27945			WD-40 repeats
CCS52A1	At4g22910	LOC_Os03g03150	Pt415429	WD-40 repeats
CCS52A1_2			Pt180625	WD-40 repeats
CCS52A2	At4g11920			WD-40 repeats
CCS52B			Pt820353	WD-40 repeats
CCS52B_2	At5g13840	LOC_Os01g74146	Pt833809	WD-40 repeats

^aGene index project access number (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>)

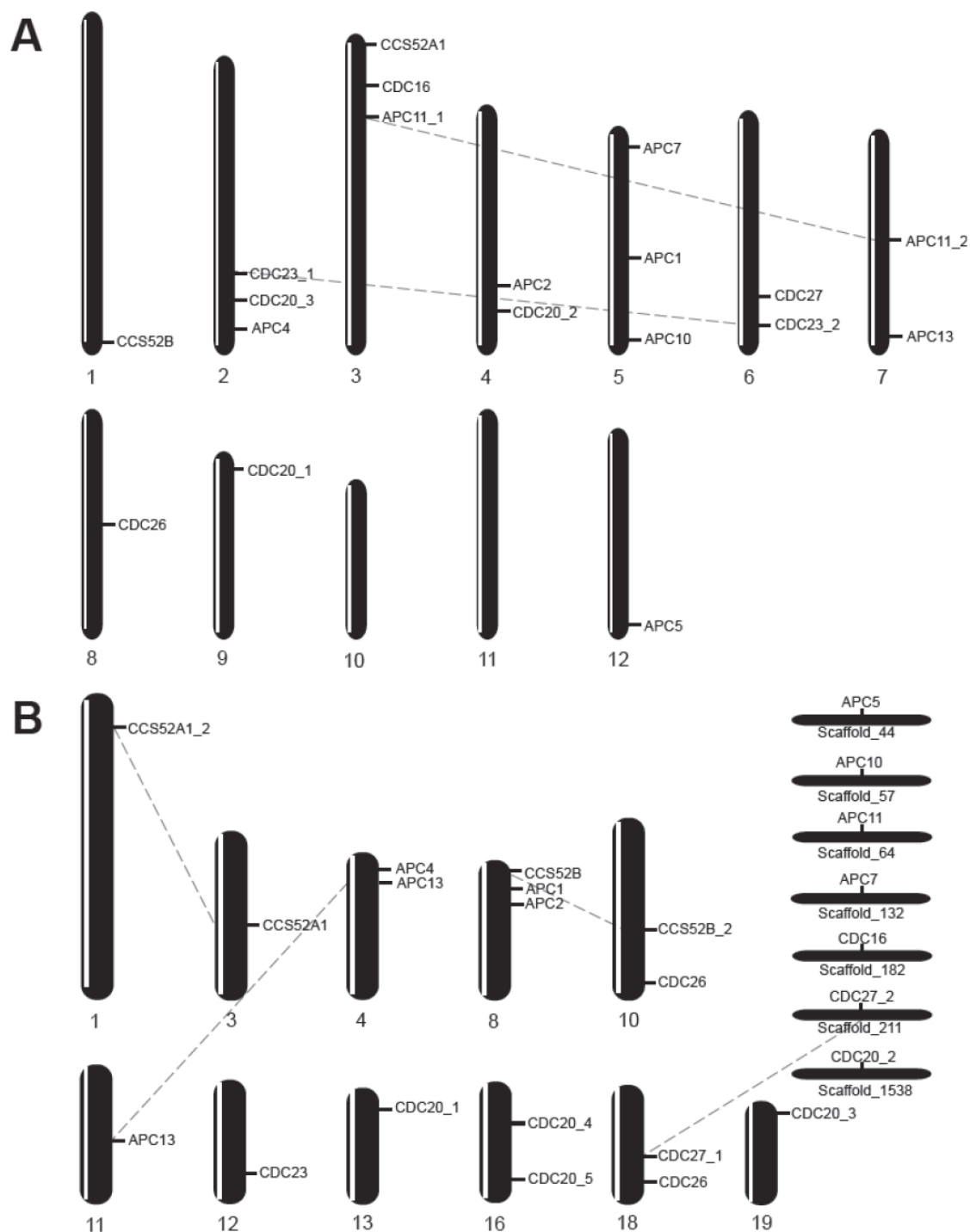


Figure 1: Chromosomal locations of rice and poplar APC subunits and activators. Chromosome numbers are indicated at the bottom of each chromosome. Paralogs are linked by dashed lines. A, chromosomal positions of genes in rice. B, chromosomal positions of genes in poplar. Seven poplar genes were assigned to scaffolds.

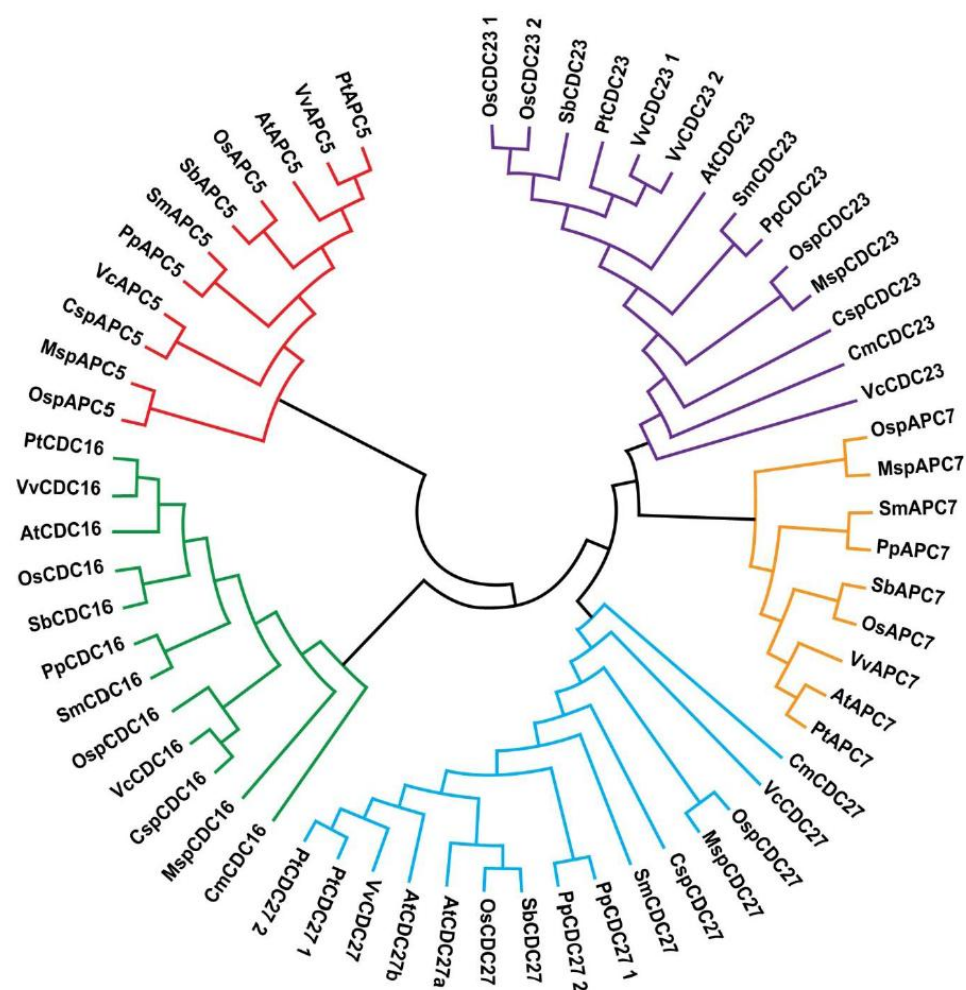


Figure 2: Phylogenetic relationships of APC TPR proteins from diverse species. Protein sequences were aligned with ClustalW using the Gonnet scoring matrix in MEGA4. The unrooted tree was generated using the MEGA4 program by the Neighbor-Joining method. Branches with less than 50% bootstrapping support were condensed. The abbreviations of species names are as follows: At, *Arabidopsis thaliana*; Pt, *Populus trichocarpa*; Os, *Oryza sativa*; Vv, *Vitis vinifera*; Zm, *Zea mays*; So, *Saccharum officinarum*; Sb, *Sorghum bicolor*; Mt, *Medicago truncatula*; Pp, *Physcomitrella patens*; Sm, *Selaginella moellendorffii*; Msp, *Micromonas sp*; Osp, *Ostreococcus sp*; Csp, *Chlorella sp*; Vc, *Volvox carteri*; Cm, *Cyanidioschyzon merolae*.

