

Universidade de São Paulo - USP
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ

**Caracterização da subunidade 4 (APC4) do Complexo Promotor da
Anáfase em *Arabidopsis thaliana***

Ingrid Andrade Rocha

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2023

Ingrid Andrade Rocha
Licenciada em Ciências Biológicas

**Caracterização da subunidade 4 (APC4) do Complexo Promotor da Anáfase em
*Arabidopsis thaliana***

Orientadora:
Profa. Dra. **NUBIA BARBOSA ELOY**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Rocha, Ingrid Andrade

Caracterização da subunidade 4 (APC4) do Complexo Promotor da Anáfase em *Arabidopsis thaliana*/ Ingrid Andrade Rocha - - Piracicaba, 2023.

91p.

Dissertação (Mestrado) - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Complexo Promotor da Anáfase
2. APC4
3. APC11
4. Desenvolvimento Vegetal

DEDICATÓRIA

Esta dissertação é dedicada à minha irmã Mariana Andrade Rocha, a quem amo profundamente e que me inspira a buscar sempre ser uma pessoa melhor. Expresso minha gratidão à minha mãe e meu pai, que, mesmo não habituados com a academia, sempre demonstraram orgulho pelas minhas conquistas.

Dedico este trabalho não somente àqueles que vieram antes de mim e abriram caminhos para o progresso da ciência no Brasil, mas também às futuras gerações de cientistas brasileiros, especialmente aqueles que enfrentam obstáculos sociais em sua trajetória.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Dra Nubia Eloy pelas oportunidades acadêmicas que ela me proporcionou, bem como pela paciência que ela demonstrou durante minha trajetória no mestrado.

A FAPESP por financiar este projeto e viabilizar recursos para realização dessa pesquisa.

Gostaria de expressar minha gratidão ao Gabriel Luis Moreira pelo acolhimento e conselhos que recebi no início da minha pós-graduação, bem como por sua amizade, que foi especialmente valiosa durante um momento desafiador de pandemia.

Eu gostaria de agradecer ao técnico Amaral pelo apoio e pelos momentos divertidos que compartilhamos entre um café e outro.

A Dra. Perla Oliveira em me ensinar técnicas de biologia molecular, e agradecer a ajuda da Giovanna no acompanhamento e elaboração dos experimentos.

Ao meu namorado Enzo Germano Eugenio pelo apoio, paciência e amor. Além disso, gostaria de agradecer à família Eugenio, que me acolheu e cuidou de mim, especialmente à minha sogra Cassia Eugenio.

Kamila Assis e Lika Crivelenti por terem sido verdadeiras amigas desde que chegaram em Piracicaba em 2022, apoiando-me e orientando-me durante todo o caminho.

A pesquisa no laboratório da Prof. Nubia Eloy recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

"Vencer a si próprio é a maior das vitórias"
- Platão

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Desenvolvimento Vegetal	14
1.2 O ciclo celular e seus mecanismos de controle	15
1.3 Sistema Ubiquitina Proteossoma	18
1.4 Complexo Promotor da Anáfase (APC)	20
Referências.....	22
2. OBJETIVO	34
3. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA SUBUNIDADE 4 DO COMPLEXO PROMOTOR DA ANÁFASE (APC4) em <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
Resumo.....	35
Abstract.....	35
3.1 Introdução	36
3.2 Materiais e Métodos.....	39
3.2.1 Clonagem	39
3.2.2 Obtenção de plantas transgênicas.....	42
3.2.3 Material vegetal, condições de crescimento e desenvolvimento	43
3.2.4 Análise dos níveis de expressão por qRT-PCR das linhagens APC4 ^{OE}	44
3.2.5 Análises fenotípicas das linhagens APC4 ^{OE}	48
3.2.6 Cruzamentos	49
3.2.7 Ensaio e coloração de GUS.....	49
3.3 Resultados	50
3.3.1 Padrão de expressão do <i>AtAPC4</i> em diferentes períodos do desenvolvimento de <i>Arabidopsis</i>	50
3.3.2 Obtenção de plantas transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> superexpressando <i>APC4</i>	50
3.3.3 Análise dos níveis de expressão de <i>APC4</i> em plantas APC4 ^{OE}	52
3.3.4 Análise do padrão de expressão dos genes marcadores do ciclo celular em plantas APC4 ^{OE}	54
3.3.5 Padrão de expressão do promotor.....	56

3.3.6 Análises fenotípicas	57
3.4 Discussão	65
3.5 Conclusão.....	68
Referências	69
4. O PAPEL DA SUBUNIDADE 11 DO COMPLEXO PROMOTOR DA ANÁFASE NO TAMANHO DE ÓRGÃOS E NO DESENVOLVIMENTO VEGETAL.....	81
Resumo	81
Abstract	81
4.1 Nota de Esclarecimento sobre o capítulo	82
4.2 Materiais e Métodos	82
4.2.1 Linhagens de trabalho.....	82
4.2.2 Material vegetal e condições de crescimento.....	83
4.2.3 Análise da expressão gênica.....	83
4.2.4 Ensaio de coloração GUS	84
4.2.5 Análise de crescimento da raiz.....	85
4.3 Resultados.....	85
4.3.1 Análise dos níveis de expressão de plantas <i>apc11-1</i> e <i>amiR-apc11</i>	85
4.3.2 Padrão de expressão de <i>APC11</i>	87
4.3.3 Análises fenotípicas das raízes de mutantes <i>apc11</i>	88
4.4 Discussão	89
4.5 Conclusão.....	90
Referências	90
ANEXO.....	91

RESUMO

Caracterização da subunidade 4 (APC4) do Complexo Promotor da Anáfase em *Arabidopsis thaliana*

O desenvolvimento vegetal é regulado por mecanismos moleculares conservados de divisão, diferenciação e expansão celular. A divisão celular garante a duplicação celular e manutenção da informação genética para as células filhas, e esse processo é realizado através de mudanças de fase mediadas por proteólise de substratos ubiquitinados, permitindo a progressão unidirecional do ciclo celular. A saída da mitose e a transição G2/M é alcançada através da E3 ubiquitina ligase, APC/C. O APC/C é composto por módulos específicos, incluindo o catalítico (APC2 e APC11), estrutural (subunidades TPR) e conector (APC4, APC5 e APC1). Esse estudo investigou o papel das subunidades 4 (APC4) e 11 (APC11) no crescimento e desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana*, através da geração de plantas de superexpressão do *APC4*, controlada pelo promotor constitutivo *CaMV 35S*, e de mutantes com redução da expressão do *APC11*. Nossos resultados mostraram que a superexpressão do gene *APC4* pode ter um efeito positivo no desenvolvimento de *Arabidopsis*, como aumento no tamanho dos cotilédones e primórdios foliares. Além disso, a linhagem *APC4^{OE364}* apresentou aumento significativo na área foliar e no comprimento da raiz principal. O perfil de expressão dos genes marcadores do ciclo celular em plantas *APC4^{OE}* mostraram níveis elevados do mRNA de *CYCD3;1*, sugerindo uma possível influência do APC4 no controle dos níveis de ciclinas da fase S. No entanto, não observamos diferença na degradação da proteína reguladora da transição G2/M, *CYCB1;1*. Mutantes *APC11 knockdown* apresentaram redução significativa de seus níveis de mRNA, e alteração no padrão de expressão dos genes marcadores da transição G2/M ao longo do desenvolvimento. Além disso, exibiram raízes menores devido a uma redução no meristema radicular, e aumento na densidade de raízes laterais. Além disso, observamos a presença de grânulos de amido na camada celular abaixo do CQ (Centro Quiescente), indicando prematura diferenciação de células da columela.

Palavras-chave: Complexo Promotor da Anáfase, APC4, APC11, Desenvolvimento Vegetal, *Arabidopsis thaliana*.

ABSTRACT

Characterization of the Anaphase Promoting Complex Subunit 4 (APC4) in *Arabidopsis thaliana*

Plant development is regulated by conserved molecular mechanisms of cell division, differentiation and expansion. Cell division ensures cell duplication and maintenance of genetic information for daughter cells, and this process is controlled by phase changes mediated by proteolysis of ubiquitinated substrates, allowing unidirectional progression of the cell cycle. The exit from mitosis and the G2/M transition is accomplished through the E3 ubiquitin ligase, APC/C. APC/C is composed of specific modules, including catalytic (APC2 and APC11), structural (TPR subunits) and connector (APC4, APC5 and APC1). This study investigated the role of subunits 4 (APC4) and 11 (APC11) during growth and development of *Arabidopsis thaliana*, through the generation of APC4 overexpression plants driven by the constitutive promoter CaMV 35S, and APC11 knockdown mutant plants. Our results showed that APC4 overexpression can have a positive effect on *Arabidopsis* development, such as increased cotyledons and leaf primordia size. In addition, the APC4^{OE364} line showed significant increase in leaf area and root length. The expression profile of cell cycle marker genes in APC4^{OE} plants showed high levels of *CYCD3;1* mRNA, suggesting a possible impact of APC4 in the control of S-phase cyclins level. However, we did not observe any difference in the degradation of the G2/M regulatory protein, CYCB1;1. APC11 knockdown mutants showed a significant reduction in their mRNA levels and alteration in the expression pattern of G2/M marker genes throughout development. In addition, they exhibited smaller roots due to a reduction in root meristem, and increased lateral root density. Furthermore, we observed the presence of starch granules in the cell layer below the QC (Quiescent Center), suggesting premature columella cell differentiation.

Keywords: Anaphase Promoting Complex, APC4, APC11, Plant Development, *Arabidopsis thaliana*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC/C	Complexo Promotor da Anáfase/ Ciclossomo
APC4	Subunidade 4 do Complexo Promotor da Anáfase
APC11	Subunidade 11 do Complexo Promotor da Anáfase
ATP	Adenosina trifosfato
CaMV	Cauliflower mosaic vírus
CCS52/Cdh1	<i>CELL CYCLE SWITCH 52</i>
CDC20	<i>CELL DIVISION CYCLE 20</i>
CDS	Sequência Codificadora
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
cDNA	DNA complementar
CKIs	Inibidores de CDK
CRLs	CULLIN-RING BOX1-LIGASEs
CYCB1;1	<i>Cyclin B1;1</i>
CYCD3;1	<i>Cyclin D3;1</i>
Col-0	Ecotipo Columbia-0 (Selvagem)
DAS	<i>Days After Stratification</i>
D-box	<i>Box Destruction</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E1	Enzima ativadora de ubiquitina
E2	Enzima conjugadora de ubiquitina
E3	Enzima ligase de ubiquitina
G0	Estado Quiescente
G1	Gap1
G2	Gap2
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GEN	Gentamicina
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GIG1	GIGAS CELL1
GUS	β - Glucuronidase
HIS4	Histone H4
KEN-box	<i>Motif</i> de Identificação
KM	Canamicina
M	Mitose
MS	Meio De Cultura Murashige & Skoog Meia Força

mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
OE	Superexpressão (<i>overexpression</i>)
OD	Densidade Ótica
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PROMAPC4	Protomor Putativo do gene APC4
RIFA	Rifampicina
RT- qPCR	<i>Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
S	Fase de Síntese
SCF	SKP/CUL/RBX/F-box
SM	Estreptomicina
SP	Espectiomicina
SUP	Sistema Ubiquitina Proteossoma
TPR	Repetições Tetratricopeptídica
T3	Homozigotas
Ub/UBQ10	Ubiquitina
UVI4	ULTRAVIOLET-B-INSENSITIVE 4
VIB-Gent	<i>Flanders Institute of Biotechnology</i>
WD-40	Triptofano e Ácido aspártico
35S	Promotor Constitutivo

1. INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento Vegetal

O desenvolvimento e o crescimento vegetal é controlado por diversos mecanismos moleculares, tanto na geração do zigoto (a partir da fecundação de gametas dioicos maduros gerados na fase reprodutiva) quanto nas fases de embriogênese, desenvolvimento vegetativo e reprodução (Figura 1) (Saleme et al., 2021). A regulação dos mecanismos moleculares nas plantas é altamente influenciada pela sua condição sésil e autotrófica, os quais são dependentes dos estímulos ambientais (Xu & Xue, 2019). O crescimento vegetal é uma consequência dos processos de divisão, diferenciação e expansão celular, que nas plantas possuem suas próprias singularidades quando comparadas aos demais eucariotos (Inzé & De Veylder, 2006; Melo et al., 2021). É também a partir destes processos que o zigoto é capaz de tornar-se um embrião, estabelecendo seu eixo polar (porção radicular e apical) e progredir ao longo das fases da embriogênese (globular, coração e torpedo), até ser capaz de germinar (Saleme et al., 2021; Wang et al., 2012).

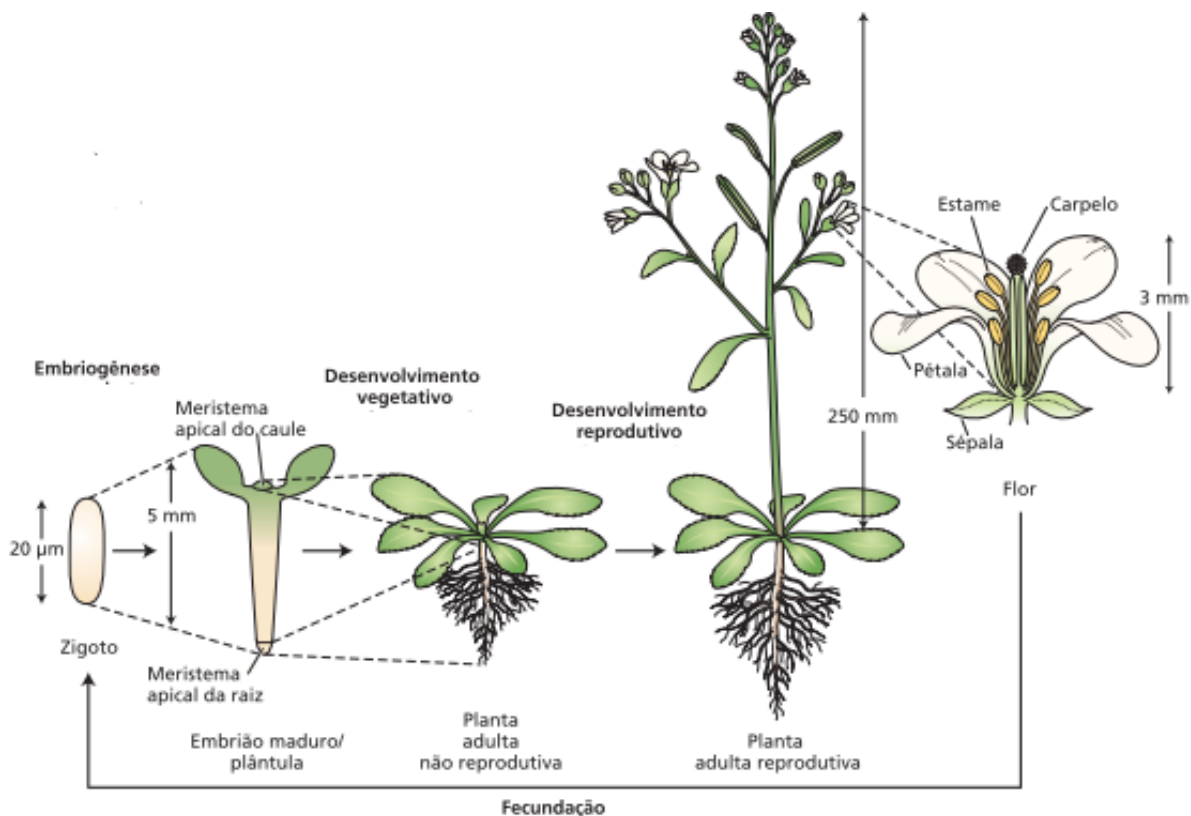


Figura 1. Principais fases do desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana*: embriogênese, desenvolvimento vegetativo e período reprodutivo, respectivamente. Figura retirada do livro “Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal”, Taiz et al. 2017.

Ao contrário dos animais, a maior parte do desenvolvimento vegetal ocorre após a embriogênese, durante o período vegetativo (Inzé & De Veylder, 2006) (Inzé & De Veylder, 2006), por meio da atividade dos tecidos meristemáticos, que são compostos por células indiferenciadas com elevadas taxas de proliferação celular (Lammens et al., 2008)

1.2 O ciclo celular e seus mecanismos de controle

O ciclo celular eucariótico é o processo pelo qual as células se duplicam, e ao mesmo tempo garantem a integridade da informação (hereditariedade) e da maquinaria básica das células descendentes. Os processos de replicação do DNA, e segregação cromossômica são realizados por mecanismos de controle bem estabelecidos e altamente conservados entre os eucariotos, pois estes garantem que a direção do ciclo ocorra de forma correta e unidirecional (Matthews et al., 2022).

O ciclo celular mitótico é constituído de duas fases, a Interfase ou fase S, onde ocorre a síntese e duplicação do DNA, e a Mitose, onde acontece a segregação cromossômica e divisão celular. A mitose e a interfase são separadas por dois intervalos, conhecidos como Gaps (G1 e G2), sendo G1 o intervalo que antecede a fase S, no qual a célula monitora o seu tamanho e checa se o ambiente está favorável para a duplicação do DNA (Figura 2).

Em animais, as células em G1 podem entrar em um estado quiescente por tempo indeterminado (fase G0), e retornar novamente ao ciclo, ou sofrer diferenciação (G_t). Na fase G0, as células possuem um tamanho menor, apresentando uma diminuição na síntese de macromoléculas e nas atividades metabólicas, quando comparadas com células em proliferação (Cheeseman, 2020).

Na fase S o DNA é duplicado, e para que ocorra uma transferência fiel da informação genética de uma geração de célula para a seguinte é necessária uma correta e precisa duplicação deste material. Células em divisão alternam-se durante etapas de síntese de DNA e etapas onde essa síntese encontra-se reprimida nas demais fases do ciclo. A duplicação do DNA em células eucarióticas, se inicia a partir de várias origens, uma vez que os cromossomos são muito grandes para ter apenas

um sítio de replicação. Todo o genoma deve ser duplicado apenas uma vez durante cada fase S do ciclo celular, e se houver algum erro durante esse processo, ou seja, uma falha na replicação do DNA ou ocorrer reduplicação do DNA, isso poderá resultar numa mitose anormal ou na amplificação adicional de alguma parte do DNA. Como esses eventos são raros, fica claro que os processos que coordenam o início da replicação em milhares de sítios no genoma são precisamente regulados para prevenir qualquer tipo de falha (Harashima et al., 2013; Satyanarayana & Kaldis, 2009).

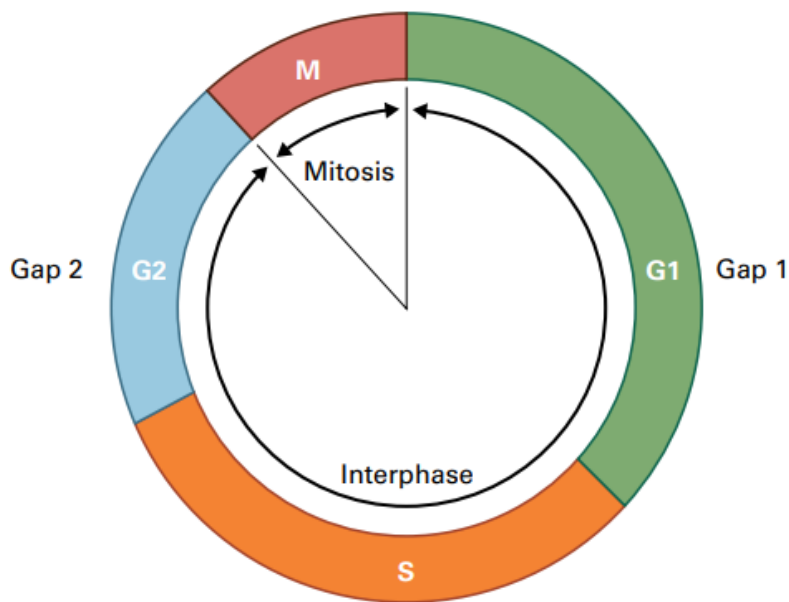


Figura 2. Fases do ciclo celular. Mitose (M), síntese de DNA (S) e duas fases de intervalo (G1 e G2) que separam os dois eventos. Interfase, os cromossomos aparecem difusos e as células não se dividem. Mitose, condensação cromossômica e divisão nuclear.

Após a conclusão da replicação um outro ponto de controle acontece em G2, o qual permite a célula checar se todo o material genético foi duplicado, antes de prosseguir para a próxima etapa. A fase seguinte é a M ou mitose, e é dividida em diferentes estágios: prófase; prometáfase; metáfase; anáfase e telófase. Durante a prófase, os cromossomos se replicam, cada um consistindo de duas cromátides irmãs pareadas, tornando-se condensados e visíveis. Na prometáfase, o envelope nuclear é desfeito, os quinetocoros formam-se na região dos centrômeros e os microtúbulos formam o eixo mitótico, iniciando a separação dos cromossomos. Na metáfase, os cromossomos alinham-se no meio da célula, sendo o conjunto chamado de placa metafásica, e são mantidos presos pelo eixo mitótico. Na anáfase, o eixo estende-se entre duas estruturas, chamadas centrômeros, localizando-se em lados opostos da célula. As cromátides, então, movem-se em direção ao seu respectivo lado na célula.

Durante a telófase, os cromossomos segregam-se dentro de dois novos núcleos, formando as células filhas. Durante a citocinese, o citoplasma se divide e duas células idênticas separadas são formadas (Pidoux & Allshire, 2000; Venuto & Merla, 2019).

O controle do ciclo celular é realizado através da inibição ou ativação de proteínas quinases conhecidas como CDKs. Estas enzimas são compostas de uma subunidade catalítica, chamada “*cyclin-dependent kinase*” (CDK), e uma subunidade ativadora, conhecida como Ciclina, formando o complexo ciclina-CDK, o qual está sujeito a regulação em diferentes níveis (Lim & Kaldis, 2013; Malumbres, 2014). As ciclinas são absolutamente necessárias para a atividade quinase e para determinar a especificidade do substrato (Malumbres, 2014).

O complexo ciclina-CDK atua em várias fases durante a progressão do ciclo celular, incluindo a transição da fase G1 para S (G1/S) e a transição da fase G2 para mitose (G2/M). Em mamíferos existem várias CDKs (Cdc2, Cdk2, Cdk3, Cdk4 e Cdk6), especializadas para diferentes transições, enquanto em *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* o ciclo celular parece ser controlado por uma simples CDK (Cdc28 e Cdc2) respectivamente (Nurse 1975; Hartwell et al. 1974).

O complexo ciclina-CDK é regulado positiva e negativamente por fosforilação (Morgan, 2007). Além disso, as CDKs são reguladas por ligação a inibidores chamados de CKIs, que são proteínas inibidoras de Ciclina quinases, como por exemplo, Sic1 em *S. cerevisiae* (Schwob et al., 1994). As CDKs estão presentes durante todo o ciclo celular, porém os níveis das Ciclinas oscilam e são regulados durante o ciclo, influenciando diretamente a atividade quinase das CDKs (Swaffer et al., 2016). Baixos níveis de atividade CDK são requeridos para saída da mitose e para a formação do complexo pré-replicativo do DNA (pré-RCs). O estágio de alta atividade CDK é essencial para iniciar a replicação do DNA na fase S, e, subsequentemente, direcionar a entrada da célula na mitose (Bertoli et al., 2013). Estas oscilações, estabelecem uma alternância entre a replicação do DNA e a segregação do cromossomo que é essencial para a proliferação celular. Em leveduras, o ciclo celular progride como um sistema bifásico, que alterna entre um estágio de baixa atividade CDK- que se inicia na telófase e vai até o final de G1- e um estágio de alta atividade CDK- que se estende de G1/S até a anáfase (Osaka et al., 1997; Sherr & Roberts, 1999).

1.3 Sistema Ubiquitina Proteossoma

Um dos mecanismos primários pelo qual uma mudança de fase no ciclo celular ocorre é a proteólise mediada por ubiquitinação de fatores inibitórios (Wade Harper et al., 2002). As reações de ubiquitinação no ciclo celular são mediadas por dois complexos protéicos de várias subunidades: o Skp1-Cullin-F-box-protein (SCF) e o Anaphase Promoting Complex ou Ciclosome (APC/C). Enquanto as mudanças conformacionais causadas pela fosforilação são reversíveis e adaptadas às alterações estruturais ou às propriedades catalíticas de uma proteína, a poliubiquitinação permite o reconhecimento e a subsequente destruição proteolítica pelo proteossoma 26S. A ubiquitinação resulta na completa inativação irreversível da proteína alvo, fazendo com que esta modificação direcione a progressão do ciclo celular numa via unidirecional (Roos-Mattjus & Sistonen, 2004). Este processo envolve ligação covalente de cadeias de ubiquitina aos resíduos de lisina de uma proteína, levando ao seu reconhecimento e degradação pelo proteossoma 26S (Glotzer et al., 1991; Hershko et al., 1991) Este processo conhecido como Sistema Ubiquitina Proteossoma (SUP) é responsável por grande parte do controle do balanço proteico celular, o qual consiste de uma cascata enzimática dividida em três etapas; ativação, conjugação e reconhecimento da proteína marcada (Nandi et al., 2006).

