

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

“Proteínas parceiras de interação de NtCDKG;2 indicam sua atuação no metabolismo de RNA, na sinalização por auxina e na regulação do florescimento”

Vanessa Thomé

**Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2016

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

“Proteínas parceiras de interação de NtCDKG;2 indicam sua atuação no metabolismo de RNA, na sinalização por auxina e na regulação do florescimento”

Vanessa Thomé

**Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Helena de Souza Goldman
Co-orientador: Me. Pedro Boscariol Ferreira**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2016

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Thomé, Vanessa

Proteínas parceiras de interação de NtCDKG;2 indicam sua atuação no metabolismo de RNA, na sinalização por auxina e na regulação do florescimento / Vanessa Thomé; orientadora Maria Helena de Souza Goldman – Ribeirão Preto – 2016. 80 p.

Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas)--Universidade de São Paulo, 2016

1. SCI1. 2. CDK. 3. Estigma. 4. Estilete. 5. Desenvolvimento do pistilo. 6. Duplo-híbrido em leveduras.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Helena de Souza de Goldman, por ter aberto as portas do seu laboratório mesmo sem nenhum contato prévio comigo. Agradeço pela confiança depositada, é muito importante saber que seu orientador confia que você faz o seu melhor. Além disso, agradeço por me ajudar a começar minha caminhada científica especialmente trazendo todo seu conhecimento e questionamentos nas discussões de hipóteses. É muito bom ter ajuda para pensar em aspectos que você nem sabia que deveriam ser levados em consideração, com isso sentia que cada vez mais estava aumentando minha capacidade de pensar “geneticamente” e “molecularmente”. Agradeço também pela paciência, principalmente nos requerimentos das bolsas, só a gente sabe como sofremos com o PUB. Entender que sua preocupação comigo ia além da esfera acadêmica me fez te valorizar não só como orientadora, mas como pessoa.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

À FAPESP e Capes pelo suporte financeiro.

À Universidade de São Paulo pela estrutura e bolsas concedidas (PAPFE/SAS e PUB).

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, FFCFRP/USP, pela utilização de suas estruturas e recursos.

Aos meus pais, Ivania e Thomé, por serem esse exemplo de luta e amor. Vocês sacrificaram tempo, lazer, conforto, bens materiais... tudo o que podiam para nos dar educação de qualidade e cultura. Sem vocês eu não teria chegado nem na metade de onde estou hoje. Amo vocês!

À minha irmã, Gabriela, por todo o carinho, amizade e amor. Torço muito para a sua felicidade, tenho certeza que você vai muito longe ainda.

Ao meu irmão, Júnior, por ter feito nossa vida mais feliz e mesmo sendo tão jovem, ser um exemplo de perseverança. Sou muito grata por ter você e a Gabi na minha vida, vocês me fazem sentir mais completa. Vocês não sabem a falta que me fazem. Amo muito vocês.

À minha vó, D. Cida, pelo amor, cuidado e todo carinho. A senhora contribuiu muito para eu ter chegado até aqui e para eu ser o que eu sou. Obrigada por ser tão guerreira e nos ajudar de tal forma que não é possível escrever nesses agradecimentos.

À minha amiga de infância, Marina Muller, por fazer parte das minhas loucuras quando criança, adolescente e universitária. Obrigada por entender e aceitar todas as peculiaridades da minha personalidade e por ouvir meus desabafos sem nem entender

direito o assunto. É tão feliz ter alguém da minha infância que faz questão de ser parte de todas as fases da minha vida. Te amo!

Aos amigos da 48 especialmente ao Bastardo, Gaga, Linhaça, Maiko (que na verdade não era, mas era), Pajé, Pre, Soudada, Tolima, Vegas, Viper, Xamã e Zigoto, que passaram comigo todo o tipo de estresse que um graduando pode passar e fizeram de forma tão brilhante que eu (acho que) saí da graduação sem nenhuma sequela. Obrigada pela paciência com meu desespero e impaciência. Espero que eu tenha conseguido retribuir a vocês tudo o que vocês me ajudaram durante esses seis longos anos.

Ao Igor, meu amado amigo e companheiro. Obrigada por estar do meu lado em todos os momentos. Te (re)conhecer foi umas das coisas mais inesperadas e especiais de 2015. Obrigada por me forçar a relaxar de vez em quando, a sua calma tem me ajudado a superar muitos momentos difíceis, estou aprendendo um outro jeito de levar a vida. Agradeço também por toda a generosidade de sua família, é muito gostoso ter um pedaço “de casa” em Ribeirão.

Ao Frodo, que eu fui só conhecer melhor em 2015 e (apesar da casca grossa) é uma pessoa incrível e generosa. Obrigada por não me deixar sentir sozinha quando eu voltei do intercâmbio, ouvir meus desabafos, jogar conversa fora, ir nas festas comigo, por debater comigo assuntos polêmicos e, claro, me passar a senha do netflix.

À Cutia, minha companheira de Austrália e de USP. Obrigada por ter se mostrado uma das pessoas mais leais que eu conheci, é muito bom poder contar com você.

À Birdo e Recruta, minhas calouras queridas, obrigada por todas as alegrias, desabafos e reflexões. Vocês estão no meu coração.

Aos amigos do *Coogee team* Bia, Dani, Davi, Fábio, Fran, Felipe, João, Joyce, Matheus e Pedro, por terem compartilhado comigo tantos momentos maravilhosos na Austrália e por terem sido a causa de felicidade em muitos outros momentos. Foi sensacional conhecer cada um de vocês e fazer parte dessa família. Saudades, amigos.

À Raissa, Thales e Fabrício, com os quais a amizade tem se fortalecido a cada dia desde que voltamos para o Brasil. Obrigada por serem presentes no meu dia a dia mesmo a longas distâncias. Vocês são muito especiais. Amo vocês!

À Dea, por me fazer companhia nos experimentos e por toda ajuda nos sequenciamentos e mini-preps.

Ao Paulão, por toda a ajuda com a limpeza dos materiais e esterilização dos meios.

Ao Pedro, meu co-orientador e amigo, obrigada por entender minhas dificuldades sem me julgar, principalmente as que envolviam lembrar de algo. Obrigada pelos desabafos, ajuda

nos experimentos e por corrigir pacientemente todos os meus trabalhos. Obrigada também por ver potencial em mim! Tenho certeza que aprendemos muito juntos nesse processo. No final você até levava menos de 24 horas pra me responder!

À Greice, uma das pessoas mais fofamente desesperadas que eu conheci. Você é uma pessoa ímpar, competente e com uma generosidade enorme, não deixe se influenciar pela opinião das pessoas, você é incrível. Obrigada pelos momentos de desabafos, é bom saber que não estamos sozinhas.

À Francine, por sempre me acalmar nos momentos de ansiedade e por ceder seus materiais tão gentilmente.

Ao Rafael, com o qual compartilhei meus momentos de I.C. Foi muito bom ter alguém aprendendo junto comigo e compartilhando conquistas e frustrações.

Ao Vitor, por estar sempre disposto a tirar as minhas dúvidas e debater comigo minhas hipóteses. Obrigada por espalhar o cheiro delicioso do seu café.

À Pati, uma das pessoas mais calmas que eu conheci. Obrigada por nos alimentar com seus doces e por sempre tentar nos colocar pra cima.

À Joelma, Juca e Edi, por todas as alegrias compartilhadas e todo o conhecimento compartilhado. Um agradecimento especial ao Juca pela ajuda na correção desse trabalho e ao Edi pelas maravilhosas balas de coco (que eu não consegui superar até hoje).

À Deus, por ter iluminado o meu caminho e me ajudado a chegar até aqui.

OBRIGADA!

Resumo

“Proteínas parceiras de interação de NtCDKG;2 indicam sua atuação no metabolismo de RNA, na sinalização por auxina e na regulação do florescimento”

O estudo de genes com expressão preferencial ou exclusiva nos órgãos florais é importante para compreender o desenvolvimento dessas estruturas e, assim, ampliar o conhecimento sobre a biologia reprodutiva das plantas. Um desses genes, *SCI1* (*Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1*) é preferencialmente expresso no estigma e estilete, e atua na regulação negativa da proliferação celular). Em uma varredura em busca de proteínas parceiras de interação com SCI1, identificou-se, entre outras proteínas, uma CDK (Cyclin Dependent Kinase) – denominada NtCDKG;2. Com o intuito de elucidar a função dessa proteína, foi dado início a um *screening* de uma biblioteca de cDNAs de estigma e estilete, no sistema de duplo-híbrido em leveduras, utilizando NtCDKG;2 como isca. O objetivo desse trabalho foi identificar os candidatos encontrados no *screening* e confirmar as interações par-a-par, para formular hipóteses sobre a(s) função(ões) biológica(s) de NtCDKG;2, a serem testadas experimentalmente no futuro. Foram confirmadas por re-teste par-a-par em Y2H as interações de NtCDKG;2 com: NtTCP15, NtDNAJ3 e NtMBD10, proteínas com putativo envolvimento na regulação do florescimento; NtRSZ21 e NtCDKF;1, que atuam no processamento de RNA, e NtTIR1 e NtIAA17, as quais fazem parte de vias de transdução de sinal de auxina. Além disso, a interação de NtCDKF;1 e NtCDKG;2 foi confirmada através de ensaio quantitativo da β -galactosidase, utilizando ONPG como substrato. Em conjunto, esses resultados fortalecem a hipótese na qual NtCDKG;2 atua no metabolismo de RNA e em vias de sinalização de auxina e de regulação do florescimento.

Palavras chaves: SCI1, CDK, estigma, estilete, desenvolvimento do pistilo, duplo-híbrido em leveduras.

Lista de siglas

3-AT – 3-amino-1,2,4-triazol

AD - *Activation Domain* – domínio de ativação do fator de transcrição GAL4

BiFC – *Bimolecular Fluorescence Complementation*

cDNA – DNA complementar

CTD- Domínio C-terminal da RNA Polimerase II

DBD - *DNA Binding Domain* – domínio de ligação ao DNA

His- Histidina

Leu- Leucina

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

OD₆₀₀ – absorvância (optical density) a 600 nm

RNAPII- RNA Polimerase II

SD – *Synthetic Dropout* (meio de cultura)

snRNPs- *small nuclear ribonucleoprotein particles*- pequenas ribonucleoproteínas nucleares

SCI1 - *Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1*

Trp – triptofano

Y2H – *Yeast Two-Hybrid*- Duplo-híbrido em leveduras

Sumário

1. Introdução	13
1.1 A flor e suas estruturas.....	13
1.2 Mecanismos moleculares do florescimento.....	14
1.3 <i>Nicotiana tabacum</i> como modelo de estudo	16
1.4 <i>SC11</i> , um gene preferencialmente expresso no pistilo	17
1.5 Ciclo celular-ciclos de regulação.....	18
1.6 CDKs presentes em plantas.....	20
1.7 A classe CDKG	23
1.8 O processo de <i>splicing</i> de pré-mRNAs	24
2. Objetivos.....	26
2.1 Objetivos gerais.....	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. Material e Métodos.....	27
3.1 Extração de DNA plasmidial de levedura.....	27
3.2 Transformação de <i>E. coli</i> eletrocompetentes.....	27
3.3 Extração de DNA plasmidial em pequena escala.....	28
3.4 Análise com endonuclease de restrição	29
3.5 Eletroforese em gel de agarose.....	29
3.6 Limpeza de DNA plasmidial pelo método do fenol-clorofórmio	30
3.7 Sequenciamento.....	31
3.8 Análise de bioinformática.....	31
3.9 Ensaio de duplo-híbrido, utilizando <i>HIS3</i> como gene repórter, para a confirmação de interações (Re-teste)	31
3.10 Avaliação das interações pelo ensaio quantitativo da β -galactosidase.....	34
3.11 Meio SD.....	35
3.12 Solução <i>Dropout</i> de aminoácidos 10X completo para meio SD	35
3.13 Meio LB (Luria-Bertani) para bactérias	36
3.14 <i>Z buffer</i>	36
3.15 Solução ONPG.....	36
4. Resultados.....	37
4.1 Análise dos parceiros de interação de NtCDKG;2, identificados no <i>screening</i> de duplo-híbrido.....	37
4.2 Re-testes em Y2H utilizando <i>HIS3</i> como gene repórter.....	38
4.2.1 NtCDKG;2 interage com fatores de transcrição	39
4.2.2 NtCDKG;2 apresenta interação positiva com proteína reguladora do florescimento	40

4.2.3	NtCDKG;2 tem interação positiva com fator de <i>splicing</i>	40
4.2.4	NtCDKG;2 interage com proteínas que regulam respostas primárias a auxina	41
4.2.5	NtCDKG;2 apresenta interação positiva com proteína que se liga a sítios metilados	42
4.2.6	CDKG;2 interage com outra Quinase Dependente de Ciclina, a CDKF	43
4.2.7	Critério utilizado para classificar uma colônia como positiva	43
4.3	Confirmação das interações pelo ensaio quantitativo da β -galactosidase	44
5.	Discussão	45
5.1	CDKG;2 pode estar participando de vias de transdução de sinal de auxina ..	45
5.2	CDKG;2 possivelmente atua na regulação do florescimento através da interação com:	47
5.2.1	Fator de transcrição	47
5.2.2	Proteína inibidora de repressor de vias florais	48
5.2.3	Proteínas de ligação à metil-citosina	49
5.3	Modelo de atuação de NtCDKG;2 no florescimento	50
5.4	CDKG;2 pode estar participando no processo de <i>splicing</i> através da interação com: ..	52
5.4.1	Outra Quinase Dependente de Ciclina, a NtCDKF;1	52
5.4.2	O putativo fator de <i>splicing</i> RSZ21	53
5.4.3	A Ciclina L	53
5.5	Os parceiros de interação de SCI1 fortalecem a hipótese de NtCDKG;2 participar em processos de <i>splicing</i>	54
5.6	Modelo de atuação de NtCDKG;2 na transcrição e <i>splicing</i>	55
5.7	Análise do re-teste quantitativo entre NtCDKG;2 e seus putativos parceiros de interação	55
6.	Conclusão	57
7.	Referências Bibliográficas	58
	Apêndice 1	69

1. Introdução

1.1 A flor e suas estruturas

As angiospermas constituem o grupo mais diverso de organismos fotossintetizantes (Raven *et al*, 2014). Observadas em registros fósseis desde o início do Cretáceo (125 Ma), foi ao final desse período (65 Ma) que essas plantas sofreram uma extraordinária radiação, passando de 5-20% para 80% da paleoflora (Crane & Lidgard, 1990). Acredita-se que o surgimento da flor foi um dos eventos fundamentais que possibilitou tamanha diversificação de espécies e habitats (Raven *et al*, 2014).

As flores são constituídas de um eixo (receptáculo) e por verticilos externos, as sépalas e pétalas, que são estruturas estéreis, e verticilos internos, os estames e carpelos, que são estruturas férteis (Figura 1.1.1) (Apezato Da Gloria & Carmen-Guerreiro, 2006). O surgimento de flores que apresentavam tanto carpelos (órgãos reprodutivos femininos), como estames (órgãos reprodutivos masculinos) aumentou a efetividade da polinização zoófila, o que pode ter sido determinante para a dramática radiação das angiospermas durante o Cretáceo (65 Ma) (Glover, 2007).

A flor pode apresentar um carpelo (apocárpico) ou carpelos fundidos (sincárpicos), denominado pistilo simples e composto, respectivamente (Esau, 1997). Após diferenciar-se, o pistilo é, então, composto pelo estigma, estilete e ovário (Esau, 1997).

Nas angiospermas, após a formação correta dos órgãos reprodutivos, é dado início ao processo reprodutivo. Nos estames ocorre a formação dos grãos de pólen e no carpelo há a produção dos óvulos (Esau, 1997). Na polinização, o grão de pólen adere à superfície do estigma, se hidrata e germina produzindo o tubo polínico. O tubo penetra e cresce através do tecido transmissor do estigma e estilete, dirigindo-se para ovário, onde estão localizados os óvulos que serão fecundados, formando o fruto e as sementes (Lord, 2003).

O órgão reprodutor feminino tem várias funções importantes na reprodução das plantas: verifica a compatibilidade entre o grão de pólen e o pistilo; fornece as condições para a germinação e crescimento direcional dos tubos polínicos; forma e protege os gametófitos femininos e protege o embrião (Sanchez *et al.*, 2004, Taiz & Zeiger, 2010).

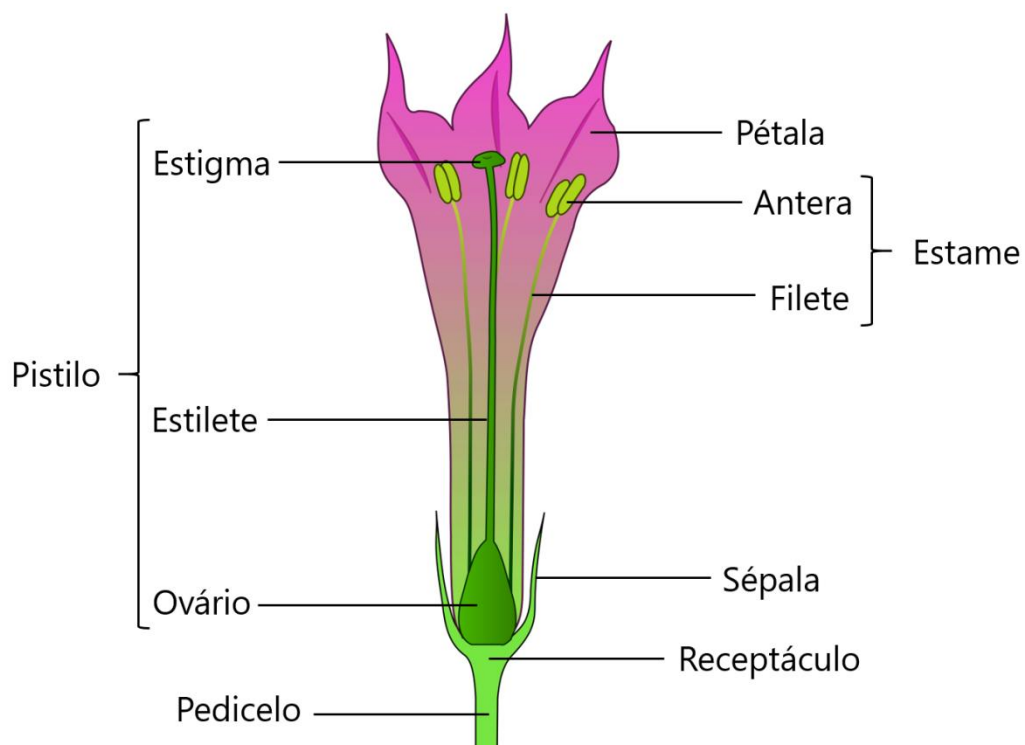


Figura 1.1.1: Modelo da flor de *Nicotiana tabacum*. Mostram-se as porções férteis da flor: pistilo, dividido em estigma, estilete e ovário, e o estame, composto pela antera e filete. Além disso, indicam-se as estruturas inférteis da flor: pétala, sépala, pedicelo e receptáculo. Por apresentar pistilo e estame, a flor dessa espécie é caracterizada como perfeita.

1.2 Mecanismos moleculares do florescimento

A transição da fase vegetativa para a reprodutiva, na qual as flores são produzidas, consiste na maior mudança que ocorre no ciclo de vida das angiospermas (Glover, 2007). Antes da transição, as plantas produzem somente folhas e meristemas axilares a partir do meristema apical do caule (SAM – *Shoot Apical Meristem*). A transição é controlada por estímulos ambientais e endógenos, que são integrados em uma complexa via de regulação da expressão gênica (Glover, 2007; Alonso-Blanco *et al.*, 2009; Andrés & Coupland, 2012). Em resposta a esses estímulos, a planta transita da fase vegetativa para a fase reprodutiva, quando o SAM origina os meristemas de inflorescência (IM – *Inflorescence Meristem*) (Irish, 2010). Os IMs se desenvolvem em meristemas florais (FM – *Flower Meristem*), cujo desenvolvimento culminará na formação de flores (Irish, 2010).

Na fase vegetativa, os genes de repressão floral, como *FLOWERING LOCUS C* (FLC) e *SHORT VEGETATIVE PHASE* (SVP), são regulados positivamente no SAM,

impedindo a expressão de genes de identidade floral (Irish, 2010). Na transição para a fase reprodutiva, a expressão dos genes *FLC* e *SVP* é reprimida e a expressão dos genes que regulam positivamente o desenvolvimento floral no FM é induzida (Irish, 2010). Assim, a expressão dos integradores de vias florais *LEAFY* (*LFY*), *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1* (*SOC1*) e *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) estimula a transcrição dos genes de identidade floral (Figura 1.2.1), cujos produtos gênicos atuam de maneira combinada resultando na especificação das sépalas, pétalas, estames e carpelo (Irish, 2010).