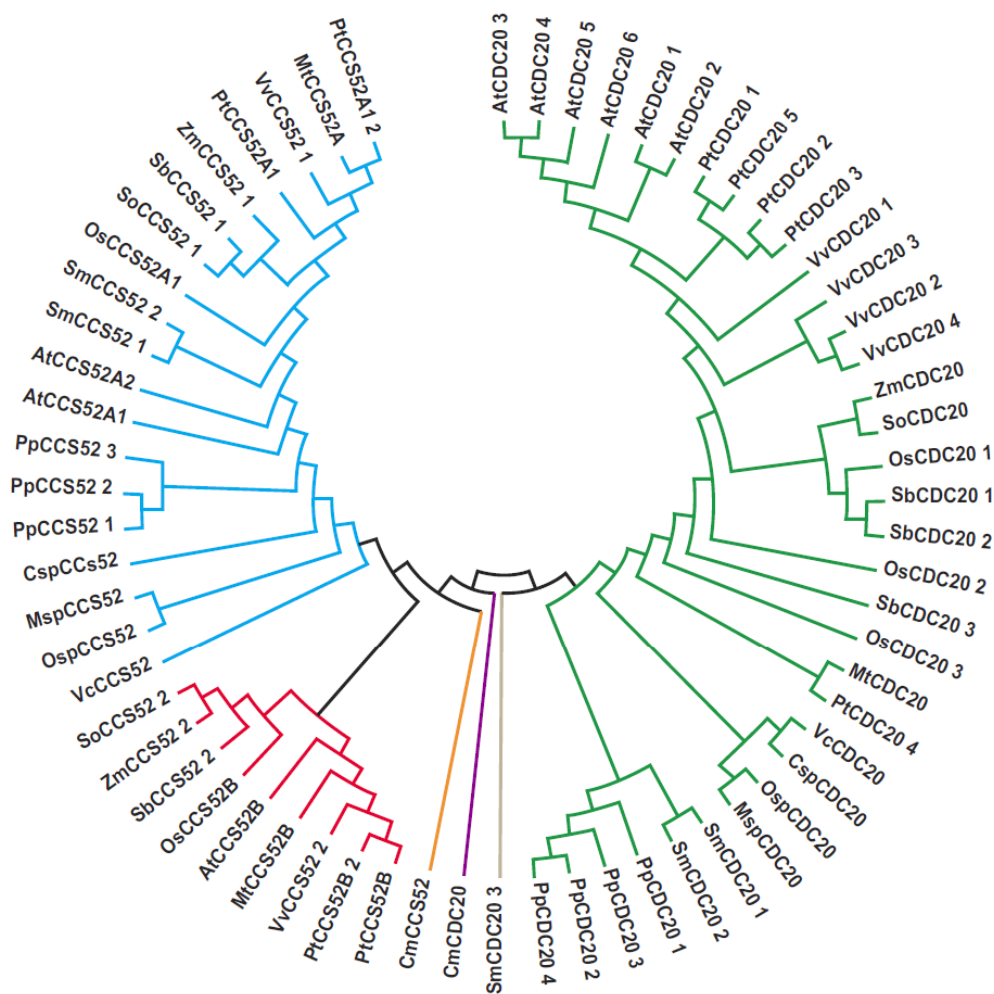


Figure 3: Phylogenetic relationships of CDC20 and CCS52 proteins from diverse species. Protein sequences were aligned with ClustalW using the Gonnet scoring matrix in MEGA4. The unrooted tree was generated using the MEGA4 program by the Neighbor-Joining method. Branches with less than 50% bootstrapping support were condensed. The abbreviations of species names are as follows: At, *Arabidopsis thaliana*; Pt, *Populus trichocarpa*; Os, *Oryza sativa*; Vv, *Vitis vinifera*; Zm, *Zea mays*; So, *Saccharum officinarum*; Sb, *Sorghum bicolor*; Mt, *Medicago truncatula*; Pp, *Physcomitrella patens*; Sm, *Selaginella moellendorffii*; Msp, *Micromonas sp.*; Osp, *Ostreococcus sp.*; Csp, *Chlorella sp.*; Vc, *Volvox carteri*; Cm, *Cyanidioschyzon merolae*.

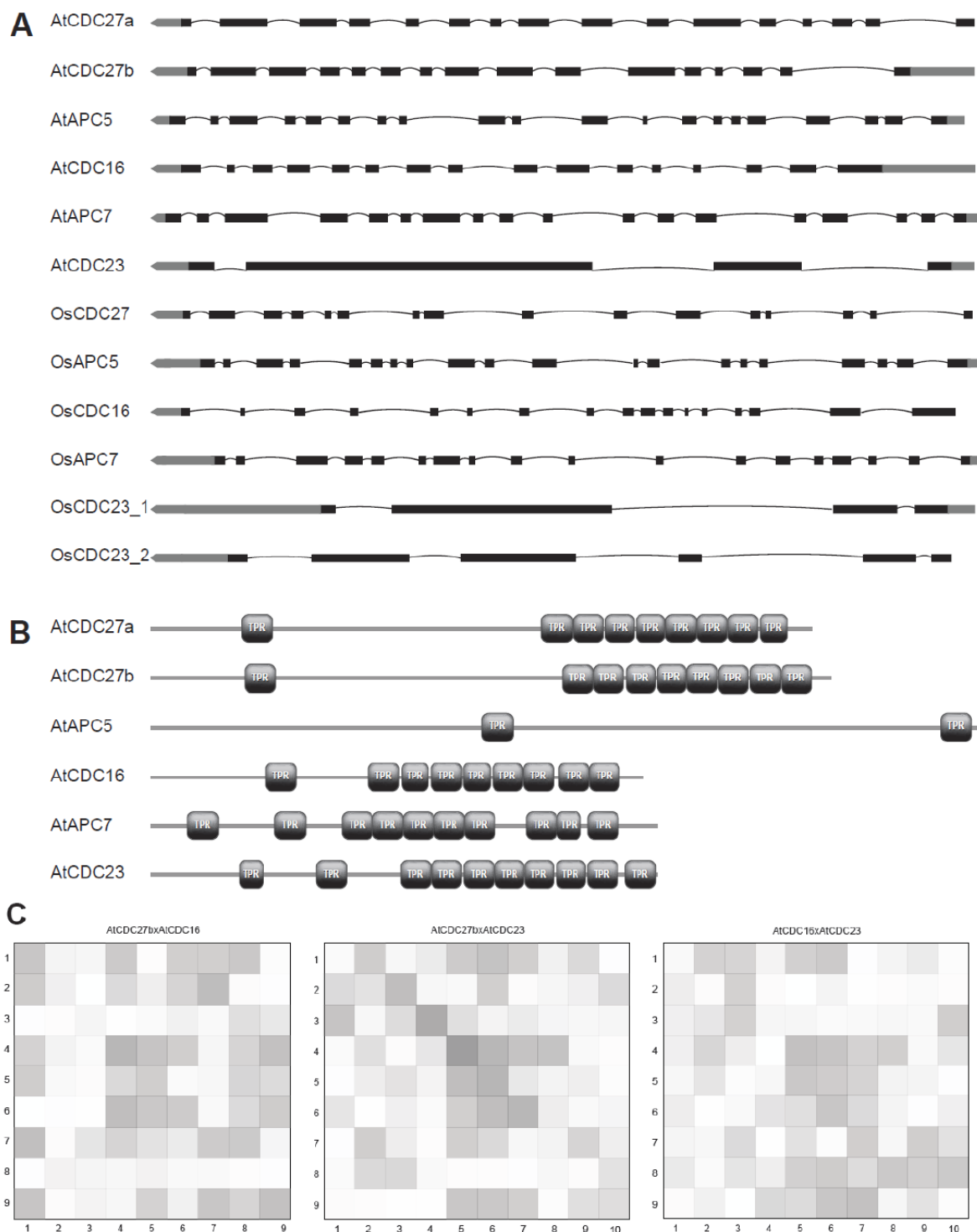


Figure 4: A, Diagram of exon-intron structure of Arabidopsis and rice TPR subunit genes. Exons and introns are represented by black boxes and lines, respectively. Thick gray lines correspond to the untranslated regions. B, Schematic representation of TPR domains on Arabidopsis TPR subunit sequences. TPR domains and full-length proteins sequences are represented by black boxes and gray lines, respectively. C, Pattern of internal domain duplications in Arabidopsis TPR subunits. The intensity of shading reflects the alignment score, with a dark shading for higher scores. The numbers on each axis indicate the domains in N-to-C terminal orientation within the repeat.