Desde a descoberta e purificação da ubiquitina (Goldstein et al., 1975) muitos estudos foram realizados até a completa elucidação da função conservada do SUP nos processos biológicos dos eucariotos (Nandi et al., 2006; Kleiger & Mayor, 2014). Em plantas, o SUP além de estar envolvido no controle do ciclo celular, também controla uma diversidade de processos ao longo do desenvolvimento, como dormência e germinação de sementes, crescimento da raiz, controle do tempo da floração, controle hormonal e desenvolvimento do cloroplasto (Shu & Yang, 2017).

Na maquinaria intracelular esse processo garante a renovação e reciclagem peptídica, proporcionado ainda que proteínas com defeitos conformacionais de dobramento e montagem sejam degradadas, e não ameacem o equilíbrio celular (Ravid & Hochstrasser, 2008). Além disso, esse processo é principalmente um mecanismo de controle (Muratani & Tansey, 2003), que no ciclo celular, possui a função de regular e direcionar a abundância espaço-temporal de proteínas específicas que controlam o ciclo (Heyman and De Veylder, 2012).

Como mencionado, a ubiquitinação envolve três grandes passos (Figura 3). Primeiro, a enzima ativadora E1 usa ATP para gerar uma ponte de tioéster entre um resíduo de cisteína do sítio ativo e um resíduo de glicina na região C-terminal da ubiquitina, que é uma pequena proteína altamente conservada em todos os eucariotos. Segundo, a ubiquitina é transferida para a cisteína do sítio ativo da E2 (enzima conjugadora de ubiquitina). Terceiro, a E2 se une a E3 (ubiquitina ligase) transferindo ubiquitina para um ou mais resíduos de lisina de um substrato proteico para gerar uma ligação isopeptídica estável. Múltiplos ciclos de ubiquitinação transferem mais ubiquitina para o conjugado proteico inicial, formando uma cadeia de poliubiquitina ligada à proteína alvo, a qual depois será reconhecida pelo “cap” regulatório do proteossoma 26S para ser degradado (Nandi et al., 2006; Purayil et al., 2022; Ravid & Hochstrasser, 2008; Shu & Yang, 2017; Vierstra, 2009).

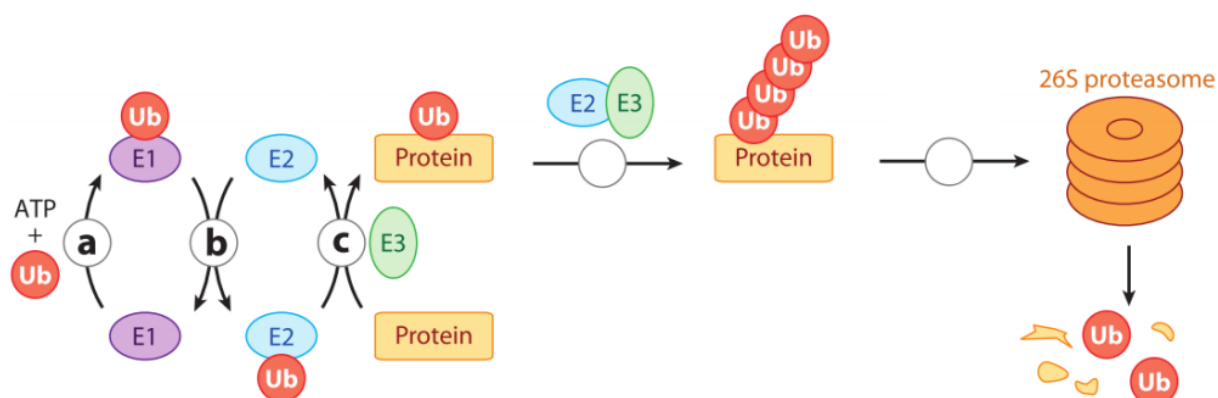


Figura 3. Cascata enzimática da reação do Sistema Ubiquitina-Proteossoma (SUP): Ubiquitina (Ub); Enzima Ativadora de Ubiquitina (E1); Enzima Conjugadora de Ubiquitina (E2); Enzima Ligase de Ubiquitina (E3); Proteína-alvo; e Proteossomo 26S. Com o uso de ATP, a E1 ativa a Ub (a) e a transfere para a E2 (b). Em seguida, E2 e E3 trabalham em conjunto (c), enquanto a E3 reconhece os domínios específicos (D-Box ou KEN-box) da proteínas-alvo, E2 transfere a Ub para a proteína alvo. Após alguns ciclos de reação de E1, E2 e E3, uma calda de poliubiquitina é formada, assegurando que a proteína-alvo seja reconhecida pelo Proteossoma 26S, e degradada. Figura retirada de <https://ag.purdue.edu/biochem/xingliulab/projects>.

E3s são os componentes chaves da via de ubiquitinação porque determinam a especificidade da reação de ubiquitinação, recrutam a E2 apropriada, e também podem contribuir para a atividade da E2 (Ciechanover, 1998; Glotzer et al., 1991). No interior do proteossoma a proteína-alvo sofre hidrólise (formando oligopeptídeos), e as ubiquitinas são dissociadas e inativadas tornando-se disponíveis para reutilização e reativação via E1 conforme demanda (Pickart & Cohen, 2004)

1.4 Complexo Promotor da Anáfase (APC)

Durante o ciclo celular duas E3 ligases, SCF (Skp, Cullin, F-box Complex) e APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) são as responsáveis por direcionar a proteólise das proteínas reguladoras das diferentes fases do ciclo celular (Shu & Yang, 2017; Skaar & Pagano, 2009). O SCF é a E3 responsável por reconhecer e ubiquitinar os inibidores de CDK (CKIs) permitindo a transição G1/S (Jun et al., 2013). Assim como o SCF, o Complexo Promotor da Anáfase (APC) pertence ao grupo das Cullin-Ring Box1-Ligases (CRLs), e é requerido principalmente para a separação das cromátides irmãs e a saída da mitose através da proteólise de diferentes reguladores do ciclo celular, incluindo Pds1/Securin e Ciclina B (Heyman & De Veylder, 2012; Shu & Yang, 2017)

O APC foi descoberto como uma ubiquitina ligase específica da mitose e da degradação de ciclina B em moluscos e extratos de *Xenopus* (King et al., 1995; Sudakin et al., 1995), e através do isolamento de mutantes de levedura, defeituosos na degradação de ciclinas mitóticas (Irniger et al., 1995). A enzima do molusco foi chamada de Ciclossomo para ilustrar a ativação e inativação cíclica da via de degradação da ciclina (Sudakin et al., 1995), enquanto que em *Xenopus* e em levedura, a ubiquitina ligase foi chamada de “*Anaphase Promoting Complex*”, para ilustrar seu papel essencial na iniciação da anáfase. Desde a sua primeira purificação, onde foram encontradas oito subunidades, tem havido um grande esforço para purificar o complexo em outros organismos.

A composição do APC mostra similaridades com o SCF. O APC contém, por exemplo, um homólogo a Cullin/Cdc53, o APC2, e, como o SCF, o APC associa-se com proteínas que o ativam em direção a um substrato específico (Shu & Yang, 2017; Wolfgang Zachariae & Nasmyth, 1999). Duas classes de proteínas contendo repetições de WD foram identificadas até o momento como ativadoras do APC. Estas proteínas são conhecidas como Cdc20 e Cdh1 (Wolfgang Zachariae & Nasmyth, 1999). O número exato das subunidades que compõem o APC tem sido objeto de mudanças todo o tempo, e no momento em vertebrados estão descritas 15 subunidades, mas só é ativo como uma ubiquitina ligase uma vez estando ligado aos seus ativadores, Cdc20 e Cdh1, que ativam o APC/C temporalmente, e fornecem especificidade ao substrato alvo (Barford 2020; Lima et al. 2010). Na transição metáfase/anáfase, o APC/C é ativado

pelo Cdc20, e posteriormente, durante a telófase e G1 pelo Cdh1, onde seus substratos são reconhecidos através de um motivo chamado D-Box (*Destruction box*), ou KEN-box (Chang et al., 2014; King et al., 1996; Lima et al., 2010b; Saleme et al., 2021).

A complexa estrutura do APC/C é composta por módulos com diferentes funções: o módulo catalítico e de reconhecimento, o módulo estrutural (TPR) e o módulo conector. No módulo catalítico a associação dos ativadores Cdc20 e Cdh1 com APC10 (Doc1) ativa o complexo e forma o módulo de reconhecimento do substrato (Nubia B. Eloy et al., 2011; Grossberger et al., 1999), enquanto que o APC2 (Cullin) (Capron et al., 2003) e APC11 (Ring-H2) (Guo et al., 2016; Schwedersky et al., 2021) são as subunidades responsáveis pela catálise da ubiquitinação (Gmachl et al., 2000; Tang et al., 2001). O módulo estrutural é constituído pelas subunidades APC3a, APC3b, APC6, APC7 e APC8 que são constituídas por sequencias com motivos estruturais conhecidos como tetratricopeptide repeat (TPR) (Chang et al., 2014), o qual consiste de 34 aminoácidos degenerados com repetições em tandem identificados em uma grande variedade de proteínas mediando as interações proteína-proteína na montagem de grandes complexos proteicos (D'Andrea & Regan, 2003). Além disso, existem as subunidades acessórias de TPR; APC12, APC13 e APC16, as quais auxiliam na estabilidade do módulo (Alfieri et al., 2017; Chang et al., 2014). O módulo conector é composto pelo APC4 que possui domínio WD40, caracterizado por repetições de aproximadamente 40 aminoácidos contendo o dipeptídeo G-H Glicina (G) e Histidina (H), e o dipeptídeo W-D Triptofano (W) e ácido aspártico (D) em seus respectivos N e C-terminais, o APC5 que também possui domínios TPR (Chang et al., 2014; Cronin, Yang, Zhang, Kulkarni, et al., 2015; Eloy et al., 2015; Wang et al., 2012) e pela maior subunidade do complexo, o APC1 que atua como uma base para o módulo estrutural e o módulo catalítico/substrato (Jørgensen et al., 2001; Wang et al., 2013). APC4, assim como o APC5, desempenham uma função conectora que é necessário para a ligação das subunidades TPR's ao APC1 (Thornton & Toczyski, 2006; van Leuken et al., 2008)

Referências

- Alfieri, C., Zhang, S., & Barford, D. (2017). Visualizing the complex functions and mechanisms of the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C). *Open Biology*, 7(11). <https://doi.org/10.1098/rsob.170204>
- Barford, D. (2020). Structural interconversions of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) regulate cell cycle transitions. *Current Opinion in Structural Biology*, 61, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.11.010>
- Beemster, G. T. S., De Veylder, L., Vercruyssen, S., West, G., Rombaut, D., Van Hummelen, P., Galichet, A., Grissem, W., Inzé, D., & Vuylsteke, M. (2005). Genome-wide analysis of gene expression profiles associated with cell cycle transitions in growing organs of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 138(2), 734–743. <https://doi.org/10.1104/pp.104.053884>
- Bertoli, C., Skotheim, J. M., & De Bruin, R. A. M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), 518–528. <https://doi.org/10.1038/nrm3629>
- Brasileiro, A.C.M. Carneiro, V. T. C. (1988). Manual de transformação genética de plantas. *EmbrapaSPI/Embrapa-Cenargen*.
- Capron, A., Serralbo, O., Fülöp, K., Frugier, F., Parmentier, Y., Dong, A., Lecureuil, A., Guerche, P., Kondorosi, E., Scheres, B., & Genschik, P. (2003). The Arabidopsis Anaphase-Promoting Complex or Cyclosome: Molecular and Genetic Characterization of the APC2 Subunit. *Plant Cell*, 15(10), 2370–2382. <https://doi.org/10.1105/tpc.013847>
- Chang, L., Zhang, Z., Yang, J., McLaughlin, S. H., & Barford, D. (2014). Molecular architecture and mechanism of the anaphase-promoting complex. *Nature*, 513(7518), 388–393. <https://doi.org/10.1038/nature13543>
- Cheeseman, I. M. (2020). *Review. Figure 2*, 259–271. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.09.029>
- Ciechanover, A. H. and A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, 67,

425–479. <https://doi.org/10.1038/458421a>

Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *16*(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x>

Cólon-Carmona, A. et al. (1999). *The Plant Journal - 2003 - Col n-Carmona - Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin GUS fusion.pdf*.

Cronin, N. B., Yang, J., Zhang, Z., & Kulkarni, K. (2015). Atomic-Resolution Structures of the APC / C Subunits Apc4 and the Apc5 N-Terminal Domain. *Journal of Molecular Biology*, *427*(20), 3300–3315. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.08.023>

Cronin, N. B., Yang, J., Zhang, Z., Kulkarni, K., Chang, L., Yamano, H., & Barford, D. (2015). Atomic-Resolution Structures of the APC/C Subunits Apc4 and the Apc5 N-Terminal Domain. *Journal of Molecular Biology*, *427*(20), 3300–3315. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.08.023>

D'Andrea, L. D., & Regan, L. (2003). TPR proteins: The versatile helix. *Trends in Biochemical Sciences*, *28*(12), 655–662. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.10.007>

De Freitas Lima, M., Eloy, N. B., Bottino, M. C., Hemerly, A. S., & Ferreira, P. C. G. (2013). Overexpression of the anaphase-promoting complex (APC) genes in *Nicotiana tabacum* promotes increasing biomass accumulation. *Molecular Biology Reports*, *40*(12), 7093–7102. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2832-8>

Eloy, Nubia B., de Freitas Lima, M., Ferreira, P. C. G., & Inzé, D. (2015). The Role of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome in Plant Growth. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *34*(5), 487–505. <https://doi.org/10.1080/07352689.2015.1078613>

Eloy, Nubia B., De Freitas Lima, M., Van Damme, D., Vanhaeren, H., Gonzalez, N., De Milde, L., Hemerly, A. S., Beemster, G. T. S., Inzé, D., & Ferreira, P. C. G. (2011). The APC/C subunit 10 plays an essential role in cell proliferation during leaf development. *Plant Journal*, *68*(2), 351–363. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

313X.2011.04691.x

- Eloy, Nubia B., Gonzalez, N., Van Leene, J., Maleux, K., Vanhaeren, H., De Milde, L., Dhondt, S., Vercruyssen, L., Witters, E., Mercier, R., Cromer, L., Beemster, G. T. S., Remaut, H., Van Montagu, M. C. E., De Jaeger, G., Ferreira, P. C. G., & Inzé, D. (2012). SAMBA, a plant-specific anaphase-promoting complex/cyclosome regulator is involved in early development and A-type cyclin stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(34), 13853–13858. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211418109>
- Eloy, Nubia Barbosa, Coppens, F., Beemster, G. T. S., Hemerly, A. S., & Ferreira, P. C. G. (2006). The Arabidopsis Anaphase Promoting Complex (APC): Regulation through subunit availability in plant tissues. *Cell Cycle*, *5*(17), 1957–1965. <https://doi.org/10.4161/cc.5.17.3125>
- Furuta, T., Tuck, S., Kirchner, J., Koch, B., Auty, R., Kitagawa, R., Rose, A. M., & Greenstein, D. (2000). EMB-30: An APC4 homologue required for metaphase-to-anaphase transitions during meiosis and mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(4), 1401–1419. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.4.1401>
- Genschik, P., Criqui, M. C., Parmentier, Y., Derevier, A., & Fleck, J. (1998). Cell cycle-dependent proteolysis in plants: Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132. *Plant Cell*, *10*(12), 2063–2075. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.12.2063>
- Glotzer, M., Murray, A. W., & Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, *349*(6305), 132–138. <https://doi.org/10.1038/349132a0>
- Gmachl, M., Gieffers, C., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., & Peters, J. M. (2000). The RING-H2 finger protein APC11 and the E2 enzyme UBC4 are sufficient to ubiquitinate substrates of the anaphase-promoting complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(16), 8973–8978. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8973>
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D. H., Niall, H. D., & Boyse,

- E. A. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(1), 11–15. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.1.11>
- Gong, P. et al. (2021). *SAMBA controls the rate of cell division in maize development through APC/C interaction.*
- Grossberger, R., Gieffers, C., Zachariae, W., Podtelejnikov, A. V., Schleiffer, A., Nasmyth, K., Mann, M., & Peters, J. M. (1999). Characterization of the DOC1/APC10 subunit of the yeast and the human anaphase-promoting complex. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 14500–14507. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.20.14500>
- Guo, L., Jiang, L., Zhang, Y., Lu, X. L., Xie, Q., Weijers, D., & Liu, C. M. (2016). The anaphase-promoting complex initiates zygote division in Arabidopsis through degradation of cyclin B1. *Plant Journal*, 86(2), 161–174. <https://doi.org/10.1111/tpj.13158>
- Harashima, H., Dissmeyer, N., & Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in Cell Biology*, 23(7), 345–356. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.03.002>
- Hartley, J. L., Temple, G. F., & Brasch, M. A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*, 10(11), 1788–1795. <https://doi.org/10.1101/gr.143000>
- Hartwell, L. H., Culotti, J., Pringle, J. R., & Reid, B. J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science*, 183(4120), 46–51. <https://doi.org/10.1126/science.183.4120.46>
- Hemerly, A., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Inzé, D., & Ferreira, P. (1992). Genes regulating the plant cell cycle: Isolation of a mitotic-like cyclin from Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(8), 3295–3299. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3295>
- Hershko, A., Ganoth, D., Pehrson, J., Palazzo, R. E., & Cohen, L. H. (1991).

Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts. *Journal of Biological Chemistry*, 266(25), 16376–16379. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)55308-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)55308-4)

Heyman, J., & De Veylder, L. (2012). The anaphase-promoting complex/cyclosome in control of plant development. *Molecular Plant*, 5(6), 1182–1194. <https://doi.org/10.1093/mp/sss094>

Inzé, D., & De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics*, 40, 77–105. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090431>

Inzé, D., Gutiérrez, C., & Chua, N. H. (1999). Trends in plant cell cycle research. *Plant Cell*, 11(6), 991–994. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.6.991>

Irniger, S., Piatti, S., Michaelis, C., & Nasmyth, K. (1995). Genes involved in sister chromatid separation are needed for b-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell*, 81(2), 269–277. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90337-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90337-2)

Jørgensen, P. M., Gräslund, S., Betz, R., Ståhl, S., Larsson, C., & Höög, C. (2001). Characterisation of the human APC1, the largest subunit of the anaphase-promoting complex. *Gene*, 262(1–2), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00511-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00511-4)

Jun, S. E., Okushima, Y., Nam, J., Umeda, M., & Kim, G. T. (2013). Kip-related protein 3 is required for control of endoreduplication in the shoot apical meristem and leaves of Arabidopsis. *Molecules and Cells*, 35(1), 47–53. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-2270-4>

Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant.pdf. *TRENDS in Plant Science*, 7(5), 193–195. <file:///C:/Users/Risa/Downloads/1-s2.0-S1360138502022513-main.pdf>

King, R. W., Glotzer, M., & Kirschner, M. W. (1996). Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Molecular Biology of the Cell*, 7(9), 1343–1357. <https://doi.org/10.1091/mbc.7.9.1343>

- King, R. W., Peters, J. M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., & Kirschner, M. W. (1995). A 20s complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell*, *81*(2), 279–288. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90338-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90338-0)
- Kleiger, G., & Mayor, T. (2014). Perilous journey: A tour of the ubiquitin-proteasome system. *Trends in Cell Biology*, *24*(6), 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.12.003>
- Kumar, M., Basha, P. O., Puri, A., Rajpurohit, D., Randhawa, G. S., Sharma, T. R., & Dhaliwal, H. S. (2010). A candidate gene OsAPC6 of anaphase-promoting complex of rice identified through T-DNA insertion. *Functional and Integrative Genomics*, *10*(3), 349–358. <https://doi.org/10.1007/s10142-009-0155-6>
- Kuppusamy, K. T., Ivashuta, S., Bucciarelli, B., Vance, C. P., Gantt, J. S., & Vandenbosch, K. A. (2009). Knockdown of CELL DIVISION CYCLE16 reveals an inverse relationship between lateral root and nodule numbers and a link to auxin in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, *151*(3), 1155–1166. <https://doi.org/10.1104/pp.109.143024>
- Lammens, T., Boudolf, V., Kheibarshekan, L., Zalmas, L. P., Gaamouche, T., Maes, S., Vanstraelen, M., Kondorosi, E., La Thangue, N. B., Govaerts, W., Inzé, D., & De Veylder, L. (2008). Atypical E2F activity restrains APC/CCCS52A2 function obligatory for endocycle onset. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(38), 14721–14726. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806510105>
- Lim, S., & Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation. *Development (Cambridge)*, *140*(15), 3079–3093. <https://doi.org/10.1242/dev.091744>
- Lima, M. de F., Eloy, N. B., Pegoraro, C., Sagit, R., Rojas, C., Bretz, T., Vargas, L., Elofsson, A., de Oliveira, A. C., Hemerly, A. S., & Ferreira, P. C. (2010a). Genomic evolution and complexity of the Anaphase-promoting Complex (APC) in land plants. *BMC Plant Biology*, *10*(1), 254. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-254>

- Lima, M. de F., Eloy, N. B., Pegoraro, C., Sagit, R., Rojas, C., Bretz, T., Vargas, L., Elofsson, A., de Oliveira, A., Hemerly, A. S., & Ferreira, P. C. (2010b). Genomic evolution and complexity of the Anaphase-promoting Complex (APC) in land plants. *BMC Plant Biology*, *10*(1), 254. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-254>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Malumbres, M. (2014). *Characterization of in vitro and in vivo metabolism of AG-024322, a novel cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor*. 1–10.
- Marrocco, K., Thomann, A., Parmentier, Y., Genschik, P., & Criqui, M. C. (2009). The APC/C E3 ligase remains active in most post-mitotic Arabidopsis cells and is required for proper vasculature development and organization. *Development*, *136*(9), 1475–1485. <https://doi.org/10.1242/dev.035535>
- Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *23*(1), 74–88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
- Melo, F. V., Oliveira, M. M., Saibo, N. J. M., & Lourenço, T. F. (2021). Modulation of Abiotic Stress Responses in Rice by E3-Ubiquitin Ligases: A Promising Way to Develop Stress-Tolerant Crops. *Frontiers in Plant Science*, *12*(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.640193>
- Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W., & Murray, J. A. H. (2003). Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension. *Plant Molecular Biology*, *53*(4), 423–442. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000019059.56489.ca>
- Menges, M., & James, A. H. M. (2002). *Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity* (p. 203±212).
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*, 474–497.
- Muratani, M., & Tansey, W. P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls

- transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(3), 192–201. <https://doi.org/10.1038/nrm1049>
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., & Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *Journal of Biosciences*, 31(1), 137–155. <https://doi.org/10.1007/BF02705243>
- Nurse P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*. 256: 547-51. <https://doi.org/10.1038/256547a0>
- Ohi, M. D., Feoktistova, A., Ren, L., Yip, C., Cheng, Y., Chen, J. S., Yoon, H. J., Wall, J. S., Huang, Z., Penczek, P. A., Gould, K. L., & Walz, T. (2007). Structural Organization of the Anaphase-Promoting Complex Bound to the Mitotic Activator Slp1. *Molecular Cell*, 28(5), 871–885. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.003>
- Osaka, F., Seino, H., Seno, T., & Yamao, F. (1997). A ubiquitin-conjugating enzyme in fission yeast that is essential for the onset of anaphase in mitosis. *Molecular and Cellular Biology*, 17(6), 3388–3397. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.6.3388>
- Pickart, C. M., & Cohen, R. E. (2004). Proteasomes and their kin: Proteases in the machine age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(3), 177–187. <https://doi.org/10.1038/nrm1336>
- Pidoux, A. L., & Allshire, R. C. (2000). Centromeres: Getting a grip of chromosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(3), 308–319. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00094-6)
- Purayil, F. T., Sudalaimuthuasari, N., Li, L., Aljneibi, R., Mohammed, A., Al, K., David, N., Kottackal, M., Alzaabi, M., Balan, J., Kurup, S. S., Hazzouri, K. M., & Amiri, K. M. A. (2022). *Transcriptome Profiling and Functional Validation of RING-Type E3 Ligases in Halophyte Sesuvium verrucosum under Salinity Stress*.
- Ravid, T., & Hochstrasser, M. (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(9), 679–689. <https://doi.org/10.1038/nrm2468>

- Rojas, C. A., Eloy, N. B., De Freitas Lima, M., Rodrigues, R. L., Franco, L. O., Himanen, K., Beemster, G. T. S., Hemerly, A. S., & Ferreira, P. C. G. (2009). Overexpression of the Arabidopsis anaphase promoting complex subunit CDC27a increases growth rate and organ size. *Plant Molecular Biology*, *71*(3), 307–318. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9525-7>
- Roos-Mattjus, P., & Sistonen, L. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway. *Annals of Medicine*, *36*(4), 285–295. <https://doi.org/10.1080/07853890310016324>
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., & Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*, *99*(5), 463–472. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81535-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81535-4)
- Saleme, M. de L. S., Andrade, I. R., & Eloy, N. B. (2021). The Role of Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) in Plant Reproduction. *Frontiers in Plant Science*, *12*(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.642934>
- Satyanarayana, A., & Kaldis, P. (2009). *Mammalian cell-cycle regulation : several Cdks , numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks , numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms*. *28*(33), 2925–2939. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.170>
- Saze, H., & Kakutani, T. (2007). Heritable epigenetic mutation of a transposon-flanked Arabidopsis gene due to lack of the chromatin-remodeling factor DDM1. *EMBO Journal*, *26*(15), 3641–3652. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601788>
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., Chen, H., & Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. *The Plant Cell*, *18*, 1121–1133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001829>
- Schwedersky, R. P., Saleme, M. de L. S., Rocha, I. A., Montessoro, P. da F., Hemerly, A. S., Eloy, N. B., & Ferreira, P. C. G. (2021). The Anaphase Promoting Complex/Cyclosome Subunit 11 and Its Role in Organ Size and Plant Development. *Frontiers in Plant Science*, *12*(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.563760>

- Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M. D., & Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell*, *79*(2), 233–244. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90193-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90193-7)
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Development*, *13*(12), 1501–1512. <https://doi.org/10.1101/gad.13.12.1501>
- Shu, K., & Yang, W. (2017). E3 ubiquitin ligases: Ubiquitous actors in plant development and abiotic stress responses. *Plant and Cell Physiology*, *58*(9), 1461–1476. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx071>
- Skaar, J. R., & Pagano, M. (2009). Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. *Current Opinion in Cell Biology*, *21*(6), 816–824. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.08.004>
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F. C., Ruderman, J. V., & Hershko, A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Molecular Biology of the Cell*, *6*(2), 185–198. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.2.185>
- Swaffer, M. P., Jones, A. W., Flynn, H. R., Snijders, A. P., & Nurse, P. (2016). CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the Cell Cycle. *Cell*, *167*(7), 1750–1761.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.034>
- Tang, Z., Li, B., Bharadwaj, R., Zhu, H., Özkan, E., Hakala, K., Deisenhofer, J., & Yu, H. (2001). APC2 cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(12), 3839–3851. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.12.3839>
- Thornton, B. R., & Toczyski, D. P. (2006). Precise destruction: An emerging picture of the APC. *Genes and Development*, *20*(22), 3069–3078. <https://doi.org/10.1101/gad.1478306>
- Tran, K., Kamil, J. P., Coen, D. M., & Spector, D. H. (2010). Inactivation and Disassembly of the Anaphase-Promoting Complex during Human

Cytomegalovirus Infection Is Associated with Degradation of the APC5 and APC4 Subunits and Does Not Require UL97-Mediated Phosphorylation of Cdh1. *Journal of Virology*, 84(20), 10832–10843. <https://doi.org/10.1128/jvi.01260-10>

van Leuken, R., Clijsters, L., & Wolthuis, R. (2008). To cell cycle, swing the APC/C. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1786(1), 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.05.002>

Venuto, S., & Merla, G. (2019). E3 ubiquitin ligase TRIM proteins, cell cycle and mitosis. *Cells*, 8(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/cells8050510>

Vierstra, R. D. (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(6), 385–397. <https://doi.org/10.1038/nrm2688>

Wade Harper, J., Burton, J. L., & Solomon, M. J. (2002). The anaphase-promoting complex: It's not just for mitosis any more. *Genes and Development*, 16(17), 2179–2206. <https://doi.org/10.1101/gad.1013102>

Wang, Y., Hou, Y., Gu, H., Kang, D., Chen, Z. L., Liu, J., & Qu, L. J. (2013). The Arabidopsis Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Subunit 1 is Critical for Both Female Gametogenesis and Embryogenesis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(1), 64–74. <https://doi.org/10.1111/jipb.12018>

Wang, Y., Hou, Y., Gu, H., Kang, D., Chen, Z., Liu, J., & Qu, L. J. (2012). The Arabidopsis APC4 subunit of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is critical for both female gametogenesis and embryogenesis. *Plant Journal*, 69(2), 227–240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04785.x>

Xu, F. Q., & Xue, H. W. (2019). The ubiquitin-proteasome system in plant responses to environments. *Plant Cell and Environment*, 42(10), 2931–2944. <https://doi.org/10.1111/pce.13633>

Yamashita, Y. M., Nakaseko, Y., Kumada, K., Nakagawa, T., & Yanagida, M. (1999). Fission yeast APC/cyclosome subunits, Cut20/Apc4 and Cut23/Apc8, in regulating metaphase-anaphase progression and cellular stress responses. *Genes to Cells*, 4(8), 445–463. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1999.00274.x>

Zachariae, W. et al . (1996). *Identification of Subunits of the Anaphase-Promoting Complex of Saccharomyces cerevisiae*.

Zachariae, Wolfgang, & Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: Cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes and Development*, 13(16), 2039–2058. <https://doi.org/10.1101/gad.13.16.2039>

Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 1(2), 641–646. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>

2. OBJETIVO

Objetivo geral

Este projeto tem como objetivo caracterizar funcionalmente as subunidades 4 e 11 do Complexo Promotor da Anáfase ao longo do desenvolvimento vegetativo de *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos específicos

- Obtenção de linhagens transgênicas de superexpressão do gene *APC4* ($APC4^{OE}$), e identificação do padrão de expressão do promotor (GUS-GFP);
- Caracterização fenotípica dos possíveis efeitos do aumento de expressão da subunidade APC4 ($APC4^{OE}$) em *Arabidopsis*;
- Análise de expressão de plantas *apc11* e $APC4^{OE}$ através de Real-Time PCR.

3. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA SUBUNIDADE 4 DO COMPLEXO PROMOTOR DA ANÁFASE (APC4) em *Arabidopsis thaliana*.

Resumo

O desenvolvimento vegetal é consequência de uma sequência de eventos altamente precisos e ordenados de divisão, diferenciação e expansão celular. O Complexo Promotor da Anáfase ou Ciclossomo (APC/C) é uma E3 Ubiquitina Ligase envolvida na regulação da divisão celular através da ubiquitinação de reguladores do ciclo, como Ciclina B e Securina, essenciais para separação das cromátides-irmãs e saída da mitose. A identificação do conjunto completo de genes que compõe o APC/C em *Arabidopsis*, assim como em outras espécies vegetais, indicam que os processos básicos controlados pela proteólise mediada por ubiquitina são semelhantes aos de outros organismos. Entretanto, resultados de vários trabalhos sugerem que o APC/C têm outras funções específicas durante o desenvolvimento vegetal. Em *Arabidopsis*, o APC/C é composto por 15 subunidades, e nos últimos anos alguns estudos têm mostrado que perturbações nos níveis desses genes podem causar aumento ou redução na biomassa vegetal. Para compreender melhor estes processos, nossa abordagem é caracterizar plantas de *Arabidopsis thaliana* com ganho ou perda de função através da análise de plantas transgênicas. Neste trabalho, nós caracterizamos a superexpressão constitutiva da subunidade 4 (*APC4*) controlado pelo promotor 35S, derivado do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), durante o desenvolvimento de *Arabidopsis*.

Palavras-chave: *Arabidopsis thaliana*, *APC4*, Complexo Promotor da Anáfase, Desenvolvimento Vegetal, Ciclo Celular

Abstract

Plant development is the consequence of highly precise and ordered events of cell division, differentiation and expansion. Anaphase Promoting Complex or Cyclosome (APC/C) is an E3 Ubiquitin Ligase involved in the regulation of cell division through ubiquitination of cell cycle regulators, such as Cyclin B and Securin that are essential for sister-chromatid separation and exit from mitosis. The identification of the complete set of genes encoding subunits of the APC/C in *Arabidopsis*, and in other plant species, suggests that the basic processes controlled by proteolysis mediated by ubiquitin in plants are similar to other organisms. However, results from several studies indicate that APC/C has other specific functions in the regulation of plant development. In *Arabidopsis*, APC/C is composed of 15 subunits, and in recent years several studies have shown that disturbances in the levels of APC/C genes can provoke an increase or decrease in plant biomass. To better understand these processes, our approach is to characterize *Arabidopsis* plants with gain or loss of function through the analysis of transgenic plants. In this work, we characterized constitutive overexpression of subunit 4 (*APC4*) controlled by the 35S promoter, derived from cauliflower mosaic virus (CaMV), during *Arabidopsis* development.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, Anaphase Promoting Complex, *APC4*, Plant Development, Cell Cycle

3.1 Introdução

O desenvolvimento vegetal é a consequência dos processos de divisão, diferenciação e expansão celular, que nas plantas possuem suas próprias particularidades quando comparadas aos demais eucariotos, e que em grande parte acontece pós embriogênese, durante o período vegetativo (Inzé & De Veylder, 2006; Melo et al., 2021).

O ciclo celular é o processo pelo qual as células se duplicam, e garantem a integridade da informação da maquinaria básica nas células descendentes, garantindo a homeostase. O ciclo celular mitótico é constituído por duas fases, a Interfase, onde ocorre a síntese e duplicação do DNA, e a Mitose, onde acontece a segregação cromossômica e divisão celular. A mitose e a interfase são separadas por dois intervalos de checagem, GAP1, o intervalo que antecede a fase S, e GAP2 o intervalo que antecede a mitose (Cheeseman, 2020). A mitose é dividida em diferentes estágios: prófase, pró-metáfase; metáfase; anáfase e telófase. O processo de segregação cromossômica é controlado por mecanismos bem estabelecidos e altamente conservados entre os eucariotos, pois estes garantem que a direção do ciclo ocorra de forma correta e unidirecional (Matthews et al., 2022).

O Complexo Promotor da Anáfase/Ciclossomo (APC/C) é uma E3 ubiquitina ligase, que possui papel essencial no controle da progressão do ciclo celular (King et al., 1995; Sudakin et al., 1995). Em plantas, assim como em outros eucariontes, a regulação do ciclo celular depende da atividade de quinases, CDKs (*cyclin-dependent kinases*), que são reguladas a partir de fosforilação, defosforilação, interação com proteínas inibidoras ou ativadoras, e proteólise das subunidades regulatórias, conhecidas como Ciclinas. O APC/C está envolvido na regulação do ciclo celular através do controle da transição GAP2 para Mitose (G2/M), e da saída da mitose, catalisando a degradação da Ciclina mitótica (CYCB1;1), e Pds1/Securina, respectivamente, pelo proteossoma 26S. O reconhecimento destas proteínas é realizado através de um motivo de sequência, denominado D-box (*Destruction-box*) encontrado em muitos alvos do APC/C, o qual possuem uma sequência consenso de aminoácidos de RxxLxxxxN, onde R é arginina, X é qualquer aminoácido, L é leucina e N é asparagina (Heyman & De Veylder, 2012; Lima et al., 2010b; Shu & Yang, 2017).

O APC/C é uma das mais complexas máquinas moleculares conhecidas, e dependendo do organismo pode conter mais de uma dúzia de subunidades. Estruturalmente, o APC/C é uma E3 ubiquitina ligase constituída por subunidades que se dividem em 3 módulos funcionais: o módulo catalítico/reconhecimento de substrato; o módulo estrutural e o módulo plataforma (Cronin, Yang, Zhang, & Kulkarni, 2015; Furuta et al., 2000; Ohi et al., 2007; van Leuken et al., 2008). No módulo catalítico/reconhecimento de substrato, o APC2 (CULINA) (Capron et al., 2003) e APC11 (RING-H2) catalisam a reação de ubiquitinação (Guo et al., 2016; Schwedersky et al., 2021), enquanto os ativadores, CDC20 e CDH1, juntamente com a subunidade DOC1 (APC10) (Eloy et al., 2011; Grossberger et al., 1999) dão especificidade a reação, reconhecendo o substrato. O módulo estrutural consiste das subunidades com domínios TPR (tetratricopeptide repeat), APC3a, APC3b, APC6, APC7, APC8 APC13 e APC15 (Chang et al. 2014; D'Andrea and Regan 2003), acompanhado das subunidades acessórias: APC12, APC13 e APC16 (Alfieri et al., 2017; Chang et al., 2014). O terceiro módulo é o plataforma ou “scaffolding”, formado pelo APC1, a maior subunidade do complexo, e pelas subunidades APC4 e APC5, que são propostas a atuar como base conectoras (Jörgensen et al., 2001; Wang et al., 2012; Wang et al, 2013), atuando como uma plataforma dando estabilidade ao complexo (Alfieri et al., 2017; Chang et al., 2014; D'Andrea & Regan, 2003; Eloy et al., 2015; Heyman & De Veylder, 2012)

O APC4 possui uma arquitetura com dois domínios: APC4WD40, caracterizado pela presença de repetições de alta frequência de pares de triptofano (W) e ácidos aspárticos (D), formando uma estrutura β -hélice, sendo o principal local para interações de proteínas; e APC4HBD, predominantemente composta por quatro α -hélices. (Cronin et al., 2015; Eloy et al., 2015). Dentro do complexo, APC4 e APC5 possuem uma extensa e estável interação através dos domínios APC4HBD e APC5TPR (Cronin, Yang, Zhang, & Kulkarni, 2015), e essa estrutura funciona como ancoragem para outras proteínas (APC1, APC2, APC8 e APC15) (Cronin, Yang, Zhang, & Kulkarni, 2015), quando APC4 e APC5 sofrem modificações ou degradação, a estabilidade do complexo é comprometida, e ele é desmontado (Tran et al., 2010).

Genes homólogos ao *APC4* foram identificados em diversos eucariontes (Wade Harper et al., 2002): *Saccharomyces cerevisiae*, Cut20(Zachariae, W., et al 1996); *Schizosaccharomyces pombe*, Lid1(Yamashita et al., 1999); EMB-30 em *Caenorhabditis*

elegans (Furuta et al., 2000); CG4350 em *Drosophila melanogaster*; *X. laevis* e mamíferos (Cronin, Yang, Zhang, & Kulkarni, 2015), e em todos os organismos caracterizados confirmou-se sua função essencial durante o ciclo celular, indicado pela parada das células em metáfase (Yamashita et al., 1999; Furuta et al., 2000; Wade Harper et al., 2002).

Em *Arabidopsis thaliana* o APC/C é constituído por 15 subunidades (Eloy et al., 2015; Heyman & De Veylder, 2012; Saleme et al., 2021), e nos últimos anos a caracterização de alguns destes genes revelaram seu potencial para aumento da biomassa vegetal, como por exemplo APC10, APC3a e SAMBA (Eloy et al., 2011, 2012; Gong, 2021). Em contrapartida, perda de função dos genes correspondentes as subunidades do APC/C causam letalidade, revelando a natureza essencial destas proteínas para o desenvolvimento vegetal. *AtAPC4* é constituído de 777 aminoácidos, possuindo localização essencialmente nuclear. Mutantes heterozigotos *apc4/+* apresentam diversos problemas na gametogênese feminina e embriogênese, como acúmulo de Ciclina B nos óvulos e embriões, alteração na distribuição de auxina em embriões, e defeitos nucleares nos sacos embrionários, afetando a fase reprodutiva do desenvolvimento das plantas (Saleme et al., 2021; Wang et al., 2012).

Para aprofundar nosso conhecimento sobre a função do *AtAPC4* em plantas, precisamos de estudos e análises mais detalhadas. Portanto, a proposta deste trabalho é a caracterização funcional da subunidade *APC4*, a partir da superexpressão do gene em *Arabidopsis thaliana*.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Clonagem

Construção de vetores

As construções usadas neste trabalho foram clonadas utilizando a metodologia e vetores Gateway da Invitrogen, baseada na recombinação de fragmentos homólogos (Hartley et al., 2000) (Figura 4). Portanto, *primers* específicos para cada região a ser amplificada foram desenhados, e sequências de recombinação homólogos ao vetor (região ATTP1 e ATTP2) foram adicionadas as sequências dos *primers* gerados (Tabela 3).

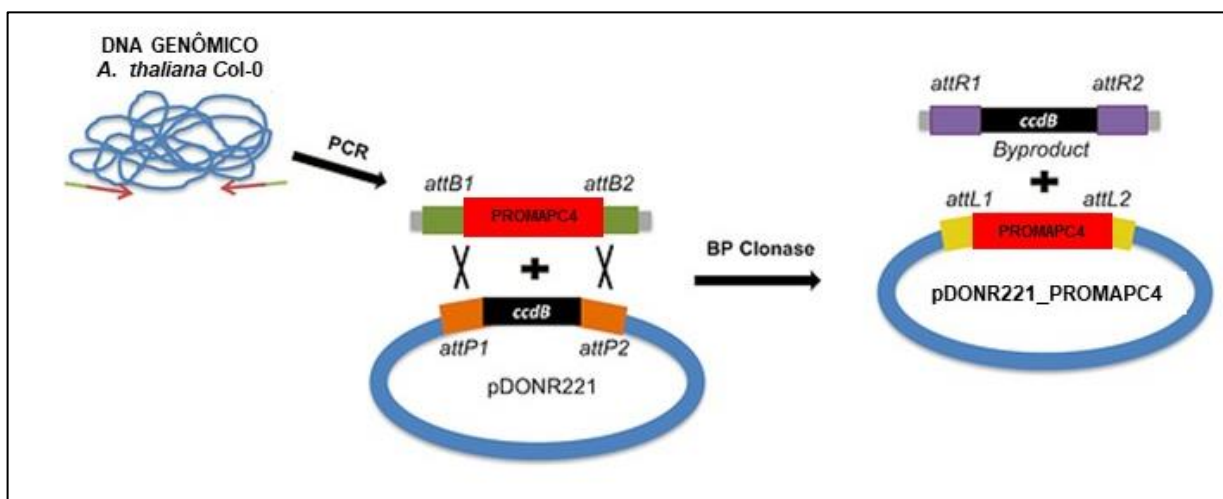


Figura 4: Esquema ilustrativo da reação de recombinação BP, onde o fragmento de interesse PROMAPC4 é inserido por recombinação no vetor de entrada pDONR221. Figura adaptada do site blog.addgene.org.

Para investigar o padrão de expressão do *APC4* no crescimento e desenvolvimento vegetal, a região promotora do gene AT4G21530 correspondente a 1,6 kb anteriores ao códon inicial ATG foi amplificada por PCR utilizando apenas um par de oligos específicos, contendo toda a sequência adaptadora da região de recombinação do vetor pDONR221 (Figura 4 e 5b), sendo utilizado para isto *primers* de aproximadamente 50 nucleotídeos (Tabela 3). O fragmento da região promotora do gene AT4G21530 foi amplificado (Figura 5a) a partir do DNA genômico de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) utilizando tampão CTAB (Doyle & Doyle, 1990; Brasileiro e Carneiro, 1988). A reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) foi realizada utilizando a enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). A reação ocorreu em um termociclador MJ- Research (PTC-100), utilizando as seguintes condições (Tabela 1).

Platinum™ Taq DNA Polymerase HF	μl	Programação PCR termociclador
DNA	5	94°C por 5 min
Tampão 10 X	5	94°C por 1 min
Enhancer 10 X	5	50°C por 30 seg
dNTP 10 mM	1,5	68°C 1 minuto/kb
Primer A 10 mM	2,5	30 repetições a partir do passo 2
Primer B 10 mM	2,5	68°C 5 min
MgSO4 50 mM	1	
Água	26,5	
Platinum (Invitrogen)	1	

Tabela 1. Condições da reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando a enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity da Invitrogen.

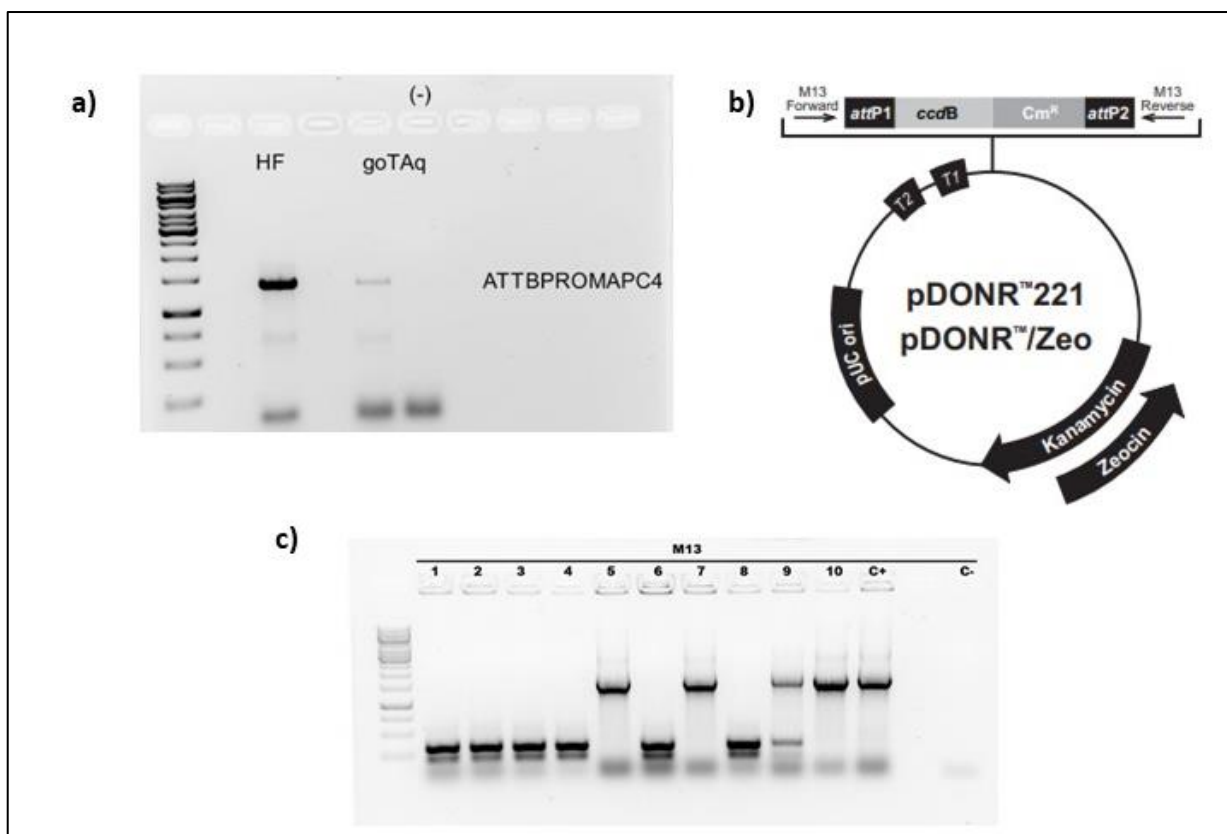


Figura 5: (a) Amplificação da região promotora do gene AT4G21530 correspondente a 1,6 kb anteriores ao códon inicial ATG. (b) Vetor de entrada pDONR221 (Invitrogen) que apresenta o gene que confere resistência à Canamicina (KM) para seleção de bactérias, figura retirada de manual Gateway® pDONR™ Vectors. (c) Confirmação da recombinação PROMAPC4:pDONR221, a partir da amplificação por PCR da sequência M13 do vetor de entrada.

Para confirmar a inserção correta do fragmento correspondente ao promotor do *APC4* no vetor de entrada Gateway, nós utilizamos o sequenciamento Sanger. Após a confirmação, realizamos uma reação LR de clonagem (Figura 11a) para recombinar a construção do vetor de entrada PROMAPC4:pDONR221, e transferir o fragmento PROMAPC4 para o vetor de expressão de plantas, pKGWFS7 (Figura 11b, c), o qual contém o gene repórter GUS-GFP (*β -Glucoronidase and Green Fluorescence Protein*).

Preparação de bactéria eletrocompetentes e eletroporação

Bactérias *E. coli* da cepa DH5 α eletrocompetentes foram preparadas de acordo com protocolo descrito por Ausubel *et al.* (1992). Para a eletroporação, foram usados 40 μ l de bactérias *E. coli* DH5 α eletrocompetentes. A eletroporação foi feita em uma cubeta (de eletroporação de 1,8 KV a 200 Ω e 25 μ F) num eletroporador Biorad como descrito por Ausubel *et al.*, (1992).

Minipreparação de DNA plasmidial

A confirmação de clonagem do inserto PROMAPC4 no vetor de expressão pKGWFS7 (Figura 11d) foi feita a partir de minipreparações de DNA plasmidial utilizando o kit “*QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)*”, conforme as instruções do fabricante. Uma colônia isolada de *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo com a construção de interesse foi inoculada em 5ml de LB líquido com os antibióticos específicos. Para o crescimento das bactérias, o inóculo foi incubado a 37°C sob agitação de 450 rpm por ~16 horas. A cultura foi transferida para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml e centrifugada a 20.000 g por 3 minutos. O meio LB foi descartado e as bactérias precipitadas foram ressuspensas sob agitação em 300 μ L da Solução I (100mM Tris-Cl pH7.5, 10mM EDTA, 400 μ g/ml RNase I). Foram acrescentados 300 μ L da Solução II (1M NaOH, 5,3% SDS), e posteriormente 600 μ L da Solução III (5M KOAc). O lisado foi centrifugado a 20.000 g por 5 minutos e o sobrenadante transferido para uma coluna de purificação acoplada a um tubo coletor de 2 ml. A coluna foi centrifugada à 20.000 g por 30 segundos e o líquido armazenado no tubo coletor foi descartado. Foram adicionados 400 μ L de “*Wash Buffer*” (50mM Tris-EDTA, etanol 80%) na coluna, e esta juntamente com o tubo coletor foram centrifugados a 20.000 g por 1 minuto. A coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga

e 50µl de água Milli-q foram adicionados. A coluna acoplada agora no tubo de 1.5mL foi centrifugada a 20.000 g por 1 minuto. A coluna foi descartada e o plasmídeo purificado permaneceu diluído em 50µL de água Milli-Q.

3.2.2 Obtenção de plantas transgênicas

Floral dip

A transformação genética de plantas foi realizada utilizando o método *Floral Dip* (Clough & Bent, 1998; Zhang et al., 2006). Plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 foram cultivadas diretamente em potes plásticos contendo substrato Jiffy e vermiculita (3:1) por aproximadamente 3 semanas. Após o surgimento dos primeiros pedúnculos florais, estes foram cortados para estimular a produção de mais botões florais. Aproximadamente 10 dias após a poda, as plantas de *Arabidopsis* estavam prontas para o processo de transformação.