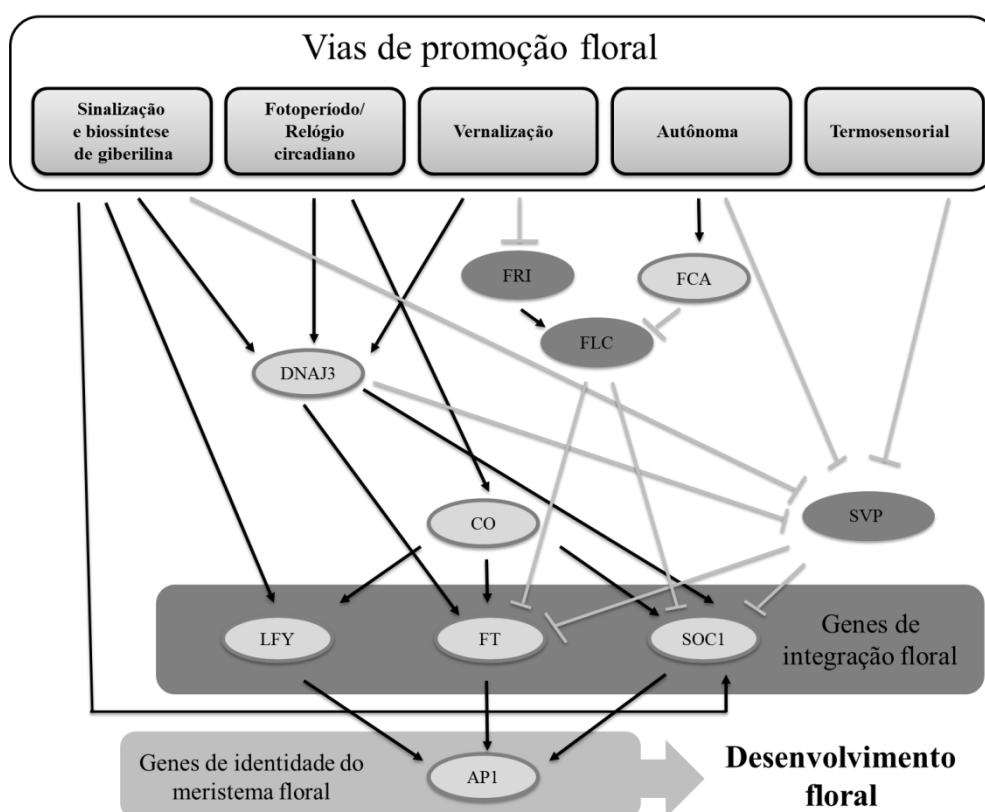


Figura 1.2.1: Integração dos sinais de florescimento durante a transição floral. Quando a planta entra em desenvolvimento reprodutivo, *SVP*, repressor que inibe a transcrição dos integradores *FT* e *SOC1*, é inibido pelas vias de giberilina, termosensorial e autônoma. O principal repressor do florescimento nas vias autônoma e de vernalização é *FLC*, que atua inibindo a transcrição de *FT* e *SOC1*. O gene *FRI*, expresso durante o frio, estimula *FLC*, atuando como um regulador negativo do florescimento. Em condições favoráveis, *FRI* é reprimido, e *FLC* também sofre repressão por vários mecanismos. A expressão de *DNAJ3* é promovida pelas vias de fotoperíodo, vernalização e giberilina. *DNAJ3* promove o florescimento através de regulações positivas na expressão de *SOC1* e *FT*. Todas as vias de sinalização envolvidas na promoção do desenvolvimento floral estimulam a expressão dos genes de integração floral *LFY*, *FT* e *SOC1*, os quais regulam positivamente os genes de identidade floral que coordenam o desenvolvimento da flor espaço-temporalmente. Setas e conectores em preto – estímulo da floração; setas e conectores em cinza – repressão da floração. *FCA* – *FLOWERING TIME CONTROL PROTEIN*; *FRI* – *FRIGIDA*; *FLC* – *FLOWERING LOCUS C*; *SVP* – *SHORT VEGETATIVE PHASE*; *CO* –

CONSTANS; LFY – LEAFY; FT – FLOWERING LOCUS T; SOC1 – SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1; AP1 – APETALA 1, DNAJ3 – DNAJ HOMOLOGUE 3. (Baseado em Irish, 2010; Zhang *et al.*, 2011; e Shen *et al.*, 2011).

1.3 *Nicotiana tabacum* como modelo de estudo

A espécie utilizada como modelo de estudo do desenvolvimento do pistilo em nosso laboratório é a *Nicotiana tabacum* (Figura 1.1.1), membro da família Solanaceae, que inclui aproximadamente outras 3000 espécies pertencentes a 150 gêneros (Marques *et al.*, 2012). Essa família é amplamente conhecida por suas espécies com importância nutricional, como a batata (*Solanum tuberosum*), berinjela (*Solanum melongena*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e pimentão (*Capsicum* sp), além de membros com importância industrial, como a planta de fumo (*N. tabacum*) (Marques *et al.*, 2012).

Além da importância supracitada, *N. tabacum* também se destaca na ciência como a espécie utilizada nos primeiros estudos de cultura celular vegetal e a primeira a ser transformada geneticamente com sucesso, além de ter sido um dos principais modelos de pesquisa sobre estrutura e função do genoma (Herrera-Estrella *et al.*, 1983; Kenton *et al.*, 1993; Ganapathi *et al.*, 2004). *N. tabacum* tem sido utilizado, sobretudo, em estudos sobre: 1) resposta à infecção por patógenos; 2) funcionamento do ciclo celular; 3) biossíntese de alcaloides (como a nicotina); 4) resposta ao estresse oxidativo; 5) reprodução vegetal; 6) desenvolvimento do tubo polínico; 7) origem, organização e evolução do genoma dessa espécie (Kenton *et al.*, 1993; Bombarely *et al.*, 2011).

Entre as características que a estabeleceram como umas das principais plantas utilizadas como modelo vegetal destacam-se: ciclo de vida relativamente curto, de aproximadamente seis meses de duração; protocolo de transformação genética bem estabelecido e eficiente; elevada produção de sementes – em torno de 1000 sementes por lóculo (Huang & Russel, 1992) e cultivo *in vitro* simples. Além disso, *N. tabacum* está bem adaptada a climas quentes, característica fundamental para a viabilidade deste trabalho em Ribeirão Preto, cidade onde essa pesquisa foi desenvolvida.

Por outro lado, há características de *N. tabacum* que geram dificuldades em estudos de biologia molecular, como: um genoma relativamente grande - aproximadamente 4,5 bilhões de pares de base (Opperman *et al.*, 2006), cujo sequenciamento foi publicado só recentemente e que ainda se encontra em fase de anotação (Sierro *et al.*, 2014); e ser alotetraplóide ($2n = 4x = 48$), proveniente do

cruzamento entre ♀*Nicotiana sylvestris* X ♂*Nicotiana tomentosiformis* (Murad *et al.*, 2002; Yukawa *et al.*, 2006).

1.4 *SCI1*, um gene preferencialmente expresso no pistilo

Genes de expressão preferencial ou exclusiva nos órgãos florais são importantes para o adequado desenvolvimento destas estruturas. Um desses genes foi descrito recentemente por nosso grupo de pesquisa e denominado *SCI1- Stigma/style Cell-cycle Inhibitor 1* (DePaoli, 2010; DePaoli *et al.*, 2011). Essa nomenclatura se refere à alteração no tamanho do pistilo em ensaios experimentais envolvendo o silenciamento (*SCI1^{Ri}*) e superexpressão (*SCI1^{OE}*) desse gene e à sua maior expressão nos estigmas e estiletes em comparação com outros órgãos da planta (DePaoli, 2010; DePaoli *et al.*, 2011). Os estigmas das plantas *SCI1^{Ri}* eram maiores e os das plantas *SCI1^{OE}* menores em comparação aos das plantas selvagens, devido a alterações no número de células nos transgênicos (DePaoli, 2010; DePaoli *et al.*, 2011). Semelhantemente, mutantes *sci1+/-* e *sci1-/-* de *Arabidopsis thaliana* também apresentaram maior proliferação celular na região superior do pistilo, com estiletes mais longos e um maior número de células estigmáticas (DePaoli *et al.*, 2014). A partir dos fenótipos encontrados, foi proposto que *SCI1* seja o fundador de uma nova família de inibidores do ciclo celular, com ação tecido-específica, controlando a proliferação em tecidos-alvo (DePaoli *et al.*, 2012; 2014).

DePaoli *et al.* (2012) observaram que os experimentos de Nemhauser *et al.* (2000), nos quais pistilos de *A. thaliana* foram submetidos a tratamentos com NPA (*N-1-naphthylphthalamic acid*), um inibidor reversível do efluxo de auxina, apresentavam fenótipos semelhantes aos encontrados nas plantas *SCI1^{Ri}* (Nemhauser *et al.*, 2000). Além disso, tanto as plantas de *SCI1^{Ri}* como *SCI1^{OE}* apresentam, ademais das alterações fenotípicas do pistilo, variações na expressão de três genes regulados por auxina (*ARF8*, *Aux/IAA13* e *Aux/IAA19*) (DePaoli *et al.*, 2012). Sendo que as plantas *SCI1^{Ri}* apresentam níveis menores de expressão de *Aux/IAA13* e *Aux/IAA19* em relação às plantas selvagens, enquanto que nas plantas *SCI1^{OE}* os três genes são comparativamente mais expressos (DePaoli, 2010; DePaoli *et al.*, 2012). A relação entre *SCI1* e auxina em *A. thaliana* foi também demonstrada pelos menores níveis de expressão de *AtSCI1* em mutantes com deficiência em auxina (*yuc2yuc6* e *np1*) e pelo menor tempo de degradação de YFP-*AtSCI1* nas pétalas em que esse hormônio que foi aplicado (DePaoli *et al.*, 2014).

Esses dados sugerem que NtSCI1 e AtSCI1, seu homólogo em *Arabidopsis*, atuam na via de sinalização de auxina (DePaoli *et al.*, 2014). Adicionalmente, com base nos fenótipos das plantas transgênicas, foi sugerido que SCI1 esteja envolvido na regulação do ciclo celular, possivelmente através da inibição de complexos ciclina-CDK (DePaoli *et al.*, 2011; 2012; 2014). Experimentos moleculares realizados por Strini (2014) e Pinoti (2016) sugerem que SCI1 atue regulando o processo de elongação da transcrição, interaja com proteínas relacionadas com o *splicing* e se localize em *splicing speckles*, indicando um provável envolvimento de SCI1 tanto nas etapas catalíticas do processamento de RNA, como na regulação da estabilidade dos transcritos (Pinoti, 2016).

A fim de elucidar as funções de SCI1, também foi realizada uma busca por suas proteínas parceiras de interação através de um ensaio de *pull down*, no qual foi utilizado um extrato de proteínas de estigma e estilete de *N. tabacum* e resultou na identificação de uma CDK (*Cyclin Dependent protein Kinase*), dentre outras proteínas (Strini, 2014). Essa quinase, que é o foco deste estudo, apresenta similaridade com a CDK10/11 de *Ricinus communis* e CDKG;2 de *Arabidopsis thaliana* (Strini, 2014), e será melhor apresentada abaixo.

1.5 Ciclo celular-ciclos de regulação

As plantas, assim como todos os eucariotos, apresentam o ciclo celular dividido em duas etapas: intérfase, na qual a célula cresce e se prepara para uma nova divisão, e mitose, em que ocorre a divisão celular (Junqueira & Carneiro, 2000). Em média, 95% da duração ciclo são destinados a intérfase, mas esse tempo varia em relação aos tipos celulares e a outros fatores como condições fisiológicas da célula e idade celular (Junqueira & Carneiro, 2000). Esta etapa é composta por G1, S e G2, sendo que as fases G1 e G2 são chamadas de *gap*, e consistem em intervalos que ocorrem desde o fim da mitose até o início da síntese de DNA (*Gap 1- G1*) e entre o final da síntese de DNA e a próxima mitose (*Gap 2-G2*) (Junqueira & Carneiro, 2000). Na fase G1, a célula integra sinais externos e pode dar continuidade ao processo de proliferação ou entrar em uma fase de estagnação, chamada G0, onde pode permanecer por períodos indeterminados (Morgan, 2007). Ao final de G1, a célula atinge o *checkpoint* (ponto de checagem) G1/S, em que há a verificação da integridade da célula e o seu encaminhamento à replicação do DNA, que ocorre durante a próxima fase (S) (Alberts, 2008). Posteriormente, a célula entra em G2, onde a célula se prepara para a divisão através da síntese de proteínas e

crescimento celular (Alberts, 2008). Ao final desta, há o *checkpoint* G2/M, no qual ocorre a verificação de danos no material genético e, caso sejam encontrados, a ativação de proteínas de reparo, sendo que a célula permanece nesse estágio até que seu genoma seja completamente reparado (Inzé & De Veylder, 2006). A célula entra, então, em M, na qual ocorre a divisão celular propriamente dita, com segregação dos cromossomos, divisão nuclear e citocinese (Taiz & Zeiger, 2010).

Nas angiospermas, o ciclo celular é afetado por mudanças na condição do meristema, sendo que em diversas espécies foi identificada uma maior taxa de divisão celular dentro deste após a indução floral (Glover, 2007). Em *Salix alba* (salgueiro branco), quando as vias de fotoperíodo de promoção floral são induzidas, a duração do ciclo celular diminui de 86 para 32 horas (Glover, 2007). Essa aceleração é causada por um encurtamento da fase G2, que é quando muitas células meristemáticas “descansam” entre os ciclos, acarretando em uma onda de mitoses no SAM (Glover, 2007). Essa diminuição é seguida por um decréscimo também nas fases G1 e S, resultando em ciclos celulares mais rápidos (Glover, 2007).

O controle do ciclo celular se dá através de mecanismos moleculares que se modificam em relação a sinais intracelulares resultantes do monitoramento das fases do ciclo, e extracelulares, como disponibilidade nutricional, hormônios, estágio de desenvolvimento e sinais ambientais (Inzé, 2007). As respostas a esses sinais ocorrem através da interação e síntese/degradação específica de algumas proteínas, como as CDKs, que atuam na regulação de diversos eventos no ciclo celular (Figura 1.5.1) (Inzé, 2007).

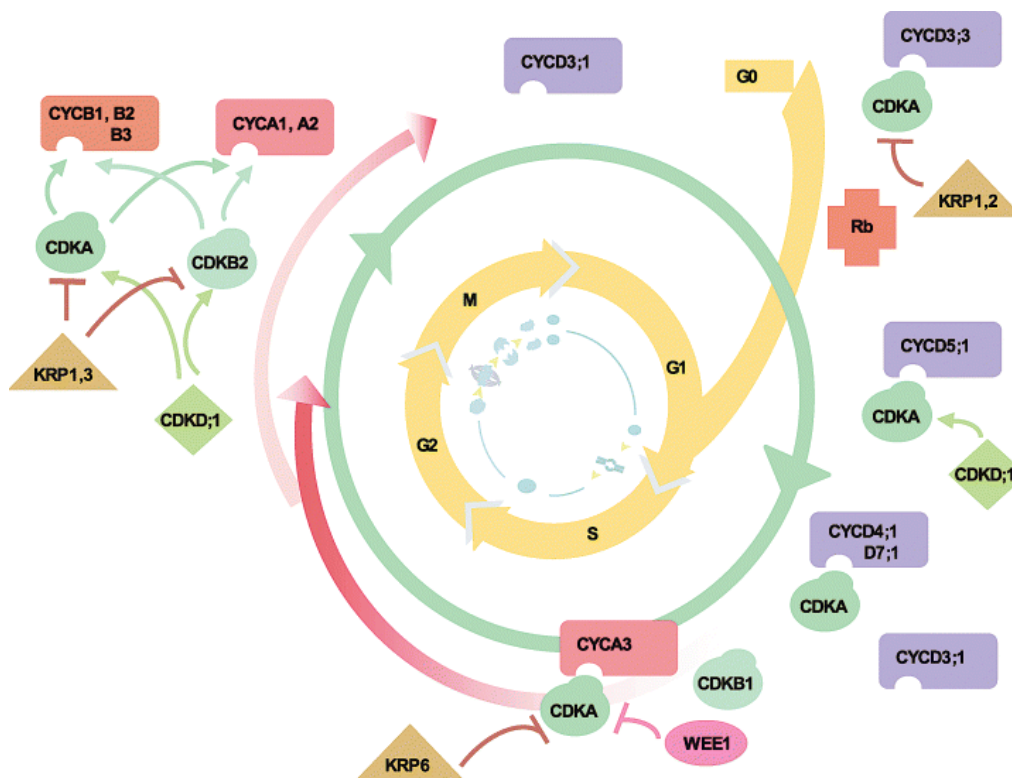


Figura 1.5.1: Visão combinada da regulação transcricional do ciclo celular em *Arabidopsis thaliana* produzida Menges *et al.* (2005), a qual evidência a presença de diferentes ciclinas e CDKs regulando esse processo. CDK: quinasas dependentes de ciclina; CYC: ciclina; KRP: Kip-related proteins; Rb: Retinoblastome protein; WEE1, uma quinase inibidora de CDK.

1.6 CDKs presentes em plantas

O desenvolvimento e funcionamento correto dos organismos dependem da regulação precisa da expressão gênica, que nos eucariotos ocorre desde níveis transcricionais até pós-traducionais (Snustad & Simmons, 2008). Nesses organismos, uma das formas de regulação pós-traducional mais importante são os ciclos de fosforilações, realizados pelas quinasas (Snustad & Simmons, 2008). Nas plantas há entre 600 e 2500 dessas proteínas, quantidade consideravelmente maior do que a encontrada em outros eucariotos, como, por exemplo, *Drosophila* e *Homo sapiens*, as quais apresentam 239 e 528 quinasas, respectivamente (Goldberg *et al.* 2006; Lehti-Shiu & Shiu, 2012).

As quinasas atuam adicionando grupamentos fosfato à cadeia lateral de resíduos de aminoácidos de outras proteínas, o que pode desencadear mudanças na atividade da proteína-alvo, marca-la para degradação, mudar sua localização celular e modificar a dinâmica do complexo onde se encontra (Inzé, 2007). A fosforilação é um processo reversível, que permite que a proteína seja ativada ou inativada, conforme a necessidade

celular, reduzindo seu gasto energético (Snustad & Simmons, 2008). A retirada do fosfato é feita pelas proteínas fosfatases, que juntamente com as quinases, estão envolvidas no controle do ciclo celular e vias de transdução de sinal (Morgan, 1997).

As quinases podem ser classificadas de acordo com o seu ativador, como, por exemplo, as CDPKs (*Calcium-dependent Protein Kinase*) que são quinases que necessitam de cálcio para seu funcionamento e as CDKs (*Cyclin-Dependent Kinase*), cuja função quinase só é ativa quando estão associadas às ciclinas (Morgan, 2007; Lubini, 2012). As ciclinas, por sua vez, são proteínas que apresentam síntese e degradação periódica durante as fases do ciclo celular e atuam no reconhecimento e direcionamento das CDKs para seus substratos-alvo (Inzé & DeVeylder, 2006; Morgan, 2007). A associação com ciclinas possibilita, então, que as CDKs atuem em seus substratos, especificamente em seus motivos-alvo de serina (S) ou treonina (T), seguido de prolina (P) (Joubès *et al.*, 2000; Inzé & DeVeylder, 2006; Morgan, 2007).

Além da quantidade significativa de genes que codificam quinases, as plantas também apresentam CDKs específicas, indicando a importância da fosforilação na regulação de diversas proteínas das células vegetais (Lubini, 2012). Nesses organismos, as CDKs dividem-se em sete classes, de CDKA a CDKG, em relação às sequências-motivo de ligação às ciclinas (Vandepoele *et al.*, 2002; Menges *et al.*, 2005). Em *Arabidopsis thaliana*, que possui o genoma completamente sequenciado, 14 CDKs distribuem-se nessas classes (Tank & Thaker, 2011).

A classe com maior representatividade é classe CDKA, cujos membros atuam em ambos os *checkpoints* do ciclo celular (G1/S e G2/M). (Mews *et al.*, 2000; Inzé & DeVeylder, 2006). A segunda maior classe é composta pelas CDKBs, as quais são específicas de plantas e seus membros se encontram divididos em CDKB1 e CDKB2 (Inzé, 2007). As quinases desse grupo controlam a entrada na mitose (Porceddu *et al.*, 2001), atuam no desenvolvimento dos estômatos (Boudolf *et al.*, 2004), na manutenção da identidade do meristema apical caulinar (Andersen *et al.*, 2008), e na sinalização para reparo no DNA (Weimer *et al.*, 2016).

A classe CDKC, por sua vez, contém as homólogas mais próximas das CDK9 de animais (Inzé, 2007). Essas quinases atuam com a ciclina T na fase de extensão da transcrição através da fosforilação do domínio C-terminal (CTD) da RNA Polimerase II (RNAPII) (Fülöp *et al.*, 2005). A CDKC;2 se co-localiza com componentes do spliceossomo, o que indica que essa CDK esteja envolvida no processamento de pré-

mRNAs (Kitsios *et al.*, 2008). Dessa forma, é possível que as CDKCs façam uma ligação entre a transcrição e o processamento de mRNAs em plantas (Kitsios *et al.*, 2008).

A classe CDKE possui apenas um membro em cada uma das cinco espécies vegetais onde foi encontrada (Tank & Thaker, 2011). Seus membros interagem com as Ciclinas C e possuem um efeito negativo na transcrição através da fosforilação do CTD da RNA polimerase II (Tank & Thaker, 2011). Em *A. thaliana*, a CDKE é necessária para a especificação da identidade dos estames e carpelos e para o término adequado da divisão das células indiferenciadas do meristema floral (Wang & Chen, 2004).

A funcionalidade das CDKs também é regulada por fosforilações, as quais ocorrem principalmente no resíduo treonina do T-loop (Thr160 ou resíduo equivalente) (Inzé, 2007). Tais alterações induzem mudanças conformacionais e possibilitam que as CDKs reconheçam seus substratos (Inzé, 2007). As classes de CDKs que atuam na fosforilação de outras CDKs são chamadas CAKs (*Cyclin-dependent kinase Activating Kinases*) (Inzé, 2007). Em *A. thaliana* há quatro CAKS, estando três inclusas na classe CDKD e a outra pertencente à classe CDKF (Shimotohno *et al.*, 2004).

A classe CDKD apresenta três membros em *A. thaliana*: CDKD;1; CDKD;2 e CDKD;3 (Shimotohno *et al.*, 2004). Com exceção de CDKD;2, as outras CDKDs contêm uma região C-terminal estendida, a qual apresenta um sinal de localização nuclear (Fabian-Marwedel *et al.*, 2002; Shimotohno *et al.*, 2004). A maioria das CDKDs possui a ciclina H como subunidade regulatória e todas apresentam atividade de quinase no CTD (Inzé, 2007). Entretanto, AtCDKD;2 apresenta maior atividade no CTD da RNAPII em comparação com AtCDKD;1 e AtCDKD;3, que atuam principalmente em outras CDKs (Shimotohno *et al.*, 2004; Hajheidari *et al.*, 2012).