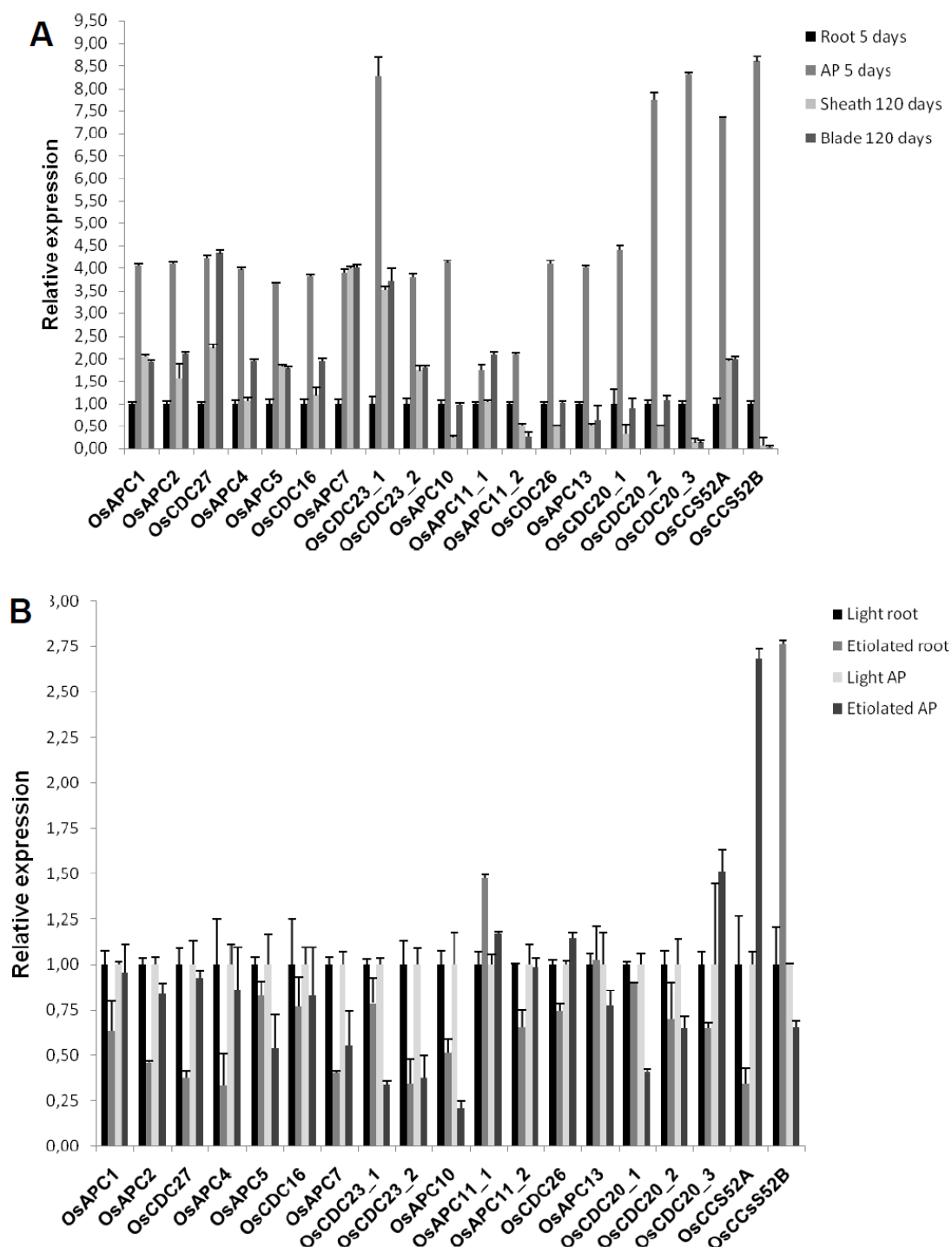


Figure 5: Relative expression profile of rice APC subunits and activators. The transcript level is represented as a ratio of absolute value of the studied gene to the absolute value of *Os28S* gene. Color codes of the bars are indicated at right figure. A, APC subunits and activator genes expression profile in different tissues. Expression levels obtained are normalized to root. B, Expression pattern of APC subunits and activators in darkness stress. Etiolated root and aerial part are normalized to corresponding control light root and aerial part respectively.

APÊNDICE XII

Plant Mol Biol (2009) 71:307–318
DOI 10.1007/s11103-009-9525-7

Overexpression of the *Arabidopsis* anaphase promoting complex subunit *CDC27a* increases growth rate and organ size

Cristian Antonio Rojas · Nubia Barbosa Eloy · Marcelo de Freitas Lima · Roberta Lopes Rodrigues · Luciana Ozório Franco · Kristiina Himanen · Gerrit T. S. Beemster · Adriana Silva Hemerly · Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira

Received: 31 December 2008 / Accepted: 9 July 2009 / Published online: 21 July 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract The Anaphase Promoting Complex (APC) controls CDK activity by targeting the ubiquitin-dependent proteolysis of S-phase and mitosis-promoting cyclins. Here, we report that the ectopic expression of the *Arabidopsis* *CDC27a*, an APC subunit, accelerates plant growth and results in plants with increased biomass production. *CDC27a* overexpression was associated to apical meristem restructuring, protoplasts with higher ³H-thymidine incorporation and altered cell-cycle marker expression. Total protein extracts immunoprecipitated with a *CDC27a* antibody showed ubiquitin ligase activity, indicating that the *Arabidopsis* *CDC27a* gets incorporated into APC complexes. These results indicate a role of

AtCDC27a in regulation of plant growth and raise the possibility that the activity of the APC and the rates of plant cell division could be regulated by the concentration of the *CDC27a* subunit.

Keywords APC · Cell cycle · Development · *Arabidopsis*

Abbreviations

APC Anaphase promoting complex
CaMV Cauliflower mosaic virus
NOS Nopaline sintase terminator
qPCR Quantitative polymerase chain reaction
SAM Shoot apical meristem
SDS Sodium dodecyl sulfate
TPR Tetratricopeptide repeat

Cristian Antonio Rojas and Nubia Barbosa Eloy contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11103-009-9525-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. A. Rojas · N. B. Eloy · M. de Freitas Lima · R. L. Rodrigues · A. S. Hemerly · P. C. G. Ferreira
Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

L. O. Franco · A. S. Hemerly · P. C. G. Ferreira (✉)
Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro,
Diretoria de Pesquisa Científica, Rua Pacheco Leão 915,
Rio de Janeiro, RJ cep. 22460-030, Brazil
e-mail: paulof@bioqmed.ufrj.br

K. Himanen · G. T. S. Beemster
Department of Plant Systems Biology, VIB, Technologiepark
927, 9052 Ghent, Belgium

N. B. Eloy · K. Himanen · G. T. S. Beemster
Department of Molecular Genetics, Ghent University,
Technologiepark 927, 9052 Ghent, Belgium

Introduction

In contrast to animals, plant development is mostly post-embryonic; during embryogenesis the main developmental event is the establishment of the root–shoot axis. Organ initiation and growth take place after germination, driven by cell division and differentiation at the meristems. It has been proposed that the cell cycle regulatory components (e.g. cyclins, CDKs) could have a bifunctional role in plants. In addition to regulation of the cell cycle process itself, they could be involved in the coordination of cell division in the context of a developing organism (Boudolf et al. 2004; Cockcroft et al. 2000; Vlieghe et al. 2003; Ramirez-Parra et al. 2004). Progression through the cell division cycle requires the temporal and spatial control by regulatory proteins in order to correctly duplicate the DNA

and to deliver the newly duplicated genomes to the two daughter cells during mitosis. In eukaryotes, regulation of cell cycle progression relies on the function of CDKs (Sherr and Roberts 2004). CDK activity is crucial at both the G1 to S phase and the G2 to M phase transitions and is regulated through association with regulatory cyclin subunits, posttranslational modifications and proteolysis (King et al. 1996). After entering mitosis, this complex is no longer needed and it must be rapidly inactivated through degradation of the cyclin. Hence, exit from mitosis requires the destruction of the mitotic cyclin and this task is carried out by the APC, or cyclosome (Morgan and Roberts 2002). The APC ubiquitinates target proteins, mediating their degradation via the proteasome machinery (Glotzer et al. 1991).

The APC is a multi-subunit E3 ubiquitin ligase that controls CDK activity by targeting the ubiquitin-dependent proteolysis of S-phase and mitosis-promoting cyclins. During the cell cycle, the APC has an extensive array of functions and a wide range of substrates have been identified (Harper et al. 2002; Peters 2006). CDC27a is one of the four tetratricopeptide repeat (TPR) subunits of the APC. TPR motifs present in APC subunits are expected to function as receptors that interact with regulatory proteins such as Cdh1 and Cdc20. Experiments *in vitro* and *in vivo* showed that the C-termini of Cdc20 and Cdh1 bind to the closely related TPR domain of CDC27 (Vodermaier et al. 2003). This could bring substrates into proximity of APC catalytic core, composed of APC2/APC11 proteins. Less understood is the role of the APC outside of the mitotic cycle, during development. Still, there is increasing evidence that the APC plays a critical role in non-dividing tissues, specially in the control cell growth and differentiation in the human nervous system (Kim and Bonni 2007).

Previous work has shown that APC subunits are differentially expressed in *Arabidopsis* organs, suggesting that in plants the complex might be regulated by subunit availability and that the different subunits could play unique regulatory roles (Eloy et al. 2006). The expression of the APC genes in non-dividing tissues suggests that also in plants they could have functions during cell differentiation and development. In particular, the CDC27a subunit gene is expressed in tissues with low proliferation rates, such as stems and leaves. Intriguingly, although homozygous mutants of most APC subunits are gametophytic lethal (Capron et al. 2003; Kwee and Sundaresan 2003), CDC27a null mutants are viable and phenotypically indistinguishable from wild type plants (Perez-Perez et al. 2008). In contrast, mutations in the HOBBIT/CDC27b gene strongly affects cell division and differentiation after embryogenesis (Blilou et al. 2002). In contrast, during gametogenesis CDC27a and HOBBIT/CDC27b seem to perform redundant functions (Perez-Perez et al. 2008).

In order to investigate the role of the individual APC subunits during plant development, we ectopically expressed the *Arabidopsis* CDC27a subunit in *Nicotiana tabacum*. Here, we show that plants overexpressing *AtCDC27a* exhibit increased growth rates and increased organ size, while overall plant morphology is not affected. We determined that the cellular basis of this growth phenotype is an accelerated cell division and re-organization of the shoot apical meristem. At the molecular level the data suggest that the *Arabidopsis* CDC27a protein is incorporated in a complex with ubiquitin ligase activity, and that this activity is enhanced compared to wild type plants. Hence, these results indicate that the AtCDC27a subunit has multiple roles during plant development, and after embryogenesis it plays a role in the control of plant growth.

Results

Ectopic expression of *AtCDC27a* accelerates the growth of tobacco plants

To investigate the role of the *AtCDC27a* gene during plant development, we studied the effect of an increase in its expression level. We choose *N. tabacum* for being a fast transformable plant that due to its larger size is easier to analyze by standard molecular and histological approaches than *Arabidopsis thaliana*. Ten independent single-copy transgenic tobacco lines expressing the *AtCDC27a* gene under the control of the constitutive 35S cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter were obtained.