Para este processo, uma solução de *Agrobacterium tumefaciens* carregando o plasmídeo PROMAPC4:pKGWFS7 foi preparada. Uma colônia isolada de *A. tumefaciens* foi inoculada em 5ml de meio YEB líquido contendo Estreptomina (Sm), Espectomicina (Sp), Gentamicina (Gen) e Rifampicina (Rif) a 300, 100, 50 e 100 µg/ml, respectivamente, à 28°C em 180 rpm por 48 horas. Após esse período todo o volume do pré-inóculo foi adicionado em 200ml de meio LB líquido (acrescido de Sm e Sp para seleção) e mantido em agitação de 180 rpm a 28°C por 16 horas até atingir OD₆₀₀=0.8. Para finalizar, todo o volume do inóculo foi centrifugado, e o *pellet* foi ressuspenso em 200ml de MS 0,5x líquido contendo 5% de sacarose e 100µl de Silwet L-77.

Assim que finalizada, a solução de imersão foi transferida para um béquer, e os pedúnculos florais foram mergulhados por ~5 segundos e levemente agitadas. Após a imersão, as plantas foram cobertas com plástico filme para manter a umidade e mantidas no escuro até o dia seguinte, quando foram transferidas para a câmara de crescimento *Fitotron*®.

Uma semana após a primeira transformação, as mesmas plantas foram novamente submetidas ao processo descrito acima, com o objetivo de aumentar a eficiência da transformação. As plantas transformadas foram mantidas em câmara de crescimento *Fitotron*® até suas sementes secarem completamente.

Seleção de linhagens transgênicas homozigotas

Após esse período as sementes foram coletadas, armazenadas em tubos de microcentrífuga, secas em estufa à 28°C e mantidas à 4°C. Para seleção das plântulas transgênicas, sementes das plantas transformadas por *floral dip* foram esterilizadas e semeadas em placas de petri 90x15mm em meio seletivo MS 0.5x sólido, suplementado com o antibiótico Canamicina (Km) 50µg/ml. As placas contendo as sementes foram mantidas à 4°C por 2 dias, para quebra de dormência e, após este período mantidas em câmaras de crescimento *Fitotron®* à 22°C com fotoperíodo de 16h de luz e 8h de escuro. Após aproximadamente 10 DAS (*Days After Stratification*) analisamos as possíveis transformantes, e todas as plântulas que se desenvolveram no meio seletivo produzindo folhas verdes e raízes bem estabelecidas foram transferidas para o solo para produção de sementes. Aproximadamente 20 plântulas foram transferidas, e mantidas na terra até a secagem completa de suas sementes. Após a coleta, aproximadamente 120 sementes de cada transformante independente foram esterilizadas, e novamente semeadas em meio seletivo contendo o antibiótico Km 50µg/ml. Depois de 10 DAS contamos o número de plântulas resistentes e sensíveis ao antibiótico Km para o cálculo da segregação. Todas as linhagens que apresentaram segregação mendeliana 3:1 foram transferidas para o solo e mantidas em câmaras *Fitotron®*.

3.2.3 Material vegetal, condições de crescimento e desenvolvimento

Plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0), linhagens homozigotas transgênicas de superexpressão *APC4* (*APC4^{OE}*) e *PROMAPC4:GUS-GFP* foram crescidas em potes plásticos contendo substrato Jiffy e vermiculita (3:1), ou em meio MS 0,5x (Murashige e Skoog., 1962).

Para evitar contaminação durante o cultivo *in vitro*, as sementes de *Arabidopsis* armazenadas à 4 °C foram esterilizadas em tubos de microcentrífuga contendo 1ml de etanol 70% por dois minutos. Após a retirada do etanol, as sementes foram colocadas em uma solução de hipoclorito de sódio 5% e *Tween* a 0,01% por 15 minutos e lavadas cinco vezes em água destilada autoclavada. As sementes esterilizadas foram então semeadas em meio de cultura MS 0,5x sólido com o auxílio de palito de dentes autoclavados.

A quebra da dormência e sincronização do crescimento das linhagens utilizadas neste trabalho foi realizada mantendo as placas (meio de cultura e sementes) à 4°C, por pelo menos dois dias no escuro. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento *Fitotron® SGC 120* a 21°C com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e umidade 60%.

3.2.4 Análise dos níveis de expressão por qRT-PCR das linhagens APC4^{OE}

Extração de RNA total e tratamento com DNase I

Para a confirmação da superexpressão das linhagens APC4^{OE} homozigotas, e análise dos níveis de mRNA dos genes chaves do ciclo celular nestes mutantes, cinco linhagens independentes de APC4^{OE} foram cultivadas *in vitro* e coletadas em diferentes períodos (7 DAS, 10 DAS, 15 DAS e 22 DAS). O material vegetal foi coletado em triplicatas biológicas, e cada amostra continha ~5 plântulas. Após a coleta, as amostras foram rapidamente congeladas e armazenadas em *freezer* - 80°C.

O RNA total foi extraído utilizando o protocolo com Trizol (Invitrogen). Aproximadamente 300mg de material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para tubos de 1,5ml contendo 1ml de Trizol. O material foi misturado por *vortex* durante 1 minuto e centrifugado a 20.000 g por 2 min. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 1 ml de Isopropanol (100%), invertidos gentilmente e mantidos por 20 minutos em temperatura ambiente. Após este período, foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. Foi adicionado ao precipitado 1 ml de etanol 70% gelado preparado com água Ultrapura Estéril (Milli-Q) e centrifugado a 8000 rpm por 5 minutos a 4°C. A solução de etanol foi descartada e o excesso de etanol foi retirado com uma breve centrifugação. O RNA precipitado foi ressuspenso em 30µl de H₂O milli-Q.

Para verificar a integridade e a concentração do RNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel 1% agarose e a leitura em *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific; Wilmington, DE, EUA*). Antes da síntese do DNA complementar (cDNA), os RNAs totais foram tratados com DNase I, para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, cerca de 2 µg do RNA extraído de cada amostra foi tratado com a enzima RQ1 *DNase* (PROMEGA) seguindo as recomendações do fabricante. A enzima

foi utilizada na concentração de 1 Unidade/microlitro (U/ μ L) utilizando 1 U de RQ1 DNase, tampão apropriado e água Milli-Q autoclavada para um volume final de 20 μ l. A reação foi então incubada em banho seco a 37°C por 30 minutos. Para que ocorresse a inativação da enzima foi adicionado as amostras *stop solution*, incubado a 65°C por 10 min e transferido para o gelo imediatamente.

Síntese de primeira fita de cDNA

O RNA total tratado com DNase I foi utilizado na síntese de 1ª fita usando o *kit “SuperScript™ III First-Strand” (Thermo Fisher Scientific)* em reações com volume final de 20 μ l, de acordo com o fabricante. 1 μ g de RNA total contendo 1 μ l de 50 μ M *primer* Oligo(dT)₂₀, 1 μ l de dNTP a 10mM em um volume de 10 μ l foram desnaturados à 65°C por 10 min, e resfriado à 4°C por 5 min. A transcrição reversa foi conduzida em uma reação contendo tampão da enzima 10x *RT Buffer*, e 200U de *Super Script III Reverse Transcriptase*, em um volume final de 20 μ l. A reação de transcrição reversa foi incubada à 50°C por 50 min, seguida à 85°C por 5 min. Após o término da reação, 20U de *RNAse H* foi adicionado, e a reação incubada à 37°C durante 20 min e mantida a 4°C posteriormente. As primeiras fitas foram utilizadas nas reações de qRT-PCR em tempo real.

PCR em tempo real

Nas reações de PCR em tempo real nós utilizamos o *kit “Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG”* da empresa *Invitrogen* conforme as instruções do fabricante (Tabela 2). As reações de amplificação ocorreram em placa de 96 poços (*MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate*, da empresa *Applied Biosystems*) usando o programa padrão do equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* por 2 horas.

MIX qRT PCR	ul
Solução Mix Platinum SYBR™	6,25
H ₂ O Milli-q	3,25
Mix primer*	0,5
V _f	10

Tabela 2: Reações de amplificação conforme instruções do kit “Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG - Invitrogen,”. Para as reações, s primers específicos dos correspondentes genes foram utilizados. Sequência de cada primer está descrito na Tabela 3.

Para cada tratamento/tecido, duas reações foram feitas com oligonucleotídeos específicos para os genes endógenos *Ubiquitina 10 (UBQ10)* e *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)*. Os genes endógenos foram usados como controle positivo, e como genes de referência para normalização da quantidade de cDNA utilizado. *CYCLIN B1;1 (CYCB1;1)*, *CYCLIN DEPENDENT KINASE B2;1(CDKB2;1)*, *CYCLIN D3;1 (CYCD3;1)* e *HISTONE H4 (HIS4)* foram os genes marcadores do ciclo celular analisados, assim como o *APC4*. Para cada experimento, 3 réplicas biológicas, e 2 réplicas técnicas foram analisadas por linhagem (Figura 6).

O valor do ciclo *threshold* (Ct) foi determinado para os genes alvo e endógenos.

	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	
1°	WT a	WT b	WT c	APC4 238 a	APC4 238 b	APC4 238 c	APC4 364 a	APC4 364 b	APC4 364 c	APC4 461 a	APC4 461 b	APC4 461 c	UBI10
2°													GAPDH
1°	APC4 464 a	APC4 464 b	APC4 464 c	WT a	WT b	WT c	APC4 238 a	APC4 238 b	APC4 238 c	APC4 364 a	APC4 364 b	APC4 364 c	APC4
2°													
1°	APC4 461 a	APC4 461 b	APC4 461 c	APC4 464 a	APC4 464 b	APC4 464 c	WT a	WT b	WT c	APC4 238 a	APC4 238 b	APC4 238 c	
2°													
1°	APC4 364 a	APC4 364 b	APC4 364 c	APC4 461 a	APC4 461 b	APC4 461 c	APC4 464 a	APC4 464 b	APC4 464 c	BRANCO	BRANCO	BRANCO	
2°													

Figura 6: Ilustração da placa de reações RT-qPCR. Genes endógenos (UBI10 E GAPDH) usados como controle positivo e referência para normalização da quantidade de cDNA. Gene de interesse APC4. E as 3 réplicas biológicas e 2 réplicas técnicas para cada gene.

A análise da quantificação relativa da expressão dos genes foi analisada pelo método descrito Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) em que: $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001):

$$\frac{CT1 + CT2}{2} = mCTUBI10$$

$$\frac{CT1 + CT2}{2} = mCTGAPDH$$

$$\frac{CT1 + CT2}{2} = mCTgenedeinteresse$$

$$\frac{mCTUBI10 + mCTGAPDH}{2} = mCTendógenos$$

$$\Delta CT = mCTgenedeinteresse - mCTendógenos$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CTlinhagens - \Delta CTCol - 0$$

A normalização da expressão gênica foi feita partir da média de genes endógenos, em todos os dados foram realizados o *test-T de Student*, com nível de significância abaixo de 5%.

Nome	Primers de sequência forward	Primers de sequência reversa
RT-qPCR		
<i>APC4</i>	ACA AAC TGG TGA CCT CGC AT GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CCT TCT TCG TCA	CAG GTT CAC AAT CGA GCC CT GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TGT AAA CCA AAC
PROM_APC4	GAG CTT CT	TCT AAG A
<i>CDKB2;1</i>	AGC ACA CTC AAG AAC TGG CA	TGA GAT TCG TTT CGC TGG CT
<i>CYCB1;1</i>	GTG CAA AGC TGT TGG CGT AT	GAA GCG TTC GTC CTT GGA GT
<i>CYCD3;1</i>	CCT CTC TGT AAT CTC CGA TTC	AAG GAC ACC GAG GAG ATT AG
<i>HIS4</i>	CAG CGA TTC GTC GTC TTG C	TCC ATA GCA GTC ACC GTC TTC
Genes endógenos		
<i>GAPDH</i>	TCC GTG TTC CAA CCG TTG AT CAC ACT CCA CTT GGT CTT GCG	GCC TTG GCA TCG AAA ATG CT TGG TCT TTC CGG TGA GAG TCT
<i>UBI10</i>	T	TCA

Tabela 3: Sequência dos primers utilizados no qRT-PCR.

3.2.5 Análises fenotípicas das linhagens APC4^{OE}

Análise de crescimento das rosetas

Para análise dos fenótipos de crescimento da superexpressão de *APC4*, plantas controle Col-0 e diferentes linhagens de APC4^{OE} foram cultivadas *in vitro* em câmara de crescimento *Fitotron*®, conforme descrito no item 3.2.3. Sementes das linhagens APC4^{OE238}, APC4^{OE438} e Col-0 foram cultivadas lado a lado em placas redondas contendo meio MS 0,5x sólido, e seus cotilédones fotografados aos 3 DAS (Figura 13).

A análise da área dos primórdios foliares foi também realizada utilizando as linhagens APC4^{OE238} e APC4^{OE438} cultivadas em placas comparativas com o controle Col-0 contendo meio MS 05x sólido colocadas verticalmente na câmara de crescimento. As plântulas foram coletadas com 6DAS, e observadas em estereomicroscópio binocular da Leica (Figura 15), a área foliar foi obtida a partir das medidas usando o *software ImageJ*.

Para investigação da área foliar das rosetas no final do período vegetativo, cinco rosetas de cada linhagem (APC4^{OE461}, APC4^{OE364} e Col-0) cultivadas em vasos contendo Jiffy e vermiculita (3:1) foram coletadas aos 20DAS, e suas folhas foram dissecadas, estendidas e alinhadas em placas tipo petri quadradas (245mm X 245mm) contendo agarose 0,8% e fotografadas. A área foliar foi medida a partir das imagens das folhas em série no *software ImageJ* (Figura 16).

Análise de crescimento das raízes

Para acompanhar o crescimento e desenvolvimento da raiz, as linhagens APC4^{OE461}, APC4^{OE364} e controle Col-0 foram cultivadas *in vitro* (item 3.2.3) em placas comparativas, colocadas em posição vertical na câmara de crescimento. A partir de 2DAS as plantas tiveram o crescimento radicular diariamente marcado até atingir 11DAS. As placas contendo as raízes utilizadas para medir o crescimento diário e final foram digitalizadas aos 5DAS e aos 11DAS para registrar o crescimento observado. As imagens foram analisadas utilizando o *software ImageJ* (Figura 17a), e ao menos 18 plantas por linhagem foram usadas (Figura 17b e c).

3.2.6 Cruzamentos

Com a finalidade de observar se a superexpressão do *APC4* interfere na degradação de CYCB1;1 mediada pelo APC/C, nós cruzamos plantas transgênicas carregando a construção do promotor de pCYCB1;1-Dbox:GUS com plantas APC4^{OE}. Cruzamentos entre plantas Col-0 e pCYCB1;1-Dbox:GUS foram usadas como controle. Os cruzamentos foram realizados em ambas as direções (♀ CYCB1;1:D-box-GUS x APC4^{OE} ♂; e ♀APC4^{OE} x CYCB1;1:D-box-GUS ♂) (Sabatini et al., 1999). Ao final do ciclo reprodutivo, as sementes F1 das plantas cruzadas foram coletadas, esterilizadas, semeadas *in vitro* e mantidas em câmara de crescimento, conforme descrito no item 3.2.3.

3.2.7 Ensaio e coloração de GUS

Para visualização da coloração de GUS, 10 plântulas de 4DAS dos cruzamentos do marcador CYCB1;1-D-box com APC4^{OE} e Col-0 em F1 (item 3.2.6) foram coletadas e imersas em acetona por 10 minutos, seguido de imersão em solução GUS (tampão 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-glucuronide (X-Gluc) buffer [100 mM 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (TRIS)-HCl, 50 mM NaCl buffer (pH 7.0), 2 mM K₃[Fe(CN)₆] 4 mM X-Gluc]), e submetidas à vácuo durante 15 minutos, logo em seguida foram incubadas a 37°C de 8h a 16h. Após este período, as plântulas foram clareadas para a remoção da clorofila com etanol 70%, e mantidas em ácido láctico 90% para observação em estereomicroscópio binocular da Leica (Figura 18).

3.3 Resultados

3.3.1 Padrão de expressão do *AtAPC4* em diferentes períodos do desenvolvimento de *Arabidopsis*.

Em *Arabidopsis thaliana* foram caracterizados 3 períodos distintos durante o seu desenvolvimento que abrangem a proliferação celular, expansão celular e o amadurecimento (Beemster et al., 2005). Baseado neste conhecimento, nós investigamos o padrão de expressão de *APC4* ao longo do crescimento, e folhas de plantas Col-0 crescidas *in vitro* foram coletadas aos 7, 15 e 22 DAS para extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão através de RTq-PCR.

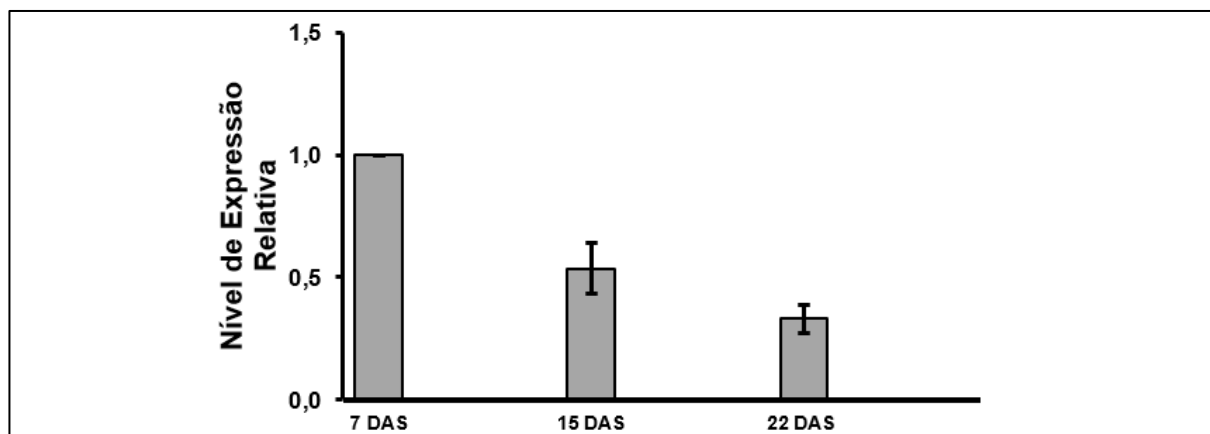


Figura 7. Análise de expressão de *APC4* por RTq-PCR em *Arabidopsis* Col-0 ao longo do desenvolvimento (7, 15 e 22 DAS) utilizando primers na região CDS do gene AT4G21530.1 (*APC4*). O gráfico mostra níveis significativamente menores de mRNA de *APC4* ao longo do desenvolvimento, apresentando maiores níveis nos estágios iniciais do desenvolvimento (~1,0 com 7 DAS) quando comparadas aos demais períodos. Os resultados foram normalizados com os genes endógenos *UBI10* e *GAPDH*. Os dados são a representação da média das triplicatas biológicas e duplicatas técnicas por amostra.

Os resultados apresentados na Figura 7 mostra que nos estágios iniciais do desenvolvimento (7 DAS), os níveis de mRNA de *APC4* estão aumentados, enquanto, nos demais períodos analisados (15 e 22 DAS) estes níveis diminuem significativamente, indicando que seu papel durante o desenvolvimento vegetal é mais expressivo durante o período de proliferação celular.

3.3.2 Obtenção de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando *APC4*.

A proteólise mediada por ubiquitinação é um dos mecanismos chave para a progressão do ciclo celular em todos os organismos, e sendo o *APC/C* um dos

complexos enzimáticos essenciais neste processo, nosso objetivo é compreender o papel individual de cada subunidade durante o desenvolvimento vegetal.

Uma vez que a região codificante (CDS) de todas as subunidades do APC/C em *Arabidopsis* já haviam sido isoladas previamente pelo nosso grupo (Eloy et al., 2006), a estratégia seguinte foi inserir os CDS(s) de cada subunidade do APC/C em vetores binários de superexpressão de plantas controlados pelo promotor 35S, derivado do vírus vegetal *cauliflower mosaic virus* (CaMV), com o objetivo de investigar o efeito do ganho de função durante o desenvolvimento da planta.

A região codificante do produto gênico do *APC4* de *Arabidopsis* (AT4G21530.1) com 2334 pares de bases (pb) foi inserido em vetor gateway pK7WG2 (Figura 8a) para expressão em plantas. A construção resultante 35S:AT4G21530 (Figura 8b e c) foi posteriormente introduzida em *Arabidopsis thaliana* através do método de *floral dip* (Clough & Bent, 1998).

As sementes transformadas foram selecionadas em meio seletivo contendo o antibiótico Canamicina (Km), numa concentração de 50µg/ml. Para obtenção de plantas T3 homozigotas selecionamos apenas as linhagens que apresentaram segregação mendeliana 3:1. Ao final do processo de seleção, cinco linhagens homozigotas independentes foram obtidas: APC4^{OE138}, APC4^{OE43} (indivíduos 4.3.2; 4.3.4 e 4.3.8). APC4^{OE238}, APC4^{OE364} e APC4^{OE46} (indivíduos 4.6.1 e 4.6.4). A obtenção destas linhagens foi realizada no *Flanders Institute of Biotechnology (VIB-Gent)* pela Professora Dra. Nubia Barbosa Eloy.

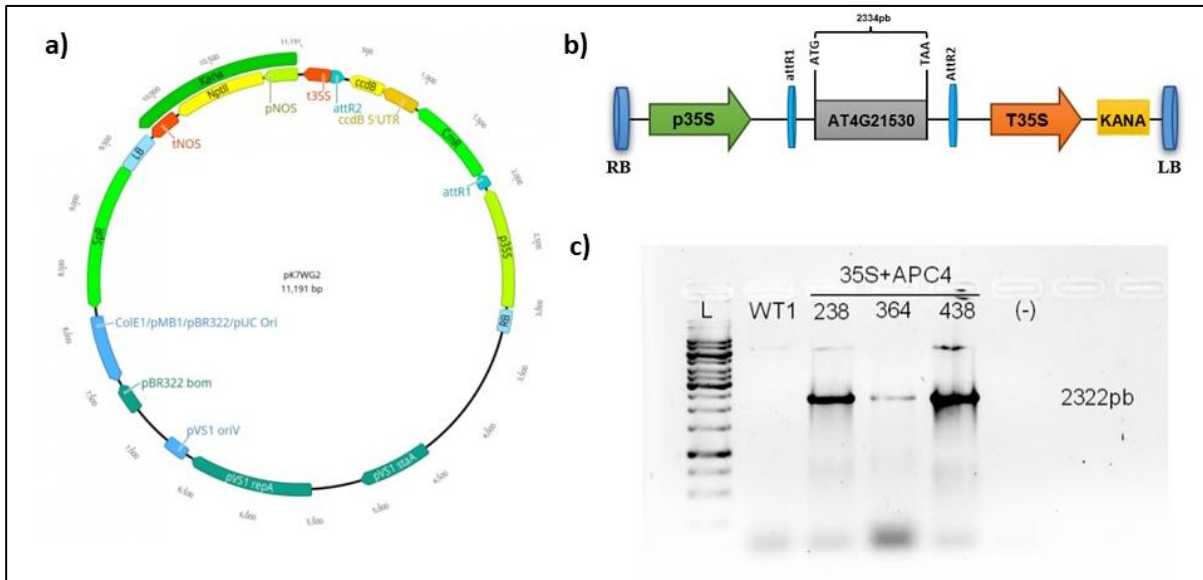


Figura 8. (a) Vetor de expressão pK7WG2 (Karimi et al., 2002). (b) Esquema da sequência genica a partir da inserção do fragmento AT4G21530 no vetor pK7WG2. (c) Confirmação da recombinação 35S:AT4G21530 a partir da amplificação por PCR usando primers 35SF e APC4R.

Como as linhagens transgênicas de $APC4^{OE}$ haviam sido produzidas há um considerável tempo, o primeiro passo após a propagação das sementes foi assegurar que todas as linhagens de $APC4^{OE}$ que estávamos trabalhando eram de fato transformadas, ou seja, possuíam o gene de resistência a Km conferida pelo vetor utilizado. Sendo assim, as cinco linhagens foram crescidas em meio MS sólido 0,5x, com adição de $50\mu\text{g/ml}$ de Km. Após 10 DAS todas as sementes germinaram e cresceram no meio seletivo, confirmando sua resistência ao antibiótico.

3.3.3 Análise dos níveis de expressão de $APC4$ em plantas $APC4^{OE}$

Para investigar os níveis de expressão de $APC4$ (mRNA) nas linhagens homocigotas de $APC4^{OE}$ selecionadas (item 3.3.2), o RNA total e síntese de cDNA das cinco linhagens, e do controle Col-0 foram preparados a partir de plantas cultivadas *in vitro*, e coletadas aos 10 DAS. RTq-PCR foi realizado utilizando um par de *primers* específicos para o $APC4$, e os genes endógenos $UBI10$ e $GAPDH$ (Tabela 3) usados para comparação e normalização dos dados.