As CDKFs não possuem interações conhecidas com ciclinas, porém apresentam um mecanismo de auto-fosforilação, indicando um mecanismo de auto-ativação independente da interação com ciclinas (Jia *et al.*, 2011; Hajheidari *et al.*, 2012). As atuações das CDKFs incluem a) regulação da atividade de CDKAs, como CAKs (Hajheidari *et al.*, 2012), b) fosforilações nos resíduos S/T das CDKDs, operando como CAKAKs (*CAK Activating Kinase*) (Hajheidari *et al.*, 2012), c) fosforilações sítio-específicas de resíduos S7 das repetições consenso do CTD da RNAPII (Inzé, 2007, Jia *et al.*, 2011; Hajheidari *et al.*, 2012).

1.7 A classe CDKG

A classe CDKG é a menos elucidada das CDKs de plantas e, até recentemente, as únicas informações disponíveis vinham de estudos em larga escala de BiFC (*Bimolecular Fluorescent Complementation*) em células BY2 de *N. tabacum* e TAP (*Tandem Affinity Purification*) em *A. thaliana* (Van Leene *et al.*, 2007; Boruc *et al.*, 2010; Van Leene *et al.*, 2010). Em *A. thaliana*, foram descritos dois membros dessa classe, CDKG;1 e CDKG;2, as quais apresentam 4 e 6 motivos RS, respectivamente (Huang *et al.*, 2013), e um motivo PLTSLRE (Menges *et al.*, 2005). Essas quinases estão relacionadas com CDK10 e CDK11 de *H. sapiens*, as quais atuam no processamento de mRNAs (Trembley *et al.*, 2004, Ferreira, 2016). Dentre as CDKs humanas, NtCDKG;2 apresenta maior semelhança com CDK11, com sequência de nucleotídeos 66% idêntica e 79% similar às das 3 principais isoformas dessa proteína (Ferreira, 2016). Essa grande similaridade de NtCDKG;2 com CDK11, cuja função no *splicing* está muito bem estabelecida, é uma das evidências da participação dessa quinase nesse processo (Ferreira, 2016).

Estudos com CDKG;1 descrevem que essa quinase a) atua na regulação do *splicing* do pré-mRNA do gene *CalS5* (*CALLOSE SYNTHASE 5*) durante a formação da parede do grão-de-pólen (Huang *et al.*, 2013); b) participa dos processos de sinapse e recombinação cromossômica durante a gametogênese masculina, em complexo com a Ciclina L1 (Zheng *et al.*, 2014); e c) interage com o fator de *splicing* RS2Z33, possivelmente através dos motivos RS em sua porção amino-terminal (Huang *et al.*, 2013).

Entre as funções conhecidas de CDKG;2 está a regulação do florescimento. Ma *et al.* (2015) constataram que em mutantes de inserção em CDKG;2, o florescimento é adiantado em relação às plantas selvagens. Nessas plantas, alguns genes que regulam o florescimento tiveram seus níveis de expressão alterados como *FLC* (*down-regulated*), *FT*, *SOC1*, *AP1* e *LFY* (*up-regulated*). Os autores sugeriram, então, que a aceleração no florescimento nos mutantes ocorre, principalmente, através da repressão de *FLC* (Ma *et al.*, 2015). O controle da expressão deste gene pode ocorrer através da fosforilação da Ciclina L por sua parceira de interação, a CDKG;2. Essa hipótese tem como base o fato que a Ciclina L pertence à família de proteínas SR-like (*Serine/Arginine-Rich-like*), a qual possui membros envolvidos no *splicing* (Formont *et al.*, 2002). É interessante mencionar que análises *in silico* da sequência de NtCDKG;2 mostraram a presença de 5 motivos RS,

o que sugere que esta proteína possivelmente atua no processamento de mRNAs (Ferreira, 2013).

CDKG;2 também pode estar envolvida na regulação do desenvolvimento inicial da planta (Žabicki *et al.*, 2013). Esta hipótese é baseada no fato de que calos de mutantes *knockout* de *CDKG;2* apresentam atraso na organogênese, não formação de raízes, malformação do caule e inflorescências sem sementes, devido à deformidade dos órgãos reprodutivos (Žabicki *et al.*, 2013).

1.8 O processo de *splicing* de pré-mRNAs

O *splicing* é um passo fundamental na expressão de muitos genes, no qual ocorre a formação dos transcritos maduros através da retirada dos íntrons e ligação dos éxons (Smith & Valcarcel, 2000; Kalyna *et al.*, 2003). Esse processo proporciona um nível adicional na regulação da expressão gênica por meio da seleção de locais alternativos de *splicing* e subsequente geração de transcritos diferentes, que em muitos casos codificam isoformas funcionais, aumentando o potencial codificador do genoma (Smith & Valcarcel, 2000; Kalyna *et al.*, 2003). O *splicing* de pré-mRNAs nucleares ocorre em um complexo chamado spliceossomo, formado pelo pré-mRNA, 5 pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs- *small nuclear ribonucleoprotein particles* - U1, U2, U4/6, e U5), além de outros fatores de *splicing* não snRNPs (Golovkin & Reddy, 1998; Staiger & Brown, 2013).

A montagem do spliceossomo é um processo altamente ordenado e se inicia com a ligação da U1 ao sítio de *splicing* 5' no pré-mRNA, seguida pela ligação da U2 no *branch site* e o recrutamento do complexo formado pelas snRNPs U4, U5 e U6 no íntron. Posteriormente, há um rearranjo no repertório proteico do spliceossomo e as snRNPs U1 e U4 são liberadas, dando início à reação de *splicing* (Golovkin & Reddy, 1998; Staiger & Brown, 2013; Pinoti, 2016).

As principais proteínas não snRNP envolvidas no *splicing* constitutivo e alternativo são os fatores de *splicing* SR (Ferreira, 2016). Essas proteínas apresentam um ou mais domínios de ligação à RNA (RRM – *RNA Recognition Motif*) em sua porção N-terminal e uma região C-terminal rica em repetições de serina-arginina e/ou arginina-serina (SR/RS), chamada domínio RS (Reddy, 2004; Ferreira, 2016). Fosforilações nas proteínas SR modulam interações com outras proteínas e localização celular (Reddy,

2004; Ferreira, 2016). O direcionamento desses fatores de *splicing* aos sítios ativos de transcrição depende de fosforilações no CTD da RNAPII (Ferreira, 2016).

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

O objetivo desse trabalho foi elucidar a(s) função(ões) biológica(s) de NtCDKG;2, através da identificação de suas proteínas parceiras de interação.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar possíveis parceiros de interação de NtCDKG;2, provenientes do *screening* de duplo-híbrido utilizando essa proteína como isca.
2. Confirmar a interação de NtCDKG;2 e proteínas com potencial função no processamento de RNA, ciclo celular e florescimento, por meio de testes par-a-par no sistema duplo-híbrido.

3. Material e Métodos

3.1 Extração de DNA plasmidial de levedura

Para essa etapa foi utilizado o kit de extração de DNA plasmidial *ZymoprepTM Yeast Plasmid Miniprep I* (Zymo Research), seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente, os *pellets* de levedura foram ressuspensos em 150 µl da Solução 1 e colocados em microtubos de 1,5 ml. A essa mistura foram adicionados 2 µl da enzima *ZymolyaseTM* e o *pellet* formado foi ressuspensado utilizando o vórtex. Posteriormente, esses tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após esse período, os tubos foram deixados a temperatura ambiente, adicionou-se 150 µl da Solução 2 e todo o conteúdo do tubo foi misturado por pipetagem. Posteriormente, a mesma quantidade da Solução 3 foi acrescentada e misturada. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo, onde foi adicionado 400 µl de isopropanol e misturado delicadamente por inversão. Em seguida, centrifugou-se esses tubos a 14000 rpm por 8 minutos. Todo o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensado em 35 µl de água deionizada.

3.2 Transformação de *E. coli* eletrocompetentes

A técnica de inserção de DNA exógeno em bactéria por eletroporação é uma das mais amplamente utilizadas, por ser um método rápido e simples. Para esse processo é necessário que as células de bactérias utilizadas sejam eletrocompetentes e preparadas de acordo com o descrito em Sambrook & Russel (2001). Na eletroporação, fragmentos de DNA exógeno entram nessas células através de poros formados temporariamente na membrana celular, induzidos por um pulso elétrico de voltagem (Rouws *et al.*, 2006). Dessa forma, para cada transformação, utilizou-se uma alíquota de 40-50 µl de células eletrocompetentes de *E. coli*, da cepa DH10B, descongeladas em gelo.

Em fluxo laminar, foram adicionados 5 µl do DNA de interesse no tubo com essas células. Essa mistura foi colocada em uma cubeta de eletroporação de 10 mm (BioRad) previamente colocada em gelo. Posteriormente, a parte metálica dessa cubeta foi secada com papel absorvente e colocada no eletroporador Gene Pulser® II (Bio-Rad), o qual foi previamente configurado com os seguintes parâmetros: resistência de 200 ohms, capacitância de 25 µF e voltagem de 1,8 kV. Então, essa cubeta foi submetida a um choque elétrico de aproximadamente 5 segundos de duração. Logo após o choque, foi

adicionado 1 ml de meio LB líquido na cubeta, para recuperar as células, e todo o volume foi transferido para um tubo de ensaio. As células foram incubadas a 37°C, sob agitação de 200 rpm por 1 hora. Em seguida, o volume do tubo de ensaio foi colocado em um microtubo de 1,5 ml, o qual foi centrifugado à 4000 rpm por 4 min, para que as células ficassem no fundo do tubo. Todo o *pellet* (aproximadamente 150 µl) foi coletado com o auxílio de uma micropipeta e distribuído sobre uma placa contendo meio LB sólido complementado com antibióticos de seleção adequados. Para uma melhor distribuição das células, utilizou-se uma alça de Drigalski previamente esterilizada com álcool 100% e flambada. Essas placas foram incubadas a 37°C entre 16 e 20 horas. Se a transformação das células foi eficiente, após esse período houve a formação de colônias, das quais 6 foram escolhidas para terem seus DNA plasmidiais extraídos. Essas colônias foram coletadas com palitos estéreis e inoculadas em tubos de ensaio estéreis contendo 5 ml de meio LB líquido, suplementado com 100µg/ml de ampicilina. O uso desse antibiótico garante que apenas os plasmídeos de interesse (pDEST22) sejam selecionados, uma vez que estes apresentam o gene de resistência à ampicilina. Esses tubos foram, então, incubados a 37°C com agitação de 200 rpm entre 16 e 20 horas. Posteriormente, 300 µl de cada cultura foram armazenados com 300 µl de glicerol 50% estéril a -80°C. O volume restante da cultura foi utilizado para a extração de DNA plasmidial.

3.3 Extração de DNA plasmidial em pequena escala

Nessa pesquisa foram utilizados dois métodos diferentes de extração de DNA plasmidial de *E. coli*. O kit comercial GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Ferramentas Lifesciences) foi utilizado principalmente para obter um DNA de melhor qualidade, para ser utilizado em transformações de levedura e sequenciamentos. A extração com o kit foi realizada segundo as instruções do fabricante. Quando o DNA iria ser utilizado para checagem de tamanhos de insertos, por digestão com enzimas de restrição, utilizou-se a técnica de extração de DNA por lisozima.

Para esse método, inicialmente foram coletados 1,5 ml da cultura líquida em um microtubo, o qual foi centrifugado a 14.000 rpm por 2 min (microcentrífuga Eppendorf 5415 C). O sobrenadante foi descartado e, em seguida, o processo foi repetido mais uma vez. Posteriormente, as células precipitadas foram ressuspensas em 175 µl de tampão TES (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0; sacarose 15%) e foram adicionados 20 µl de lisozima (25 mg/µl). Os tubos foram incubados por 10 minutos a

temperatura ambiente e, logo após, 15 minutos em banho-maria a 73°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos, a fim de que os plasmídeos se separassem dos restos celulares. O sobrenadante foi transferido para um microtubo novo, no qual foram adicionados 20 µl de acetato de sódio 3 M e 400 µl de etanol 100%. A mistura foi incubada por 1 hora em -20°C e, em seguida, o microtubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min. Descartou-se o sobrenadante e manteve-se os tubos abertos em temperatura ambiente. Após a evaporação total do etanol, o DNA precipitado foi ressuspendido com 50 µl de água deionizada estéril e armazenados à -20°C.

3.4 Análise com endonuclease de restrição

Para analisar o DNA plasmidial extraído, foram feitas digestões enzimáticas desse material, seguidas por eletroforese em gel de agarose. Como a sequência dos clones de cDNA inseridos no vetor era desconhecida, utilizou-se uma endonuclease que cortasse o plasmídeo nas sequências que flanqueiam o inserto, a BsrGI. Essas digestões foram planejadas utilizando a ferramenta *online* NEBcutter V2.0 (disponível em: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/> New England BioLabs), a qual mostra os sítios de restrição presentes em uma sequência de interesse. Uma vez que a enzima foi escolhida, preparou-se a reação de digestão considerando as instruções do fabricante da mesma, assim como a temperatura de incubação. Sendo assim, cada reação foi feita com 2 µl de tampão NEB2 (10x); 0,2 µl de 100X BSA (Bovine Serum Albumine) (10 mg/ml); 0,2 µl de RNase (10 mg/ml); 0,25 µl da enzima BsrGI (10.000 U/ml); 5 µl de DNA plasmidial e 12,35 µl água deionizada estéril. Os microtubos contendo essa mistura foram incubados a 37°C entre 16 e 20 horas.

3.5 Eletroforese em gel de agarose

Após a reação de digestão com a endonuclease BsrGI, os tamanhos dos fragmentos de DNA das amostras foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X (Tris-base 50 mM; ácido bórico 50 mM; EDTA 2 mM, pH 8,0).

Esse procedimento iniciou-se com o aquecimento em forno micro-ondas da mistura (TBE 0,5X; agarose 1%) até a total dissolução da agarose. Quando essa mistura estava levemente fria, adicionou-se um agente intercalante de DNA chamado brometo de

etídeo (em concentração final de 1 ng/ml), o qual é utilizado para a visualização de fragmentos de DNA em gel agarose. Logo em seguida, essa mistura foi colocada em um molde para gel de agarose para a formação dos poços para a posterior aplicação de amostras. Assim que foi solidificado, o gel foi colocado na cuba de eletroforese, que continha quantidade suficiente do tampão TBE 0,5X para o recobri-lo.

A preparação das amostras consistiu na adição de tampão de carregamento (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol, 15% Ficoll) 6X, em volume suficiente para sua concentração final na amostra ficar 1X. As amostras foram então aplicadas, juntamente com o marcador (1kb Plus DNA Ladder- Invitrogen) e o gel foi submetido a uma corrente elétrica de 100 V durante 90-120 min.

A visualização do gel foi feita através do sistema *Kodak Gel Logic 100 Imaging System* (Kodak), o qual possui um sistema de emissão de luz UV acoplado a uma câmera, ligado a um computador. Nesse sistema, a luz UV emitida destaca as bandas de DNA que tem suas imagens capturadas pela câmera, as quais são transmitidas para o computador. O *software* desse sistema capturou as imagens, sendo que foi possível ajustar as condições de exposição e iluminação para otimizar a visualização do DNA aplicado no gel.

3.6 Limpeza de DNA plasmidial pelo método do fenol-clorofórmio

No caso de ser necessário o sequenciamento das amostras de DNA preparadas pelo método de lisozima (item 3.3), foi realizado um passo adicional de limpeza do DNA, incluindo o tratamento com RNase e a subsequente limpeza pelo método do fenol-clorofórmio descrito abaixo.

O início desse processo se deu por completar o volume inicial da solução de DNA com água deionizada esterilizada q.s.p. 200 µl e adicionar 4 µl de solução de RNase (10 µg/µl). Essa mistura foi mantida em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, 200 µl de fenol pH 8,0 (Invitrogen) foram adicionados e a mistura foi submetida a homogeneização em vórtex e centrifugação a 14000 rpm por 3 minutos (microcentrífuga Eppendorf 5415C). Em seguida, a fase superior da mistura foi transferida para um novo microtubo, no qual foi adicionado 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1. O tubo foi vortexado e centrifugado nas condições anteriores. Novamente transferiu-se a fase superior da mistura para um novo microtubo, no qual 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol gelado foram adicionados. Esses microtubos foram incubados a -80°C por 15 min, possibilitando a precipitação do DNA plasmidial. Em

seguida, o tubo foi centrifugado por 15 min a 14000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 400 µl de etanol 70 %, sendo novamente centrifugado por 3 min nas mesmas condições da anterior. Mais uma vez, descartou-se o sobrenadante e manteve-se o tubo aberto a temperatura ambiente até a evaporação total do etanol. O precipitado de DNA foi ressuspensionado em 50 µl de água deionizada estéril.

3.7 Sequenciamento

A Dra. Andréa Carla Quiapim sequenciou todos os insertos de cDNA dos clones que apresentaram padrões diferentes de digestão enzimática, utilizando o método de Sanger *et al.* (1977) e o primer DEST22-AD502-Fw (TAT AAC GCG TTT GGA ATC ACT), no sequenciador ABI 3100 (*Applied Biosystems*).

3.8 Análise de bioinformática

As sequências foram identificadas com o *software* TBLASTX no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e no *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR, <https://www.arabidopsis.org/Blast/>). Esse *software* traduz uma sequência de nucleotídeos nas 6 fases de leitura possíveis e compara com todas as sequências traduzidas de aminoácidos depositadas no banco de dados. A partir dessa análise, consegue-se associar uma função biológica putativa para a sequência de nucleotídeos, possibilitando a formulação de hipóteses. Os clones codificando proteínas promissoras de interação foram usados para teste de interação par-a-par.

3.9 Ensaio de duplo-híbrido, utilizando *HIS3* como gene repórter, para a confirmação de interações (Re-teste)

A fim de confirmar a interação entre as proteínas codificadas pelos clones G2H4.6, G2G5.1, G2D6.3, G2E6.4, G2F6.2, G2F6.6, G2G7.4, G2F9.2, G2D12.2 e G2E12.2 com a NtCDKG;2, foi realizado um ensaio de duplo-híbrido em leveduras (*Yeast Two-Hybrid System*).

O sistema de Y2H utilizado baseia-se na possibilidade de se separar o sítio de ligação ao DNA (*DNA Binding domain* - DBD) e o sítio de ativação (*Activation domain* - AD) do fator de transcrição GAL4 (Fields & Song, 1989). Nesse sistema, cada domínio é

fusionado a uma proteína de interesse (X e Y, respectivamente) e interações físicas entre DBD-X e AD-Y reconstituem a capacidade dos domínios ativarem a transcrição do gene repórter, regulado por promotores reconhecidos pelo DBD utilizado (Fields & Song, 1989). As células de levedura utilizadas foram da cepa PJ69-4A (James *et al.*, 1996), a qual possui os genes *LacZ* e *HIS3*, que estão sob controle de promotores ativados pelo fator de transcrição GAL4. Caso as proteínas em estudo interajam, aproximando o AD de DBD e restaurando a funcionalidade do GAL4, haverá a transcrição desses genes. A expressão do gene *HIS3* confere a capacidade de crescimento em meio sem histidina, enquanto o gene *LacZ* produz a enzima b-galactosidase, que pode ser utilizada em ensaios quantitativos.

Para atingir o objetivo de confirmar a interação de NtCDKG;2 com os clones escolhidos, estavam fusionadas: a sequência codificadora de NtCDKG;2 à do DBD (no vetor pDEST32) e a sequência codificadora dos clones à do AD (pDEST22). Os plasmídeos utilizados apresentam genes marcadores de seleção que foram fundamentais para o desenvolvimento desse experimento. Sendo que, o pDEST32 (Figura 3.9.1) possui o gene marcador de seleção *LEU2*, o qual permite que a levedura cresça em meio sem leucina, já o pDEST22 (Figura 3.9.1) apresenta o gene *TRP1*, o qual possibilita o desenvolvimento da levedura em meio sem triptofano.

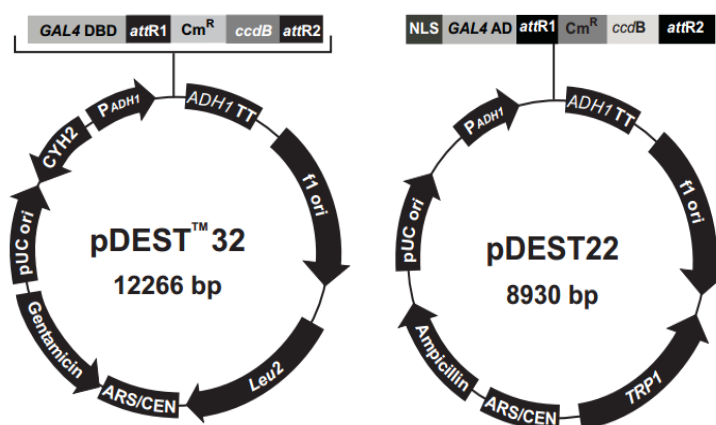


Figura 3.9.1: Mapa dos vetores pDESTTM32 e pDESTTM22 (Invitrogen). Esses vetores apresentam características em comum como os genes de seleção negativa *Cm^R* e *ccdB* sendo flanqueados pelos sítios de recombinação *attR*; a presença da sequência ARS que funciona como a origem de replicação e a sequência CEN que corresponde a uma região do centrômero de cromossomos em *S. cerevisiae*. Além disso, ambos apresentam a sequência pUC ori, que é a origem de replicação em *E. coli*. Por outro lado, ambos apresentam particularidades, o pDESTTM32 apresenta no cassete de expressão o GAL4DBD, gentamicina como gene de seleção positiva em *E. coli* e o gene *LEU2*, como marcador auxotrófico para leucina em *S. cerevisiae*. Já o pDESTTM22 apresenta no cassete de expressão o GAL4AD, ampicilina como gene de seleção positiva em *E. coli* e o gene *TRP1*, como marcador auxotrófico para triptofano em *S. cerevisiae*. Retirado de Invitrogen (2005).

Correspondendo a necessidade de assegurar o não aparecimento de falsos positivos, realizou-se o teste de auto-ativação. Nesse experimento, as leveduras foram co-transformadas com os clones selecionados no *screening* (no pDEST22) e com o vetor complementar do sistema (pDEST32) vazio. Com isso, foi possível identificar se as proteínas sozinhas conseguiam ativar o sistema no meio de seleção SD–Leu-Trp-His. Além disso, foram incluídos controles de leveduras contendo a NtCDKG;2 (pDEST32) e o vetor pDEST 22 vazio, resultados que mostram se essa proteína foi suficiente para a ativação do sistema. Para evitar a ocorrência de auto-ativação, algumas transformações foram repicadas em placas contendo diferentes concentrações de 3-amino-1,2,4-triazol (3AT). 3AT é um inibidor da via biossintética da Histidina, e se liga à enzima produzida pelo gene repórter HIS3, utilizado na avaliação das interações por Y2H.