When compared to the SR1 wild-type control, all lines exhibited accelerated growth and increased size of cotyledons and true leaves (Fig. 1a, b). The increased leaf size was accompanied by a significant increase in dry matter of plant stems, and to a less extent of leaves and roots, measured at different stages of development (Fig. 1c). Together with the enhanced growth there was a decrease in flowering time in all transgenic lines studied compared to wild type plants (Fig. 1d; Table 1). Despite the earlier flowering, the transgenic plants produced the same final number of leaves, indicating that leaf initiation rate at the shoot apex was proportionally accelerated. There was also a direct correlation between number of days to flowering and height at flowering time, and more precocious lines were the highest ones at bloom. These observations indicate that next to growth, the rate of plant development was enhanced in 35S-*AtCDC27a* plants. However, we also observed that the leaf width/length ratio was similar in transgenic and SR1 plants, showing that morphogenesis of the leaf was unaffected (Supplementary material S1A). Likewise, flower morphology was not affected (Supplementary material S1B). In order to verify if the phenotype observed was not due to

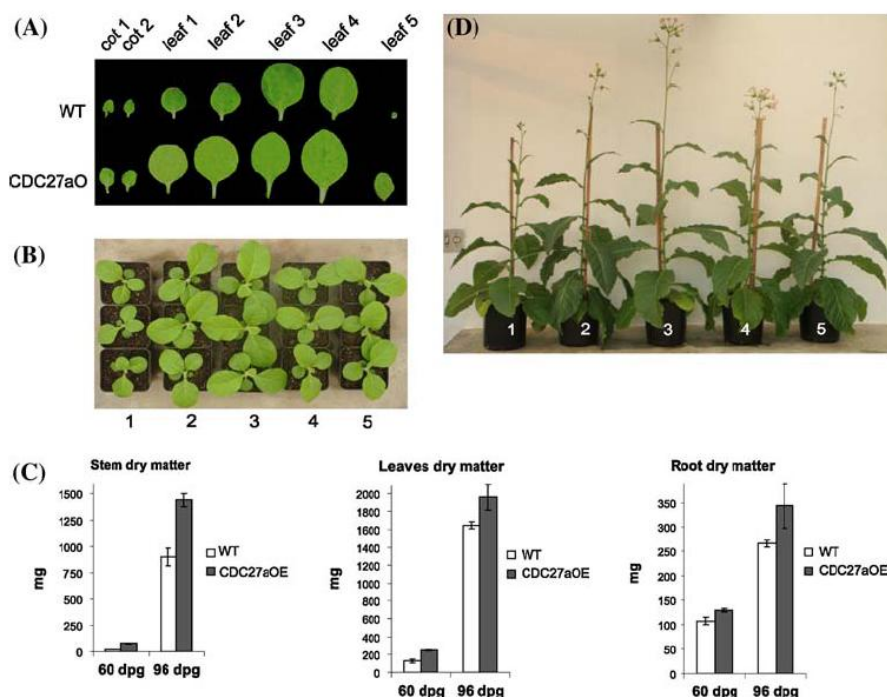


Fig. 1 Phenotypic characterization of *AtCDC27a*-overexpressing tobacco plants (CDC27aOE). **a** Leaf development. **b** 15-day-old *N. tabacum* plants. 1: WT (SR1); 2: line 1.1; 3: line 1.3; 4: line 18; 5: line 32. **c** Dry matter distribution in organs of CDC27aOE plants at 60

and 90 days post-germination (60 dpg and 96 dpg). **d** Height differences between 3-month-old transgenic and wild type plants. 1, wild type; 2, line 35; 3, line 18.1; 4, line 1.3; 5, line 1.1

Table 1 Phenotypic characterization at flowering time in T3 populations of untransformed and CDC27aOE tobacco plants

Lines	No of days to flowering	Height at flowering time (cm)
1.1 (T3)	94.2 ± 2.03	147 ± 1.79
1.3 (T3)	90 ± 3.03	161 ± 1.41
18 (T3)	89 ± 3.28	135 ± 1.21
32 (T3)	97 ± 4.62	137 ± 1.33
WT (T3)	115 ± 4.49	123 ± 1.14

WT wild type

Significance levels of transgenic plants compared with wild type: $P < 0.001$. Values indicate average ±SE; $n = 10$ in all cases

heterologous gene expression, we generated *Arabidopsis* plants ectopically expressing the *AtCDC27a* gene under the control of the 35S promoter. The analyses show that, like in tobacco, the overall plant growth in transgenic *Arabidopsis* plants is enhanced (Supplementary material S2A–B). For further analyses, the tobacco line 1.3 was selected and used for more detailed phenotypic and molecular analysis because was the most representative.

First we investigated the expression pattern of the transgene. Real-time RT-PCR using primers specific for the *Arabidopsis* gene and that do not recognize the tobacco

Cdc27 ortholog, showed that the expression of *AtCDC27a* was well above background levels in seedlings and in leaves during the entire plant development (Fig. 2a–b). Western blot shows that *AtCDC27a* protein was detected in 15-day-old seedlings, increasing at least twofold at 25 days (Fig. 2c). In *Arabidopsis* all APC components are transcriptionally regulated during leaf development, with high expression levels specifically during the proliferation phase (Eloy et al. 2006). To analyze if APC components are also altered in transgenic plants, we performed an expression analysis of tobacco *APC7* gene in developing seedlings. The results showed that *APC7* mRNA levels are slightly downregulated (Fig. 3a). This trend was also observed in leaves of different stages of development (Supplementary material S3) and suggests that there may be some coordination between the different APC components. The overexpression of *CDC27a* in tobacco plants also results in changes in *CycA3;3*, *CycB1;2*, *CycD3;3* and *CdkA;3* steady state levels (Fig. 3b, e), indicating a modification in cell cycle machinery which could be associated with altered cell division rates. Specifically, we see that *CdkA;3* levels are increased as well as cyclins that are normally expressed in S-phase (*CycD3;3* and *CycA3*) are upregulated, whereas the M-phase specific *CycB1;2* is slightly downregulated (Menges et al. 2005).

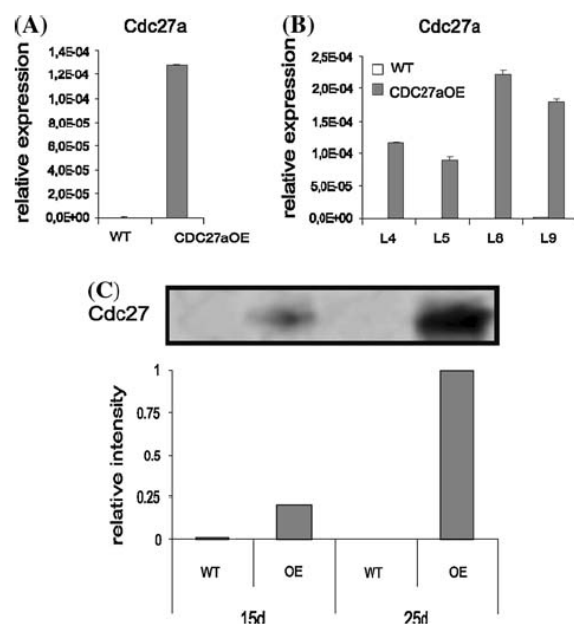


Fig. 2 Expression profile of CDC27a at transcriptional and post-transcriptional level. **a** AthCdc27a mRNA levels in seedlings of 15 days post-germination. **b** Developmental expression of AtCdc27a in leaves of 45- (L4, L5) and 60-day-old- (L8, L9) plants. The transcript level is represented as a ratio of the absolute value of the studied gene to the absolute value of 28S gene. Primers used here amplify the *cdc27a* gene from overexpression lines, but not the *Cdc27* ortholog from tobacco. The data are the result of at least two experiments and representative results are shown. **c** Protein gel blot of extracts from wild-type and AtCDC27a-expressing tobacco plants of different ages. Blots were probed with purified antiserum raised against a specific C-terminal region of AtCDC27a. Relative intensity of bands was calculated as described in “Materials and methods”. All experiments were carried out on equal amounts of protein extracts. 15d, 15-day-old seedlings extract; 25d, 25-day-old seedling extract

Because of the heterologous expression system, we addressed the question if the cellular localization of the *Arabidopsis* CDC27a subunit in *N. tabacum* was similar to that observed in *Arabidopsis* cells (Capron et al. 2003). To check this, we assayed first the *in vivo* localization of AtCDC27a. When we expressed this subunit fused to GFP gene under the control of the 35SCaMV promoter in the tobacco-derived BY2 cells, we observed a predominant nuclear localization, with temporal co-localization between Cdc27a and mitotic spindle and chromosomes in mitosis (Supplementary material S4). These results indicate that localization of *Arabidopsis* CDC27a during the cell cycle is similar in *N. tabacum* and in *Arabidopsis*.