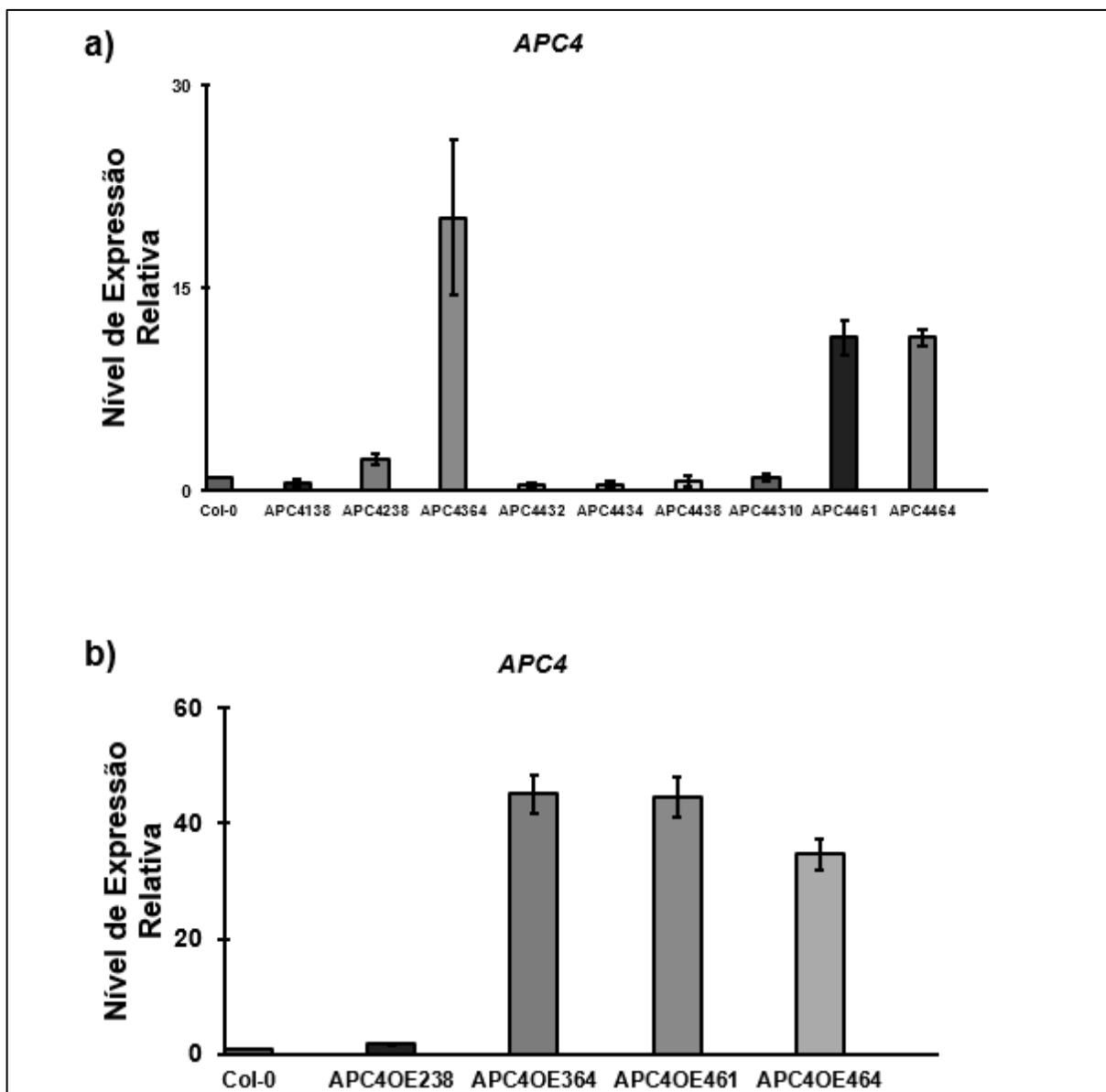


Figura 9. RTq-PCR dos níveis de expressão de APC4 em plantas APC4^{OE} e Col-0 aos 10DAS em diferentes linhagens. Primers específicos da região C-terminal do APC4, e dos genes endógenos UBI10 e GAPDH foram utilizados. O resultado apresentado é a média dos valores das triplicatas biológicas e duplicatas técnicas por linhagem.

Nos gráficos da Figura 9 é possível observar que dentre as cinco linhagens analisadas, apenas três apresentaram níveis de mRNA significativamente maiores que o controle, APC4^{OE238}, APC4^{OE364} e APC4^{OE46} (indivíduos 4.6.1 e 4.6.4), enquanto as linhagens, APC4^{OE138} e APC4^{OE43} (4.3.2, 4.3.4 e 4.3.8) apresentaram níveis semelhantes as plantas Col-0.

Estes resultados revelam que obtivemos de forma eficiente plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas e expressando altos níveis do gene APC4. A

etapa seguinte será verificar uma possível influência destes níveis aumentados no fenótipo das plantas.

3.3.4 Análise do padrão de expressão dos genes marcadores do ciclo celular em plantas $APC4^{OE}$

Para investigar os efeitos da superexpressão de $APC4$ nos genes chaves do ciclo celular, nós analisamos o perfil de acúmulo de mRNA de genes marcadores das fases de transição G2/M e G1/S. Os genes *CYCLIN B1;1* ($CYCB1;1$) e *CYCLIN DEPENDENT KINASE B2;1* ($CDKB2;1$) estão envolvidos no controle da transição

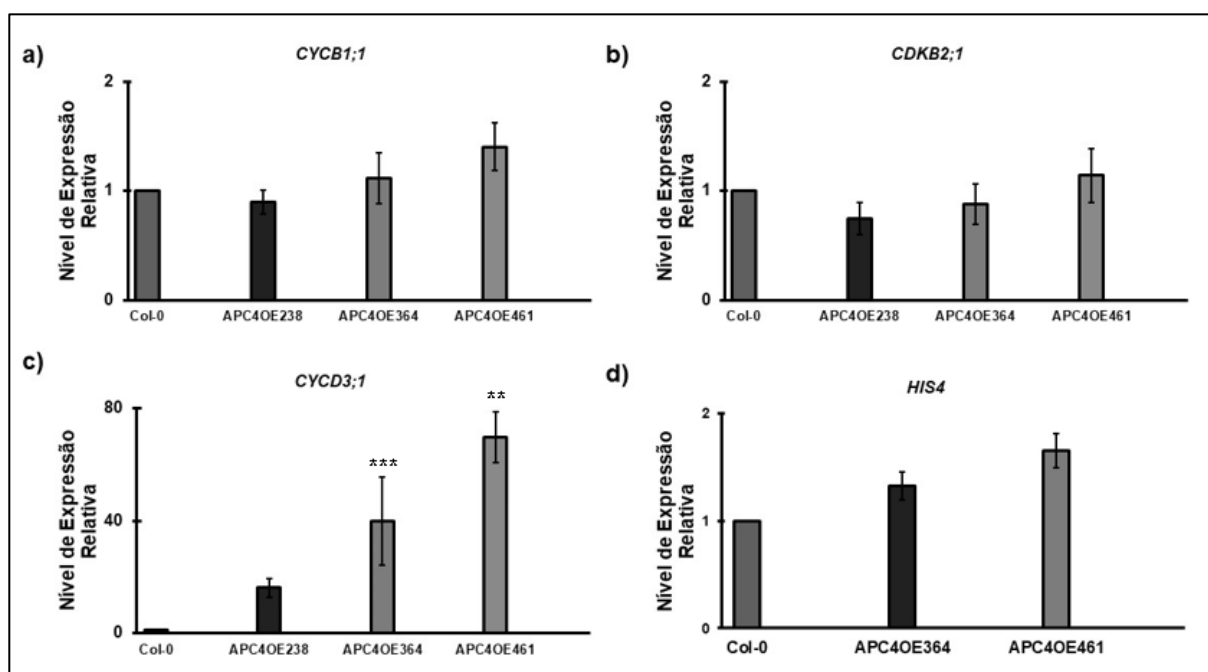


Figura 10. Linhagens independentes de *Arabidopsis* $APC4^{OE}$ e Col-0 foram crescidas em meio MS 0,5x durante 10 DAS para observação do padrão de expressão (mRNA) por RT-qPCR dos marcadores do ciclo celular $CYCB1;1$; $CDKB2;1$; $HIS4$ e $CYCD3;1$. Os níveis de $CYCB1;1$, $CDKB2;1$ e $HIS4$ não demonstraram diferença significativa quando comparados a Col-0, enquanto $CYCD3;1$ teve aumento significativo de expressão nas linhagens $APC4^{OE364}$ e $APC4^{OE461}$ quando comparadas a Col-0. O resultado apresentado é a média dos valores das triplicatas biológicas e duplicatas técnicas por amostra.

G2/M (Hemerly et al., 1992; Segers et al., 1996), enquanto que a *CYCLIN D3;1* ($CYCD3;1$), e *HISTONE H4* ($HIS4$) controlam a transição G1/S (Menges e Murray, 2002; Menges et al., 2003). Plantas $APC4^{OE238}$, $APC4^{OE364}$, $APC4^{OE461}$ e Col-0 foram crescidas *in vitro* e um *pool* de folhas de cada linhagem coletadas aos 10 DAS. O RNA total e a síntese de cDNA foram obtidos com estas amostras para a realização do estudo de expressão através de RT-qPCR. *Primers* específicos para os quatro marcadores foram utilizados no experimento (Tabela 3).

Os resultados ilustrados na Figura 10 indicam que o padrão de expressão dos genes marcadores da transição G2/M (CYCB1;1 e CDKB2;1) são muito semelhantes entre si, com variações muito pequenas em seus níveis de expressão quando comparados ao controle, e não foram observadas diferenças significativas entre as amostras analisadas. Um dado interessante foi que os níveis de mRNA da CYCD3;1 são significativamente mais elevados nas plantas APC4OE em comparação as plantas do tipo selvagem. Além disso, observa-se que a tendência do padrão de acúmulo de HIS4 nas plantas APC4OE é semelhante ao da CYCD3;1, porém, os níveis de acúmulo de HIS4 são consideravelmente menores quando comparados aos da CYCD3;1.

3.3.5 Padrão de expressão do promotor

Para analisar o padrão de expressão do *APC4* nos tecidos de planta, um fragmento de 1.6Kb acima do códon de iniciação ATG do gene AT4G21530 (região promotora) (Figura 5a) foi fusionado ao gene repórter β -glucuronidase (GUS) por meio de um vetor binário de plantas, pKGWFS7 (Figura 11a), e introduzido em plantas de *Arabidopsis* através de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (item 3.2.2).

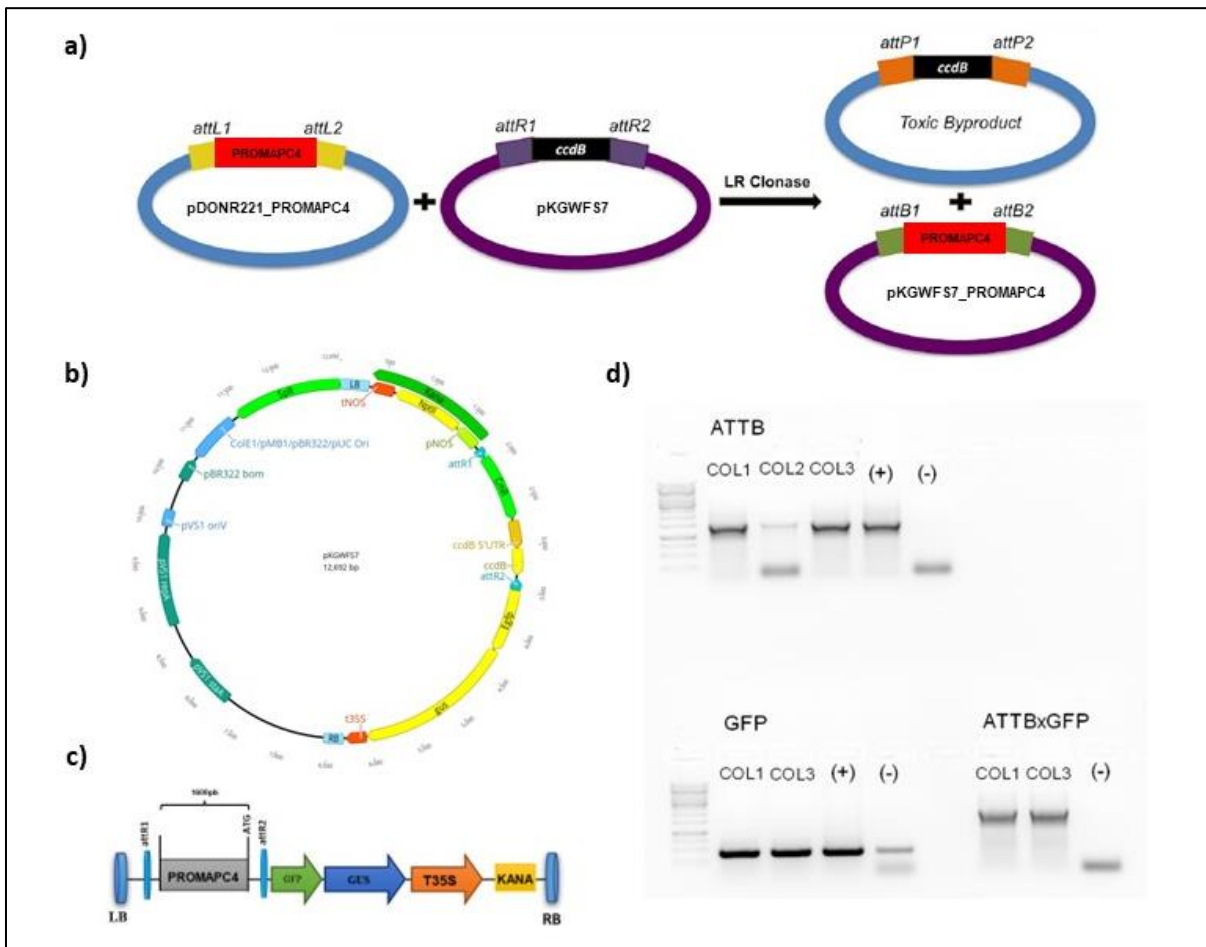


Figura 11: (a) Esquema de reação LR ilustrando a transferência do fragmento de interesse PROMAPC4 para o vetor de expressão pKGWFS7 por recombinação, figura adaptada do site blog.addgene.org. (b) Vetor de expressão pKGWFS7(GUS-GFP) (Karimi et al., 2002) (c) Esquema da sequência genica a partir da inserção do fragmento PROMAPC4 no vetor pKGWFS7. (d) Confirmação da recombinação (PROMAPC4:PKGWFS7) a partir da amplificação por PCR de fragmentos ATTB, GFP e ATTBxGFP em colônias de *E. coli* eletrocompetentes transformadas com a construção PROMAPC4:PKGWFS7.

As sementes provenientes do processo de transformação foram cultivadas em meio seletivo contendo 50 μ g/L de Km para selecionar as plantas transformadas. Quinze transformantes independentes foram selecionados e transferidas ao solo para obter sementes T2, para posterior seleção. Cinco dessas linhagens independentes

apresentaram segregação mendeliana 3:1, e aproximadamente 12 plântulas de cada linhagem foram transferidas para obter linhagens T3 homocigotas. Apesar de termos obtido plantas transgênicas T3 homocigotas, com a provável região promotora do gene *APC4*, nossa construção (PROM_*APC4*-GUS-GFP) não mostrou atividade GUS, demonstrado pela coloração azul no tecido vegetal, quando realizado o ensaio de

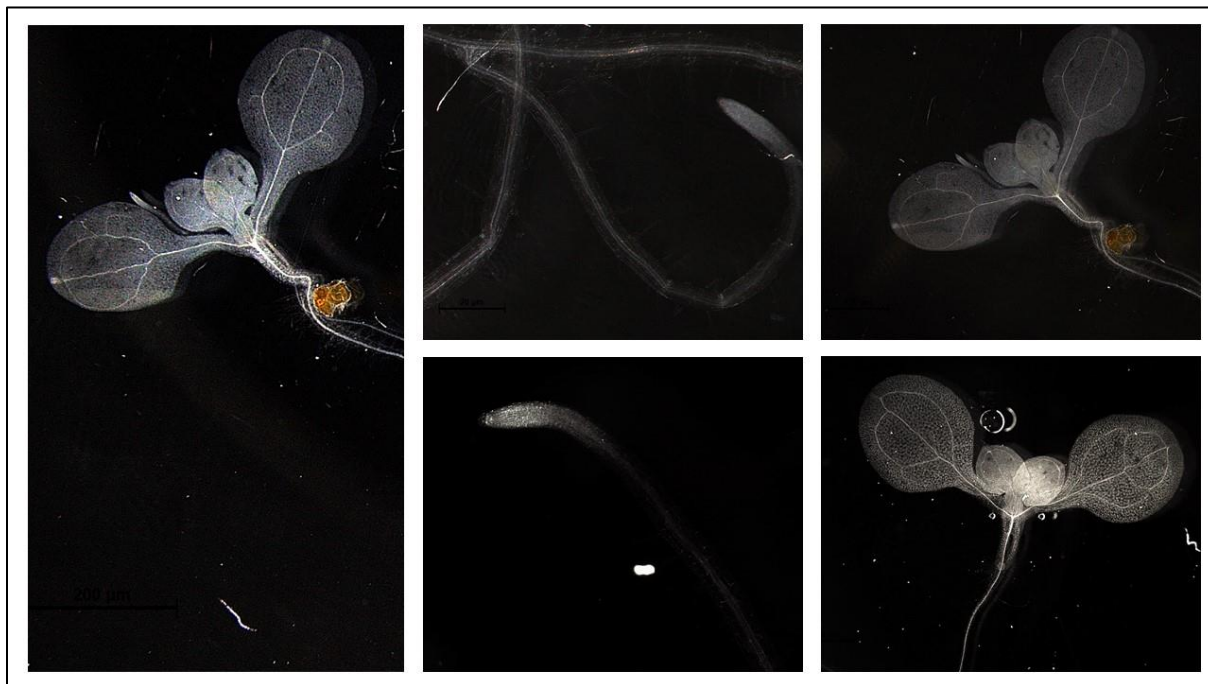


Figura 12: Plantas de linhagens independentes T3 homocigota (PROM_*APC4*-GUS-GFP). O uso do promotor do *APC4* fusionado ao gene repórter GUS não mostrou atividade GUS nas plantas transformadas.

coloração GUS (Figura 12).

3.3.6 Análises fenotípicas

Parte Aérea

Estudos anteriores já descreveram que alterações nos níveis dos genes que compõe o APC/C influenciam no desenvolvimento vegetal (Eloy et al., 2011, 2012; Rojas et al., 2009; Schwedersky et al., 2021). Baseado nestas evidências, nós investigamos se plantas mutantes *APC4*^{OE} apresentavam alterações fenotípicas durante o crescimento.

Plantas APC4^{OE} foram crescidas em diferentes períodos e comparadas com o controle. Duas linhagens independentes, APC4^{OE238} e APC4^{OE438} foram usadas neste experimento. Como podemos observar na Figura 13a, plântulas com 3 DAS cultivadas *in vitro* já apresentavam diferença no tamanho dos cotilédones em ambas as linhagens APC4^{OE} analisadas (Figura 13a e b), e após 4 dias (7 DAS) a parte aérea manteve-se maior que a linhagem controle Col-0 (Figura 14).

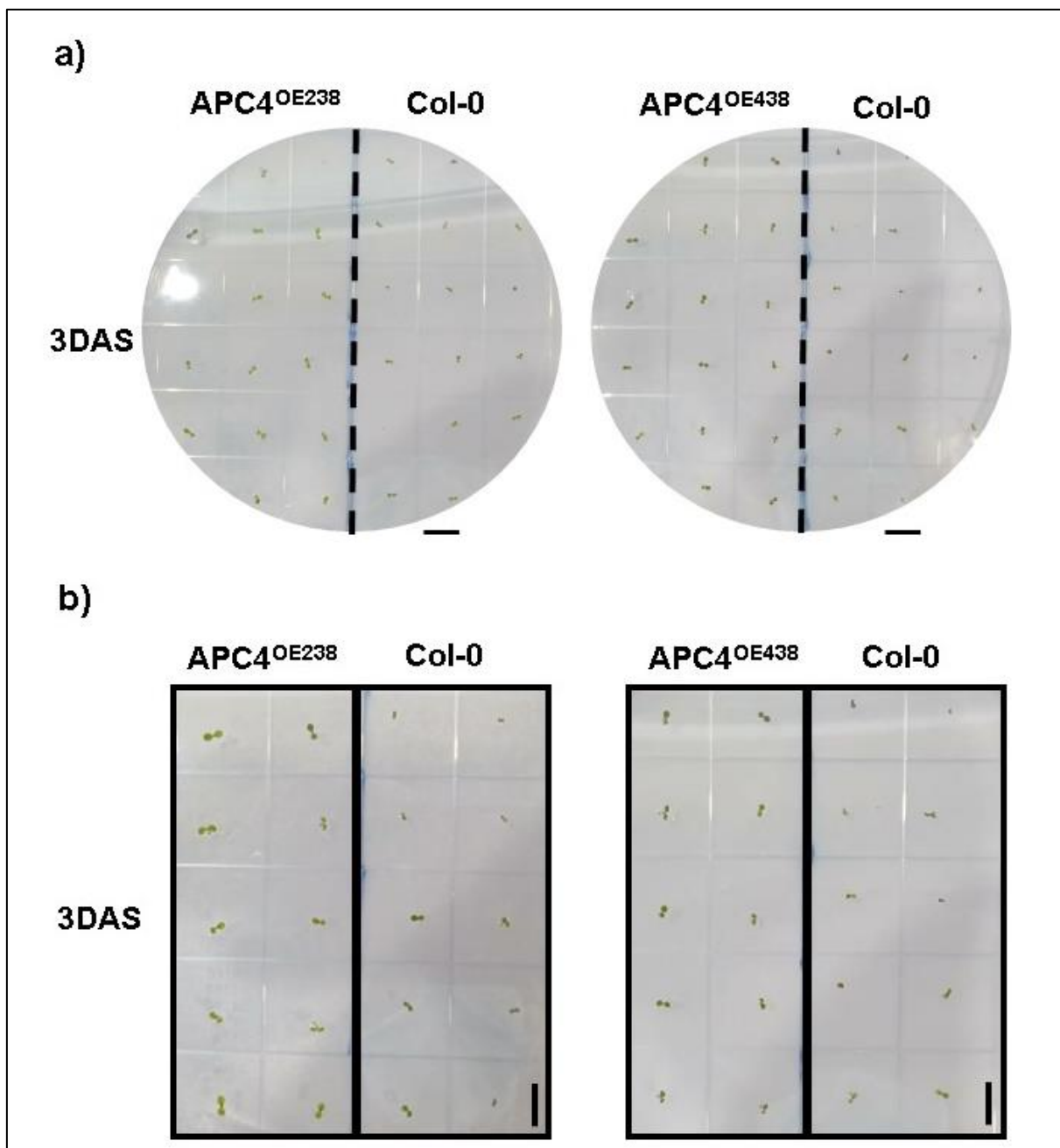


Figura 13: Placa comparativa de crescimento de plantas das linhagens mutantes APC4^{OE238}, APC4^{OE438} e contole Col-0 **(a)** A partir da imagem é possível notar que aos 3 DAS as linhagens de superexpressão apresentavam diferença no tamanho dos cotilédones em comparação ao controle. **(b)** Plantas de *Arabidopsis thaliana* aos 3 DAS em destaque mostrando visível diferença nos tamanhos dos cotilédones nas linhagens mutantes em comparação ao controle.

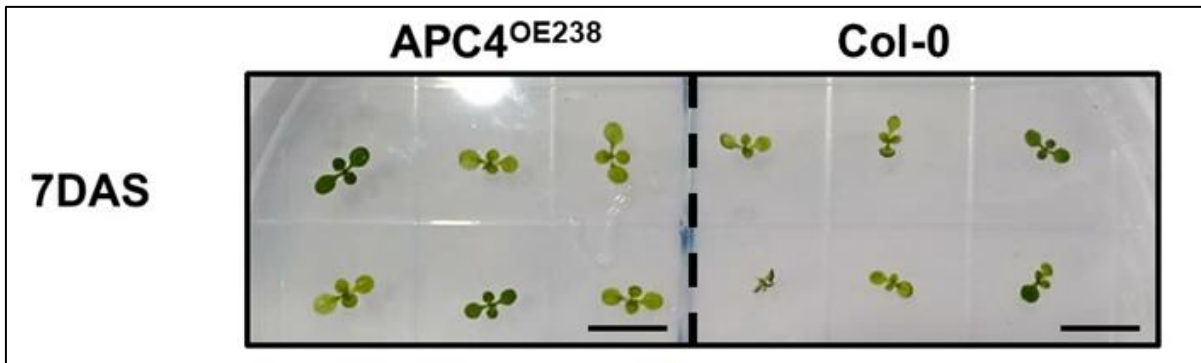


Figura 14. Plantas de *Arabidopsis thaliana* aos 7 DAS. A linhagem APC4^{OE238} apresenta consistente aumento na parte aérea

A partir dessas observações, cultivamos as linhagens APC4^{OE238} e APC4^{OE438} *in vitro*, em placas quadradas (placas comparativas APC^{OE} x Col-0) e posicionadas verticalmente em câmara de crescimento. Aos 6 DAS, os primórdios foliares foram observados em estereomicroscópio binocular da Leica. A área dos primórdios foliares analisadas pelo *software ImageJ* mostraram que comparados ao controle, os primórdios das linhagens mutantes são significativamente maiores, especialmente na linhagem APC4^{OE238} (Figura 15a e b).