Outros dois controles foram utilizados nesse experimento, provenientes do kit ProQuest™ Two-Hybrid System (Invitrogen), os quais consistem na interação entre a proteína de rato Krev1 associada ao DBD e duas versões da proteína RalGDS ligadas ao AD. A variação entre elas é devido a diferentes mutações em sua sequência codificadora, sendo que uma mutação na posição I77 para T77 altera parcialmente a interação - funcionando como interação fraca - e uma mutação na posição L65 para P65 inativa a proteína - atuando como controle negativo.

As leveduras utilizadas foram transformadas pelo método do choque térmico. Inicialmente, 2 ml de cultura foram centrifugados a 14000 rpm por 10 segundos. Repetiu-se esse passo, totalizando 4 ml de cultura por transformação. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 ml de LiAc 100 mM. Os tubos foram, então, incubados a temperatura ambiente por 1 minuto. Novamente, centrifugou-se os tubos a 14000 rpm por 10 segundos e removeu-se o sobrenadante, e o precipitado de células foi ressuspensionado em 240 µl de 50% PEG-3350 (polietilenoglicol – Merck). Em cada tubo foram adicionados DNA de interesse (500 ng de cada construção), 70 µl de água deionizada estéril, 5 µl de carreador de DNA fresco (50 µg de espermatozoides de salmão sonificado) e 36 µl de LiAc 1 M. Logo após, as amostras foram vortexadas por 1 minuto e incubadas a 42° C em banho-maria por 1 hora. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 10 segundos. O sobrenadante foi removido e o precipitado de células foi ressuspensionado em 300 µl de água ultrapura estéril. Os passos seguintes consistiram na centrifugação dos tubos a 14000 rpm por 10 segundos e ressuspensão do *pellet* em 50 µl de água ultrapura estéril. Ao final, os 50 µl de cada amostra foram plaqueados em meio seletivo (SD-Leu-Trp). As leveduras

transformadas foram mantidas a 30°C por aproximadamente 72 horas e armazenadas a 20°C por até 3 semanas.

A segunda etapa do experimento foi iniciada com a escolha aleatória de três colônias provenientes de cada co-transformação de levedura, as quais foram inoculadas em meio líquido SD-Leu-Trp por 24 horas a 30°C e 200 rpm. Após esse período, mediu-se a OD de cada amostra no espectrofotômetro (a 600 nm). Assim, calculou-se a quantidade de cultura e meio necessários para diluir cada cultura a OD de 0,2 em 250 µl de volume final. Cada uma dessas culturas diluídas (250 µl) foi colocada na primeira linha de poços de uma placa com 96 poços. Posteriormente, 150 µl de meio de cultura foram colocados nos poços da segunda linha, nos quais se diluiu em 4 vezes a mistura da primeira linha. Utilizando um replicador de 96 pinos, repicou-se a placa preparada em 6 placas de Petri diferentes, uma contendo meio SD-Leu-Trp (para controle de crescimento), uma contendo meio SD-Leu-Trp-His (para seleção das interações) e quatro com SD-Leu-Trp-His + 3-amino1,2,4-triazol (3AT) em diferentes concentrações (0,5 µM; 1 µM; 2 µM e 3 µM) (para controle de auto ativação).

As placas foram incubadas à 30°C por 72 horas e, após esse período, a incubação passou a ser feita à 20°C. O crescimento das colônias foi monitorado diariamente e registrado por câmera fotográfica.

3.10 Avaliação das interações pelo ensaio quantitativo da β -galactosidase

Na realização do ensaio quantitativo da β -galactosidase utilizando ONPG (O-Nitrofenil- β -D-Galactopiranosídeo) como substrato, foram testadas 3 colônias isoladas de cada interação. Primeiramente, as colônias foram inoculadas em 5 ml de meio SD -Leu – Trp e incubadas *overnight* a 30°C sob agitação entre 230-250 rpm. As culturas foram então diluídas em 5 ml de meio YPAD para uma OD₆₀₀ de aproximadamente 0,5 e incubadas a 30°C e entre 230-250 rpm até atingir uma OD₆₀₀ entre 1.0-1.5. Cada cultura foi dividida em três microtubos de 1,5 ml, que foram centrifugados a 14000 x g por 30 segundos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e descartados. Em seguida, cada *pellet* foi ressuspensionado em 1,5 ml de Z Buffer (3.14). Centrifugou-se novamente os tubos a 14000 x g por 30 segundos, seguido da remoção e descarte do sobrenadante. Os passos seguintes consistiram na ressuspensão de cada *pellet* em 300 µl de Z Buffer, transferência de 100 µl da suspensão de células para novos tubos, e armazenamento dos 200 µl restantes no gelo para repetir se necessário. As células foram lisadas em 3 ciclos

de imersão em nitrogênio líquido (10 segundos) e em banho-maria a 37°C (90 segundos). Após isso, preparou-se uma solução estoque de 700 µl de *Z Buffer* com 1,9 µl de 2-mercaptoetanol para cada tubo a ser ensaiado e o “branco” com 100 µl de *Z Buffer*. A cada tubo foi adicionado 700 µl da solução estoque, incluindo o branco e, nesse momento, iniciou-se a contagem do tempo. Imediatamente, adicionou-se 160 µl da solução de ONPG aos tubos, que foram colocados em banho-maria a 30°C. Deu-se início ao monitoramento de cor da reação. Quando a reação começava a ficar amarela, ela era parada com a adição de 400 µl de Na₂CO₃ 1 M, que também foi adicionado no branco. O tempo decorrido foi anotado. Logo após, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 14000 x g e 1 ml do sobrenadante foi transferido para cuvetas de espectrofotômetro. O branco foi utilizado para calibrar o espectrofotômetro em um comprimento de onda de 420 nm. A OD₄₂₀ de cada amostra foi medida e foi feito o cálculo de unidades de β-galactosidase, onde 1 unidade de β-gal é definida como a quantidade necessária para hidrolisar 1 nmol de ONPG em o-nitrofenol e D-galactose por minuto: Unidades de β-gal = 1,000 x OD₄₂₀/(t x V x OD₆₀₀) (t = tempo (em minutos) de incubação, V = volume de cultura utilizado (ml por tubo), OD₄₂₀ = absorbância do o-nitrofenol, OD₆₀₀ = densidade de células no início do ensaio).

3.11 Meio SD

Na confecção desse meio utilizou-se 6,7 g de base nitrogenada para leveduras sem aminoácidos (Difco), 20 g de dextrose, H₂SO₄ para ajustar o pH em 5,8 e quantidade suficiente de água deionizada para inteirar 900ml. Para a preparação de meio SD sólido, foi adicionado ágar para concentração final de 2% (p/v). Após a mistura, o meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos sob 1 atm de pressão e 120°C (autoclave vertical - Fanem) e, só então, a solução *Dropout* estéril foi adicionada (descrição abaixo).

3.12 Solução *Dropout* de aminoácidos 10X completo para meio SD

Para a preparação desta solução 10X foram utilizados: 300 mg de isoleucina, 1500 mg de L-valina, 200 mg de hemissulfato de L-Adenina, 200 mg de L-Arginina HCl, 200 mg de L-Histidina HCl monoidratada, 1000 mg de L-Leucina, 300 mg de L-Lisina HCl, 200 mg de L-Metionina, 500 mg de L-Fenilalanina, 2000 mg de L-Treonina, 200 mg de L-Triptofano, 300 mg de L-Tirosina, 200 mg de L-Uracila e o suficiente de água

deionizada para completar 1 litro. A solução foi autoclavada por 20 minutos sob 1 atm de pressão e 120°C (autoclave vertical - Fanem). A solução foi adicionada para concentração final 1X nos meios de cultura. Para meios seletivos SD-Leu-Trp (sem leucina e triptofano) ou SD-Leu-Trp-His (sem leucina, triptofano e histidina) foram usadas soluções *dropout* feitas sem adição destes aminoácidos.

3.13 Meio LB (Luria-Bertani) para bactérias

Para a preparação do meio LB foram utilizados: 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl e quantidade suficiente de água deionizada para completar 1 litro. Para a preparação de meio sólido, foram adicionados 15 g de ágar bacteriológico (Sigma-Aldrich). Depois de preparado, o meio foi dividido em garrafas de vidro, nunca ultrapassando dois terços do volume total, e foi autoclavado por 20 minutos sob 1 atm de pressão e 120°C (autoclave vertical - Fanem).

3.14 *Z buffer*

Para 1 litro de solução *Z buffer* foram utilizados 16,1 g de Na₂HPO₄•7H₂O, 5,5 g de NaH₂PO₄•H₂O, 0,75 g de KCl, 0,246 g de MgSO₄•7H₂O e água deionizada estéril em quantidade para completar 1 litro. O pH foi ajustado para 7,0 e a solução foi autoclavada por 20 minutos sob 1 atm de pressão e 120°C (autoclave vertical - Fanem).

3.15 Solução ONPG

Para 100 ml de solução ONPG foram utilizados 400 mg de O-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo e 100 ml de *Z buffer*. Essa solução foi dissolvida por agitação entre 1 e 2 horas.

4. Resultados

4.1 Análise dos parceiros de interação de NtCDKG;2, identificados no *screening* de duplo-híbrido

O *screening* inicial de duplo-híbrido em leveduras (Y2H), utilizando NtCDKG;2 como isca, foi realizado por Lubini (dados não publicados). Este *screening* produziu 225 colônias de leveduras positivas, as quais foram repicadas individualmente para a identificação gradual dos plasmídeos (clones) que estas continham e posterior confirmação das interações.

O processo de identificação incluiu as análises dos fragmentos de DNA provenientes de 6 colônias diferentes de bactérias que tinham sido transformadas com o DNA proveniente de uma mesma colônia de *S. cerevisiae*. Nessa etapa identificaram-se duas possibilidades (Figura 4.1.1): 1) todos os 6 clones apresentavam o mesmo padrão de bandas (G2B3.1 a G2B3.6); e 2) os clones apresentavam padrões diferentes de bandas (G2A3.1 a G2A3.6). No primeiro caso, os resultados mostram que na colônia de levedura em estudo havia apenas um único tipo de plasmídeo, ou seja, apenas o plasmídeo codificando a proteína candidata à interação com NtCDKG;2. No segundo caso, na colônia de levedura em estudo existem 2 ou mais plasmídeos, sendo que provavelmente apenas um deles deve codificar a proteína candidata à interação. Em ambos os casos realizou-se o re-teste par-a-par, para confirmar a interação com NtCDKG;2.

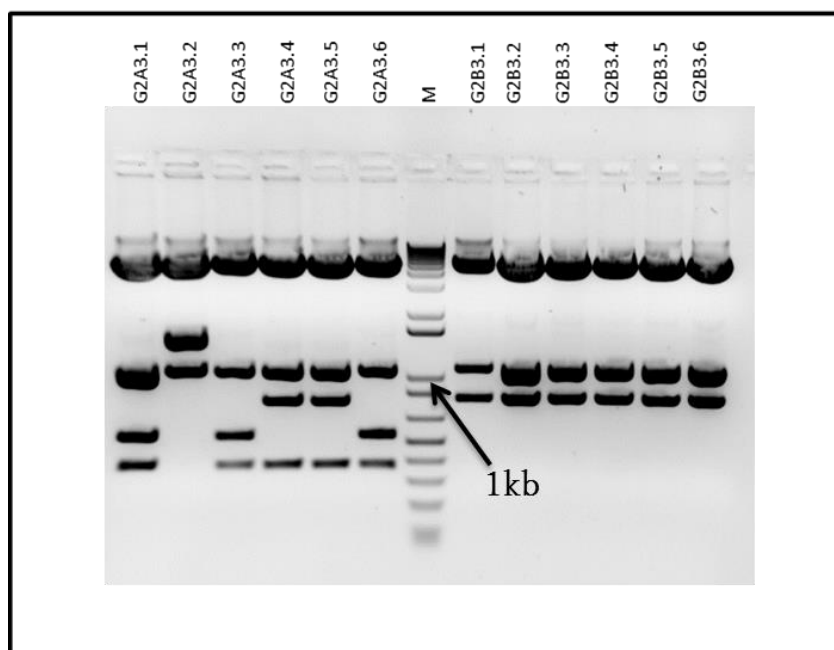


Figura 4.1.1: Exemplos das diferentes situações encontradas na análise dos clones provenientes do *screening*. As primeiras 6 amostras (G2A3.1-A3.6) correspondem às colônias de bactérias transformadas

com o DNA plasmidial proveniente da colônia de levedura G2A3. Neste caso, existem 3 padrões de bandas diferentes sendo que, provavelmente, apenas um destes clones codifica a proteína candidata à interação. Já os outros 6 clones (G2B3.1-B3.6), transformados com o DNA oriundo da colônia G2B3, apresentaram apenas um tipo de padrão de bandas, indicando a presença de um único clone codificando a proteína candidata à interação. Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), dos produtos de digestão com BsrGI, dos DNAs plasmidiais das colônias de *E. coli* transformadas com o DNA extraído de colônias de levedura positivas do *screening* de Y2H de NtCDKG;2. M: marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); *: colônias escolhidas para sequenciamento com base nas diferenças dos padrões de digestão observados.

Durante a execução deste projeto, foram analisadas 92 dessas colônias de leveduras, as quais possuíam 185 clones de cDNAs independentes, que foram sequenciados e identificados. Os resultados da identificação estão na Tabela 1, do APÊNDICE 1.

Uma grande quantidade dos cDNAs dos clones independentes identificados nesse trabalho codificam proteínas ribossomais. Tal quantidade (14: G1H4.1, G2G3.2, G2B4.1, G2D7.1, G2F7.1, G2H7.1, G2G9.1, G2H9.1, G2C10.2, G2H11.1, G2H11.2, G2B12.1, C12.1, G2D12.1) era esperada, uma vez que interação com proteínas ribossomais é um dos falsos positivo mais comuns do sistema de duplo-híbrido (Hengen, 1997).

4.2 Re-testes em Y2H utilizando *HIS3* como gene repórter

A identificação dos clones possibilitou a realização de um levantamento bibliográfico, permitindo que nosso grupo de pesquisa selecionasse aqueles com potenciais funções em processos biológicos interessantes, como o ciclo e proliferação celular, *splicing* e florescimento, para terem a interação com NtCDKG;2 analisada/confirmada por Y2H. Destes, 10 clones foram re-testados neste trabalho, sendo que 6 interações foram positivas e 4 negativas (Tabela 4.2.1).

Tabela 4.2.1: Clones re-testados com NtCDKG;2 por Y2H. *Por codificar a mesma proteína os clones entre parênteses não foram utilizados no re-teste. Nomes das proteínas foram dados em relação aos seus homólogos em *A. thaliana* ou de acordo com a anotação do banco de dados NCBI.

Re-testes por Y2H com NtCDKG;2		
Clone	Proteína	Resultado
G2D12.2 (G1E5.4, G2C5.1)*	NtAPX1	Negativo
G2G5.1 (G2D10.3)*	NtTCP15	Positivo
G2E6.4	NtDNAJ3	Positivo
G2F6.6	NtTIR1	Positivo

G2F6.2	NtRSZ21	Positivo
G2H4.6	NtIAA17	Positivo
G2D6.3	NtMBD10	Positivo
G2G7.4	NtSDG2	Negativo
G2F9.2	NtH2A.1	Negativo

4.2.1 NtCDKG;2 interage com fatores de transcrição

O clone G2G5.1 codifica a proteína NtTCP15 e essa interação foi encontrada no *screening* de Y2H utilizando NtCDKG;2 como isca e confirmada por Y2H par-a-par neste trabalho (Figura 4.2.1.1). O clone G2D10.3 também codifica essa mesma proteína, portanto, não foi utilizado nos re-testes. No *screening*, encontrar clones independentes, codificando a mesma proteína, fortalece a hipótese de interação entre as proteínas codificadas pelos clones em estudo. Neste caso, é mais uma evidência da interação entre NtCDKG;2 e NtTCP15.

NtTCP15 é homóloga à TCP7 de *Arabidopsis thaliana*, sendo que apresentam 72% das sequências de nucleotídeos idênticas e 81% similares. Elas pertencem à família dos fatores de transcrição TCP, cuja nomenclatura é derivada dos três primeiros genes em que o domínio TCP foi encontrado: *Teosinte branched1* (*tb1*) em *Zea mays* (milho), *CYCLOIDEA* (*CYC*) em *Antirrhinum majus* (boca-de-leão) e *PROLIFERATING CELL FACTORS 1* e *2* (*PCF1* e *PCF2*) em *Oryza sativa* (arroz) (Li, 2015). As TCPs encontradas em *A. thaliana* estão envolvidas na regulação positiva e negativa da proliferação celular (Li, 2015).

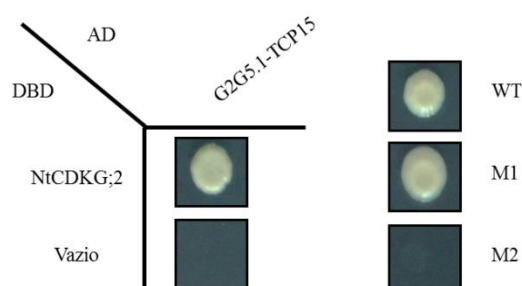


Figura 4.2.1.1: Resultado do re-teste por Y2H entre NtCDKG;2 e o clone G2G5.1-TCP15. Na linha superior encontra-se o resultado da interação, e na linha inferior está o controle negativo. AD: *Activation*

domain; DBD: *Binding domain*; Wt: controle de interação forte; M1: controle de interação médio; M2: controle de interação negativa.

4.2.2 NtCDKG;2 apresenta interação positiva com proteína reguladora do florescimento

A proteína NtDNAJ3 (*DNAJ homologue 3*), codificada pelo clone G2E6.4, foi identificada no *screening* e teve sua interação com NtCDKG;2 confirmada no re-teste par-a-par por Y2H (Figura 4.2.2.1). AtDNAJ3, cuja sequência de nucleotídeos é 79% idêntica e 87% similar à de NtDNAJ3, atua positivamente no desenvolvimento floral através da repressão de inibidores de vias florais (Shen *et al.*, 2011).

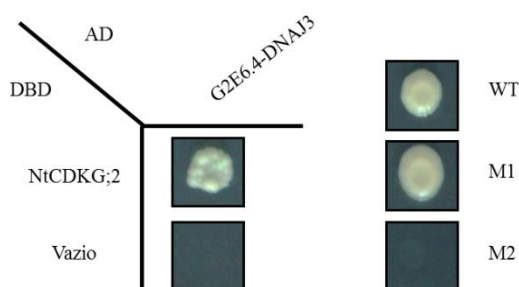


Figura 4.2.2.1: Resultado do re-teste por Y2H entre NtCDKG;2 e o clone G2E6.4-DNAJ3. Na linha superior encontra-se o resultado da interação, e na linha inferior está o controle negativo. AD: *Activation domain*; DBD: *Binding domain*; Wt: controle de interação forte; M1: controle de interação médio; M2: controle de interação negativa.

4.2.3 NtCDKG;2 tem interação positiva com fator de *splicing*

O clone G2F6.2 foi identificado como o fator de *splicing* NtRSZ21 e a interação com NtCDKG;2 foi confirmada por Y2H (Figura 4.2.3.1). A sequência de nucleotídeos de NtRSZ21 é 88% idêntica e 90% similar à sequência de AtRSZ21, sendo, assim, considerados homólogos. AtRSZ21 pertencente à sub-família RSZ da família de proteínas SR e está relacionado com a regulação do *splicing* (Golovkin & Reddy, 1998, Richardson *et al.*, 2011).

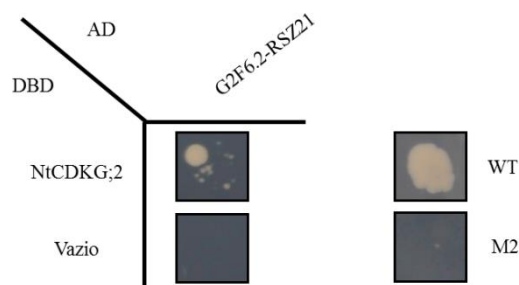


Figura 4.2.3.1: Resultado do re-teste por Y2H entre NtCDKG;2 e o clone G2F6.2-RSZ21. Na linha superior encontra-se o resultado da interação, e na linha inferior está o controle negativo. AD: *Activation domain*; DBD: *Binding domain*; Wt: controle de interação forte; M2: controle de interação negativa.

4.2.4 NtCDKG;2 interage com proteínas que regulam respostas primárias a auxina

O clone G2F6.6 codifica NtTIR1, cuja sequência de nucleotídeos é 58% idêntica e 72% similar ao seu homólogo TIR1 de *Arabidopsis thaliana*. TIR1 é uma F-box que, juntamente com CUL1 e SKP1-like, formam o complexo ubiquitina-ligase SCF^{TIR1}, o qual atua como receptor celular de auxina (Gray *et. al*, 2001). A interação entre NtTIR1 e NtCDKG;2 foi confirmada por Y2H (Figura 4.2.4.1).

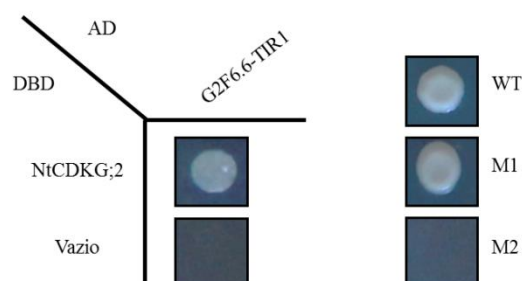


Figura 4.2.4.1: Resultado do re-teste por Y2H entre NtCDKG;2 e o clone G2F6.6-TIR1. Na linha superior encontra-se o resultado da interação, e na linha inferior está o controle negativo. AD: *Activation domain*; DBD: *Binding domain*; Wt: controle de interação forte; M1: controle de interação médio; M2: controle de interação negativa.