Cellular parameters underlying the enhanced growth phenotype

In higher plants, most of aerial parts of the body are ultimately derived from a small population of mitotic cells, the

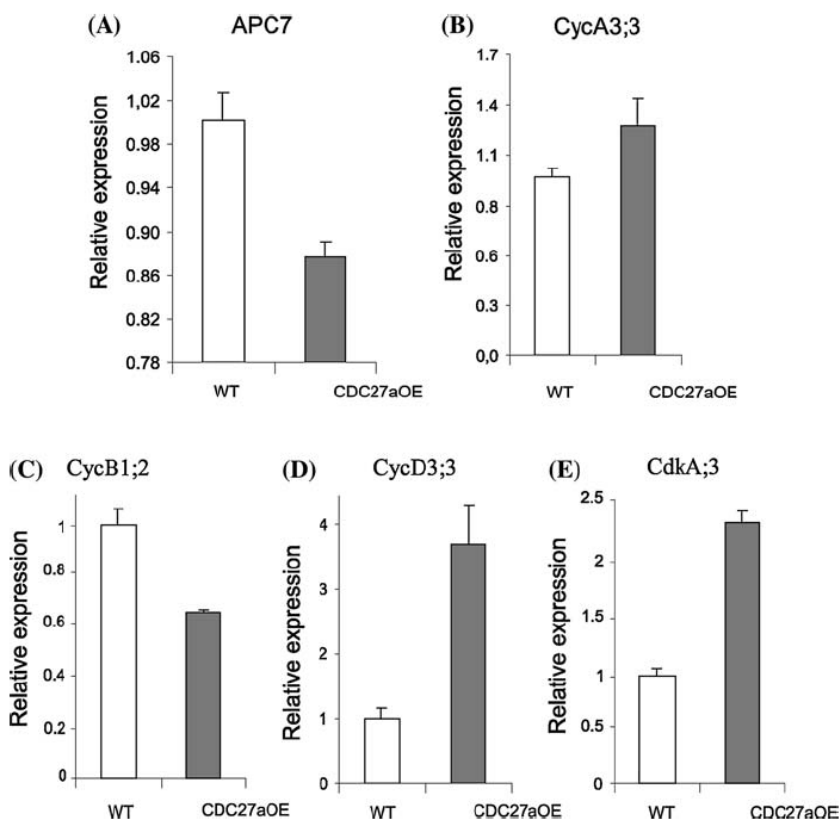
shoot apical meristem (SAM). To determine whether the faster development and increased leaf initiation in the transgenic lines could be associated with changes at the cellular architecture of the SAM, we characterized the SAM structure of 35S-AtCDC27a plants under light microscope. No obvious differences were detected in the basic structure of the SAM, as normal pattern of zonation (L1, L2, L3) and the overall SAM diameter were similar in both wild type and transgenic plants (Fig. 4a, b). However, when the average area of layer L1 cells was measured, we observed that SAM from 35S-AtCDC27a plants exhibited cells with smaller size, when compared to control in the same stage of development (Fig. 4c). As a result, the average L1 cell number in 35S-AtCDC27a was slightly larger, maintaining however the overall SAM size (Fig. 4d).

To verify if differences in cell size and area were maintained in differentiated tissues we performed transversal sections of stems of 35S-AtCDC27a and control plants. Unlike the shoot apex, the diameter of the differentiated stem was increased in the transgenic plants (Fig. 4e). To investigate the cellular basis in more detail, we analyzed the epidermis and the two cortical layers of the stem. Similar to the situation in the SAM, we found that the number of cells was significantly increased by the transgene in all three layers (Fig. 4f). However, in contrast to the situation in the SAM, cells were also consistently larger in the transgenic plants, albeit not significantly in the outer layer of the cortex (Fig. 4g).

To understand the effect of the transgene on the development of lateral organs, we investigated the development of the leaves in detail. To this end, the area of leaf 1 and 2 was determined by quantitative image analysis from day 11 till day 25 after sowing. Cell number and cell size were determined in the abaxial epidermis, which lacks trichomes. The results showed that leaves are already bigger in overexpressing AtCDC27a plants than in SR1 at the earlier stages of development that were analyzed (Supplementary material S5A). Also, the cellular data indicate that, at least in these stages, there are more cells in the transgenic leaves, demonstrating that the observed growth phenotype by enhanced levels of CDC27a is due to enhanced cell division during the very early stages of its development (Supplementary material S5B).

To investigate the impact of the transgene on cell cycle regulation in these plants in more detail, we performed flow-cytometry analysis. Young leaves of wild type tobacco plants contained approximately 20% more cells in 2C than in 4C, reflecting the relative durations of G1 and G2 phases. In contrast, in 35S-AtCDC27a plants there is a decrease in the relative proportion of 2C to 4C cells. In mature leaves, the same distribution of 2C and 4C cell was found, showing that in contrast to *Arabidopsis* (Beemster et al. 2005) there is very little endoreduplication in this

Fig. 3 Expression profile of cell cycle regulators and APC subunits in CDC27aOE plants. **a** *N. tabacum* APC7 mRNA levels. **b** *N. tabacum* CycA3;3 mRNA levels. **c** *N. tabacum* CycB1;2 mRNA levels. **d** *N. tabacum* CycD3;3 mRNA levels. **e** *N. tabacum* CdkA;3 mRNA levels. RNA was extracted from whole seedlings of 15 days after germination. The transcript level is represented as a ratio of the absolute value of the studied gene to the absolute value of 28S gene. The data are the result of at least two experiments and representative results are shown



species. These data also suggest that both G1/S and G2/M transitions as well as the exit from mitosis are enhanced (Supplementary material S6).

35S-*AtCDC27* protoplasts have higher rates of ^3H -thymidine incorporation

Plants overexpressing the *AtCDC27a* show increased growth due to enhanced cell division at the shoot apex and during the early stages of leaf development. To investigate whether cells indeed have an intrinsically higher capacity to divide, we investigated if differentiated transgenic leaf cells would be able to reinitiate cell division quicker than cells from non-transformed plants. Protoplasts from in vitro grown transgenic and control plants were incubated in medium in presence of ^3H -thymidine. The availability of nutrients and hormones induce mitotic activity in cells, which can be measured by ^3H -thymidine incorporation into DNA. Forty-eight hours after induction protoplasts were collected, washed, and quickly frozen in liquid nitrogen. Acid-insoluble DNA was extracted and ^3H -thymidine incorporation was measured. At the time of transition, we measured similar background levels in both transgenic- and control-derived protoplasts. However, after 48 h, ^3H -thymidine incorporation was considerably higher in

35S-*AtCDC27a*-derived protoplasts, when compared to control protoplasts (Fig. 5). This indicates that 35S-*AtCDC27a*-derived protoplasts re-enter the division cycle faster and reach the S-phase earlier, a larger fraction of the protoplasts is induced to divide and/or cell division rates of dividing protoplasts are increased.

Overexpression of *AtCDC27a* increases ubiquitination in tobacco plants

CDC27 is an essential subunit of the E3 ubiquitin-protein ligase called the APC. To address whether the ectopically expressed *AtCDC27a* could be incorporated into protein complexes containing E3 ligase activity, in vitro ubiquitination assays were carried out with total protein extracts from 35S-*AtCDC27a* transgenic and non-transgenic plants, immunoprecipitated with an antibody raised against the *AtCDC27a* protein. In vitro ubiquitination was carried out in the presence of human E1 and E2 enzymes with and without purified *Arabidopsis* Cyclin B1;1 protein as an APC substrate. The typical size increasing pattern was observed in the immunological detection only when Cyclin B1 was included and is in accordance with a progressive ubiquitination reaction. These data indicates that *AtCDC27a* is associated with

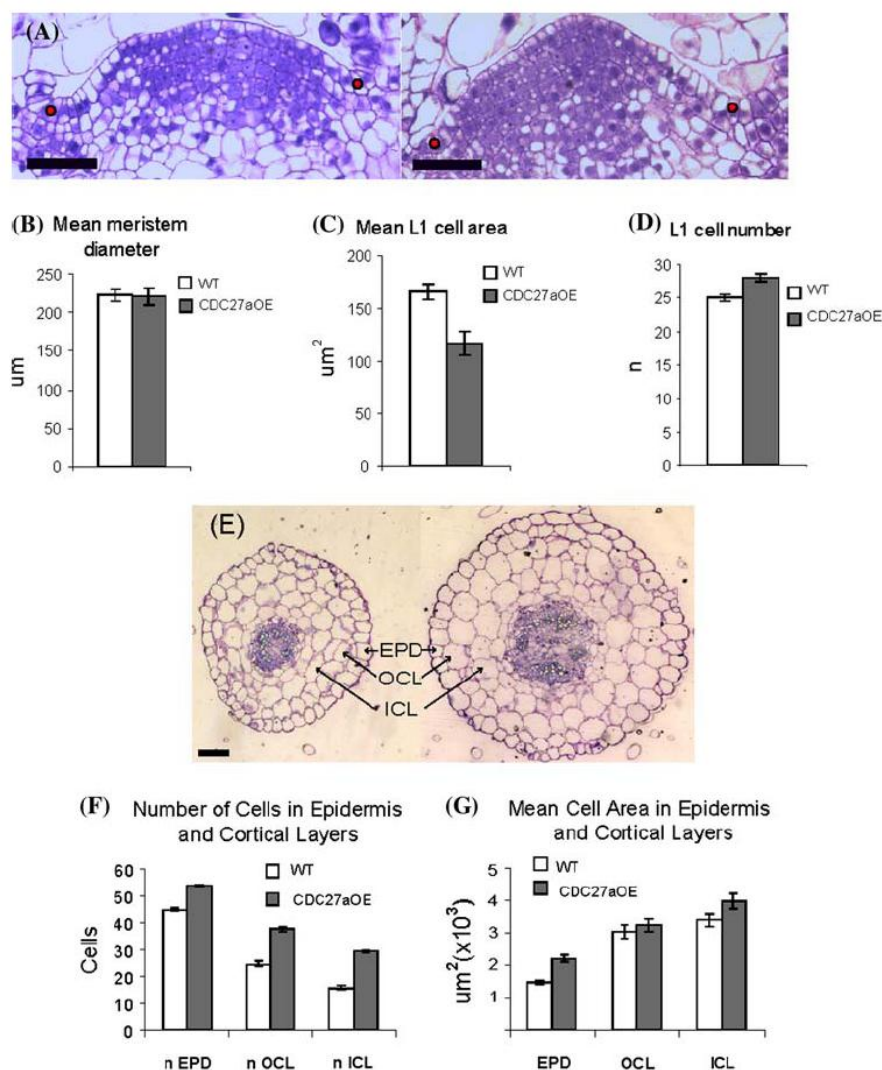


Fig. 4 AtCDC27a induces re-organization of meristem structure and alters cell size in non-meristematic tissues from 15-day-old seedlings. **a** Longitudinal sections of 15-day-old SAMs of WT (*left*) and 35S-AtCDC27a line 1.3 (*right*) stained with Toluidine Blue. Three parameters of meristems were measured: diameter (between the two *red dots*) (**b**) L1 layer cell area (**c**) and L1 layer cell number (**d**) mean values and standard errors correspond to 10 individuals.