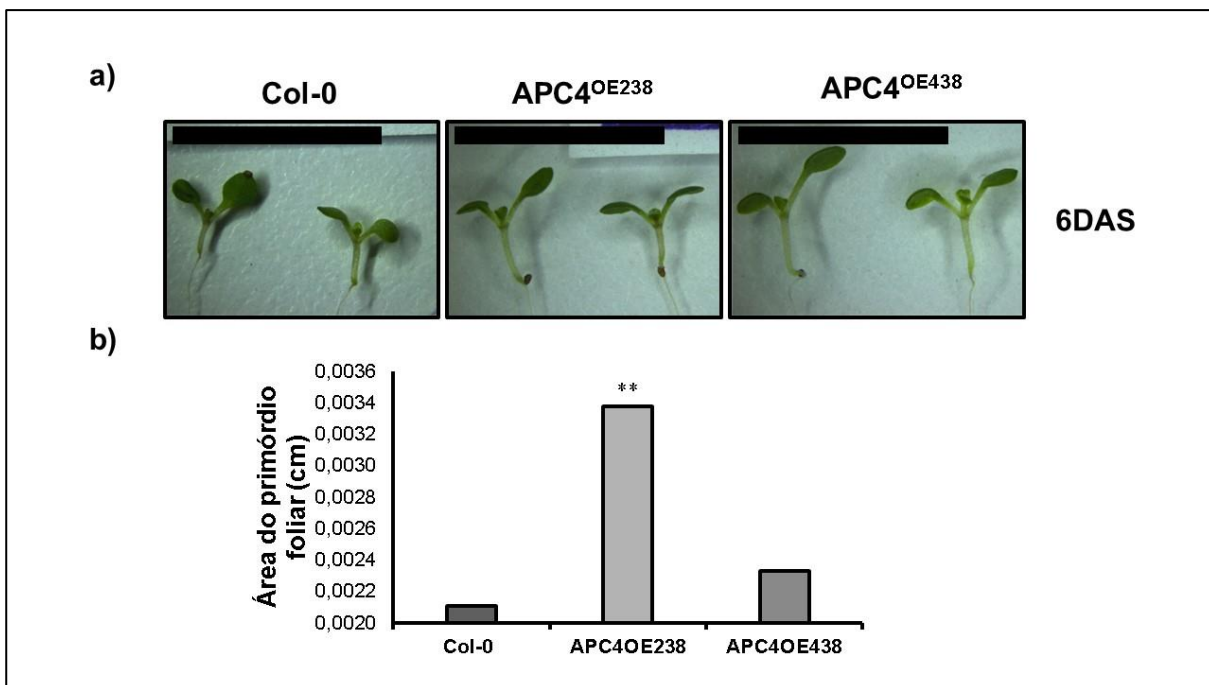


Figura 15: (a) Comparação entre os primórdios foliares dos mutantes APC4^{OE} e Col-0 aos 6 DAS. Plantas de *Arabidopsis* tipo selvagem, e duas linhagens mutantes (APC4^{OE238} e APC4^{OE438}) foram cultivadas *in vitro*, em placas tipo petri redondas e observadas em estereomicroscópio binocular da Leica. **(b)** Área dos primórdios foliares obtidos pelo software ImageJ.

Com o objetivo de constatar se o fenótipo observado nos estágios iniciais do desenvolvimento se manteria ao longo do crescimento vegetativo nas plantas de superexpressão de *APC4*, nós analisamos a área foliar de toda a roseta das linhagens *APC4*^{OE461} e *APC4*^{OE364} comparando-as com o controle. Aos 22 DAS folhas maduras da roseta de ambas as linhagens, e de Col-0 foram medidas e analisadas pelo software *ImageJ*. Na figura 16 podemos notar que neste estágio do desenvolvimento, a partir da folha 3, a linhagem *APC4*^{OE364} apresentou aumento de sua área foliar, e sustentou este fenótipo em todas as folhas da roseta, no entanto, embora a linhagem *APC4*^{OE461} tenha apresentado um aumento em algumas folhas quando comparadas ao controle, este aumento não foi reproduzido em todas as folhas da roseta, como observado na linhagem *APC4*^{OE364}.

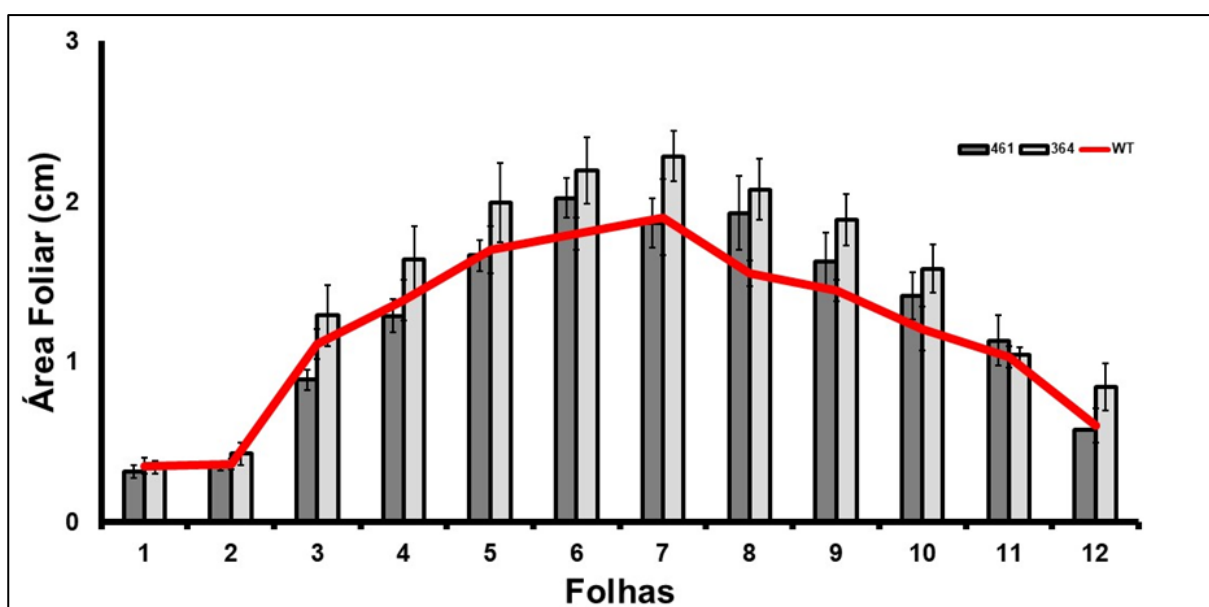


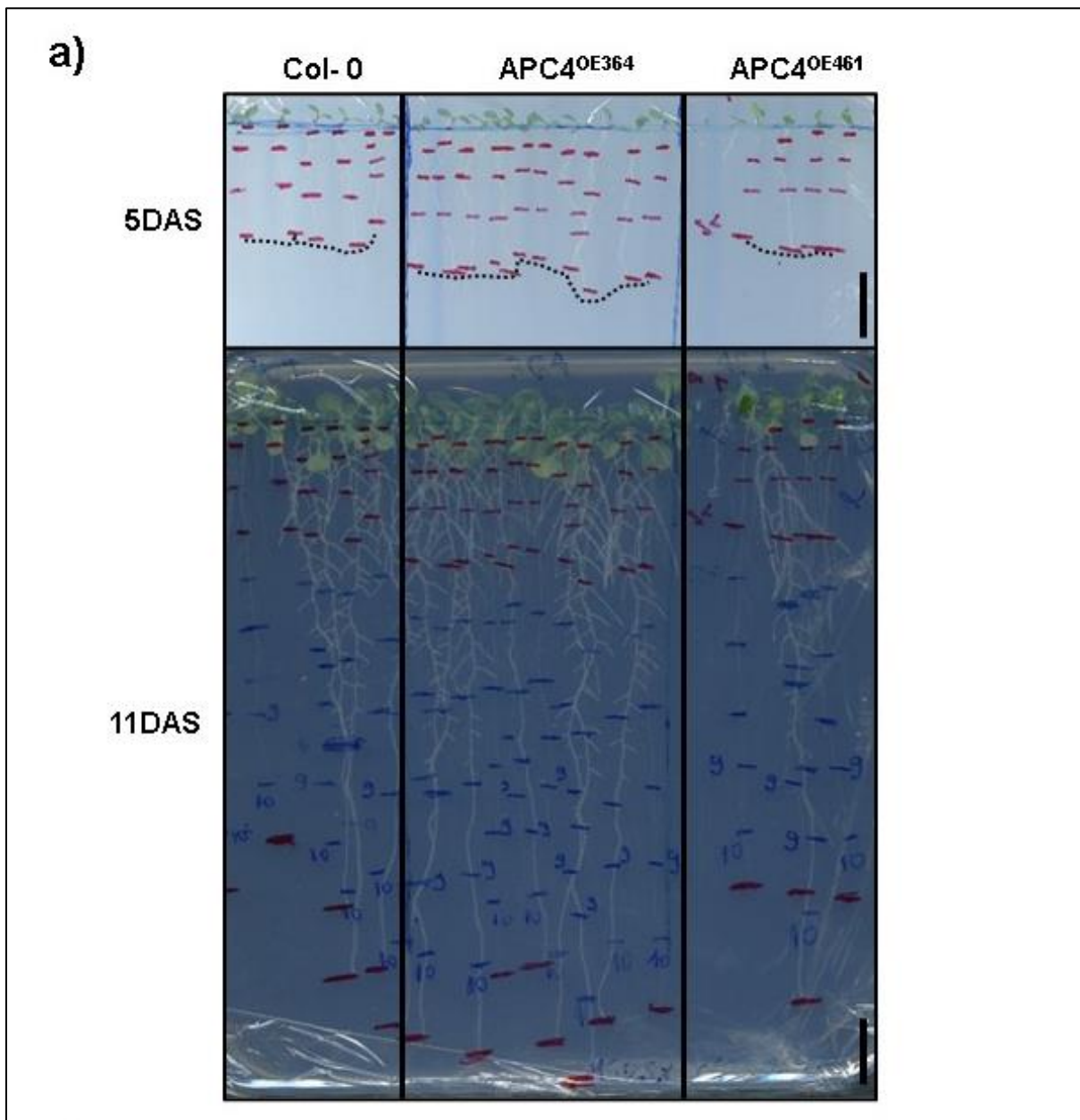
Figura 16 Área foliar das rosetas aos 22 DAS (1 a 12) das linhagens *APC4*^{OE461} e *APC4*^{OE364} comparadas ao controle (5 rosetas por linhagem), medidas pelo software *ImageJ*.

Raiz

Para investigar se a alteração na expressão de *APC4* também afeta o desenvolvimento radicular, o crescimento da raiz principal de plantas *APC4*^{OE461}, *APC4*^{OE364} e Col-0 foi acompanhado ao longo de um período de 11 DAS (Figura 17a). O crescimento da raiz foi acompanhado diariamente com medições que iniciaram aos 2 DAS até aos 11 DAS. A figura 17a mostra uma foto representativa dos primeiros 5 DAS, e no final da medição aos 11 DAS. Na figura 17b e c, os gráficos representam

as medidas do comprimento da raiz em cada dia avaliado. Os dados obtidos revelam que há um aumento significativo no comprimento da raiz principal da linhagem $APC4^{OE364}$ nos primeiros 4 dias de medição (2-5 DAS), entretanto, a linhagem $APC4^{OE461}$ não apresentou diferença em seu padrão de crescimento, exibindo um fenótipo semelhante ao controle (Figura 17a).

O gráfico da Figura 17c também revela que a partir dos 7 DAS, a diferença de comprimento entre as linhagens torna-se menor, mas apesar disso, aos 11 DAS o comprimento final da raiz principal da linhagem $APC4^{OE364}$ ainda é significativamente maior que o controle.



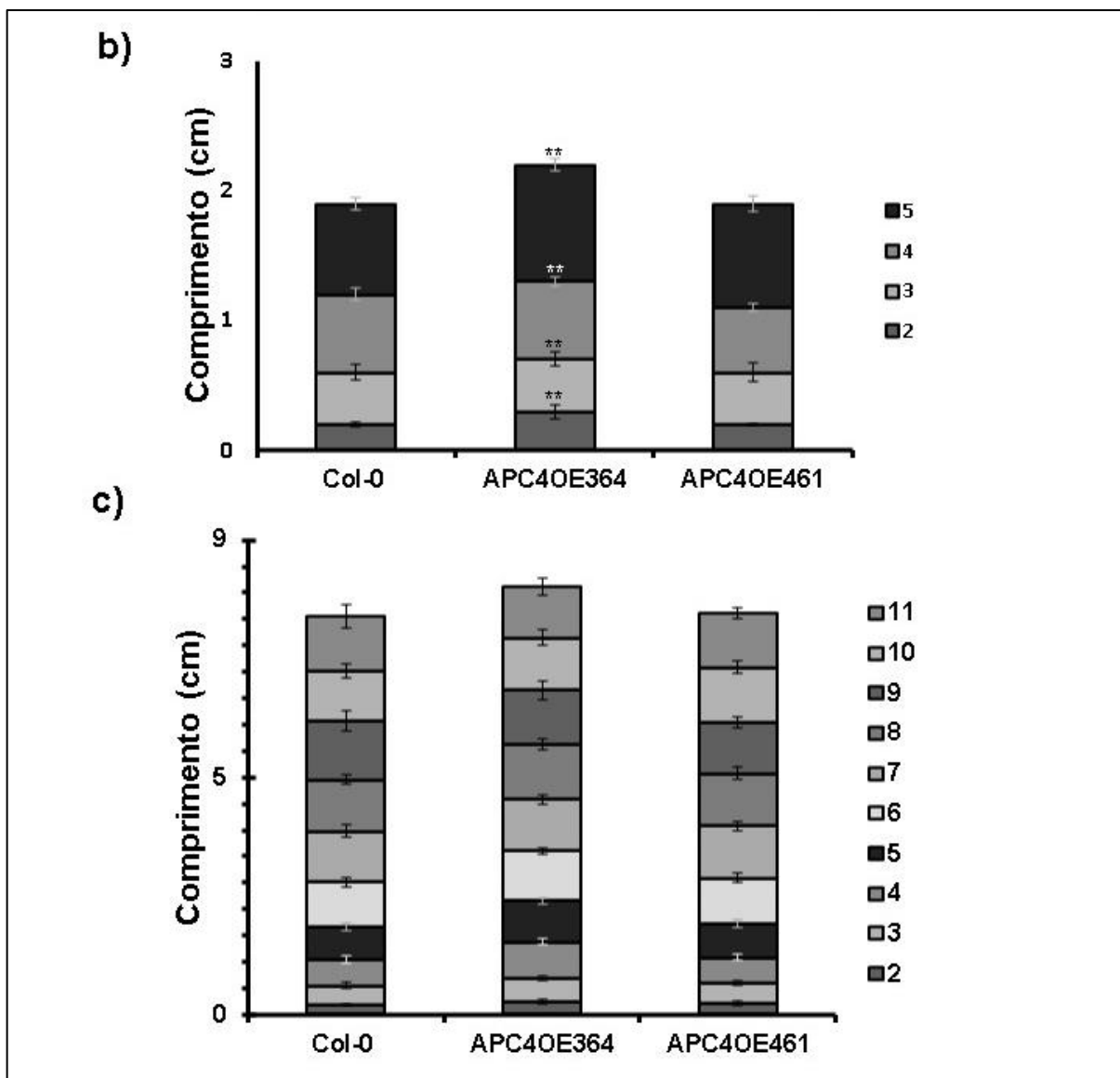


Figura 17 (a) Foto representativa do crescimento das raízes aos 5 DAS (acima) e 11 DAS (abaixo) em placas comparativas entre as linhagens $APC4^{OE364}$, $APC4^{OE461}$ e controle. (b) Gráfico representativo das medidas de aproximadamente 18 plantas por linhagem, utilizando o software ImageJ de raízes aos 5 DAS e (c) 11DAS.

3.3.5 Efeito do aumento da expressão de *APC4* na proteólise da *CYCB1;1*

O APC/C está envolvido na regulação do ciclo celular, especificamente no controle da transição G2/M através da degradação da Ciclina mitótica, *CYCB1;1*, reconhecendo a proteína alvo por meio de um motivo chamado D-box (*Destruction box*). Com a finalidade de observar se a superexpressão de *APC4* interfere na degradação da *CYCB1;1*, nós cruzamos plantas transgênicas carregando a construção do promotor $pCYCB1;1$ -Dbox:GUS com plantas $APC4^{OE}$, e como controle

utilizamos o cruzamento de plantas pCYCB1;1-Dbox:GUS com plantas selvagens Col-0.

A expressão da construção pCYCB1;1-Dbox:GUS nos permite estimar o número de células em G2/M, e a taxa de degradação de CYCB1;1 nos meristemas (Colón-Carmona et al., 1999; Genschik et al., 1998). Para este experimento, os primórdios foliares e raízes de aproximadamente 10 plântulas da geração F1 de cada cruzamento foram coletadas, e observadas após ensaio de GUS em estereomicroscópio binocular da Leica (Figura 18).

Os resultados apresentados na figura 18 revelam que não houve diferença no padrão de degradação da CYCB1;1, explicado pela ausência de diferença de coloração GUS entre os cruzamentos realizados entre plantas transgênicas e o controle.

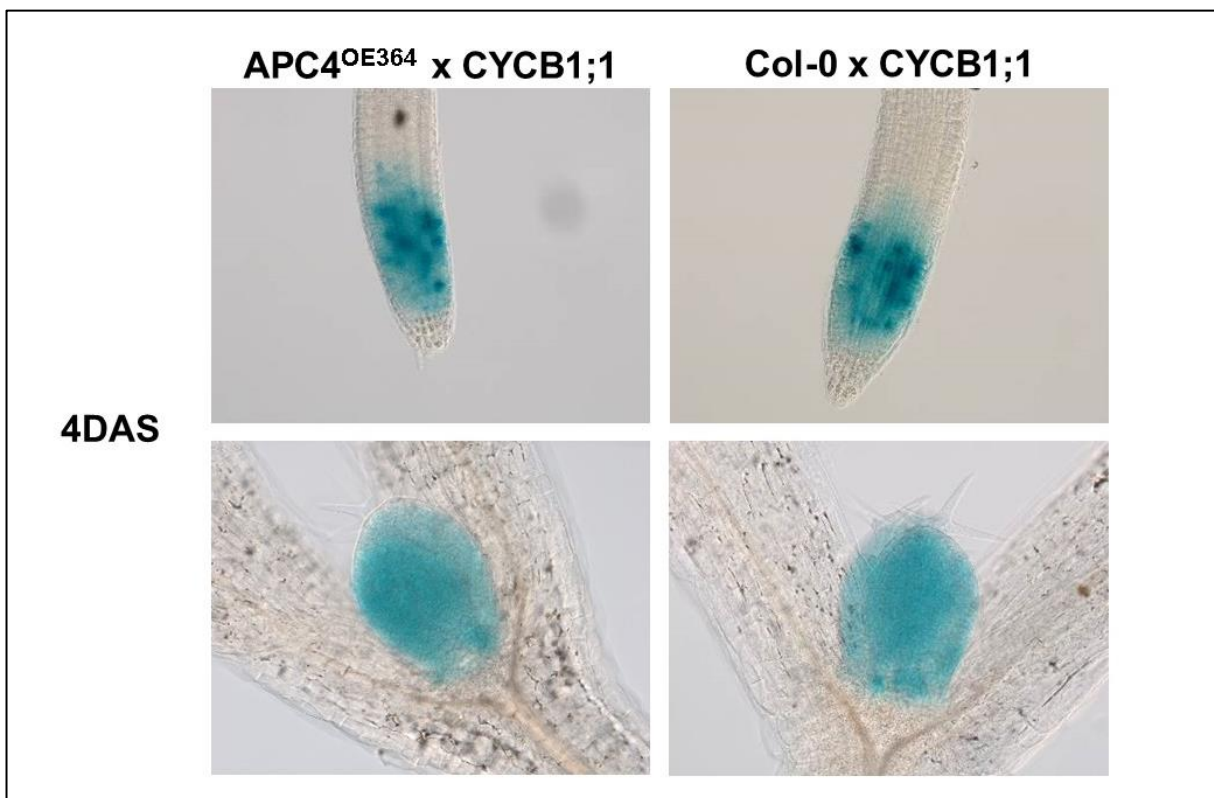


Figura 18 Meristema da raiz e primórdios foliares de 10 plântulas em F1 de APC4^{OE364} e o controle Col-0 (APC4^{OE} x pCYCB1;1-Dbox:GUS e Col-0 x pCYCB1;1-Dbox:GUS) foram analisadas por ensaio histoquímico de GUS.

3.4 Discussão

O APC/C é um complexo enzimático (E3) que regula a progressão do ciclo celular marcando proteínas reguladoras para degradação. Esta máquina enzimática consiste em múltiplas subunidades que desempenham diferentes funções, incluindo o reconhecimento de proteínas-alvo e transferência de ubiquitina para o substrato. Uma vez que a proteólise é um processo irreversível, o APC/C desempenha função essencial no reconhecimento dos alvos a serem degradados. Uma característica intrigante sobre esta E3 ligase é sua quantidade de subunidades, pois, dependendo do organismo pode conter até 16. Dentre as diferentes subunidades, APC1, APC4 e APC5 atuam como proteínas “andaime”, agindo como conectores entre as outras subunidades, e o APC1 servindo como uma plataforma para ambos (van Leuken et al., 2008; Wang et al., 2012, 2013). O processo de identificação e transferência de ubiquitina para as proteínas alvo é realizado pelas subunidades do centro catalítico, que incluem as subunidades APC10 e APC3. Essas proteínas trabalham em conjunto com os cofatores CDC20 e CCS52/CDH1 reconhecendo o substrato, enquanto APC2 e APC11 realizam a ubiquitinação dos substratos. Para entender a função de cada subunidade durante o desenvolvimento vegetal, neste trabalho, nós investigamos o papel da subunidade 4 (*AtAPC4*) no crescimento e desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana*, através da criação de plantas de superexpressão dirigida pelo promotor constitutivo CaMV 35S.

Existem três etapas distintas no desenvolvimento de *Arabidopsis*: proliferação, expansão e amadurecimento (Beemster et al., 2005). Com a finalidade de investigar em qual fase o *APC4* estaria mais expresso, nós medimos seus níveis de expressão ao longo do desenvolvimento, folhas de *Arabidopsis* tipo selvagem Columbia-0 (Col-0) cultivadas *in vitro* foram coletadas aos 7, 15 e 22 DAS, e analisadas por RTq-PCR. A figura 7 mostra que os níveis de mRNA de *APC4* estão aumentados no início do desenvolvimento (7 DAS), e diminuem significativamente nos períodos posteriores (15 e 22 DAS), indicando um papel importante durante a proliferação celular. Corroborando com este dado, estudos do padrão de expressão do promotor do APC10 revelaram que a medida que o desenvolvimento foliar progredia, a expressão diminuía gradativamente (Eloy et al., 2011). Estudos prévios do padrão de expressão da proteína de fusão APC4-GUS transformadas nos mutantes *apc4/+*, mostraram que

nas linhagens transgênicas homocigotas T2, nas quais os fenótipos APC4 foram resgatados e usados para análise da atividade GUS, mostraram que em plântulas de 10 dias forte atividade GUS foi identificada em tecidos com divisão celular ativa, tais como o meristema apical, ponta da raiz, e primórdios da raiz lateral. Intensa expressão também foi detectada nos tecidos reprodutivos, incluindo pistilos, óvulos e fracamente no pólen maduro. Durante a embriogênese, a expressão foi observada em óvulos fertilizados, e nos embriões em desenvolvimento até chegar ao estágio de maturidade (Wang et al., 2012). Infelizmente, em nosso estudo utilizando o promotor do APC4 fusionado ao gene repórter GUS (PROMAPC4-GUS), nenhuma atividade GUS foi encontrada nas plantas transformadas, apesar de obtermos plantas T3 homocigotas com segregação 3:1, e com transformação confirmada através da resistência ao antibiótico Canamicina, e presença da construção através de PCR. Acreditamos que este resultado é devido ao fato que em nosso trabalho utilizamos um fragmento de 1,6 Kb antecedente ao códon de início ATG do gene AT4G21530, enquanto no estudo de Wang e colaboradores, 2012, eles utilizaram um fragmento de DNA genômico correspondente ao CDS completo, junto com a região promotora. Provavelmente existem regiões reguladoras da expressão dentro do CDS do APC4, que não estão presentes na região promotora.

O CDS do APC4 (AT4G21530.1) foi inserido no vetor gateway pK7WG2, e introduzido em *Arabidopsis* com o objetivo de obter plantas transformadas superexpressando o gene. Cinco linhagens T3 homocigotas independentes foram obtidas, APC4^{OE138}, APC4^{OE238}, APC4^{OE364}, APC4^{OE43}, APC4^{OE46}, e confirmadas após cultivo em meio sólido com adição de Canamicina, apresentando resistência ao antibiótico. Os gráficos da Figura 9 mostram que apenas três linhagens (APC4^{OE238}, APC4^{OE364} e APC4^{OE46}), entre as cinco analisadas apresentaram níveis significativamente maiores de mRNA de APC4 comparado ao controle Col-0, enquanto as linhagens APC4^{OE138} e APC4^{OE43} exibiram níveis de expressão semelhantes a Col-0. Estes resultados confirmam que plantas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *AtAPC4* foram obtidas com sucesso, e expressam níveis elevados do gene Figura 9

Para avaliar o impacto dos níveis elevados de APC4 (35S::APC4) no desenvolvimento das plantas, uma análise comparativa do crescimento entre os

transgênicos $APC4^{OE238}$, $APC4^{OE438}$ e o controle Col-0 foi realizada. Aos 3 DAS, as linhagens de superexpressão de $APC4$ apresentaram visível aumento no tamanho dos cotilédones em comparação ao controle Figura 13a e a linhagem $APC4^{OE238}$ sustentou este fenótipo também aos 7 DAS Figura 14. Análise dos primórdios foliares das plantas $APC4^{OE238}$ e $APC4^{OE438}$ exibiram aumento de seus primórdios em comparação ao controle Figura 15, entretanto, apenas as plantas $APC4^{OE238}$ apresentaram área significativamente maior que o controle. Prosseguindo com as análises fenóticas da parte aérea de plantas $APC4^{OE}$, nós medimos a área foliar aos 22 DAS (folhas 1 a 12) em outras duas linhagens de superexpressão, $APC4^{OE461}$ e $APC4^{OE364}$. Os resultados mostraram que a linhagem $APC4^{OE364}$ teve aumento significativo da área foliar comparado ao controle, enquanto a linhagem $APC4^{OE461}$ apresentou aumento de área apenas em algumas folhas da roseta Figura 16.