A interação entre NtCDKG;2 e NtIAA17(clone G2H4.6) foi confirmada por Y2H (Figura 4.2.4.2). NtIAA17 foi identificada como homóloga à AtIAA17, com sequências de nucleotídeos 60% idênticas e 77% similares. AtIAA17 é um repressor transcricional que atua na inibição da transcrição de genes responsivos à auxina (Gray *et. al*, 2001).

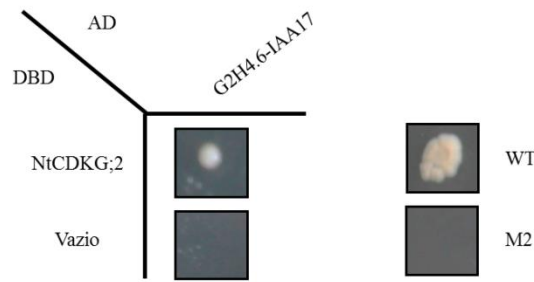


Figura 4.2.4.2: Resultado do re-teste por Y2H entre NtCDKG;2 e o clone G2H4.6-IAA17. Na linha superior encontra-se o resultado da interação, e na linha inferior está o controle negativo. AD: *Activation domain*; DBD: *Binding domain*; Wt: controle de interação forte; M1: controle de interação médio; M2: controle de interação negativa.

4.2.5 NtCDKG;2 apresenta interação positiva com proteína que se liga a sítios metilados

O clone G2D6.3 foi identificado no *screening* de NtCDKG;2 como NtMBD10 (*Methyl-CpG-binding domain 10*), o qual apresenta sequência de nucleotídeos 71% idêntica e 84% similar à MBD10 de *Arabidopsis thaliana*. As proteínas da família MBD em *A. thaliana* atuam na inativação de genes através de ligação a sítios metilados (Zemach & Grafi, 2007). A interação entre NtCDKG;2 e NtMBD10 foi positiva no re-teste par-a-par em Y2H.

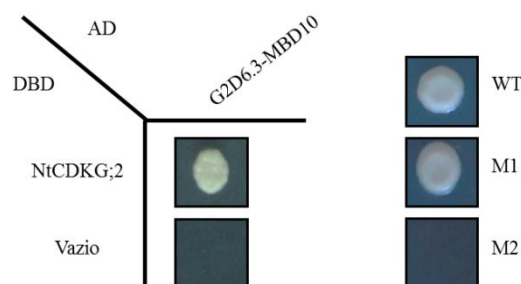


Figura 4.2.5.1: Resultado do re-teste por Y2H entre NtCDKG;2 e o clone G2D6.3-MBD10. Na linha superior encontra-se o resultado da interação, e na linha inferior está o controle negativo. AD: *Activation domain*; DBD: *Binding domain*; Wt: controle de interação forte; M1: controle de interação médio; M2: controle de interação negativa.

4.2.6 CDKG;2 interage com outra Quinase Dependente de Ciclina, a CDKF

Encontrada no *screening*, NtCDKF;1, homóloga à AtCDKF;1, teve sua interação com NtCDKG;2 confirmada no re-teste par-a-par (Figura 4.2.6.1). Essa interação já havia sido demonstrada nos trabalhos de Ferreira (2013, 2016) e Lubini (dados não publicados). Em *A. thaliana*, CDKF;1 regula a atividade de várias CDKs, através de fosforilações, e também fosforila o CTD da RNAPII (Hajheidari *et al.*, 2012).

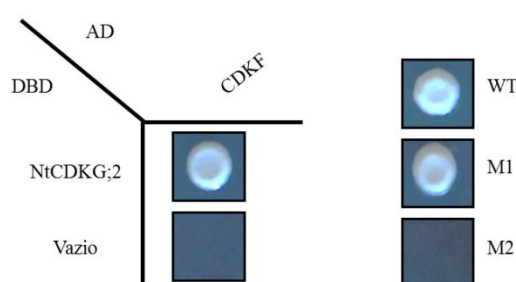


Figura 4.2.6.1: Resultado do re-teste por Y2H entre NtCDKG;2 e NtCDKF;1. Na linha superior encontra-se o resultado da interação, e na linha inferior está o controle negativo. AD: *Activation domain*; DBD: *Binding domain*; Wt: controle de interação forte; M1: controle de interação médio; M2: controle de interação negativa.

4.2.7 Critério utilizado para classificar uma colônia como positiva

A interação foi considerada como positiva quando a colônia teste de interação apresentou um maior crescimento em relação aos controles, independente do tamanho das colônias de interação. Isto foi estabelecido porque o uso de 3-aminotriazol (3-AT), para impedir a auto-ativação do sistema de Y2H, pode ter afetado o tamanho das colônias. O 3-AT exige maiores tempos de incubação (5-15 dias) e, ocasionalmente, reduz o tamanho das colônias para menos de 1 mm (Clontech, 2007). Além disso, um outro fator que pode ter influenciado o tamanho das colônias, é que, apesar de ser possível detectar interações fracas em ensaios de Y2H, como as de quinase e seu substrato, ocorre uma limitação no tamanho das colônias (Rodriguez-Milla *et al.*, 2006; Brückner *et al.*, 2009).

4.3 Confirmação das interações pelo ensaio quantitativo da β -galactosidase

As confirmações de interação apresentadas nos itens acima foram realizadas utilizando o gene repórter *HIS3*, que avalia a capacidade de crescimento das leveduras na ausência de Histidina. Para avaliar quantitativamente as interações, utilizou-se o gene repórter LacZ, produtor da enzima β -galactosidase, a qual converte lactose em glicose + galactose. Os ensaios quantitativos envolvendo a β -galactosidase utilizam análogos de galactose conjugados com cromóforos, permitindo quantificar a atividade da mesma. No experimento realizado neste trabalho, utilizou-se o análogo *O*-Nitrofenil β -D-Galactopyranosideo (ONPG).

Os resultados obtidos encontram-se na Figura 4.3.1. A interação entre NtCDKG;2 e NtCDKF;1, encontrada no *screening* e confirmada por Lubini (dados não publicados), Ferreira (2013, 2016) e neste trabalho, foi utilizada como controle positivo adicional, já que se trata de uma interação forte. Foram utilizados os controles do sistema de duplo-híbrido (Wt, M1 e M2), controles de auto-ativação de NtCDKG;2 e controle de auto-ativação de cada um dos clones testados.

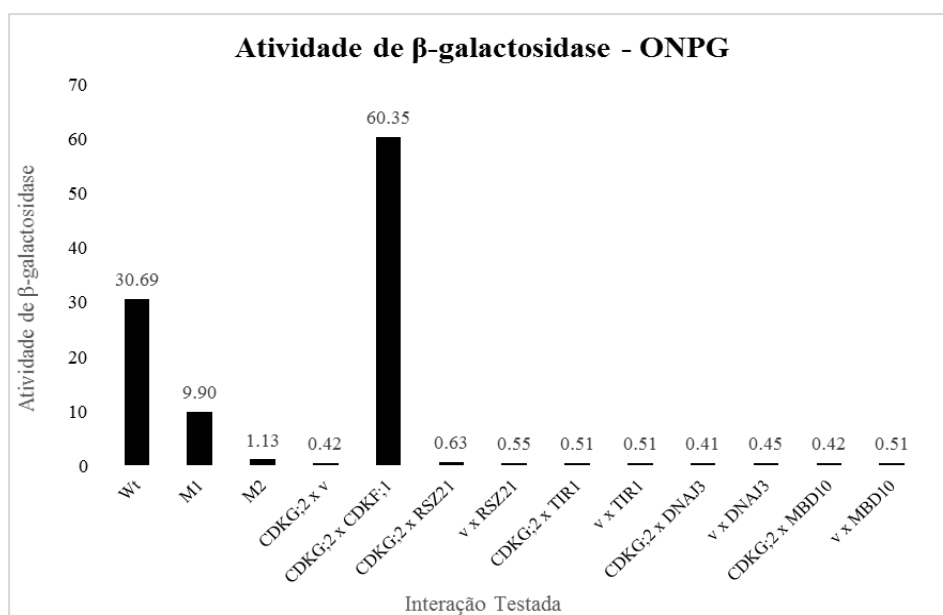


Figura 4.3.1. Ensaio quantitativo da β -galactosidase utilizando ONPG como substrato. A interação entre NtCDKG;2 e NtCDKF;1 é clara, enquanto que as interações com as outras proteínas não são evidentes. Wt – controle positivo de interação forte; M1 – controle positivo de interação média; M2 – controle negativo de interação.

5. Discussão

5.1 CDKG;2 pode estar participando de vias de transdução de sinal de auxina

O crescimento e desenvolvimento na planta são coordenados principalmente pelo fitormônio auxina. Sua forma natural mais frequente, IAA (*Indole-3-acetic-acid*), coordena muitos processos de crescimento e desenvolvimento através da modulação da expressão gênica, que leva a mudanças na divisão, alongação e diferenciação celular (Guilfoyle & Hagen, 2007; Tan *et al.*, 2007).

Para que a ação bioquímica ocorra, o fitormônio deve se ligar aos seus receptores, sendo que um dos principais é TIR1, o qual foi encontrado no *screening* de CDKG;2 e confirmado pelo re-teste par-a-par (Figura 4.2.4.1). Além dos receptores TIR, outras moléculas estão envolvidas no início da via de sinalização por auxina: as proteínas da família Aux/IAA, que atuam como repressores transcricionais, e os ARFs (*auxin response factors*), fatores de transcrição que regulam a expressão de genes responsivos à auxina (Guilfoyle & Hagen, 2007; Tan *et al.*, 2007). Os ARFs se ligam especificamente aos elementos de resposta à auxina TGTCTC (AuxREs - *auxin response elements*) nos promotores desses genes e funcionam em combinação com os repressores Aux/IAA na regulação de sua expressão (Guilfoyle & Hagen, 2007; Tan *et al.*, 2007).

Em baixos níveis de auxina, os repressores Aux/IAA se ligam aos ARFs, formando heterodímeros e bloqueando a atividade desses fatores de transcrição (Guilfoyle & Hagen, 2007; Tan *et al.*, 2007; Arase *et al.*, 2012). Quando a concentração de auxina aumenta, ela se liga ao receptor TIR1 no complexo SCF^{TIR1}, aumentando a afinidade deste às proteínas Aux/IAA (Guilfoyle & Hagen, 2007; Tan *et al.*, 2007; Arase *et al.*, 2012). Isso permite que SCF^{TIR1} marque as proteínas AUX/IAA com ubiquitinas, levando-as a degradação e, conseqüentemente, ativando os ARFs e desreprimindo as vias de resposta à auxina (Gray *et al.*, 2001; Guilfoyle & Hagen, 2007; Tan *et al.*, 2007; Arase *et al.*, 2012).

Entre as proteínas parceiras de interação de TIR1, já descritas na literatura, encontra-se IAA17 (Arase *et al.*, 2012), a qual também foi identificada no *screening* (clone G2H4.6-NtIAA17) e confirmada no re-teste par-a-par com a NtCDKG;2 por Y2H (Figura 4.2.4.2). Essa proteína se localiza no núcleo e, assim como os outros membros da família Aux/IAA, possuem 4 domínios conservados I, II, III e IV, sendo que a interação com o complexo SCF^{TIR1} ocorre através do domínio II e com os ARFs nos domínios III, IV (Guilfoyle *et al.*, 1998, Tan *et al.*, 2007).

Estudos sugerem que a ligação entre SCF^{TIR1} e proteínas AUX/IAA é regulada por fosforilação, uma vez que em muitas leveduras e mamíferos, os substratos de SCF precisam estar fosforilados para que as enzimas de ubiquitinação os reconheçam e se liguem a eles (Worley *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2001). Entretanto, Gray *et al.* (2001) não encontraram sítios de fosforilação no domínio II da IAA17, que, como explicado acima, é o domínio reconhecido por TIR1. Visto isso, os autores sugeriram que, em resposta à auxina, uma proteína seria fosforilada para atuar como ponte entre TIR1 e IAA17. Como NtCDKG;2 interage tanto com NtTIR1 como NtIAA17, é possível que esta quinase seja a ponte entre elas em *Nicotiana tabacum*. Hipoteticamente, em resposta à auxina, NtCDKG;2 seria fosforilada e se ligaria a IAA17, possibilitando seu reconhecimento pelo complexo SCF^{TIR1} . Isso levaria a degradação deste repressor e consequente ativação das vias de resposta à auxina (Figura 5.1.1).

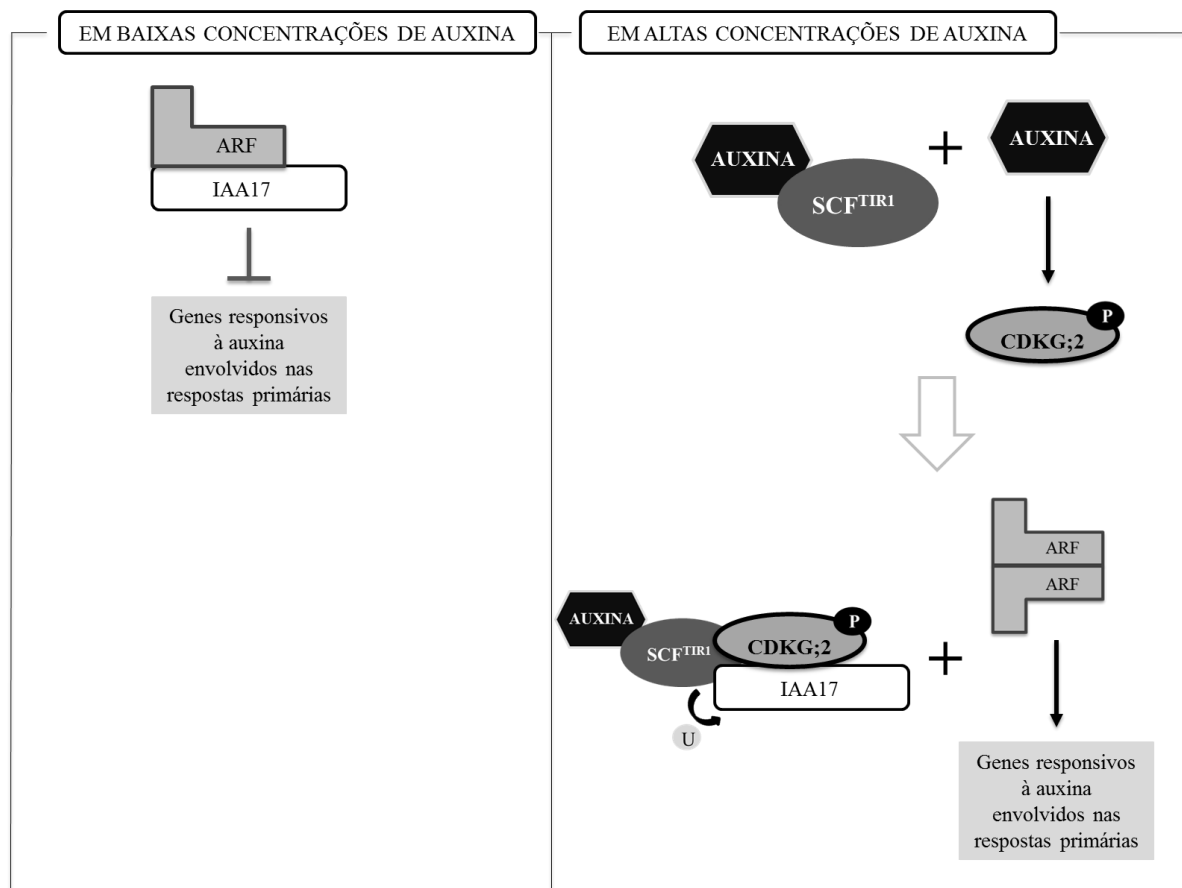


Figura 5.1.1: Hipótese de atuação de NtCDKG;2 em vias de transdução de sinal de auxina. **Em baixos níveis de auxina**, NtIAA17 se liga aos ARFs, formando heterodímeros e bloqueando a atividade desses fatores de transcrição. Por outro lado, **em altas concentrações de auxina**, esse hormônio se liga ao receptor TIR1 no complexo SCF^{TIR1} , aumentando sua afinidade por IAA17. Além disso, nessa hipótese, a auxina sinalizaria para que NtCDKG;2 fosse fosforilada. Isso permitiria que ela se ligasse à NtIAA17 possibilitando o reconhecimento desse inibidor pelo complexo SCF^{TIR1} , que a ubiquitinaria, conduzindo-a

para degradação. Uma vez perdida a repressão dos ARFs pela NtIAA17, eles poderiam formar homodímeros e atuar na ativação dos genes envolvidos com na resposta primária à auxina. Baseado nos trabalhos de Guilfoyle *et al.* (1998), Worley *et al.* (2000), Gray *et al.* (2001) e Tan *et al.* (2007). Barras terminadas em seta indicam indução/ativação. Barras terminadas em barra perpendicular indicam repressão. U: ubiquitinação. . P: fosforilação.

5.2 CDKG;2 possivelmente atua na regulação do florescimento através da interação com:

5.2.1 Fator de transcrição

A interação de NtCDKG;2 com NtTCP15, proteína homóloga à TCP7 de *A. thaliana*, é interessante. Essa proteína foi encontrada seis vezes no *screening*, sendo duas vezes neste trabalho (clones G2G5.1 e G2D10.3) e 4 vezes em trabalhos anteriores (Ferreira, 2016). O fato desta TCP ter sido encontrada tantas vezes, sendo que existem pelo menos outras 19 TCPs em plantas (Li, 2015), que não foram encontradas como parceiros de NtCDKG;2 no *screening*, aumenta a confiança de que esta interação realmente ocorre nas células e tem uma importância biológica. Aqui, é importante ressaltar que temos conhecimento que pelo menos 2 outras TCPs são expressas no estigma/estilete e estão presentes entre os clones da biblioteca de Y2H usada no *screening* (Roberto, 2015). Coerentemente, o re-teste confirmou a interação positiva (Figura 4.2.1.1) entre NtCDKG;2 e NtTCP15.

As proteínas pertencentes à família TCP são fatores de transcrição exclusivos de plantas que compartilham um domínio bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*), também chamado de domínio TCP (Li *et al.*, 2005; Li, 2015). As proteínas desse grupo estão envolvidas na regulação de muitos processos biológicos, como assimetria e arquitetura floral, desenvolvimentos dos órgãos laterais e do gametófito, germinação de sementes, senescência foliar, ritmo circadiano e respostas de defesa (Li, 2015).

A família TCP é dividida em classes I e II, sendo que as proteínas da classe I foram descritas como atuando na promoção da proliferação celular e as da classe II com papel na inibição da proliferação celular (Li, 2015). Sendo que na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal, as proteínas dessas famílias atuam de forma antagônica nos mesmos genes alvo (Li, 2015). AtTCP7 pertence a classe I, que inclui as TCPs que

apresentam uma cisteína conservada na posição 20, a qual não está presente nas proteínas da classe II (Li, 2015).

Análises de transgênicos de *A. thaliana* com superexpressão de *AtTCP7* indicam que essa proteína esteja envolvida na regulação da expansão e divisão celular, uma vez que as primeiras folhas verdadeiras apresentaram uma maior quantidade de células, porém com tamanho menor (Wang, 2015). Além disso, a arquitetura floral foi modificada, sendo que as plantas mutantes apresentaram maiores distâncias entre anteras e estigmas e estatisticamente pistilos maiores e estames menores, do que as plantas selvagens (Wang, 2015). A diferença entre a altura dessas estruturas dificultou a autopolinização, culminando em baixa fertilidade nessas plantas (Wang, 2015). As plantas mutantes também apresentaram atraso no florescimento (Wang, 2015). Os defeitos nos tecidos causados pela superexpressão de *AtTCP7* foram maiores na transição do estágio vegetativo para o reprodutivo, indicando a importância dessa proteína nesse processo (Wang, 2015).

Tais dados permitem sugerir uma relação entre NtCDKG;2 e NtTCP15 na regulação do controle do florescimento, uma vez que seus homólogos em *A. thaliana* afetam negativamente esse processo (Ma *et al.*, 2015). Nessa hipótese, seria possível que NtCDKG;2 fosforilasse NtTCP15, ativando-a e viabilizando a ligação desta ao promotor de genes de inibição floral, como, por exemplo, o *FLC*. Alternativamente, NtTCP15 e NtCDKG;2 poderiam estar interagindo na regulação do controle da proliferação celular. Possivelmente, NtCDKG;2 fosforilaria NtTCP15, ativando-a e permitindo que esta promova a transcrição de genes que controlam positivamente o ciclo celular, ou inibindo-a, regulando negativamente esse processo.

5.2.2 Proteína inibidora de repressor de vias florais

A confirmação da interação entre NtCDKG;2 e NtDNAJ3 em Y2H (Figura 4.2.2.1), uma *Heat-shock protein* (HSP) que atua como um regulador transcricional no controle do florescimento, contribui para a hipótese de que essa quinase também atue na regulação desse processo. As HSP são chaperonas que atuam no dobramento, montagem, translocação e degradação de proteínas em muitos processos celulares, além de estabilizar proteínas e membranas, e auxiliar no redobramento de proteínas sob condições de estresse (Wang *et al.*, 2004; Salas-Muñoz *et al.*, 2016). Dessa forma, muitos estudos em plantas foram destinados a entender o papel dessas proteínas nas vias de sinalização de estresse.

Entretanto, Shen *et al.* (2011), interessados na possível atuação dessas proteínas também no desenvolvimento da planta, fizeram um estudo investigando o envolvimento da proteína DNAJ3 no florescimento de *A. thaliana*. Em plantas na quais houve perda de função dessa proteína (pela baixa expressão de seu gene ou em mutantes *knockout*), o florescimento foi atrasado, decorrente em parte da menor expressão dos genes *FLOWERING LOCUS T (FT)* e *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* (Shen *et al.*, 2011). No desenvolvimento vegetativo, o repressor *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* se liga às sequências regulatórias de *FT* e *SOC1*, impedindo a transcrição desses genes (Shen *et al.*, 2011). Durante a transição do desenvolvimento vegetativo para o reprodutivo, DNAJ3 recebe sinais de vias de florescimento e se liga à SVP, comprometendo a capacidade desse repressor se ligar às regiões regulatórias de *FT* e *SOC1* (Shen *et al.*, 2011). Sem estes repressores em suas sequências regulatórias, os genes *FT* e *SOC1* seriam expressos e o desenvolvimento floral continuaria. A expressão de *DNAJ3* é regulada pelas vias de fotoperíodo, giberelina e vernalização, indicando que este afeta o florescimento em resposta a sinais ambientais e de desenvolvimento (Shen *et al.*, 2011).