Bar = 50 μm . **e** Three concentric layers of cells were measured in transversal stem sections of WT (*left*) and 35S-AtCDC27a line 1.3 (*right*), as described in [methodology](#). Cell number (**f**) and mean cell area (**g**) in epidermis and two cortical layers were measured and compared between transgenic and wild type, at same position in both cases. EPD epidermis, OCL outer cortical layer, ICL inner cortical layer. *Bar* = 100 μm

protein complexes capable to perform ubiquitination in vitro of APC substrates (Fig. 6). Because AtCDC27a antibody can precipitate APC activities from the plant protein extracts it is likely that the protein is correctly incorporated in plants and could mediate the observed growth enhancement in the overexpression lines through increased APC activities. The flow cytometry analysis suggested a fast exit from mitosis in the overexpression lines.

Discussion

While the role of the APC in coordinating cell cycle progression is widely recognized, much less is known about its possible functions throughout development (Harper et al. 2002). Transcripts from some of the APC core subunits, including the CDC27 TPR-containing subunit, and from the CDH1 activator have been detected in non dividing post-mitotic neurons (Gieffers et al. 1999). In *Arabidopsis*,

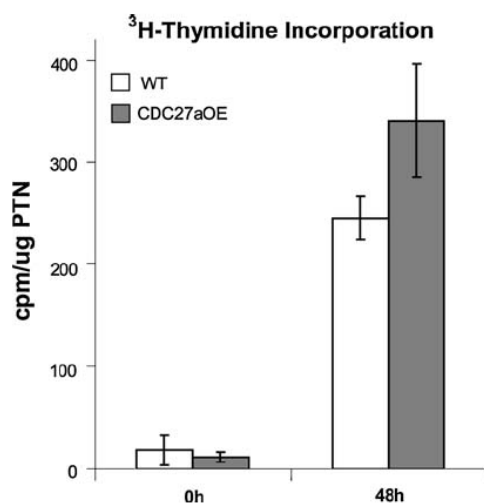


Fig. 5 Increased DNA synthesis in early stages of culture of protoplasts derived of transgenic Cdc27a OE. Freshly prepared protoplasts were incubated for 48 h in complete K3 medium with hormones and ³H-thymidine. Values and standard error correspond to quadruplicate experiments and were expressed as counts per minute per microgram of protein

two genes encoding *CDC27* homologs (*AtCDC27a* and *AtCDC27b/HOBBIT*) were identified, and it has been shown that transcripts from both genes are detected in tissues with low proliferation rates, suggesting that they might have functions outside the mitotic cycle (Eloy et al. 2006). In this context, it has been shown that the *HOBBIT* gene links cell division and differentiation (Blilou et al. 2002). The function(s) of the other *CDC27* homolog during development remains elusive, because null mutant plants are viable and phenotypically indistinguishable from the wild type (Perez-Perez et al. 2008). Therefore, the method of choice to understand their function during postembryonic development has been their ectopic expression under the control of constitutive promoters (Gutierrez 2005). Here, we reported such a study on the overexpression of the *AtCDC27a* in *N. tabacum* driven by the 35S CaMV promoter.

CDC27a overexpression modulates cell division rates and developmental timing

Our results show that tobacco plants ectopically expressing the *AtCDC27a* gene develop faster and generate larger structures. As a consequence, developmental timing is considerably influenced, and flowering occurs earlier in the transgenic plants. This results in taller plants and with significant more biomass accumulation, particularly at the stem. Microscopic analyzes revealed a subtle cellular re-organization in meristematic cells. In meristems of

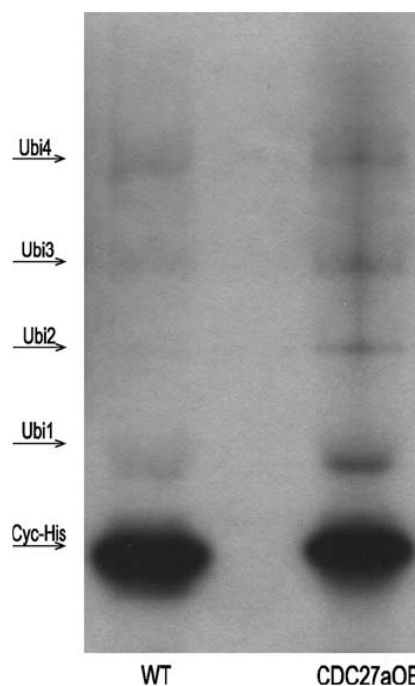


Fig. 6 Plant CDC27a bind to functional ubiquitination complex. A his-tagged version of Cyclin B1;1 from *Arabidopsis thaliana* was used in an in vitro ubiquitination assay. Cyclin B was mixed with Recombinant E1 and E2 enzymes and same amounts of immunoprecipitations made on WT and CC27aOE extracts with anti-Ath-CDC27a. The positions of mono- and polyubiquitinated substrates are indicated (Ubi1-4). The data is the result of three independent experiments and the representative picture is shown

15-day-old seedlings we found smaller cells, what often coincides with fast cell division rates, and an increment in cell number at L1 layer, without any apparent changes in meristem diameter. Additional evidence that cell division is accelerated in the 35S-*AtCDC27a* plants is that protoplast from mature leaves re-enter into the cell cycle quicker than those obtained from wild type plants. The ectopically expressed protein behaves in tobacco similarly to what has been observed in *Arabidopsis* since the sub-cellular localization of *Arabidopsis* CDC27a observed in BY2 cells is comparable to the observed in *Arabidopsis* cells (Capron et al. 2003). The only discrepancy between our localization results and those from Capron and co-workers is the presence of CDC27a in cells at metaphase. One possible reason of this difference could be the lack of free epitopes in the previous work at this stage, as in this assay antibodies were used to immunodetect CDC27a. In our case, a fusion with GFP was introduced and visualized in living cells. Another strong support for a conserved function of the Cdc27a in both *Arabidopsis* and tobacco is that the same phenotype of accelerated growth observed with the

ectopic expression in tobacco is observed in *Arabidopsis* 35S-*AtCDC27a* plants (Supplementary material S2).

In plants, CDKA/CYC activity is crucial to control cell cycle progression and the size and maintenance of stem cell pools. CDKA is typically highly abundant throughout the cell cycle, determining the competence to divide (Hemerly et al. 1993), whereas the expression of most cyclins is restricted to a limited portion of the cell cycle where their activity is required. The best known function of *CDC27a* is its role in the APC complex which executes targeted proteolysis of mitotic cyclins, enabling mitotic exit. Increased *CDC27a* levels could lead to altered APC activity, which would affect the break-down of mitotic cyclins. This could impinge on mitotic entry, as kinase activity to trigger M-phase entry will be affected. At the same time, mitotic exit is also dependent on cyclin destruction and could also be affected. If we suppose that the increased proliferation observed in the transgenic cells could be due to an altered APC activity in G2/M and faster transition through this checkpoint, we would expect to see a smaller fraction of cells in G2 phase of the cell cycle, combined with a reduction of the G2 and M phase specific Cyclin B expression, an increase in G1 and S phase specific Cyclin A and D expression, and similar expression levels of CDKA. Flow cytometry data however show an increase in 4C fraction, combined with increased expression of A and D-type cyclins and CDKA. The data strongly suggest a function of *CDC27a* in other regulatory processes, which would stimulate G1/S transition through increased expression of CDKA and G1/S specific cyclins. Experiments with *Arabidopsis* cell suspensions have shown that *CycD3;1* is rate limiting for the G1/S transition (Planchais et al. 2004). The Cyclin D regulates the E2F/Rb pathway and recent work has revealed that local reduction of the Retinoblastoma-related gene increases the size pool of stem cells in the root meristem in *Arabidopsis* (Wildwater et al. 2005). *CdkA* and *CycA3;3* transcripts are both more abundant in the transgenic plants, most remarkable, *CycD3;3* mRNA steady state levels are more than three times higher in the transgenic seedlings (Fig. 2f). Hence, our results suggest that ectopic expression of *AtCDC27a* is activating pathways upstream of the CDK/CYCD.

Plants overexpressing *CDC27a* are morphologically indistinguishable from the wild types

Surprisingly, the morphology of the transgenic plants is entirely normal at all stages of the development. This contrasts with what is observed when cell cycle regulators are overexpressed. *CycD3;3* induces leaf curling and hyperplasia in *Arabidopsis* (Dewitte et al. 2003). Defects in root and shoot formation, and a reduction in endoreduplication were observed in tobacco ectopically expressing the

CycA3;3 (Yu et al. 2003). Likewise, the genetic manipulation of the E2F/RB pathway resulted in a variety of morphological deficiencies in differentiation and morphogenesis (De Veylder et al. 2002; del Pozo et al. 2002; Vlieghe et al. 2003). On the other hand, overexpression of the *AtCycD2* in tobacco leads to accelerated growth and plants with normal morphology (Cockcroft et al. 2000). Plant growth is mainly controlled by the timing that meristematic cells exit cell division, and we indeed observed that, while the overall structure of the meristem is maintained, there are more cells per area which could indicate an increase in the rate of plant growth. One possibility is that the small increase in E3 ligase produced by excess *CDC27a* could also lead to slight enhancement of cyclin proteolysis, which in turn would accelerate cell cycle transitions and produce higher rates of cell division at the meristems. Alternatively, *CDC27a* could act higher in the pathway that stimulates proliferation, and leading to coordinated stimulation of multiple components required to increase proliferation without leading to developmental defects. Finally, because *Cdc27a* is expressed at low levels in *Arabidopsis* and it does not functionally complement a yeast strain carrying a *Cdc27* temperature sensitive mutation, its overexpression could produce an inhibitory effect on the APC/Cdh1 type, leading to an increase of G1cyclins and earlier entry into cell cycle.