Corroborando com nossos dados, a superexpressão do *AtAPC10* em tabaco produziu plantas mais altas e com folhas maiores, devido ao aumento do número de células. Cruzamentos entre a superexpressão *AtAPC10* e *AtAPC3a* (*CDC27a*) resultou em plantas T1 com fenótipo de crescimento aumentado em comparação com as superexpressões das subunidades isoladamente (De Freitas Lima et al., 2013). Em *Arabidopsis*, a superexpressão do *APC10* resultou em folhas maiores, devido ao aumento na taxa de divisão celular (Eloy et al., 2011). Em contrapartida, plantas RNAi de *Arabidopsis* dos genes *APC6* e *APC10* apresentaram folhas de tamanho reduzido, e inflorescências mais curtas (Marrocco et al., 2009), e a perda de função do *APC13* resultou em plantas anãs, devido ao término precoce do crescimento da parte aérea (Saze & Kakutani, 2007). Além disso, em arroz, mutantes *APC6 knockdown* apresentaram fenótipo de nanismo e sementes menores (Kumar et al., 2010).

Nós também investigamos o efeito da alteração na expressão de $APC4$ durante o desenvolvimento radicular. O crescimento da raiz principal das plantas $APC4^{OE364}$, $APC4^{OE461}$ e Col-0 foi analisado ao longo de 11 dias, e os dados coletados mostraram um aumento significativo no comprimento da raiz principal na linhagem $APC4^{OE364}$ durante os primeiros 4 dias de medição, entretanto, a linhagem $APC4^{OE461}$ não mostrou diferença em seu padrão de crescimento comparado ao controle. Apesar da diferença do comprimento radicular tornar-se menor a partir dos 7 DAS, a raiz principal da linhagem $APC4^{OE364}$ foi significativamente maior que o controle Figura 17.

Estudos sobre o efeito da diminuição da expressão de *APC6* em *Medicago* resultou em plantas com crescimento deficiente da raiz principal e menos raízes laterais (Kuppusamy et al., 2009). Já a perda de função de *SAMBA*, um regulador do APC/C, resultou em folhas, raízes e sementes maiores (Eloy et al., 2012). Diversos estudos sobre a alteração na expressão das diferentes subunidades do APC/C mostraram um impacto significativo no desenvolvimento vegetal, tanto da raiz quanto da parte aérea, exibindo uma ampla variedade de fenótipos (Eloy et al., 2015).

Análise do perfil de expressão dos principais genes marcadores do ciclo celular: *CYCB1;1*, *CDKB2;1*, *CYCD3;1* e *HIS4*, através de RT-qPCR nas plantas *APC4^{OE}*, mostraram que não houve diferença significativa no padrão de expressão dos genes *CYCB1;1* e *CDKB2;1*, marcadores da fase G2/M. Todavia, um dado muito interessante foi observado em relação aos níveis de mRNA de *CYCD3;1*. Plantas *APC4^{OE}* apresentaram níveis muito elevados do transcrito de *CYCD3;1*, sugerindo uma possível influência de *APC4* no aumento dos níveis de ciclinas da fase S. Além disso, o acúmulo de *HIS4* seguiu um padrão semelhante ao da *CYCD3;1*, porém com níveis menores (Figura 10). Estes dados, apesar de interessantes precisam ser investigados cuidadosamente, e confirmados com outros experimentos, para entendermos qual o papel do *APC4* na fase S do ciclo celular.

Com o objetivo de investigar se a superexpressão de *APC4* altera a degradação de proteínas mediada por APC/C, nós verificamos os níveis da proteína reguladora da transição G2/M, *CYCB1;1*. Plantas *APC4^{OE}* e Col-0 foram cruzadas com plantas carregando a construção do promotor p*CYCB1;1*-Dbox:GUS, possibilitando monitorar a atividade mitótica nos meristemas. Plantas F1 foram submetidas ao ensaio de GUS, e os resultados mostraram que não houve diferença na degradação da *CYCB1;1*, em relação ao controle Figura 12, indicando que a superexpressão de *APC4* não afeta a degradação desta ciclina mitótica, sendo necessário a investigação de outras ciclinas.

3.5 Conclusão

Com base nos resultados é possível concluir que a superexpressão do gene *APC4* em plantas de *Arabidopsis* pode ter um efeito positivo em seu crescimento e desenvolvimento. Além disso, os resultados sugerem que o *APC4* pode influenciar os níveis de ciclinas da fase S, conforme indicado pelo perfil de expressão da *CYCD3;1*.

No entanto, não observamos efeito da perturbação do APC4 na degradação da proteína reguladora da transição G2/M, CYCB1;1. No geral, os resultados fornecem indicações importantes sobre a função do gene *APC4* em plantas e podem ter implicações práticas para a produção agrícola e controle do crescimento vegetal

Referências

- Ausubel, Frederick M. et al. Short protocols in molecular biology. New York, v. 275, p. 28764-28773, 1992.
- Nurse P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*. 256: 547-51. <https://doi.org/10.1038/256547a0>
- Alfieri, C., Zhang, S., & Barford, D. (2017). Visualizing the complex functions and mechanisms of the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C). *Open Biology*, 7(11). <https://doi.org/10.1098/rsob.170204>
- Barford, D. (2020). Structural interconversions of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) regulate cell cycle transitions. *Current Opinion in Structural Biology*, 61, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.11.010>
- Beemster, G. T. S., De Veylder, L., Vercruyse, S., West, G., Rombaut, D., Van Hummelen, P., Galichet, A., Gruissem, W., Inzé, D., & Vuylsteke, M. (2005). Genome-wide analysis of gene expression profiles associated with cell cycle transitions in growing organs of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 138(2), 734–743. <https://doi.org/10.1104/pp.104.053884>
- Bertoli, C., Skotheim, J. M., & De Bruin, R. A. M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), 518–528. <https://doi.org/10.1038/nrm3629>
- BRASILEIRO, A.C.M. CARNEIRO, V. T. C. (1988). Manual de transformação genética de plantas. *EmbrapaSPI/Embrapa-Cenargen*.
- Capron, A., Serralbo, O., Fülöp, K., Frugier, F., Parmentier, Y., Dong, A., Lecureuil, A., Guerche, P., Kondorosi, E., Scheres, B., & Genschik, P. (2003). The Arabidopsis Anaphase-Promoting Complex or Cyclosome: Molecular and Genetic

- Characterization of the APC2 Subunit. *Plant Cell*, 15(10), 2370–2382.
<https://doi.org/10.1105/tpc.013847>
- Chang, L., Zhang, Z., Yang, J., McLaughlin, S. H., & Barford, D. (2014). Molecular architecture and mechanism of the anaphase-promoting complex. *Nature*, 513(7518), 388–393. <https://doi.org/10.1038/nature13543>
- Cheeseman, I. M. (2020). Review. *Figure 2*, 259–271.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.09.029>
- Ciechanover, A. H. and A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 425–479. <https://doi.org/10.1038/458421a>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16(6), 735–743.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x>
- COLÓN-CARMONA, A. et al. (1999). *The Plant Journal - 2003 - Col n-Carmona - Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin GUS fusion.pdf*.
- Cronin, N. B., Yang, J., Zhang, Z., & Kulkarni, K. (2015). Atomic-Resolution Structures of the APC / C Subunits Apc4 and the Apc5 N-Terminal Domain. *Journal of Molecular Biology*, 427(20), 3300–3315.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.08.023>
- Cronin, N. B., Yang, J., Zhang, Z., Kulkarni, K., Chang, L., Yamano, H., & Barford, D. (2015). Atomic-Resolution Structures of the APC/C Subunits Apc4 and the Apc5 N-Terminal Domain. *Journal of Molecular Biology*, 427(20), 3300–3315.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.08.023>
- D'Andrea, L. D., & Regan, L. (2003). TPR proteins: The versatile helix. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(12), 655–662.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.10.007>
- De Freitas Lima, M., Eloy, N. B., Bottino, M. C., Hemerly, A. S., & Ferreira, P. C. G. (2013). Overexpression of the anaphase-promoting complex (APC) genes in *Nicotiana tabacum* promotes increasing biomass accumulation. *Molecular Biology*

- Reports*, 40(12), 7093–7102. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2832-8>
- Eloy, Nubia B., de Freitas Lima, M., Ferreira, P. C. G., & Inzé, D. (2015). The Role of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome in Plant Growth. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(5), 487–505. <https://doi.org/10.1080/07352689.2015.1078613>
- Eloy, Nubia B., De Freitas Lima, M., Van Damme, D., Vanhaeren, H., Gonzalez, N., De Milde, L., Hemerly, A. S., Beemster, G. T. S., Inzé, D., & Ferreira, P. C. G. (2011). The APC/C subunit 10 plays an essential role in cell proliferation during leaf development. *Plant Journal*, 68(2), 351–363. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04691.x>
- Eloy, Nubia B., Gonzalez, N., Van Leene, J., Maleux, K., Vanhaeren, H., De Milde, L., Dhondt, S., Vercruyssen, L., Witters, E., Mercier, R., Cromer, L., Beemster, G. T. S., Remaut, H., Van Montagu, M. C. E., De Jaeger, G., Ferreira, P. C. G., & Inzé, D. (2012). SAMBA, a plant-specific anaphase-promoting complex/cyclosome regulator is involved in early development and A-type cyclin stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), 13853–13858. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211418109>
- Eloy, Nubia Barbosa, Coppens, F., Beemster, G. T. S., Hemerly, A. S., & Ferreira, P. C. G. (2006). The Arabidopsis Anaphase Promoting Complex (APC): Regulation through subunit availability in plant tissues. *Cell Cycle*, 5(17), 1957–1965. <https://doi.org/10.4161/cc.5.17.3125>
- Furuta, T., Tuck, S., Kirchner, J., Koch, B., Auty, R., Kitagawa, R., Rose, A. M., & Greenstein, D. (2000). EMB-30: An APC4 homologue required for metaphase-to-anaphase transitions during meiosis and mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell*, 11(4), 1401–1419. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.4.1401>
- Genschik, P., Criqui, M. C., Parmentier, Y., Derevier, A., & Fleck, J. (1998). Cell cycle-dependent proteolysis in plants: Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132. *Plant Cell*, 10(12), 2063–2075. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.12.2063>

- Glotzer, M., Murray, A. W., & Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, *349*(6305), 132–138. <https://doi.org/10.1038/349132a0>
- Gmachl, M., Gieffers, C., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., & Peters, J. M. (2000). The RING-H2 finger protein APC11 and the E2 enzyme UBC4 are sufficient to ubiquitinate substrates of the anaphase-promoting complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(16), 8973–8978. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8973>
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D. H., Niall, H. D., & Boyse, E. A. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*(1), 11–15. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.1.11>
- Gong, P. et al. (2021). *SAMBA controls the rate of cell division in maize development through APC/C interaction.*
- Grossberger, R., Gieffers, C., Zachariae, W., Podtelejnikov, A. V., Schleiffer, A., Nasmyth, K., Mann, M., & Peters, J. M. (1999). Characterization of the DOC1/APC10 subunit of the yeast and the human anaphase-promoting complex. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(20), 14500–14507. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.20.14500>
- Guo, L., Jiang, L., Zhang, Y., Lu, X. L., Xie, Q., Weijers, D., & Liu, C. M. (2016). The anaphase-promoting complex initiates zygote division in Arabidopsis through degradation of cyclin B1. *Plant Journal*, *86*(2), 161–174. <https://doi.org/10.1111/tpj.13158>
- Harashima, H., Dissmeyer, N., & Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in Cell Biology*, *23*(7), 345–356. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.03.002>
- Hartley, J. L., Temple, G. F., & Brasch, M. A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*, *10*(11), 1788–1795. <https://doi.org/10.1101/gr.143000>

- Hartwell, L. H., Culotti, J., Pringle, J. R., & Reid, B. J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science*, *183*(4120), 46–51. <https://doi.org/10.1126/science.183.4120.46>
- Hemerly, A., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Inzé, D., & Ferreira, P. (1992). Genes regulating the plant cell cycle: Isolation of a mitotic-like cyclin from *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(8), 3295–3299. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3295>
- Hershko, A., Ganoth, D., Pehrson, J., Palazzo, R. E., & Cohen, L. H. (1991). Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(25), 16376–16379. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)55308-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)55308-4)
- Heyman, J., & De Veylder, L. (2012). The anaphase-promoting complex/cyclosome in control of plant development. *Molecular Plant*, *5*(6), 1182–1194. <https://doi.org/10.1093/mp/sss094>
- Inzé, D., & De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics*, *40*, 77–105. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090431>
- Inzé, D., Gutiérrez, C., & Chua, N. H. (1999). Trends in plant cell cycle research. *Plant Cell*, *11*(6), 991–994. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.6.991>
- Imniger, S., Piatti, S., Michaelis, C., & Nasmyth, K. (1995). Genes involved in sister chromatid separation are needed for b-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell*, *81*(2), 269–277. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90337-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90337-2)
- Jørgensen, P. M., Gräslund, S., Betz, R., Ståhl, S., Larsson, C., & Höög, C. (2001). Characterisation of the human APC1, the largest subunit of the anaphase-promoting complex. *Gene*, *262*(1–2), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00511-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00511-4)
- Jun, S. E., Okushima, Y., Nam, J., Umeda, M., & Kim, G. T. (2013). Kip-related protein 3 is required for control of endoreduplication in the shoot apical meristem and leaves of *Arabidopsis*. *Molecules and Cells*, *35*(1), 47–53.

<https://doi.org/10.1007/s10059-013-2270-4>

- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant.pdf. *TRENDS in Plant Science*, 7(5), 193–195. file:///C:/Users/Risa/Downloads/1-s2.0-S1360138502022513-main.pdf
- King, R. W., Glotzer, M., & Kirschner, M. W. (1996). Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Molecular Biology of the Cell*, 7(9), 1343–1357. <https://doi.org/10.1091/mbc.7.9.1343>
- King, R. W., Peters, J. M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., & Kirschner, M. W. (1995). A 20s complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell*, 81(2), 279–288. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90338-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90338-0)
- Kleiger, G., & Mayor, T. (2014). Perilous journey: A tour of the ubiquitin-proteasome system. *Trends in Cell Biology*, 24(6), 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.12.003>
- Kumar, M., Basha, P. O., Puri, A., Rajpurohit, D., Randhawa, G. S., Sharma, T. R., & Dhaliwal, H. S. (2010). A candidate gene OsAPC6 of anaphase-promoting complex of rice identified through T-DNA insertion. *Functional and Integrative Genomics*, 10(3), 349–358. <https://doi.org/10.1007/s10142-009-0155-6>
- Kuppusamy, K. T., Ivashuta, S., Bucciarelli, B., Vance, C. P., Gantt, J. S., & Vandenbosch, K. A. (2009). Knockdown of CELL DIVISION CYCLE16 reveals an inverse relationship between lateral root and nodule numbers and a link to auxin in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 151(3), 1155–1166. <https://doi.org/10.1104/pp.109.143024>
- Lammens, T., Boudolf, V., Kheibarshekan, L., Zalmas, L. P., Gaamouche, T., Maes, S., Vanstraelen, M., Kondorosi, E., La Thangue, N. B., Govaerts, W., Inzé, D., & De Veylder, L. (2008). Atypical E2F activity restrains APC/CCCS52A2 function obligatory for endocycle onset. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14721–14726.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0806510105>

- Lim, S., & Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation. *Development (Cambridge)*, *140*(15), 3079–3093. <https://doi.org/10.1242/dev.091744>
- Lima, M. de F., Eloy, N. B., Pegoraro, C., Sagit, R., Rojas, C., Bretz, T., Vargas, L., Elofsson, A., de Oliveira, A. C., Hemerly, A. S., & Ferreira, P. C. (2010a). Genomic evolution and complexity of the Anaphase-promoting Complex (APC) in land plants. *BMC Plant Biology*, *10*(1), 254. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-254>
- Lima, M. de F., Eloy, N. B., Pegoraro, C., Sagit, R., Rojas, C., Bretz, T., Vargas, L., Elofsson, A., de Oliveira, A., Hemerly, A. S., & Ferreira, P. C. (2010b). Genomic evolution and complexity of the Anaphase-promoting Complex (APC) in land plants. *BMC Plant Biology*, *10*(1), 254. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-254>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Malumbres, M. (2014). *Characterization of in vitro and in vivo metabolism of AG-024322, a novel cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor*. 1–10.
- Marrocco, K., Thomann, A., Parmentier, Y., Genschik, P., & Criqui, M. C. (2009). The APC/C E3 ligase remains active in most post-mitotic Arabidopsis cells and is required for proper vasculature development and organization. *Development*, *136*(9), 1475–1485. <https://doi.org/10.1242/dev.035535>
- Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *23*(1), 74–88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
- Melo, F. V., Oliveira, M. M., Saibo, N. J. M., & Lourenço, T. F. (2021). Modulation of Abiotic Stress Responses in Rice by E3-Ubiquitin Ligases: A Promising Way to Develop Stress-Tolerant Crops. *Frontiers in Plant Science*, *12*(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.640193>

- Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W., & Murray, J. A. H. (2003). Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension. *Plant Molecular Biology*, 53(4), 423–442. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000019059.56489.ca>
- Menges, M., & James, A. H. M. (2002). *Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity* (p. 203±212).
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 474–497.
- Muratani, M., & Tansey, W. P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(3), 192–201. <https://doi.org/10.1038/nrm1049>
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., & Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *Journal of Biosciences*, 31(1), 137–155. <https://doi.org/10.1007/BF02705243>
- Ohi, M. D., Feoktistova, A., Ren, L., Yip, C., Cheng, Y., Chen, J. S., Yoon, H. J., Wall, J. S., Huang, Z., Penczek, P. A., Gould, K. L., & Walz, T. (2007). Structural Organization of the Anaphase-Promoting Complex Bound to the Mitotic Activator Slp1. *Molecular Cell*, 28(5), 871–885. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.003>
- Osaka, F., Seino, H., Seno, T., & Yamao, F. (1997). A ubiquitin-conjugating enzyme in fission yeast that is essential for the onset of anaphase in mitosis. *Molecular and Cellular Biology*, 17(6), 3388–3397. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.6.3388>
- Pickart, C. M., & Cohen, R. E. (2004). Proteasomes and their kin: Proteases in the machine age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(3), 177–187. <https://doi.org/10.1038/nrm1336>
- Pidoux, A. L., & Allshire, R. C. (2000). Centromeres: Getting a grip of chromosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(3), 308–319. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00094-6)
- Purayil, F. T., Sudalaimuthuasari, N., Li, L., Aljneibi, R., Mohammed, A., Al, K., David,

- N., Kottackal, M., Alzaabi, M., Balan, J., Kurup, S. S., Hazzouri, K. M., & Amiri, K. M. A. (2022). *Transcriptome Profiling and Functional Validation of RING-Type E3 Ligases in Halophyte Sesuvium verrucosum under Salinity Stress*.
- Ravid, T., & Hochstrasser, M. (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(9), 679–689. <https://doi.org/10.1038/nrm2468>
- Rojas, C. A., Eloy, N. B., De Freitas Lima, M., Rodrigues, R. L., Franco, L. O., Himanen, K., Beemster, G. T. S., Hemerly, A. S., & Ferreira, P. C. G. (2009). Overexpression of the Arabidopsis anaphase promoting complex subunit CDC27a increases growth rate and organ size. *Plant Molecular Biology*, 71(3), 307–318. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9525-7>
- Roos-Mattjus, P., & Sistonen, L. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway. *Annals of Medicine*, 36(4), 285–295. <https://doi.org/10.1080/07853890310016324>
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., & Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*, 99(5), 463–472. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81535-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81535-4)
- Saleme, M. de L. S., Andrade, I. R., & Eloy, N. B. (2021). The Role of Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) in Plant Reproduction. *Frontiers in Plant Science*, 12(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.642934>
- Satyanarayana, A., & Kaldis, P. (2009). *Mammalian cell-cycle regulation : several Cdks , numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms Mammalian cell-cycle regulation : several Cdks , numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms*. 28(33), 2925–2939. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.170>
- Saze, H., & Kakutani, T. (2007). Heritable epigenetic mutation of a transposon-flanked Arabidopsis gene due to lack of the chromatin-remodeling factor DDM1. *EMBO Journal*, 26(15), 3641–3652. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601788>
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., Chen, H., & Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. *The Plant Cell*, 18,

1121–1133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001829>

Schwedersky, R. P., Saleme, M. de L. S., Rocha, I. A., Montessoro, P. da F., Hemerly, A. S., Eloy, N. B., & Ferreira, P. C. G. (2021). The Anaphase Promoting Complex/Cyclosome Subunit 11 and Its Role in Organ Size and Plant Development. *Frontiers in Plant Science*, 12(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.563760>

Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M. D., & Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell*, 79(2), 233–244. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90193-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90193-7)

Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Development*, 13(12), 1501–1512. <https://doi.org/10.1101/gad.13.12.1501>

Shu, K., & Yang, W. (2017). E3 ubiquitin ligases: Ubiquitous actors in plant development and abiotic stress responses. *Plant and Cell Physiology*, 58(9), 1461–1476. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx071>

Skaar, J. R., & Pagano, M. (2009). Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), 816–824. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.08.004>

Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F. C., Ruderman, J. V., & Hershko, A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Molecular Biology of the Cell*, 6(2), 185–198. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.2.185>

Swaffer, M. P., Jones, A. W., Flynn, H. R., Snijders, A. P., & Nurse, P. (2016). CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the Cell Cycle. *Cell*, 167(7), 1750–1761.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.034>

Tang, Z., Li, B., Bharadwaj, R., Zhu, H., Özkan, E., Hakala, K., Deisenhofer, J., & Yu, H. (2001). APC2 cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. *Molecular Biology of*

- the Cell*, 12(12), 3839–3851. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.12.3839>
- Thornton, B. R., & Toczyski, D. P. (2006). Precise destruction: An emerging picture of the APC. *Genes and Development*, 20(22), 3069–3078. <https://doi.org/10.1101/gad.1478306>
- Tran, K., Kamil, J. P., Coen, D. M., & Spector, D. H. (2010). Inactivation and Disassembly of the Anaphase-Promoting Complex during Human Cytomegalovirus Infection Is Associated with Degradation of the APC5 and APC4 Subunits and Does Not Require UL97-Mediated Phosphorylation of Cdh1. *Journal of Virology*, 84(20), 10832–10843. <https://doi.org/10.1128/jvi.01260-10>
- van Leuken, R., Clijsters, L., & Wolthuis, R. (2008). To cell cycle, swing the APC/C. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1786(1), 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.05.002>
- Venuto, S., & Merla, G. (2019). E3 ubiquitin ligase TRIM proteins, cell cycle and mitosis. *Cells*, 8(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/cells8050510>
- Vierstra, R. D. (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(6), 385–397. <https://doi.org/10.1038/nrm2688>
- Wade Harper, J., Burton, J. L., & Solomon, M. J. (2002). The anaphase-promoting complex: It's not just for mitosis any more. *Genes and Development*, 16(17), 2179–2206. <https://doi.org/10.1101/gad.1013102>
- Wang, Y., Hou, Y., Gu, H., Kang, D., Chen, Z. L., Liu, J., & Qu, L. J. (2013). The Arabidopsis Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Subunit 1 is Critical for Both Female Gametogenesis and Embryogenesis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(1), 64–74. <https://doi.org/10.1111/jipb.12018>
- Wang, Y., Hou, Y., Gu, H., Kang, D., Chen, Z., Liu, J., & Qu, L. J. (2012). The Arabidopsis APC4 subunit of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is critical for both female gametogenesis and embryogenesis. *Plant Journal*, 69(2), 227–240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04785.x>

- Xu, F. Q., & Xue, H. W. (2019). The ubiquitin-proteasome system in plant responses to environments. *Plant Cell and Environment*, 42(10), 2931–2944. <https://doi.org/10.1111/pce.13633>
- Yamashita, Y. M., Nakaseko, Y., Kumada, K., Nakagawa, T., & Yanagida, M. (1999). Fission yeast APC/cyclosome subunits, Cut20/Apc4 and Cut23/Apc8, in regulating metaphase-anaphase progression and cellular stress responses. *Genes to Cells*, 4(8), 445–463. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1999.00274.x>
- Zachariae, W. et al . (1996). *Identification of Subunits of the Anaphase-Promoting Complex of Saccharomyces cerevisiae*.
- Zachariae, Wolfgang, & Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: Cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes and Development*, 13(16), 2039–2058. <https://doi.org/10.1101/gad.13.16.2039>
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 1(2), 641–646. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>

4. O PAPEL DA SUBUNIDADE 11 DO COMPLEXO PROMOTOR DA ANÁFASE NO TAMANHO DE ÓRGÃOS E NO DESENVOLVIMENTO VEGETAL.

Resumo

O Complexo Promotor da Anáfase/Ciclossomo (APC/C), membro da família das E3s ubiquitina-ligases, desempenha papel fundamental no reconhecimento de substratos a serem ubiquitinados. A progressão da anáfase e, portanto, do ciclo celular, é coordenado por ciclos de degradação de ciclina dependentes de proteólise promovido pelo APC/C. A atividade APC/C depende da formação de um “pocket” formado pelas subunidades catalíticas, APC2, APC11 e APC10. Entre eles, o papel do APC11 fora do ciclo de divisão celular é pouco compreendido. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar a função do APC11 durante o desenvolvimento vegetal, caracterizando linhagens mutantes *apc11* “knock-down”. Nossas análises mostraram diminuição da expressão de *APC11* nas linhagens mutantes, seguido por redução no tamanho do meristema da raiz com base no comprimento das células do córtex, além de diminuição do tamanho geral da planta ao longo do desenvolvimento. Ainda, cruzamentos de *apc11-1* e *amiR-apc11* com plantas carregando o marcador fluorescente WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5 (WOX5) mostrou uma diminuição das células positivas para GFP (Green Fluorescent Protein) no Centro Quiescente. Além disso, mutantes *apc11-1* apresentam menor área foliar, em consequência da diminuição da área celular, observado através de análise cinemática. Finalmente, observamos uma diminuição da atividade de APC/C nos meristemas da raiz e apical através de cruzamentos do marcador pCYCB1;1:D-box-GUS com plantas *apc11-1*. Nossos resultados indicam que o APC11 é importante nos estágios iniciais do desenvolvimento, mediando a arquitetura meristemática através da atividade APC/C, afetando o crescimento total da planta.