Uma vez que AtCDKG;2 parece ter efeito negativo no florescimento (Ma *et al.*, 2015), é possível sugerir que NtCDKG;2, na fase vegetativa da planta atuaria inibindo, através de fosforilações, NtDNAJ3, que deixaria de inibir SVP, permitindo que este reprima a transcrição de genes de promoção floral.

5.2.3 Proteínas de ligação à metil-citosina

A proteína MBD10 pertence a uma família conservada, inicialmente descrita em animais, chamada *methyl-CpG-binding domain (MBD)* (Grafi *et al.*, 2007). Esta proteína teve sua interação com NtCDKG;2 confirmada por re-teste par-a-par em Y2H (Figura 4.2.5.1). Em *Arabidopsis thaliana*, há treze genes que codificam proteínas MBDs, sendo que a maioria delas se encontra dispersa no núcleo e poucas apresentam preferências à certas regiões como no caso da AtMBD5 e AtMBD6, que se ligam preferencialmente à heterocromatina (Grafi *et al.*, 2007; Zemach & Grafi, 2007). A proteína AtMBD10 ainda é pouco descrita na literatura, mas Preuss *et al.* (2008) encontraram que esta proteína atua de maneira mais geral no núcleo e está associada com o silenciamento de rRNA.

Estudos com outras proteínas da família MBD em *A. thaliana* mostraram evidências do envolvimento de membros dessa família no florescimento. O primeiro

indício da importância das MBDs no crescimento e desenvolvimento das plantas foi o fenótipo de plantas com baixa expressão de *AtMBD11*, as quais apresentavam efeitos pleiotrópicos similares ao de plantas com níveis de expressão reduzidos de *Histona desacetilase (AtHD1)*, incluindo a formação de rosetas aéreas e redução na fertilidade (Tian & Chen, 2001; Berg *et al.*, 2003; Stangeland *et al.*, 2009). Posteriormente, *AtMBD9* foi relacionada com a ativação do repressor de florescimento *FLC*, uma vez que em plantas mutantes com baixa expressão de *AtMBD9* apresentaram uma redução nos níveis de acetilação nas caudas das histonas H3 e H4 nas regiões do gene *FLC* (Stangeland *et al.*, 2009). Estes resultados evidenciaram que as proteínas MBDs de plantas também podem atuar como reguladores positivos da expressão gênica, diferentemente das MBDs encontradas nos animais, que só atuam como repressoras (Peng *et al.* 2006; Stangeland *et al.*, 2009). De maneira semelhante, *AtMBD8* pode estar regulando positivamente e diretamente a expressão de *FT* e indiretamente a expressão de *SOC1* (Stangeland *et al.*, 2009).

A revisão da literatura feita nesta seção sobre a atuação de MBDs no crescimento e desenvolvimento revelou o envolvimento de membros dessa família na regulação do florescimento. Além disso, tem-se que o fenótipo dos mutantes de *NtCDKG;2* em *A. thaliana* indica sua regulação negativa no florescimento (Ma *et al.*, 2015). Sendo assim, possivelmente tanto *NtCDKG;2* como *NtMBD10* atua na regulação do desenvolvimento floral, possibilitando inferir que *NtCDKG;2* fosforile *MBD10* controlando sua atividade nesse processo.

5.3 Modelo de atuação de *NtCDKG;2* no florescimento

A confirmação da interação entre *NtCDKG;2* e parceiras com possíveis papéis na regulação do florescimento, possibilitou a formulação de uma hipótese na qual *NtCDKG;2*, juntamente com estas, atuaria na regulação do desenvolvimento floral de *Nicotiana tabacum* (Figura 5.3.1). As interações confirmadas por Ferreira (2016) de *NtCDKG;2* com as proteínas homólogas à *FRIGIDA-like*; *WRKY32* e *BRG3 (BOI-RELATED GENE 3)* de *A. thaliana*, as quais possuem putativas funções no controle do florescimento, reforçam a hipótese de que esta quinase esteja atuando de fato nesse processo.

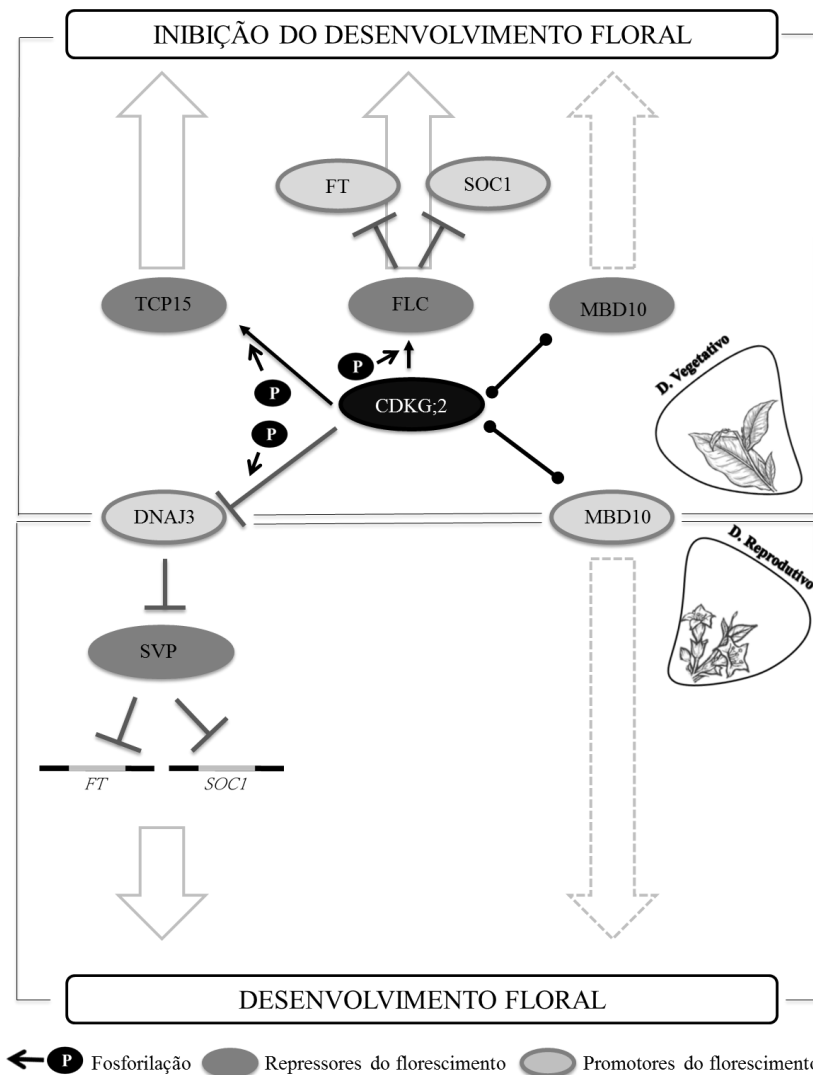


Figura 5.3.1: Hipótese da atuação da proteína quinase NtCDKG;2 na regulação do desenvolvimento floral. De maneira geral, NtCDKG;2, através de fosforilações, regularia negativamente a atividade de proteínas promotoras do florescimento e positivamente a ação dos repressores. Dessa forma, durante o **desenvolvimento vegetativo**, NtCDKG;2 estaria ativa e fosforilaria 1) NtTCP15, o que a tornaria funcional e permitiria suas ações em vias de inibição do florescimento; 2) o repressor NtFLC, que se ligaria as regiões regulatórias de *FT* e *SOC1*, inibindo a transcrição destes genes, que atuam na integração das vias de indução do florescimento; 3) DNAJ3, impedindo que esta se ligue ao repressor SVP, permitindo que este iniba *FT* e *SOC1*. Durante o **desenvolvimento reprodutivo** NtCDKG;2 estaria inativa, provavelmente por ação de *SCI1*, o que levaria a uma diminuição na ativação dos repressores das vias florais (NtTCP15 e NtFLC) e também permitiria a ação dos promotor floral DNAJ3. MBD10 ainda não possui função bem estabelecida na literatura, não sendo possível estabelecer se sua possível função no florescimento seria indutória ou inibitória. Hipótese baseada nos trabalhos de Tan & Irish (2006), Stangeland *et al.* (2009), Shen *et al.* (2011), Wang (2015), Stangeland *et al.* (2009). Barras terminadas em seta indicam indução/ativação. Barras terminadas em barra perpendicular indicam repressão. Barras terminadas em círculo indicam indução ou repressão, sem direção definida. P: fosforilação. Os balões em cinza escuro foram usados para os repressores de florescimento e cinza claro para os promotores.

5.4 CDKG;2 pode estar participando no processo de *splicing* através da interação com:

5.4.1 Outra Quinase Dependente de Ciclina, a NtCDKF;1

A proteína NtCDKF;1 foi encontrada no *screening* e sua interação com NtCDKG;2 foi confirmada por Y2H e BiFC em trabalhos anteriores (Ferreira, 2013; 2016; Lubini, dados não publicados). No presente estudo, além de novos resultados positivos em Y2H (Figura 4.2.6.1), a interação entre essas proteínas também foi confirmada/quantificada utilizando o ONPG (Figura 4.3.1).

O domínio C-terminal da subunidade maior (RPB1) da RNA polimerase II apresenta repetições da sequência consenso $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$, nas quais ocorrem fosforilações que acarretam modificações na atividade dessa enzima (Ferreira, 2016). Fosforilações nos resíduos S_7 do CTD da RNAPII pela CDKF;1, modificam a quantidade de mRNAs totais, especialmente de pequenos RNAs, além de controlar o processamento e o controle de qualidade dos transcritos de pre-miRNA contendo *stem-loop* (Hajheidari *et al.*, 2012). Em plantas, CDKF;1 é única quinase específica dos resíduos S_7 das repetições do CTD (Hajheidari *et al.*, 2012).

Além disso, estudos com CDKF;1 também demonstraram que essa quinase pode apresentar atividade de CAK ou CAKAK, através de fosforilação em várias CDKs, sendo um dos principais mecanismos regulatórios no ciclo celular da célula eucariótica (Nietzsche *et al.*, 2015). A importância dessa proteína é evidenciada pelo fenótipo de seus mutantes *knockout*, os quais apresentam severos defeitos na divisão e elongação celular, bem como na endorreduplicação (Takatsuka *et al.*, 2009; Nietzsche *et al.*, 2015). Tais defeitos não foram observadas durante a embriogênese, sugerindo que CDKF;1 é necessária principalmente para o desenvolvimento pós-embrionário (Takatsuka *et al.*, 2009).

Os dados apresentados contribuem para a formulação da hipótese sobre a interação entre NtCDKG;2 e NtCDKF;1, na qual sugere-se que nos processos de transcrição e *splicing*, NtCDKF;1 fosforilaria NtCDKG;2 tornando-a funcional e permitindo que esta fosforile outras proteínas chave nesses processos, como a RNAPII. Essa hipótese é corroborada pelos resultados de Y2H obtidos por Ferreira (2016), os quais confirmam a interação entre NtCDKG;2 e o CTD da RNAPII.

5.4.2 O putativo fator de *splicing* RSZ21

A interação direta entre NtCDKG;2 e NtRSZ21 foi confirmada no re-teste em Y2H (Figura 4.2.3.1). Essa proteína é um putativo fator de *splicing* pertencente à sub-família RSZ da família de proteínas SR (Richardson *et al.*, 2011). A proteína RSZ21 de *A. thaliana* possui um motivo de reconhecimento de RNA (RRM), um domínio *zinc-finger* do tipo CCHC, chamado *Zinc Knuckle*, e um domínio RS C-terminal, o qual é rico em arginina e serina (Golovkin & Reddy, 1998). Golovkin & Reddy (1998) demonstraram que AtRSZ21 interage com U1-70K, uma das três proteínas específicas da snRNP U1, indicando seu papel na regulação do processamento de RNAs. Porém, desde então, pouco foi esclarecido sobre essa proteína. Estudos realizados por Huang *et al.* (2013), com RSZ33 e RSZ22, indicam envolvimento destes no *splicing*, fortalecendo as conclusões obtidas por Golovkin & Reddy (1998).

Visto que a) o domínio RS está envolvido com interação com outras proteínas e com a maquinaria de *splicing* (Kumar & Kirti, 2012); b) a fosforilação em resíduos de serina parece afetar a função de proteínas SR (Kumar & Kirti, 2012); e c) no *splicing* as proteínas RS se ligam ao domínio CTD da RNAPII (Kornblihtt, 2015), pode-se sugerir que a interação entre NtCDKG;2 e NtRSZ21 se daria através de fosforilações por essa quinase. Esta modificação sinalizaria para NtRSZ21 se ligar ao CTD da RNAPII e à snRNP U1 do spliceossomo. Nesse contexto, o direcionamento dos fatores de *splicing* ao sítio ativo de transcrição também seria feito através de fosforilações no CTD feitas por NtCDKG;2, juntamente com CDKC, CDKD, CDKE e CDKF, já que a interação entre elas e o CTD foi confirmada em *A. thaliana* (, Hajheidari *et al.*, 2012, Ferreira, 2016).

5.4.3 A Ciclina L

A determinação das vias nas quais uma CDK atua depende da identificação e compreensão da atividade de suas ciclinas parceiras de interação. Dessa forma, foram feitas investigações sobre ciclinas relacionadas com NtCDKG;2, as quais levaram a identificação da Ciclina L (Strini, 2014). A interação entre elas foi então confirmada no trabalho de Ferreira (2016), através de ensaios de Y2H e experimentos de BiFC em folhas de *N. benthamiana*. Além disso, foi verificado que localização dessa interação no núcleo e em um *speckle* nuclear é a mesma de NtCDKG;2-GFP (Lubini, 2012; Ferreira, 2013; 2016).

A ciclina L apresenta dois domínios de ciclina na região N-terminal e um domínio rico em SR na região C-terminal, típico de fatores de *splicing* pertencentes à família SR (Xu *et al.*, 2012). Uma vez que as quinases SRPKs (*Serine/Arginine-Rich Protein Kinases*) fosforilam especificamente proteínas SR e também apresentam motivos RS, Ferreira (2016) propôs que a interação entre Ciclina L e CDKG;2 ocorre tanto na forma de quinase-substrato como a de Ciclina-CDK. Desta forma, a fosforilação realizada por NtCDKG;2 direcionaria a NtCiclina L ao *speckle* e, quando associadas em um complexo Ciclina-CDK, NtCiclina L interagiria com fatores de *splicing* e, assim, ambas se encontrariam no *speckle* (Ferreira, 2016).

5.5 Os parceiros de interação de SCI1 fortalecem a hipótese de NtCDKG;2 participar em processos de *splicing*

Em trabalhos anteriores de nosso laboratório, foi determinado que a proteína SCI1 está envolvida no controle da proliferação celular (DePaoli *et al.*, 2011; DePaoli *et al.*, 2014). Entretanto, ainda não se sabia por quais vias essa regulação ocorria e, assim, foram feitos experimentos para identificar seus parceiros de interação. Em experimentos de *pull down*, utilizando SCI1 como isca, Strini (2014) identificou a interação entre NtCDKG;2 e SCI1. Experimentos de Y2H e BiFC demonstraram a interação de SCI1 com NtDEAD-box e NtCiclina-L, duas proteínas com funções preditas em *splicing*. Adicionalmente, foi demonstrado que SCI1 se localiza em *splicing speckles*, em algumas fases do ciclo celular (Strini, 2014). Assim, foi sugerido que SCI1 esteja envolvido no *splicing*.

Posteriormente, Pinoti (2016) mostrou que NtDEAD-box e NtCiclina-L também apresentam localização em *splicing speckles*. Além de que, estas e NtSCI1, interagem com a proteína central do spliceossomo, a NtU2a', e com os fatores de *splicing* NtRS2Z33 e NtSR45, corroborando a hipótese de que NtSCI1 estaria atuando na regulação do *splicing*. De forma complementar, Ferreira (2016) demonstrou que NtCDKG;2, também interage com NtDEAD-box, NtCiclina-L1 e NtU2a'.

Sendo assim, a identificação de proteínas parceiras em comum entre NtSCI1 e NtCDKG;2 fortalecem a hipótese de atuação dessa quinase no *splicing*. Possivelmente, NtSCI1 recrutaria NtCDKG;2 para que esta fosforilasse proteínas, ativando-as ou as inibindo, para que o *splicing* ocorresse de maneira correta.

5.6 Modelo de atuação de NtCDKG;2 na transcrição e *splicing*

Na figura 5.7.1 se encontra o putativo mecanismo de ação de NtCDKG;2 e suas parceiras de interação na regulação da transcrição e do *splicing*.

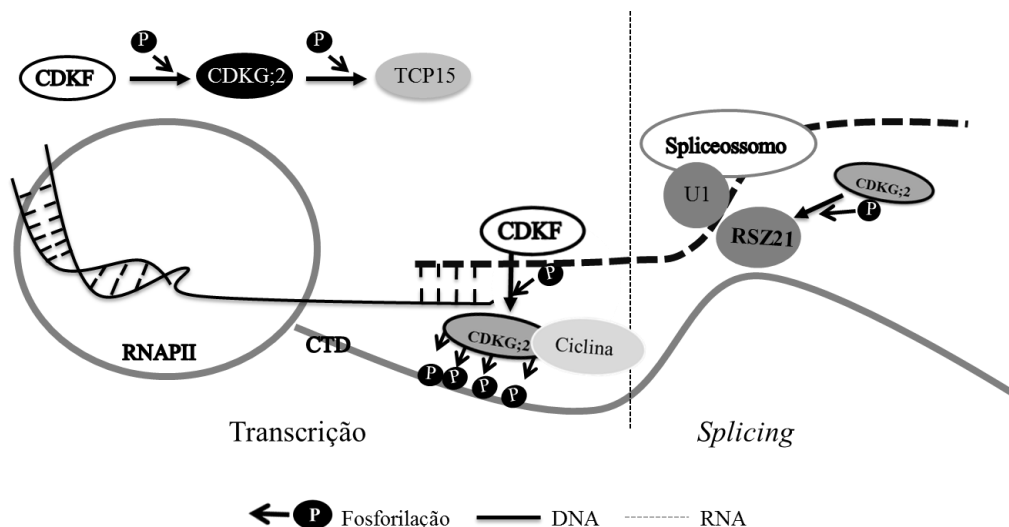


Figura 5.7.1: Hipótese sobre as funções de NtCDKG;2 na transcrição e *splicing*. **Na transcrição**, NtCDKF;1 regularia positivamente a atividade de NtCDKG;2 através de fosforilações. Uma vez ativa, NtCDKG;2 controlaria fatores de transcrição através de fosforilações. No caso de NtTCP15, uma proteína parceira de interação confirmada por Y2H, a fosforilação poderia estar ativando-a, o que viabilizaria a ligação desta à região reguladora de genes de controle da proliferação celular e/ou inibição floral. Além disso, NtCDKG;2 fosforilaria o CTD da RNAPII, regulando a atividade dessa enzima. **No *splicing***, NtCDKG;2, poderia fosforilar o putativo fator de *splicing* NtRSZ21, sinalizando para este se ligar à U1 e ao CTD da RNAPII. Hipótese baseada nos trabalhos de Golovkin & Reddy (1998), Takatsuka *et al.* (2009), Kumar & Kirti (2012), Huang *et al.* (2013), Kornblihtt (2015), Nietzsche *et al.* (2015) e Ferreira, (2016). Barras terminadas em seta indicam indução/ativação. P: fosforilação.

5.7 Análise do re-teste quantitativo entre NtCDKG;2 e seus putativos parceiros de interação

Durante a realização do ensaio quantitativo da β -galactosidase utilizando ONPG como substrato (Figura 4.3.1), foi possível perceber que a partir de determinado tempo, todas as reações que ainda não haviam ocorrido começaram a exibir mudança de cor indiscriminadamente. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que o gene *LacZ* está sob controle de um promotor de expressão vazada na cepa utilizada (promotor *met2::GAL7* na cepa PJ69-4A), levando a uma expressão basal do *LacZ* mesmo sem haver ligação ativa do fator de transcrição no promotor. Pretende-se repetir o experimento utilizando uma

cepa diferente, que apresente o gene *LacZ* sob controle de um promotor de ativação mais restrita, como no caso da cepa Y187 (*URA3::GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-LacZ*).

Outro ponto importante a ser considerado é que o substrato ONPG é utilizado para interações médias e fortes, como no caso de NtCDKG;2 X NtCDKF;1. Uma vez que as interações entre quinases e substratos são transientes e/ou fracas, possivelmente esse não seja o substrato ideal para avaliar interações mais fracas. O substrato CPRG (Vermelho de Clorofenol β -D-Galactopiranosídeo) é 10 vezes mais sensível que o ONPG (Simon & Lis, 1987), e talvez seja uma melhor alternativa para avaliar as interações em questão.

6. Conclusão

A identificação de proteínas parceiras de interação de NtCDKG;2, resultante deste trabalho, sugere o envolvimento desta CDK no metabolismo de RNA e em vias de sinalização de auxina e de regulação do florescimento.