Support for functional divergence of *CDC27a*

Is there evidence that would support a functional divergence of the *CDC27a* gene? Indeed, based on functional complementation of temperature sensitive yeast *CDC27* mutants it has been suggested that *HOBBIT/CDC27b* is the only functional homolog of the yeast *CDC27* gene (Blilou et al. 2002). More importantly, recently it has been elegantly shown that, after embryogenesis, *HOBBIT/CDC27b* is the only homolog essential for APC activity and accurate plant development (Serralbo et al. 2006). Still, both *CDC27* subunits are required to produce viable gametes in *Arabidopsis* (Perez-Perez et al. 2008). In addition, our recent results have shown that both *Arabidopsis* homologs interact and therefore could also be part of the core APC (Eloy et al. 2006). However, it is noteworthy that, on average, the steady state levels of *CDC27a* mRNA are one order of magnitude lower than of the *CDC27b* gene. In particular, the transcript derived from the *AtCDC27a* cDNA used in this work is even less abundant. Biochemical characterization of the human APC has suggested that the TPR containing subunits such as *CDC27a* could act as receptors that interact with the activators protein CDH1 and *CDC20* (Vodermaier et al. 2003). It has been also shown that APC/CDH1 complexes depleted of *CDC27* retain enzymatic activity, although five times CDH1 protein is required for

wild-type activity (Thornton et al. 2006). In these circumstances, the presence of elevated amounts of CDC27a, and of APC activity in cells and tissues where it is normally expressed in very low levels, could modulate the activity of the APC, by either increasing its overall activity or by conferring novel properties to the complex as a whole.

Materials and methods

Molecular cloning of *AtCDC27a*

In order to isolate *AtCDC27a*, human CDC27a (NP_001247.2) was used to search homologues in the TAIR EST database. Best match was selected and used to screen an *Arabidopsis* cDNA library made of C24 ecotype seedlings. Probes were labeled with ^{32}P random-labeling method by using T7 QuickPrimer kit (Amersham Pharmacia Biotech). Hybridization was carried out at 65°C for overnight in 0.5 mM phosphate buffer (pH 7.2), 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA, and 0.5 mg mL⁻¹ salmon sperm DNA. Membranes were washed in 40 mM phosphate buffer, 1% SDS for 30 min at room temperature followed by 5–10 min at 65°C, and then were subjected to autoradiography at -80°C for overnight. A positive clone was purified from the cDNA libraries and sequenced using synthetic primers. This sequence is slightly different from *AtCDC27a* of GeneBank. We denominated this variant *AtCDC27aSpl* and it was submitted to NCBI data bank (Access number DQ922637). For practical reasons we will refer to this variant as *AtCDC27a*, unless mentioned. Next, *AtCDC27a* was amplified with the forward primer 5'-gggtcgacatggagaatctactgccaat-3', and the reverse primer 5'-gggtctagactacaatttctcctcgtcac-3'. The PCR-generated full-length *AtCDC27a* cDNA sequence was digested with *NcoI/BamHI* (underlined in primers) and cloned in pBS35S plasmid, between the CaMV 35S promoter (35S) and the nopaline sintase terminator (NOS). The construction 35S-*AtCDC27a*-NOS was then excised with *Sall/XbaI* and sub-cloned into equally restricted pGSV4 binary vector (Herouart et al. 1993).

Plant transformation

The *AtCDC27a* expression cassette was introduced in *N. tabacum* by *Agrobacterium*-mediated transformation (Horsch et al. 1985). The *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 harboring pGSV435s*AtCDC27a* was used in the co-cultivation procedure. To induce callus formation, leaf strips were incubated in MS medium containing 30 g L⁻¹ of sucrose, 2 mg L⁻¹ of 6-benzylaminopurine (Serva, Heidelberg, Germany), and 0.05 mg L⁻¹ of naphthalene-acetic acid (Serva). Seeds obtained from T0 plants by

self-pollination were germinated on MS medium supplemented with 100 mg L⁻¹ kanamycin to get transformed T1 plants. The kanamycin-resistant plantlets were cultured in vitro until they grew sufficient roots and then were transferred to the greenhouse. Self-pollination was repeated until T3 generation plants that were subsequently used in all experiments described here.

BY2 transformation

CDC27a gene was subcloned into pK7WG2 vector (Karimi et al. 2002) through GATEWAY technology (Invitrogen) and introduced in *Agrobacterium tumefaciens*. BY2 cells were transformed as described elsewhere (An 1985). Briefly, four-milliliter aliquots of a 4-day-old, exponentially growing suspension of BY2 cells were transferred to a 90-mm Petri dish and incubated at 25°C with 100 µL of an overnight culture of *A. tumefaciens* harboring the binary plasmid. After 2 days of co-cultivation, the cells were plated on MS solid medium containing 250 µg mL⁻¹ carbenicillin and 100 µg mL⁻¹ kanamycin. After 4 weeks, the kanamycin-resistant calli were collected and transferred onto solid medium containing 100 µg mL⁻¹ kanamycin. Resistant calli were subjected to genomic PCR analysis to confirm the existence of the transgenes. Wild type and transformed cells were maintained as described by Nagata et al. (1992).

Immunoprecipitation and ubiquitination assay

35S-*AtCDC27a* and wild type tobacco plants were immunoprecipitated with antibody prepared against CDC27a *Arabidopsis* protein. Briefly, total extract was prepared in 200 µl of lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM, 1% NP-40, 1 mM β-mercaptoethanol, 1 mM PMSF]. The lysates were cleared by centrifugation at 14,000 rpm for 30 min at 4°C and immunoprecipitated with the primary monoclonal antibody bound to protein A-Sepharose (Amersham-Pharmacia) with gentle rocking at 4°C, for 2 h. The beads were washed seven times with 1 mL of washing buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.2% NP-40].

The immunoprecipitate was mixed with 50 mM Tris (pH 7.4) 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP (Boston Biochemicals), human HA-ubiquitin (3 µg), human recombinant E1 (80 nM), human recombinant E2 (0.5 µM) (Boston Biochemicals) and 0.4 mM DTT in a final volume of 30 µL. As a substrate we used *Arabidopsis* Cyclin B1;1 His-tagged expressed in *E. coli* and purified with his-beads (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Each reaction mixture was subjected to SDS-PAGE on a 10% gel, followed by immunoblotting analysis with the anti-His

antibody (Amersham Pharmacia) and anti HA antibody (Amersham Pharmacia).

Protein gel blot analysis

For each sample, whole seedlings were collected and quickly frozen in liquid nitrogen, ground and mixed with an equal volume of extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 15 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, and 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.5) containing a protease-inhibitor cocktail according to the manufacturer's instructions (SIGMA), then centrifuged 20 min at 18,000g at 4°C. Protein gel blot analysis of AtCDC27a was performed in 15- and 25-day-old seedlings extract, essentially as described elsewhere (Towbin and Gordon 1984). At-CDC27a protein was detected with rabbit anti-AtCDC27a antibody (a kind gift from Ben Scheres, Department of Molecular Cell Biology, Utrecht University). Blots were probed with the ECL Western blot detection system according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences). Densitometric analysis was carried out with Multi Measure plugin of ImageJ (rsb.info.nih.gov/ij/).

Leaf measurement and cell number analysis

The leaf measurement and subsequent cell number analysis of 35S-*CDC27a* and SR1 plants was performed on the abaxial epidermis of leaf 1 and 2 blades harvested daily from days 11 to 25, as described earlier (De Veylder et al. 2001). Plants were sown in quarter sections of round 12-cm Petri dishes filled with 100 mL of 1× Murashige and Skoog medium (Duchefa, Haarlem, The Netherlands) and 0.9% plant tissue culture agar. All healthy plants were placed in ethanol overnight to remove chlorophyll, and subsequently cleared and stored in lactic acid for microscopy.

Flow cytometry analysis

The first leaves tissues from 12 and 30 day-old seedlings in proliferating stage were chopped with a razorblade in 500 µL of buffer (45 mM MgCl₂, 30 mM sodium citrate, 20 mM 3-[*N*-morpholino]-propane-sulfonic acid, pH 7, and 1% Triton X-100) (Galbraith et al. 1991), filtered over a 30 µm mesh. To this supernatant 1 µL of 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) from a stock of 1 mg mL⁻¹ was added. The nuclear DNA content distribution was analyzed with a Cyflow ML flow-cytometer (Partec, Germany).

Real time PCR

Seeds of *N. tabacum* were plated on agar-solidified culture medium (Murashige and Skoog MS, with 1% of sucrose at pH 5.7 and 0.8% plant tissue culture agar) under light

length conditions of 16 h of light/8 h of darkness and at 24°C. For RNA expression analysis, in vitro whole seedlings of 12, 14, 15, 16, 20, 25 and 30 days after germination were used (as described above), or mature leaves from plants grown in growth chamber (previously germinated in vitro and transferred after 20 days after germination). In this case, leaves number 4 and 5 were from 45-day-old plants and leaves number 8 and 9 were from 60-day-old plants. Plants in growth chamber were maintained in pots containing a 1:2 vermiculite:soil mixture, with a cycle of 12 h light (~120 µEinstein m⁻² s⁻¹) and 12 h dark at 24°C. Total RNA was extracted from the frozen materials according to Logemann et al. (1987). To eliminate the residual genomic DNA present in the preparation, RNA was treated by RNase-free DNase I, according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences). RNA was then quantified with a spectrophotometer and loaded onto an agarose gel to check its integrity. First strand cDNA was synthesized using "TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents" (Applied Biosystems) with Random Hexamer primer solution on 1 µg RNA template according to the manufacturer's instructions.

The Real Time PCR amplification has been performed with oligonucleotides specific for 6 tobacco genes (*APC7*, *CdkA*, *CycB*, *CycA*, *CycD*, *cdk2*) and *A. thaliana* specific primer *CDC27a* gene. The sequences of primers used for the quantitative analysis are described in Supplementary materials (Table S1). The cDNA was amplified using SYBR-Green[®] PCR Master Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystem) on the GeneAmp 9600 thermocycler (Perkin-Elmer Applied Biosystems) under standard conditions. For the time series the "qPCR Core Kit for Sybr Green I" (Eurogentec) was used on the iCycler from BioRad. The data were normalized to the level of expression of 28S for each RNA sample and then normalized to the level of the controls for expression analyses comparing overexpressor with wild type plants.

Microscopy

For microscopic examination, whole 15-day-old seedlings were fixed with cacodylate buffer (pH 7.0) for at least 24 h. After rinsing, samples were dehydrated in a progressive series of ethanol dilutions (70, 80, 90, 95, and 100% for 90 min each) and embedded in historesin (Leica Instruments, Heidelberg, Germany). Then, seedlings were gradually infiltrated with basic resin (ethanol:basic resin 1:1, v/v for 4 h; ethanol:basic resin 1:1, v/v overnight; and pure basic resin for 1 day) and with a mixture of basic resin and activator (for 5 h) and washing with the complete resin mixture. Sections (5 µm thick) were cut with a rotary microtome (RM 2145; Spencer, Germany) and stained with 0.05% toluidine blue and examined with an Olympus

BX50 microscope. A preliminary examination enabled to select the median meristem figures, measuring the biggest diameter in the complete series of every seedling. In the selected images, cells in L1 layer were counted and measured with CoolSnap Pro software (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD). Cell area was obtained assuming a squared geometry. In all cases the values were taken from ten seedlings and expressed as mean with corresponding standard errors. In the case of differentiated tissues, 1.3 and WT 15-day-old seedlings were defoliated, embedded in historesin and completely sectioned from apex to root. Sections were stained and orderly mounted in microscope slides. These series were examined starting by sections corresponding to apex, toward the root, and the first fully rounded stem image (nearly, after the leaf insertion zone) was selected and measured. BY2 cells were observed and photographed in an Olympus BX50 microscope, provided with a CoolSnap-Pro camera. DNA images were obtained staining cells with DAPI $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ for 10 min. Images were processed with Adobe Photoshop.

^3H -thymidine incorporation

Protoplasts were isolated from in vitro-cultured tobacco plants. After washing, protoplasts were incubated in tissue culture plates ($2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) in 2 mL of K3 complete culture medium. The culture media contained the appropriate hormones (NAA: 1 mg L^{-1} ; BAP 0.2 mg L^{-1}) and $2 \mu\text{Ci L}^{-1}$ of methyl- ^3H thymidine. The protoplasts were cultured for 48 h, at 25°C , 5000 lux, and 16 h of light, and then macerated in $300 \mu\text{L}$ of cold 10% TCA and centrifuged for 5 min at $14,000g$ in an Eppendorf centrifuge. Supernatant was discarded and pellet was washed once in cold 5% TCA. ^3H -thymidine incorporation was measured in the other $200 \mu\text{L}$ as described elsewhere (Lepetit et al. 1992). Samples were normalized after determination of protein concentration performed in $50 \mu\text{L}$ of supernatant using a protein assay kit (Bradford; BioRad). Mean values and standard errors correspond to quadruplicate samples.

Acknowledgments We are grateful to Ben Scheres for providing anti-AtCDC27a antibody. We are also thankful to Cropdesign (Belgium) for technical training. C.A.R is indebted to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), M.F.L. and N.B.E are indebted to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) and BELSPO (Belgian Science Policy), for graduate and postdoctoral fellowships. P.C.G.F and A.S.H receive support from CNPq research grants.

References

- An G (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 79:568–570
- Beemster GT, De VL, Vercruyse S et al (2005) Genome-wide analysis of gene expression profiles associated with cell cycle transitions in growing organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138:734–743
- Blilou I, Frugier F, Folmer S et al (2002) The *Arabidopsis* HOBBIT gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes Dev* 16:2566–2575
- Boudolf V, Barroco R, Engler JA et al (2004) B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16:945–955
- Capron A, Serralbo O, Fulop K et al (2003) The *Arabidopsis* anaphase-promoting complex or cyclosome: molecular and genetic characterization of the APC2 subunit. *Plant Cell* 15:2370–2382
- Cockcroft CE, den Boer BG, Healy JM, Murray JA (2000) Cyclin D control of growth rate in plants. *Nature* 405:575–579
- De Veylder L, Beemster GT, Beeckman T, Inze D (2001) CKS1At overexpression in *Arabidopsis thaliana* inhibits growth by reducing meristem size and inhibiting cell-cycle progression. *Plant J* 25:617–626
- De Veylder L, Beeckman T, Beemster GT et al (2002) Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the *Arabidopsis* E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J* 21:1360–1368
- del Pozo JC, Boniotti MB, Gutierrez C (2002) *Arabidopsis* E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCFAtSKP2 pathway in response to light. *Plant Cell* 14:3057–3071
- Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy JMS, Jacquard A, Kilby NJ, Murray JAH (2003) Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* 15:79–92
- Eloy NB, Coppens F, Beemster GT, Hemery AS, Ferreira PC (2006) The *Arabidopsis* anaphase promoting complex (APC): regulation through subunit availability in plant tissues. *Cell Cycle* 5:1957–1965
- Galbraith DW, Harkins KR, Knapp S (1991) Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 96:985–989
- Gieffers C, Peters BH, Kramer ER, Dotti CG, Peters JM (1999) Expression of the CDH1-associated form of the anaphase-promoting complex in postmitotic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11317–11322
- Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349:132–138
- Gutierrez C (2005) Coupling cell proliferation and development in plants. *Nat Cell Biol* 7:535–541
- Harper JW, Burton JL, Solomon MJ (2002) The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev* 16:2179–2206
- Hemery AS, Ferreira P, de Almeida EJ, Van MM, Engler G, Inze D (1993) *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* 5:1711–1723
- Herouart D, Van MM, Inze D (1993) Redox-activated expression of the cytosolic copper/zinc superoxide dismutase gene in *Nicotiana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3108–3112
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229–1231
- Karimi M, Inze D, Depicker A (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7:193–195
- Kim AH, Bonni A (2007) Thinking within the D box: initial identification of Cdh1-APC substrates in the nervous system. *Mol Cell Neurosci* 34:281–287
- King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW (1996) How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274:1652–1659
- Kwee HS, Sundaresan V (2003) The NOMEA gene required for female gametophyte development encodes the putative APC6/

- CDC16 component of the anaphase promoting complex in *Arabidopsis*. *Plant J* 36:853–866
- Lepetit M, Ehling M, Chaubet N, Gigot C (1992) A plant histone gene promoter can direct both replication-dependent and -independent gene expression in transgenic plants. *Mol Gen Genet* 231:276–285
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* 163:16–20
- Menges M, de Jager SM, Gruijsem W, Murray JA (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* 41:546–566
- Morgan DO, Roberts JM (2002) Cell cycle oscillation sensation. *Nature* 418:495–496
- Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S (1992) Tobacco BY-2 cell line as the « HeLa » cell in the cell biology of higher plants. *Int Rev Cytol* 132:1–30
- Perez-Perez JM, Serralbo O, Vanstraelen M et al. (2008) Specialization of CDC27 function in the *Arabidopsis thaliana* anaphase-promoting complex (APC/C). *Plant J* 53:78–89
- Peters JM (2006) The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:644–656
- Planchais S, Samland AK, Murray JA (2004) Differential stability of *Arabidopsis* D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *Plant J* 38:616–625
- Ramirez-Parra E, Lopez-Matas MA, Frundt C, Gutierrez C (2004) Role of an atypical E2F transcription factor in the control of *Arabidopsis* cell growth and differentiation. *Plant Cell* 16:2350–2363
- Serralbo O, Perez-Perez JM, Heidstra R, Scheres B (2006) Non-cell-autonomous rescue of anaphase-promoting complex function revealed by mosaic analysis of HOBBIT, an *Arabidopsis* CDC27 homolog. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:13250–13255
- Sherr CJ, Roberts JM (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 18:2699–2711
- Thornton BR, Ng TM, Matyskiela ME, Carroll CW, Morgan DO, Toczyski DP (2006) An architectural map of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 20:449–460
- Towbin H, Gordon J (1984) Immunoblotting and dot immunobinding—current status and outlook. *J Immunol Methods* 72:313–340
- Vlieghe K, Vuylsteke M, Florquin K et al (2003) Microarray analysis of E2Fa-DPa-overexpressing plants uncovers a cross-talking genetic network between DNA replication and nitrogen assimilation. *J Cell Sci* 116:4249–4259
- Vodermaier HC, Gieffers C, Maurer-Stroh S, Eisenhaber F, Peters JM (2003) TPR subunits of the anaphase-promoting complex mediate binding to the activator protein CDH1. *Curr Biol* 13:1459–1468
- Wildwater M, Campilho A, Perez-Perez JM et al (2005) The retinoblastoma-related gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. *Cell* 123:1337–1349
- Yu Y, Steinmetz A, Meyer D, Brown S, Shen WH (2003) The tobacco A-type cyclin, Nicta:CYCA3;2, at the nexus of cell division and differentiation. *Plant Cell* 15:2763–2777

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)