7. Referências Bibliográficas

- Alberts, B. (2008). *Molecular Biology of The Cell*. 5th ed. New York, NY, Garland Science.
- Alonso-Blanco, C., Aarts, M. G., Bentsink, L., Keurentjes, J. J., Reymond, M., Vreugdenhil, D., & Koornneef, M. (2009). What has natural variation taught us about plant development, physiology, and adaptation?. *The Plant Cell*, 21(7), 1877-1896.
- Andersen, S. U., Buechel, S., Zhao, Z.; Ljung, K., Novák, O., Busch, W., Schuster, C., Lohmanna, J. U. (2008) Requirement of B2-type cyclindependent kinases for meristem integrity in *Arabidopsis thaliana*. *PlantCell*, 20, 88– 100.
- Andrés, F., & Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), 627-639.
- Apezato Da Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S.M. (2006). *Anatomia Vegetal*. 2ª edição. Universidade Estadual de Viçosa, pp 448.
- Arase, F., Nishitani, H., Egusa, M., Nishimoto, N., Sakurai, S., Sakamoto, N., & Kaminaka, H. (2012). IAA8 involved in lateral root formation interacts with the TIR1 auxin receptor and ARF transcription factors in *Arabidopsis*. *PloS one*, 7(8), e43414.
- Berg, A., Meza, T. J., Mahić, M., Thorstensen, T., Kristiansen, K., & Aalen, R. B. (2003). Ten members of the *Arabidopsis* gene family encoding methyl-CpG-binding domain proteins are transcriptionally active and at least one, AtMBD11, is crucial for normal development. *Nucleic acids research*, 31(18), 5291-5304.
- Bombarely, A., Menda, N., Tecle, I. Y., Buels, R. M., Strickler, S., Fischer-York, T., Pujar, A., Leto, J., Gosselin, J., Mueller, L. A. (2011). The Sol Genomics Network (solgenomics.net): growing tomatoes using Perl. *Nucleic Acids Research* 38(Database issue), D1149-D1155.
- Boudolf, V., Barrôco, R., Engler, J. A., Verkest, A., Beeckman, T., Naudt, M., Inzé, D., De Veylder, L. (2004). B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16, 945–955.
- Boruc, J., Mylle, E., Duda, M., De Clercq, R., Rombauts, S., Geelen, D., Hilson, P., Inzé, D., Van Damme, D., Russinova, E. (2010). Systematic localization of the *Arabidopsis*

core cell cycle proteins reveals novel cell division complexes. *Plant Physiology*, 152(2), 553-565.

Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., & Schlattner, U. (2009). Yeast Two-Hybrid, a Powefull Tool for Systems Biology. *Int J Mol Sci*, 10(6), 2763-2788.

Clontech. (2007). Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual. 36.

Crane, P. R., & Lidgard, S. (1990). Angiosperm radiation and patterns of Cretaceous palynological diversity. *Major evolutionary radiations*, 377, 407.

DePaoli, H. C. (2010). SCI1, um novo inibidor tecido-específico da proliferação celular relacionado à sinalização por auxina . Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

DePaoli , H. C., Brito, M. S., Quiapim, A. C., Teixeira, S. P., & Goldman, M. H. (2011). Stigma/style cell cycle inhibitor 1 (SCI1), a tissue-specific cell cycle regulator that controls upper pistil development. *New Phytol*, 190(4), 82-95.

DePaoli, H. C., Dornelas, M. C., Goldman, M. H. (2014). SCI1 is a component of the auxin-dependent control of cell proliferation in Arabidopsis upper pistil. *Plant Sci* 229, 122-130.

DePaoli , H. C., Goldman , G. H., & Goldman, M. H. (2012). SCI1, the first member of the tissue-specific inhibitors of CDK (TIC) class, is probably connected to the auxin signaling pathway. *Plant Signal Behav*, 7(1), 1-6.

Esau, K. (1997). Anatomy of Seed Plants. 2ª edição. New York, John Wiley.

Fabian-Marwedel, T., Umeda, M., & Sauter, M. (2002). The Rice Cyclin-Dependent Kinase–Activating Kinase R2 Regulates S-Phase Progression. *The plant cell*, 14(1), 197-210.

Ferreira, P. B. (2013). Estudos de localização e interações proteína-proteína de uma putativa proteína quinase, NtCDKG;2, de *Nicotiana tabacum*. Ribeirão Preto: Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ferreira, P. B. (2016). A identificação de parceiros de interação de NtCDKG;2 revela suas possíveis funções biológicas em *Nicotiana tabacum*. Ribeirão Preto: Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências - Área de concentração: Genética.

Fields, S. & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature*, 340 (6230), 245–6.

Forment, J., Naranjo, M. Á., Roldan, M., Serrano, R., & Vicente, O. (2002). Expression of Arabidopsis SR-like splicing proteins confers salt tolerance to yeast and transgenic plants. *The Plant Journal*, 30(5), 511-519.

Fülöp, K., Pettkó-Szandtner, A., Magyar, Z., Miskolczi, P., Kondorosi, E., Dudits, D., Bakó, L. (2005). The *Medicago* CDKC;1–CYCLINT;1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *Plant J*, 42,810–820.

Ganapathi, T. R., Suprasanna, P., Rao, P. S., & Bapat, V. A. (2004). Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)-A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian Journal of Biotechnology*, 3(2), 171-184.

Glover, B. J. (2007). *Understanding Flowers & Flowering- An Integrated Approach*. 1^a edição. Oxford, Oxford University Press.

Golovkin, M., & Reddy, A. S. (1998). The plant U1 small nuclear ribonucleoprotein particle 70K protein interacts with two novel serine/arginine-rich proteins. *The Plant Cell*, 10(10), 1637-1647.

Grafi, G., Zemach, A., & Pitto, L. (2007). Methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1769, 287–294.

Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., & Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, 414, 271–276.

Goldberg, J. M., Manning, G., Liu, A., Fey, P., Pilcher, K. E., Xu, Y., & Smith, J. L. (2006). The dictyostelium kinome—analysis of the protein kinases from a simple model organism. *PLoS Genet*, 2(3), e38.

Guilfoyle, T. J., & Hagen, G. (2007). Auxin response factors. *Current opinion in plant biology*, 10(5), 453-460.

- Guilfoyle, T. J., Ulmasov, T., & Hagen, G. (1998). The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 54(7), 619-627.
- Hajheidari, M., Farrona, S., Huettel, B., Koncz, Z., Koncza, C. (2012). CDKF;1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the C-terminal domain of Arabidopsis RNA polymerase II. *Plant Cell*, 24, 1626-1642.
- Hengen, P. H. (1997). Methods and reagents: False positives from the yeast two-hybrid system. *Trends in Biochemical Sciences*, 22 (1), 33-34.
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M., Schell, J. (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature*, 303, 209-213.
- Huang, B. & Russel, S. D. (1992). Synergid degeneration in Nicotiana: a quantitative, fluorochromatic and chlorotetracycline study. *Sex. Plant Reprod*, 5, 151-155.
- Huang, X. Y., Niu, J., Sun, M. X., Zhu, J., Gao, J. F., Yang, J., Zhou, Q., Yang, Z. N. (2013). CYCLIN-DEPENDENT KINASE G1 is associated with the spliceosome to regulate CALLOSE SYNTHASE5 splicing and pollen wall formation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(2), 637-648.
- Inzé, D., & De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development 1. *Annu. Rev. Genet.*, 40, 77-105.
- Inzé, D. (2007) Cell Cycle Control and Plant Development. *Annual Plant Reviews*, 32.
- Irish, V. F. (2010). The flowering of Arabidopsis flower development. *Plant Journal*, 61, 1014-1028.
- James, P., Halladay, J., & Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144, 1425-1236.
- Jia, Y., Anderson, J. V., Chao, W. S. (2011). Autophosphorylation is crucial for CDK-activating kinase (Ee;CDKF;1) activity and complex formation in leafy spurge. *Plant Science*, 180, 259-267.
- 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, 607-20.

- Junqueira, L. C. U. & Carneiro, J., Andrade, C. G. T., & Jordão, B. Q. (2000). *Biologia celular e molecular*, (pp. 175-202), Guanabara-Koogan.
- Kalyna, M., Lopato, S., & Barta, A. (2003). Ectopic expression of atRSZ33 reveals its function in splicing and causes pleiotropic changes in development. *Molecular biology of the cell*, 14(9), 3565-3577.
- Kenton, A., Parokonny, A. S., Gleba, Y. Y., & Bennett, M. D. (1993). Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics MGG*, 240(2), 159-169.
- Kitsios, G., Alexiou, K. G., Bush, M., Shaw, P., Doonan, J. H. (2008). A cyclindependent protein kinase, CDKC2, colocalizes with and modulates the distribution of spliceosomal components in *Arabidopsis*. *Plant J*, 54, 220–235.
- Kornblihtt, A. R. (2015). Transcriptional control of alternative splicing along time: Ideas change, experiments remain. *RNA*, 21, 670-672.
- Kumar, K. R., & Kirti, P. B. (2012). Novel role for a serine/arginine-rich splicing factor, AdRSZ21 in plant defense and HR-like cell death. *Plant Mol Biol*, 80, 461-476.
- Li, C., Potuschak, T., Cólón-Carmona, A., Gutiérrez, R. A., & Doerner, P. (2005). *Arabidopsis* TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. *PNAS*, 102, 12978-12983.
- Li, S. (2015). The *Arabidopsis thaliana* TCP transcription factors: A broadening horizon beyond development. *Plant signaling & behavior*, 10(7), e1044192.
- Lehti-Shiu, M. D. & Shiu, S. H. (2012). Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philosophic Transactions of The Royal Society B*, v. 367, p. 2619-2639.
- Lord, E. M. (2003). Adhesion and guidance in compatible pollination. *Journal of Experimental Botany*, 54, 47-54.
- Lubini, G. (2012). Caracterização do gene NtCDKG;2 expresso no pistilo de *Nicotiana tabacum* L. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, São Paulo.

- Ma, X., Qiao, Z., Chen, D., Yang, W., Zhou, R., Zhang, W., & Wang, M. (2015). CYCLIN-DEPENDENT KINASE G2 regulates salinity stress response and salt mediates flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 88, 287-299.
- Marques, R. S., Miguel, J. R., & Jascone, C. E. (2012). A família Solanaceae no parque natural municipal da Taquara. *Saúde & Ambiente*, 7, 19-23.
- Menges, M., Jager, S. M., Grussem, W., Murray, J. A. H. (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. *The Plant Journal*, 41, 546–566.
- Mews, M., Sek, F.J., Volkmann, D., John, P.C.L. (2000). Immunodetection of four mitotic cyclins and the Cdc2a protein kinase in the maize root: their distribution in cell development and dedifferentiation. *Protoplasma*, 212, 236- 249.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 261–291
- Morgan, D. O. (2007) *The Cell Cycle: Principles of Control*. London, New Science Press Ltd.
- Murad, L., Lim, K. Y., Christopodulou, V., Matyasek, R., Lichtenstein, C. P., Kovarik, A., & Leitch, A. R. (2002). The origin of tobacco's T genome is traced to a particular lineage within *Nicotiana tomentosiformis* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 89(6), 921-928.
- Nemhauser, J. L., Feldman, L. J., Zambryski, P. C. (2000). Auxin and ETTIN in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Development* 127, 3877-3888.
- Nietzsche, M., Landgraf, R., Tohge, T., & Börnke, F. (2016). A protein–protein interaction network linking the energy-sensor kinase SnRK1 to multiple signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Current Plant Biology*, 5, 36-44.
- Opperman, C. H.; Lommel, S. A.; Burke, M.; Carlson, J.; George, C.; Gove, S.; Houfek, T. D.; Jefferys, S.; Kalat, S.; King, R.; Levin, J.; Little, P. C.; Lumpkin, A.; Ross, T.; Salstead, A.; Scholl, E.; Sosinski, B.; Stevens, P. J.; Zekanis, S.; Frelinger, J.; Lakey, N.; Bidell, J.; Budiman, A.; Hayes, A. (2006). Update On The Tobacco Genome Initiative: A Gene Discovery Platform. In *Plant & Animal Genomes XIV Conference*.

Peng, M., Cui, Y., Bi, Y. M., & Rothstein, S. J. (2006). AtMBD9: a protein with a methyl-CpG-binding domain regulates flowering time and shoot branching in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 46(2), 282-296.

Pinoti, V. F. (2016). Análise do envolvimento de SCI1 (Stigma/style Cell cycle Inhibitor 1) no splicing de pré-mRNAs e seu impacto no transcriptoma do pistilo de *N. tabacum*. Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J. P., Segers, G., De Veylder, L., de Pinho Barrôco, R., Casteels, P., Van Montagu, M., Inzé, D., Mironov, V. (2001). A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36354-36360.

Preuss, S. B., Costa-Nunes, P., Tucker, S., Pontes, O., Lawrence, R. J., Mosher, R., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., Baulcombe, D. C., Viegas, W., Pikaard, C. S. (2008). Multimegabase silencing in nucleolar dominance involves siRNA-directed DNA methylation and specific methylcytosine-binding proteins. *Molecular cell*, 32(5), 673-684.

Raven, P. H., Eichhorn, S. E., & Evert, R. F. (2014). *Biologia vegetal*. 8ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Reddy, A. S. (2004). Plant serine/arginine-rich proteins and their role in pre-mRNA splicing. *Trends in plant science*, 9(11), 541-547.

Richardson, D. N., Rogers, M. F., Labadorf, A., Ben-Hur, A., Guo, H., Paterson, A. H., & Reddy, A. S. (2011). Comparative analysis of serine/arginine-rich proteins across 27 eukaryotes: insights into sub-family classification and extent of alternative splicing. *PLoS One*, 6(9), e24542.

Roberto, L. F. (2015). Estudo de FEF1, uma F-box do Complexo SCF envolvida com a Proliferação Celular no Pistilo de *Nicotiana tabacum* L. Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Rodriguez-Milla, M. A., Uno, Y., Chang, I. F., Townsend, J., Maher, E. A., Quilici, D., & Cushman, J. C. (2006). A novel yeast two-hybrid approach to identify CDPK substrates: characterization of the interaction between AtCPK11 and AtDi19, a nuclear zinc finger protein. *EBS Lett*, 580(3), 904-11.

Rouws, L. F., Hemerly, A. S., & Baldani, J. I. (2006). Transformação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Estirpe PAL 5 pela técnica de Eletroporação. Embrapa, Comunicado Técnico 84.

Salas-Muñoz, S., Rodríguez-Hernández, A. A., Ortega-Amaro, M. A., Salazar-Badillo, F. B., & Jiménez-Bremont, J. F. (2016). Arabidopsis AtDjA3 Null Mutant Shows Increased Sensitivity to Absciscic Acid, Salt, and Osmotic Stress in Germination and Post-germination Stages. *Frontiers in plant science*, 7, 220.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual 3rd edition. *Coldspring-Harbour Laboratory Press*, UK.

Sanchez, A. M., Bosch, M., Bots, M., Nieuwland, J., Feron, R., Mariani, C. (2004). Pistil Factors Controlling Pollination. *The Plant Cell*, 16, 98–106.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-5467.

Shen, L., Kang, Y. G., Liu, L., & Yu, H. (2011). The J-domain protein J3 mediates the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Plant Cell*, 23, 499-514.

Sierro N., Battey J. N., Ouadi S., Bakaher N., Bovet L., Willig A., Goepfert S., Peitsch M. C., Ivanov N. V. (2014) The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nat Commun*, 5, 3833.

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

Simon, J. A., Lis, J. T. (1987). A germline transformation analysis reveals flexibility in the organization of heat shock consensus elements. *Nucleic Acids Res.* 15(7), 2971-88.

Smith, C.W. & Valcarcel, J. (2000). Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* 25, 381–388.

Snutad, D. P., & Simmons, M. J. (2008). Fundamentos de Genética (4ª ed.). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Staiger, D., & Brown, J. W. (2013). Alternative splicing at the intersection of biological timing, development, and stress responses. *The Plant Cell*, 25(10), 3640-3656.

Stangeland, B., Maryann Rosenhave, E., Winge, P., Berg, A., Amundsen, S. S., Karabeg, M., Mandal, A., Bones, A. M., Grini, P. E., Aalen, R. B. (2009). AtMBD8 is involved in control of flowering time in the C24 ecotype of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia plantarum*, 136(1), 110-126.

Strini, E. J. (2014). A análise do interactoma de SCI1 (Stigma/style Cell cycle Inhibitor 1) revela possíveis mecanismos de controle da proliferação celular. Tese de Doutorado, apresentada ao programa de pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Taiz, L. & Zeiger, E. (2010). *Fisiologia Vegetal*. 5 edição. Porto Alegre, Artmed.

Takatsuka, H., Ohno, R., Umeda, M.. (2009) The *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase-activating kinase CDKF;1 is a major regulator of cell proliferation and cell expansion but is dispensable for CDKA activation. *Plant Journal*, 59, 475-487.

Tan, Q. K., & Irish, V. F. (2006). The *Arabidopsis* Zinc Finger-Homeodomain Genes Encode Proteins with Unique Biochemical Properties That Are Coordinately Expressed during Floral Development. *Plant Physiol*, 140(3), 1095-1108.

Tan, X., Calderon-Villalobos, L. I. A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V., Estelle, M., & Zheng, N. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, 446(7136), 640-645.

Tank, J. G., Thaker V. S. (2011). Cyclin dependent kinases and their role in regulation of plant cell cycle. *Biologia Plantarum*, 55, 201-212.

Tian, L., & Chen, Z. J. (2001). Blocking histone deacetylation in *Arabidopsis* induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(1), 200-205.

Trembley, J. H., Loyer, P., Hu, D., Li, T., Grenet, J., Lahti, J. M., Kidd, V. J. (2004). Cyclin dependent kinase 11 in RNA transcription and splicing. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 77, 263–288

Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., Van Isterdael, G., Verkest, A., Neiryneck, S., Buffel, Y., De Bodt, S., Maere, S., Laukens, K., Pharazyn, A., Ferreira, P. C., Eloy, N., Renne, C., Meyer, C., Faure, J. D., Steinbrenner, J., Beynon, J., Larkin, J. C., Van de Peer, Y., Hilson, P., Kuiper, M., De Veylder, L., Van

- Onckelen, H., Inzé, D., Witters, E., De Jaeger, G. (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular systems biology*, 6(1), 397.
- Van Leene, J., Stals, H., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Van Isterdael, G., De Clercq, A., Bonnet, E., Laukens, K., Remmerie, N., Henderickx, K., De Vijlder, T., Abdelkrim, A., Pharazyn, A., Van Onckelen, H., Inzé, D., Witters, E., De Jaeger, G. (2007) A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Cell Proteomics*, 6, 1226–1238.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S., & Inzé, D. (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14(4), 903-916.
- Wang, B. (2015). Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* Class I TCP genes AtTCP7 and its roles in plant development. Doctoral Thesis, University of Trento.
- Wang, W., Chen, X. (2004). HUA ENHANCER3 reveals a role for a cyclin-dependent protein kinase in the specification of floral organ identity in *Arabidopsis*. *Development*, 131, 3147–3156.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*, 9(5), 244-252.
- Weimer, A. K., Biedermann, S., Harashima, H., Roodbarkelari, F., Takahashi, N., Foreman, J., Guan, Y., Pochon, G., Heese, M., Van Damme, D., Sugimoto, K., Koncz, C., Doerner, P., Umeda, M., Schnittger, A. (2016). The plant-specific CDKB1-CYCB1 complex mediates homologous recombination repair in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, e201593083.
- Worley, C. K., Zenser, N., Ramos, J., Rouse, D., Leyser, O., Theologis, A., & Callis, J. (2000). Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin signalling. *The Plant Journal*, 21(6), 553-562.
- Xu, F., Xu, S., Wiermer, M., Zhang, Y., & Li, X. (2012). The cyclin L homolog MOS12 and the MOS4-associated complex are required for the proper splicing of plant resistance genes. *The Plant Journal*, 70(6), 916-928.

Yukawa, M., Tsudzuki, T., & Sugiura, M. (2006). The chloroplast genome of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*: complete sequencing confirms that the *Nicotiana sylvestris* progenitor is the maternal genome donor of *Nicotiana tabacum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 275, 367-373.

Żabicki, P., Kuta, E., Tuleja, M., Rataj, K., & Przemysław, M. (2013). Arabidopsis cyclin-dependent kinase gene CDKG; 2 is involved in organogenic responses induced in vitro. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 55(1), 37-48.

Zemach, A., & Grafi, G. (2007). Methyl-CpG-binding domain proteins in plants: interpreters of DNA methylation. *Trends in Plant Science*, 12, 80-85.

Zhang, J.Z., Ai X, Y., Sun, L. M., Zhang, D. L., Guo, W. W., Deng, X. X., Hu, C. G. (2011). Transcriptome profile analysis of flowering molecular processes of early flowering trifoliate orange mutant and the wild-type [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] by massively parallel signature sequencing. *BMC Genomics*, 12, 63.

Zheng, L., Zhang, Q., Sun, R., Kong, H., Zhang, N., Ma, H. (2014). Resolution of deep angiosperm phylogeny using conserved nuclear genes and estimates of early divergence times. *Nature Communications*, 5.

Apêndice 1

Nessa tabela, os *Top hits* correspondem aos resultados que demonstraram maior cobertura da sequência, maior identidade de nucleotídeos entre as sequências e menor *e-value*. Os clones que não apresentaram similaridades ou aqueles com similaridades extremamente baixas foram classificados como “*no match*”, indicando que não foi encontrada sequência correspondente no banco de dados referente.

Colônia <i>S. cerevisiae</i>	Colônia <i>E. coli</i>	<i>Top hits</i> TAIR	<i>Top hits</i> NCBI
G1H4	G1H4.1	AT3G04770.2 Symbols: RPSAb 40s ribosomal protein SA B	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> 40S ribosomal protein SA-like (LOC107816512), mRNA
G1B5	G1B5.1	<i>No match</i>	<i>No match</i>
G1C5	G1C5.1	AT4G27450.1 Symbols: Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> stem-specific protein TSJT1-like (LOC107777728), mRNA
G1D5	G1D5.1	AT1G04340.1 Symbols: HR-like lesion-inducing protein-related	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> uncharacterized LOC107773755 (LOC107773755), mRNA
G1E5	G1E5.1	AT4G01100.2 Symbols: ADNT1 adenine nucleotide transporter 1	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> mitochondrial adenine nucleotide transporter ADNT1-like (LOC107767971), mRNA
	G1E5.2	AT5G02380.1 Symbols: MT2B metallothionein 2B	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> metallothionein-like protein type 2 (LOC107809985), mRNA
	G1E5.3	AT5G59320.1 Symbols: LTP3 lipid transfer protein 3	<i>Nicotiana tabacum</i> NtLTP1 gene for lipid transfer protein, complete cds
	G1E5.4	AT1G07890.8 Symbols: APX1, MEE6, CS1, ATAPX1, ATAPX01 ascorbate peroxidase 1	<i>Nicotiana tabacum</i> L-ascorbate peroxidase 2, cytosolic-like (LOC107759703), mRNA
G1F5	G1F5.5	<i>No match</i>	<i>No match</i>
	G1F5.6	AT5G59320.1 Symbols: LTP3 lipid transfer protein 3	<i>Nicotiana tabacum</i> NtLTP1 gene for lipid transfer protein, complete cds
G1G5	G1G5.1	<i>No match</i>	<i>No match</i>

	G2A3.1	AT1G31330.1 Symbols: PSAF photosystem I subunit F	<i>Nicotiana tabacum</i> photosystem I reaction center subunit III, chloroplastic-like (LOC107789388), mRNA
G2A3	G2A3.2	AT5G64510.1 Symbols: TIN1 unknown protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> uncharacterized LOC107804685 (LOC107804685), mRNA
	G2A3.4	AT1G35720.1 Symbols: ANNAT1, OXY5, ATOXY5 annexin 1	<i>Nicotiana tabacum</i> annexin D2-like (LOC107815719), mRNA
G2B3	G2B3.1	AT5G12250.1 Symbols: TUB6 beta-6 tubulin	<i>Nicotiana tabacum</i> beta tubulin-like mRNA, partial sequence
G2C3	G2C3.1	No match	No match
G2D3	G2D3.3	AT4G16520.2 Symbols: ATG8F Ubiquitin-like superfamily protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> autophagy-related protein 8f-like (LOC107815935), mRNA
	G2E3.3	AT5G13490.1 Symbols: AAC2 ADP/ATP carrier 2	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> ADP,ATP carrier protein, mitochondrial (LOC107811966), mRNA
G2E3	G2E3.4	AT1G31330.1 Symbols: PSAF photosystem I subunit F	<i>Nicotiana tabacum</i> photosystem I reaction center subunit III, chloroplastic-like (LOC107789388), mRNA
	G2E3.6	AT3G48560.1 Symbols: CSR1, ALS, AHAS, TZP5, IMR1 chlorsulfuron/imidazolinone Resistant 1	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> acetolactate synthase 1, chloroplastic-like (LOC107814192), mRNA
G2F3	G2F3.3	AT3G08940.2 Symbols: LHCB4.2 light harvesting complex photosystem II	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> chlorophyll a-b binding protein CP29.2, chloroplastic (LOC107798677), mRNA
	G2F3.4	AT4G16520.2 Symbols: ATG8F Ubiquitin-like superfamily protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> autophagy-related protein 8f-like (LOC107815935), mRNA
G2G3	G2G3.2	AT3G04770.2 Symbols: RPSAb 40s ribosomal protein SA B	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> 40S ribosomal protein SA-like (LOC107816512), mRNA
	G2H3.2	No match	No match
G2H3	G2H3.3	AT4G09160.1 Symbols: SEC14 cytosolic factor family protein /phosphoglyceride transfer family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> patellin-3-like (LOC107806665), mRNA
	G2H3.4	AT4G24660.1 Symbols: ATHB22, MEE68, HB22, ZHD2 homeobox protein 22	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> zinc-finger homeodomain protein 2-like

(LOC107790230), mRNA			
G2A4	G2A4.1	AT4G27080.1 Symbols: ATPDIL5-4, ATPDI7, PDIL5-4 PDI-like 5-4	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> protein disulfide-isomerase 5-3-like (LOC107784201), mRNA
	G2A4.2	AT2G06025.1 Symbols: Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> uncharacterized LOC107792131 (LOC107792131), transcript variant X2, ncRNA
G2B4	G2B4.1	AT3G04770.2 Symbols: RPSAb 40s ribosomal protein SA B	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> 40S ribosomal protein SA-like (LOC107813555), mRNA
G2C4	G2C4.1	AT4G08320.1 Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein-like (LOC107796996), transcript variant X1, mRNA
G2D4	G2D4.1	AT4G35760.1 NAD(P)H dehydrogenase (quinone)s	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> thiol-disulfide oxidoreductase LTO1 (LOC107794467), mRNA
G2D4	G2D4.2	AT4G34588.1 Symbols: CPuORF2 conserved peptide upstream open reading frame 2	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> uncharacterized LOC107766297 (LOC107766297), mRNA
G2E4	G2E4.1	AT1G67310.1 Calmodulin-binding transcription activator protein with CG-1 and Ankyrin domains	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> calmodulin-binding transcription activator 4-like (LOC107825443), transcript variant X1, mRNA
G2F4	G2F4.1	AT5G06860.1 polygalacturonase inhibiting protein 1	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> polygalacturonase inhibitor-like (LOC107824201), mRNA
G2G4	G2G4.1	AT3G62580.1 Symbols: Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> transmembrane protein 205-like (LOC107788056), mRNA
	G2G4.2	AT1G07080.1 Symbols: Thioredoxin superfamily protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase-like (LOC107793859), mRNA
	G2G4.5	AT4G36810.1 Symbols: GGPS1 geranylgeranyl	<i>Nicotiana tabacum</i> geranylgeranyl pyrophosphate synthase, chloroplastic-like

G2H4	G2H4.2	AT3G14920.1 Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy)asparagine amidase A protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy)asparagine amidase A-like (LOC107760917), mRNA
	G2H4.5	No match	No match
	G2H4.6	AT4G14550.1 indole-3-acetic acid inducible 14	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> auxin-responsive protein IAA17-like (LOC107823026), mRNA
G2A5	G2A5.2	AT3G14920.1 Symbols: Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy)asparagine	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy)asparagine amidase A-like (LOC107760917), mRNA
	G2A5.3	AT1G07080.1 Symbols: Thioredoxin superfamily protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase-like (LOC107793859), mRNA
	G2A5.4	AT3G62580.1 Symbols: Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> transmembrane protein 205-like (LOC107788056), mRNA
	G2A5.5	AT3G44510.1 Symbols: alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> uncharacterized LOC107811373 (LOC107811373), transcript variant X1, mRNA
	G2A5.6	AT4G36810.1 Symbols: GGPS1 geranylgeranyl pyrophosphate synthase 1	<i>Nicotiana tabacum</i> geranylgeranyl pyrophosphate synthase, chloroplastic-like (LOC107774226), mRNA
	G2B5.1	AT5G07740.1 Symbols: actin binding chr5:2458577-2466813 REVERSE LENGTH=5682	<i>Nicotiana tabacum</i> polyphenol oxidase E, chloroplastic-like (LOC107805360), mRNA

	G2C5.1	AT1G07890.6 Symbols: APX1, MEE6, CS1, ATAPX1, ATAPX01 ascorbate peroxidase	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic-like (LOC107776943), transcript variant X2, misc_RNA
G2C5	G2C5.3	AT5G59320.1 Symbols: LTP3 lipid transfer protein 3	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> non-specific lipid-transfer protein 2-like (LOC107760448), mRNA
	G2C5.6	AT5G28840.1 Symbols: GME GDP-D-mannose 3',5'-epimerase	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> GDP-mannose 3,5-epimerase 1-like (LOC107797479), transcript variant X1, mRNA
G2F5	G2F5.1	AT4G01900.1 Symbols: PII, GLB1 GLNB1 homolog	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> nitrogen regulatory protein P-II homolog (LOC107773744), mRNA
	G2G5.1	AT5G23280.1 Symbols: TCP family transcription factor	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> transcription factor TCP7-like (LOC107830175), mRNA
G2G5	G2G5.3	AT4G06692.1 transposable_element_gene	<i>Nicotiana tabacum</i> trypsin proteinase inhibitor precursor (PI) mRNA, complete cds
	G2H5.1	AT1G01950.2 Symbols: ARK2 armadillo repeat kinesin 2	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> uncharacterized LOC107771959 (LOC107771959), transcript variant X1, mRNA
G2H5	G2H5.2	AT2G26540.1 Symbols: HEMD, UROS, ATUROS, ATDUF3, DUF3 uroporphyrinogen-III synthase family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> uroporphyrinogen-III synthase, chloroplastic-like (LOC107763502), transcript variant X1, mRNA
	G2H5.4	AT5G07600.1 Symbols: Oleosin family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> induced stolen tip protein TUB8-like (LOC107805948), mRNA
G2A6	G2A6.1	No match	No match
G2B6	G2B6.1	AT3G12500.1 Symbols: ATHCHIB, PR3, PR-3, CHI-B, B-CHI, HCHIB basic chitinase	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> acidic endochitinase P (LOC107771200), mRNA
G2B6	G2B6.2	AT3G12500.1 Symbols: ATHCHIB, PR3, PR-3, CHI-B, B-CHI, HCHIB basic chitinase	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> acidic endochitinase P (LOC107771200), mRNA
G2C6	G2C6.1	AT4G34588.1 Symbols: CPuORF2 conserved peptide upstream open reading frame	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> uncharacterized LOC107766297 (LOC107766297), mRNA
G2D6	G2D6.3	AT1G15340.2 Symbols: MBD10 methyl-CPG-binding	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> methyl-CpG-binding

		domain 10	domain-containing protein 11-like (LOC107811030), transcript variant X2, mRNA
G2E6	G2E6.4	AT3G44110.1 Symbols: ATJ3, ATJ DNAJ homologue 3	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> dnaJ protein homolog (LOC107825388), transcript variant X2, mRNA
G2F6	G2F6.2	AT1G23860.2 Symbols: SRZ-21, SRZ21, RSZ21, At-RSZ21 RS-containing zinc finger protein 21	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> serine/arginine-rich splicing factor RSZ21A-like (LOC107809120), transcript variant X1, mRNA
	G2F6.6	AT3G62980.1 Symbols: TIR1 F-box/RNI-like superfamily protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> protein TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1-like (LOC107821218), transcript variant X2, mRNA
G2G6	G2G6.1	AT2G14680.3 Symbols: MEE13 myosin heavy chain-related chr2:6277802-6283940	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> pistil-specific extensin-like protein (LOC107768631), mRNA
G2H6	G2H6.1	AT1G53910.1 Symbols: RAP2.12 related to AP2 12	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> ethylene-responsive transcription factor RAP2-12-like (LOC107788512), mRNA
	G2H6.2	AT3G58630.1 Symbols: sequence-specific DNA binding transcription factors	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> trihelix transcription factor ASIL2-like (LOC107806575), mRNA
G2A7	G2A7.1	AT3G02470.1 Symbols: SAMDC S-adenosylmethionine decarboxylase	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> uncharacterized LOC107801520 (LOC107801520), mRNA
	G2A7.3	AT2G20690.1 Symbols: lumazine-binding family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana sylvestris</i> riboflavin synthase (LOC104221024), mRNA
	G2A7.5	AT4G17670.1 Symbols: Protein of unknown function (DUF581)	PREDICTED: <i>Nicotiana sylvestris</i> uncharacterized LOC104246078 (LOC104246078), mRNA
G2B7	G2B7.1	AT1G12090.1 Symbols: ELP extensin-like protein chr1:4089847-4090725	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> 14 kDa proline-rich protein DC2.15-like (LOC107817575), mRNA
	G2B7.4	AT4G14360.2 Symbols: S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> probable methyltransferase PMT3 (LOC107759039), mRNA
G2C7	G2C7.3	AT4G09320.1 Symbols: NDPK1 Nucleoside diphosphate kinase family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> nucleoside diphosphate kinase 1-like (LOC107771678), mRNA
G2D7	G2D7.1	AT3G04770.2 Symbols:	PREDICTED: <i>Nicotiana</i>

		RPSAb 40s ribosomal protein SA B	tabacum 40S ribosomal protein SA-like (LOC107816512), mRNA
G2E7	G2E7.1	AT2G20690.1 Symbols: lumazine-binding family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> riboflavin synthase-like (LOC107825203), mRNA
	G2E7.3	AT5G38410.1 Symbols: Ribulose biphosphate carboxylase (small chain)	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> ribulose biphosphate carboxylase small chain, chloroplastic (LOC107766567), mRNA
G2F7	G2F7.1	AT3G49010.3 Symbols: ATBBC1, BBC1, RSU2 breast basic conserved 1	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> 60S ribosomal protein L13-1 (LOC107766512), mRNA
	G2G7.2	No match	No match
G2G7	G2G7.4	AT4G15180.1 Symbols: SDG2, ATXR3 SET domain protein 2	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> histone-lysine N-methyltransferase ATXR3-like (LOC107829313), transcript variant X1, mRNA
	G2G7.6	AT1G60420.1 Symbols: DC1 domain-containing protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> probable nucleoredoxin 2 (LOC107812784), mRNA
G2H7	G2H7.1	AT3G04770.2 Symbols: RPSAb 40s ribosomal protein SA B	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> 40S ribosomal protein SA-like (LOC107816512), mRNA
G2A8	G2A8.1	AT3G09740.1 Symbols: SYP71, ATSYP71 syntaxin of plants 71	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> syntaxin-71-like (LOC107799493), mRNA
G2B8	G2B8.3	AT2G44300.1 Symbols: Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> protein YLS3-like (LOC107781098), mRNA
G2C8	G2C8.1	AT3G44160.1 Symbols: Outer membrane OMP85 family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> polyphenol oxidase E, chloroplastic-like (LOC107789348), transcript variant X3, mRNA
G2E8	G2E8.4	AT4G09320.1 Symbols: NDPK1 Nucleoside diphosphate kinase family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> nucleoside diphosphate kinase 1-like (LOC107771678), mRNA
	G2E8.6	AT3G25800.2 Symbols: PDF1, PR 65, PP2AA2 protein phosphatase 2A subunit A2	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform-like (LOC107787439), transcript variant X1, mRNA

G2F8	G2F8.1	AT3G53980.2 Symbols: Bifunctional inhibitor/lipid- transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> uncharacterized LOC107765337 (LOC107765337), mRNA
	G2F8.4	AT3G53980.2 Symbols: Bifunctional inhibitor/lipid- transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> uncharacterized LOC107765337 (LOC107765337), mRNA
G2G8	G2G8.1	AT4G09320.1 Symbols: NDPK1 Nucleoside diphosphate kinase family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> nucleoside diphosphate kinase 1-like (LOC107771678), mRNA
	G2G8.5	<i>No match</i>	
G2H8	G2H8.1	AT2G44300.1 Symbols: Bifunctional inhibitor/lipid- transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> protein YLS3-like (LOC107781098), mRNA
G2A9	G2A9.3	AT4G09320.1 Symbols: NDPK1 Nucleoside diphosphate kinase family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> nucleoside diphosphate kinase 1-like (LOC107771678), mRNA
	G2A9.5	AT4G09320.1 Symbols: NDPK1 Nucleoside diphosphate kinase family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> nucleoside diphosphate kinase 1-like (LOC107771678), mRNA
G2B9	G2B9.1	AT3G51590.1 Symbols: LTP12 lipid transfer protein 12 	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> non-specific lipid- transfer protein 2 (LOC107814800), mRNA
G2B9	G2B9.3	AT5G44890.1 Symbols: transposable element gene	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> uncharacterized LOC107802204 (LOC107802204), ncRNA
G2C9	G2C9.1	AT3G01280.1 Symbols: VDAC1, ATVDAC1 voltage dependent anion channel 1	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> mitochondrial outer membrane protein porin of 34 kDa-like (LOC107789843), mRNA
	G2C9.2	AT1G32210.1 Symbols: ATDAD1 Defender against death (DAD family) protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> dolichyl- diphosphooligosaccharide-- protein glycosyltransferase subunit DAD1 (LOC107768807), mRNA
	G2C9.6	AT4G38510.2 Symbols: ATPase, V1 complex, subunit B protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> V-type proton ATPase subunit B2-like (LOC107805728), mRNA
G2D9	G2D9.1	AT4G09480.1 Symbols: transposable element gene	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> uncharacterized LOC107794225 (LOC107794225), partial

			mRNA
G2E9	G2E9.1	AT1G26355.1 Symbols: SP1L1 SPIRAL1-like1	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> protein SPIRAL1-like 1 (LOC107820715), mRNA
	G2F9.2	AT5G59870.1 Symbols: HTA6 histone H2A 6	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> histone H2A.1 (LOC107761301), mRNA
G2F9	G2F9.4	AT3G07090.1 Symbols: PPPDE putative thiol peptidase family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> desumoylating isopeptidase 1-like (LOC107822016), mRNA
G2G9	G2G9.1	AT3G04770.2 Symbols: RPSAb 40s ribosomal protein SA B	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> 40S ribosomal protein SA-like (LOC107816512), mRNA
G2H9	G2H9.1	AT3G04770.2 Symbols: RPSAb 40s ribosomal protein SA B	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> 40S ribosomal protein SA-like (LOC107816512), mRNA
	G2A10.1	AT3G29360.2 Symbols: UDP-glucose 6-dehydrogenase family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> UDP-glucose 6-dehydrogenase 3-like (LOC107764147), mRNA
G2A10	G2A10.2	AT3G56130.1 Symbols: biotin/lipoyl attachment domain-containing protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase-like (LOC107795053), transcript variant X2, mRNA
G2B10	G2B10.1	AT1G29910.1 Symbols: CAB3, AB180, LHCb1.2 chlorophyll A/B binding protein 3	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> chlorophyll a-b binding protein 40, chloroplastic-like (LOC107773465), partial mRNA
G2C10	G2C10.2	AT5G23280.1 Symbols: TCP family transcription factor	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> 40S ribosomal protein SA-like (LOC107816512), mRNA
G2D10	G2D10.3	AT2G20690.1 Symbols: lumazine-binding family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> transcription factor TCP7-like (LOC107830175), mRNA
G2F10	G2F10.1	AT3G58010.1 Symbols: PGL34 plastoglobulin 34kD chr3:21475805-21477569	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> riboflavin synthase-like (LOC107825203), mRNA

G2G10	G2G10.1	AT3G27180.1 Symbols: S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> probable plastid-lipid-associated protein 13, chloroplastic (LOC107760813), mRNA
	G2G10.2	AT3G27180.1 Symbols: S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> RNA polymerase II subunit 5-mediating protein homolog (LOC107810662), transcript variant X2, mRNA
	G2G10.5	AT3G27180.1 Symbols: S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> RNA polymerase II subunit 5-mediating protein homolog (LOC107810662), transcript variant X2, mRNA
	G2G10.6	AT1G58250.2 Symbols: SAB Golgi-body localisation protein domain ;RNA pol II promoter Fmp27 protein domain	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> protein SABRE-like (LOC107822498), mRNA
G2H10	G2H10.1	AT1G29930.1 Symbols: CAB1, AB140, CAB140, LHCB1.3	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> chlorophyll a-b binding protein 21, chloroplastic-like (LOC107807889), mRNA
	G2H10.3	AT2G33520.1 Symbols: unknown protein;	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> cysteine-rich and transmembrane domain-containing protein A-like (LOC107823676), mRNA
G2B11	G2B11.1	AT1G58250.2 Symbols: SAB Golgi-body localisation protein domain ;RNA pol II promoter Fmp27 protein domain	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> transmembrane protein 205-like (LOC107788056), mRNA
	G2B11.4	AT1G29930.1 Symbols: CAB1, AB140, CAB140, LHCB1.3 chlorophyll A/B binding protein 1	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> protein ACCUMULATION AND REPLICATION OF CHLOROPLASTS 6, chloroplastic-like (LOC107788198), transcript variant X1, mRNA
G2C11	G2C11.1	AT2G33520.1 Symbols: unknown protein;	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> ABC transporter I family member 1 (LOC107776986), transcript variant X1, mRNA

G2D11	G2D11.2	AT2G34700.1 Symbols: Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> non-classical arabinogalactan protein 31-like (LOC107813352), mRNA
	G2D11.3	AT3G62580.1 Symbols: Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> transmembrane protein 205-like (LOC107788056), mRNA
	G2D11.4	AT1G27530.1 Symbols: CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Ubiquitin-conjugating enzyme/RWD-like (InterPro:IPR016135), Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1 (InterPro:IPR014806)	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1 (LOC107805705), mRNA
G2H11	G2H11.1	AT1G72370.1 Symbols: P40, AP40, RP40, RPSAA 40s ribosomal protein SA	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> 40S ribosomal protein SA-like (LOC107816512), mRNA
	G2H11.2	AT3G04770.2 Symbols: RPSAb 40s ribosomal protein SA B	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> 40S ribosomal protein SA-like (LOC107813555), mRNA
G2A12	G2A12.1	AT3G62580.1 Symbols: Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> transmembrane protein 205-like (LOC107788056), mRNA
G2B12	G2B12.1	AT3G04770.1 Symbols: RPSAb 40s ribosomal protein SA B	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> 40S ribosomal protein SA-like (LOC107816512), mRNA
G2C12	C12.1	AT3G04770.1 Symbols: RPSAb 40s ribosomal protein SA B	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> 40S ribosomal protein SA-like (LOC107816512), mRNA
G2D12	G2D12.1	AT3G11940.1 Symbols: ATRPS5A, AML1, RPS5A ribosomal protein 5A	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> 40S ribosomal protein S5 (LOC107790011), mRNA
	G2D12.2	AT1G07890.8 Symbols: APX1, MEE6, CS1, ATAPX1, ATAPX01	<i>Nicotiana tabacum</i> L-ascorbate peroxidase 2, cytosolic-like (LOC107759703), mRNA
G2E12	G2E12.1	AT3G46450.2 Symbols: SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> serine hydroxymethyltransferase 3, chloroplastic-like (LOC107759094), transcript variant X2, mRNA
	G2E12.2	AT1G31970.1 Symbols: STRS1 DEA(D/H)-box RNA helicase family protein	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 5-like (LOC107789804), mRNA
G2G12	G12.3	AT5G56780.1 Symbols:	PREDICTED: <i>Nicotiana</i>

		ATET2, ET2 effector of <i>tabacum</i> uncharacterized transcription2 LOC107792131 (LOC107792131), transcript variant X2, ncRNA
G2H12	G2H12.1	AT1G58100.1 Symbols: PREDICTED: <i>Nicotiana</i> TCP family transcription factor <i>tabacum</i> transcription factor TCP8-like (LOC107788021), mRNA