Palavras Chave: Desenvolvimento vegetal, ciclo celular, Complexo Promotor da Anáfase (APC), tamanho do órgão, células meristemáticas

Abstract

The anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C), a member of the E3 ubiquitin ligase family, plays an important role in recognizing the substrates to be ubiquitylated. Progression of anaphase, and therefore, of the cell cycle, is coordinated through cyclin degradation cycles dependent on proteolysis triggered by APC/C. The APC/C activity depends on the formation of a pocket comprising the catalytic subunits, APC2, APC11, and APC10. Among these, the role of APC11 outside the cell division cycle is poorly understood. Therefore, the goal of this work was to analyze the function of APC11 during plant development by characterizing *apc11* knock-down mutant lines. Accordingly, we observed decreased *apc11* expression in the mutant lines, followed by a reduction in meristem root size based on the cortical cell length, and an overall size diminishment throughout the development. Additionally, crosses of *apc11-1* and *amiR-apc11* with plants carrying a WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5 (WOX5) fluorescent marker showed a weakening of the green fluorescent protein-positive cells in the Quiescent Center. Moreover, plants with *apc11-1* show a decreased leaf area,

together with a decrease in the cell area when the shoot development was observed by kinematics analysis. Finally, we observed a decreased APC/C activity in the root and shoot meristems in crosses of pCYCB1;1:D-box-GUS with *apc11-1* plants. Our results indicate that APC11 is important in the early stages of development, mediating meristematic architecture through APC/C activity affecting the overall plant growth.

Keywords: plant development, cell cycle, anaphase promoting complex (APC), organ size, meristem cells

4.1 Nota de esclarecimento sobre o capítulo 4

Este capítulo descreve os experimentos realizados por mim, assim como os resultados obtidos que contribuíram para a publicação deste trabalho na revista *Frontiers in Plant Science*, na qual sou co-autora. “*The APC/C subunit 11 and its role in organ size and plant development*”. Schwedersky, R.P, Saleme, M.L.S., Andrade, L., Montessoro, P.F., Hemerly, A.S., Eloy, N.B.* , Ferreira, P.C.G.

Portanto, neste capítulo estará apenas descrito a metodologia e os resultados em português referentes a minha contribuição para o manuscrito. Para maiores informações, o artigo completo pode ser consultado na seção “anexos”, no final desta dissertação.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Linhagens de trabalho

As linhagens com inserção T-DNA *knockdown* para o *APC11* utilizadas neste trabalho foram obtidas do *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC). A linhagem SALK_019654 (*zyg1-2*) possui localização do T-DNA no terceiro *ítron*, e SALK_046847.33.70.x (*apc11-1*) na região 3' UTR (Schwedersky et al., 2021). A linhagem *amiR-apc11* foi produzida a partir do precursor *amiRNAapc11* e inserido no vetor pRS300 modificado por mutagênese através de PCR (Schwab et al., 2006), e posteriormente introduzido no vetor pK7WG2 (Karimi et al., 2002; Schwedersky et al., 2021).

Para a análise do padrão de expressão do promotor *APC11*, um fragmento genômico de 3,5 kb precedentes ao códon de início ATG foi amplificado a partir do DNA genômico de plantas de *Arabidopsis thaliana*, e clonado no vetor pDONR201

(Invitrogen Corporation, CA, Estados Unidos), seguido de transferência para o vetor de destino pKGWFS7 (Karimi et al., 2002) através de reação de recombinação LR Clonase (Invitrogen Corporation, CA, Estados Unidos) (Schwedersky et al., 2021).

4.2.2 Material vegetal e condições de crescimento

Plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 e *apc11* foram crescidas em potes plásticos contendo substrato Jiffy e vermiculita (3:1), ou em meio MS 0,5X (Murashige & Skoog, 1962), e mantidas à 4°C no escuro por pelo menos dois dias para a quebra de dormência. Para evitar a contaminação durante o desenvolvimento *in vitro*, as sementes foram esterilizadas conforme descrito no item 3.2.3. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento *Fitotron® SGC 120* a 21°C com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e umidade 60%.

4.2.3 Análise da expressão gênica

Extração de RNA total, tratamento com DNase e síntese de primeira fita de cDNA

Para verificar os níveis de mRNA das plantas mutantes *apc11*, qRT-PCR foi realizado em raízes e folhas de um *pool* de ± 6 plantas coletadas aos 8, 15 e 25 dias após a semeadura (DAS), três repetições biológicas, e 3 réplicas técnicas foram utilizadas nestes experimentos.

Para análise de expressão dos genes chaves do ciclo celular nos mutantes *apc11* e no controle Col-0, três réplicas biológicas de um *pool* de ± 6 plantas foram coletadas para cada ponto de tempo analisado (8, 15 e 25 DAS). Após a coleta, as amostras foram rapidamente congeladas e armazenadas em freezer -80°C. Conforme descrito no item 3.2.4 a extração de RNA total foi realizada a partir de 300mg de material vegetal utilizando o protocolo com Trizol (Invitrogen). Antes da síntese do DNA complementar (cDNA), cerca de 2 μ g de RNA total extraído de cada amostra foi tratado com a enzima RQ1 DNase (PROMEGA), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total tratado com DNase I foi utilizado na síntese de primeira fita usando o kit “*SuperScript™ III First-Strand*” (Thermo Fisher Scientific) em reações com volume final de 20 μ l de acordo com instruções do fabricante. Os primers utilizados foram desenhados com Primer Express Software v.2.0 (Applied Biosystems, CA, Estados Unidos).

PCR em Tempo Real

O cDNA foi amplificado por PCR em tempo real utilizando o sistema da *Applied Biosystems 7500* em placas de 96 poços com *Power SYBR™ Green PCR Master Mix* (*Thermo Fischer Scientific, MA, Estados Unidos*). As curvas de *Melting* foram analisadas para verificar a especificidade dos *primers* (as sequências dos *primers* estão listadas na Tabela 1). O valor do *threshold* (Ct) foi determinado para o gene alvo e o gene de referência, e a quantificação relativa da expressão de cada gene analisada pelo método delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), descrito por (Livak & Schmittgen, 2001), com normalização feita em comparação a média dos genes endógenos UBI10 e GAPDH. Os dados obtidos a partir das três réplicas biológicas foram analisadas usando Teste T *Student* verificando os níveis de significância (abaixo de 5%).

Nome	Primers de sequência forward	Primers de sequência reversa
RT-qPCRs		
APC11	TTATGGCATGCAGTTGCTTC	GTCTGCGAATTCACCCATTT
CDKB2;1	AGCACACTCAAGAACTGGCA	TGAGATTCGTTTTCGCTGGCT
CYCB1;1	GTGCAAAGCTGTTGGCGTAT	GAAGCGTTCGTCCTTGGAGT
CYCD3;1	CCTCTCTGTAATCTCCGATTC	AAGGACACCGAGGAGATTAG
HIS4	CAGCGATTCGTCGTCTTGC	TCCATAGCAGTCACCGTCTTC
Genes Endógenos		
GAPDH	TCCGTGTTCCAACCGTTGAT	GCCTTGGCATCGAAAATGCT
UBI10	CACACTCCACTTGGTCTTGCCT	TGGTCTTTCCGGTGAGAGTCTTCA

Tabela 1: Sequências de primers utilizados no qRT-PCR

4.2.4 Ensaio de coloração GUS

Para analisar o padrão de expressão de *APC11* nos tecidos vegetais, um fragmento de 3,5 Kb anteriores ao códon de início ATG foi fusionado ao gene repórter GUS, e introduzido em plantas de *Arabidopsis* conforme descrito (Schwedersky et al., 2021). Plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* de duas linhagens independentes promo11:GUS-GFP foram coletadas na fase reprodutiva do desenvolvimento, e o ensaio de coloração GUS foi realizado conforme descrito no item 3.2.7 e observadas em estéreo microscópio binocular da Leica.

4.2.5 Análise de crescimento da raiz

Sementes dos mutantes *knockdown* de *apc11* e controle Col-0 foram semeadas para cultivo *in vitro* conforme descrito no item 3.2.3. As placas contendo as sementes foram colocadas verticalmente em câmara de crescimento (22°C; fotoperíodo de 16 h luz, e 8 h escuro) para observação de suas raízes. Para análise do padrão de acúmulo de grânulos de amido na columela, as raízes foram coradas com solução Lugol por 5 à 7min, seguida de montagem em lâminas de microscópio com hidrato cloral, e visualização imediata em Microscópio Axio Imager. A2 (Carl Zeiss AG, Jena, Alemanha) usando objetiva DIC. Para cada genótipo Col-0, *apc11-1* e *amiR-apc11* foram analisadas cerca de 20 raízes de 6 DAS.

4.3 Resultados

4.3.1 Análise dos níveis de expressão de plantas *apc11-1* e *amiR-apc11*

As análises do transcrito de *APC11* por qRT-PCR nos mutantes *apc11-1*, *amiR-apc11* e no controle Col-0 foram realizados em plantas de 8, 15 e 25 DAS, confirmando os níveis reduzidos de mRNA em ambas as linhagens em comparação ao controle. A linhagem *amiRNA-apc11* apresentou maior redução nos níveis de expressão aos 15 DAS, enquanto *apc11-1* apresentou redução significativa aos 25 DAS.

Para investigar como a redução da expressão de *APC11* afeta os genes chaves do ciclo celular, analisamos os níveis de mRNA dos genes marcadores da fase (M) e (S). *CYCB1;1* e *CDKB2;1* estão envolvidos no controle da transição G2/M (Hemerly et al., 1992); Segers et al., 1996), enquanto *CYCD3;1* e *HIS4* são genes marcadores específicos da fase G1/S (Menges et al., 2003; Menges & James, 2002).

Os resultados mostraram um perfil de expressão muito semelhante para os genes específicos da transição G2/M (*CYCB1;1* e *CDKB2;1*) em ambas as linhagens *apc11* nos períodos analisados. Resumidamente, os níveis de expressão desses genes apresentaram um leve aumento aos 8 DAS na linhagem *amiR-apc11*, seguido de um aumento significativo da expressão em ambas as linhagens aos 15 DAS, e redução aos 25 DAS, enquanto os genes específicos da fase G1/S (*CYCD3;1* e *HIS4*)

não apresentaram variação significativa em seus níveis de transcritos em praticamente todos os tempos analisados, com exceção do transcrito de *CYCD3;1* na linhagem *amiR-apc11*, que apresentou significativo aumento aos 25 DAS.

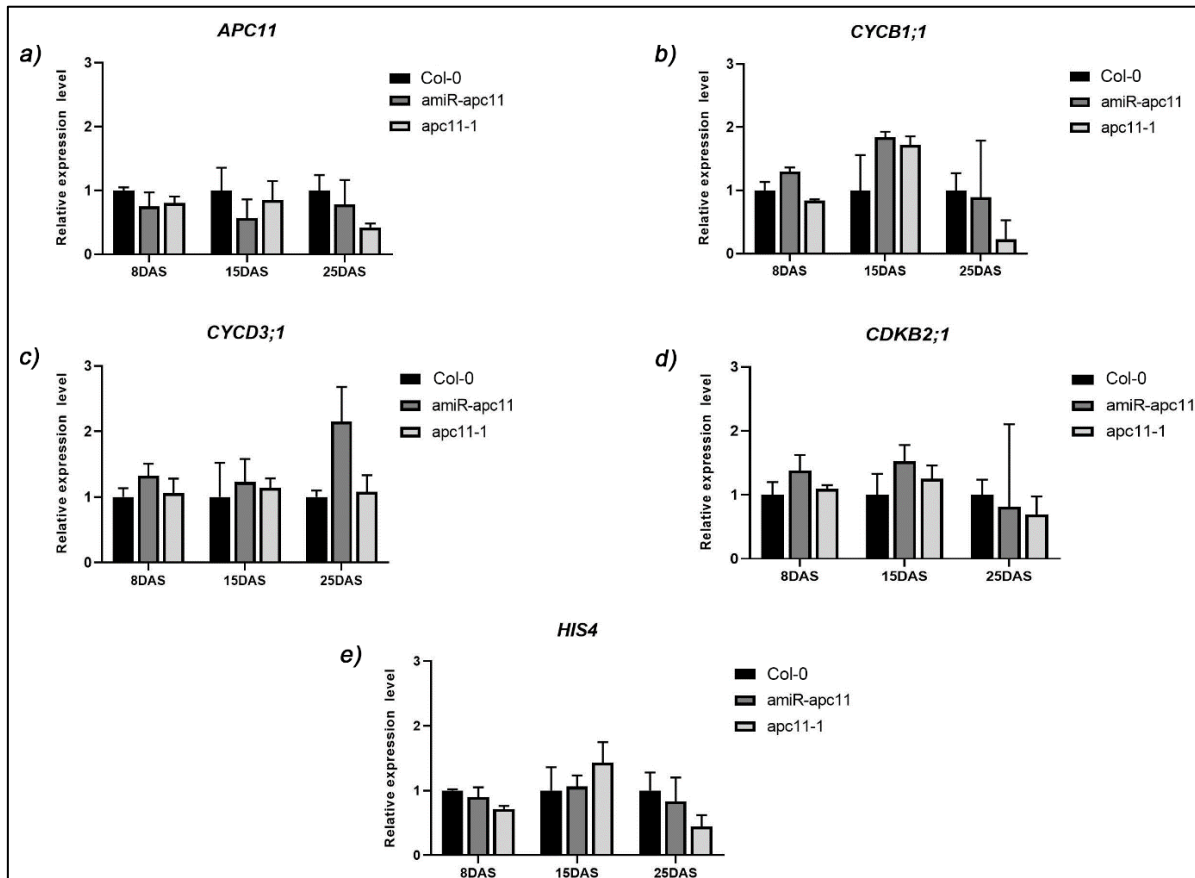


Figura 1: Análise quantitativa por RT-PCR dos transcritos de APC11 e marcadores do ciclo celular em plântulas das linhagens: *apc11-1*, *amiR-apc11* e Col-0 ao longo do desenvolvimento (8, 15 e 25 DAS). Níveis de mRNA de (a) APC11 (b) CYCB1;1 (c) CYCD3;1 (d) CDKB2;1 (e) HIS4. Todos os valores foram normalizados em relação ao nível de expressão dos genes endógenos (*UBI10* e *GAPDH*), e comparada com os dados de expressão do controle WT. Os dados são as médias \pm SD (n = 3).

4.3.2 Padrão de expressão de *APC11*

Para estudar o padrão de expressão de *APC11* na fase reprodutiva do desenvolvimento vegetal, duas linhagens independentes do promotor do *APC11* fusionado ao GUS (*pAPC11-GUS*) foram analisadas. A coloração para atividade de β -glucuronidase (GUS) revelou uma forte expressão nos botões florais, carpelos, estames e gineceu (Figura 2), confirmando sua importância para a gametogênese feminina e masculina conforme descrito (Guo et al., 2016).

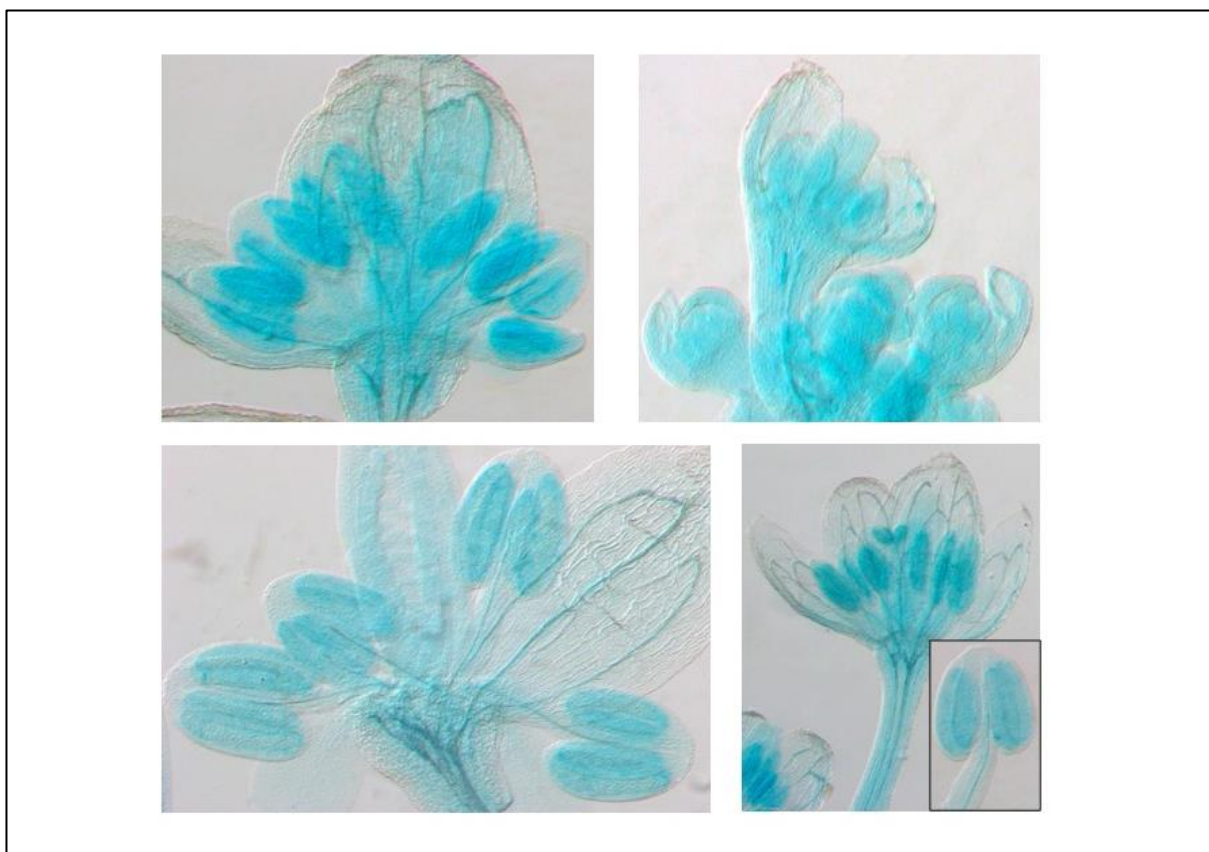


Figura 2: Padrão de expressão do promotor de *APC11* (*pAPC11-GUS*) nos órgãos reprodutivos. Fotografias de inflorescências aos 30 DAS.

4.3.3 Análises fenotípicas das raízes de mutantes *apc11*

Para observar o padrão das células-tronco da columela (CSC), o ápice radicular das plantas mutantes *apc11-1*, *amiR-apc11* e controle Col-0 foram coradas com solução lugol, com o objetivo de visualizar todas as camadas diferenciadas da columela. Como visualizado na Figura 3, o mutante *apc11-1* apresentou grânulos de amido na camada celular abaixo do QC (*Quiescent Center*), revelando que esta camada é uma célula da columela diferenciada (DCC), e não uma CSC. Plantas *amiR-apc11* também apresentou grânulos de amido na camada celular abaixo do QC, mostrando que essas células estão diferenciando. Entretanto, algumas células próximas parecem estar ausentes de amido, sugerindo que algumas propriedades das células-tronco (CSC) ainda permanecem nos mutantes *amiR-apc11*.

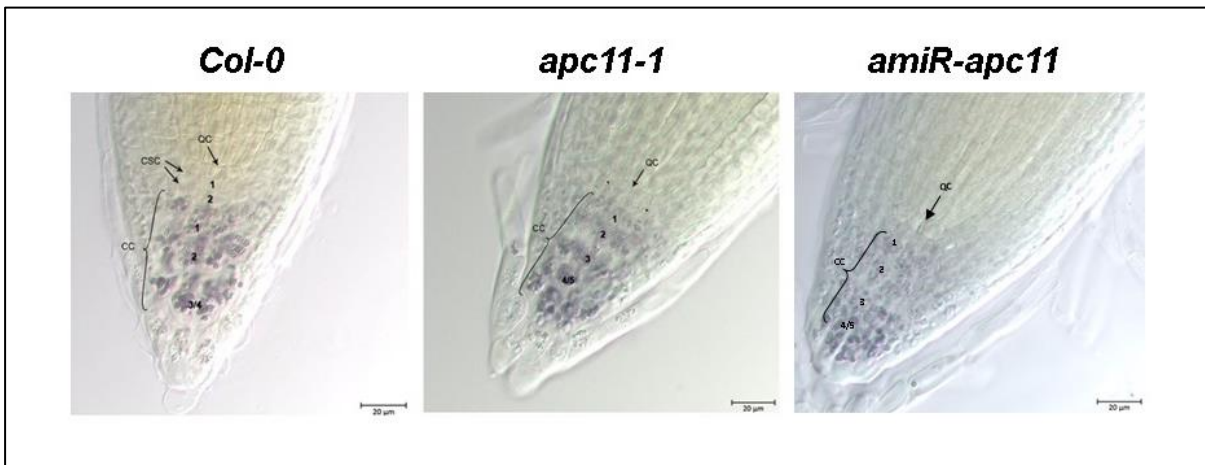


Figura 3: Imagens DIC representativas das células do centro quiescente (QC) nas plantas Col-0, *apc11-1* e *amiR-apc11*. Coloração de Lugol mostrando o padrão de acúmulo de grânulos de amido nas células-tronco da columela (CSCs). Grânulos de amido indicando a diferenciação de CSC. Barra preta = 20 μ m, n = 15

4.4 Discussão

Análise de expressão dos mutantes de *APC11* através de RT-qPCR mostraram redução nos seus níveis de mRNA em todos os períodos (8, 15 e 25) analisados, em ambas as linhagens investigadas, *apc11-1* e *amiR-apc11*, em relação a Col-0 (Figura 1). Além disso, os efeitos da redução de expressão do *APC11* exibiram um perfil de expressão semelhante entre os genes marcadores da transição G2/M (*CYCB1;1* e *CDKB2;1*), durante todos os períodos avaliados. Os níveis de mRNA desses genes apresentaram um leve aumento aos 8DAS na linhagem *amiR-apc11*, seguido de um aumento significativo de expressão em ambas as linhagens aos 15 DAS, e redução aos 25 DAS, enquanto os genes específicos da fase G1/S (*CYCD3;1* e *HIS4*) não apresentaram variação significativa em seus níveis de transcritos em praticamente todos os períodos analisados, com exceção do transcrito de *CYCD3;1* no mutante *amiR-apc11*, que apresentou significativo aumento aos 25 DAS (Figura 1).

Análise cinemática do desenvolvimento das folhas 1 e 2, em plantas mutantes *APC11* mostraram que, desde o início, as folhas das plantas *apc11-1* possuem área foliar menor que Col-0. Porém, a partir dos 15 dias, estas folhas recuperaram parte de sua área em relação ao controle (Schwedersky et al., 2021). Além disso, a análise por RT-qPCR indicou uma tendência de aumento na expressão dos genes marcadores da divisão celular, *CYCB1;1* e *CDKB2;1*, após 15 dias (Figura 1), sugerindo uma compensação na taxa de divisão celular após esse período

Mutantes *apc11* apresentaram raízes menores, devido a um meristema radicular reduzido (Schwedersky et al., 2021). Entretanto, apresentaram maior densidade de raízes laterais (Schwedersky et al., 2021), que pode ser explicado pelos elevados níveis do marcador de divisão celular, *CYCB1;1*, aos 15 dias após germinação.

Na Figura 3, nós observamos nas raízes dos mutantes *apc11.1* e *amiR-apc11*, grânulos de amido na camada celular abaixo do QC (centro quiescente), indicando prematura diferenciação de células da columela. No entanto, células próximas a columela aparentam não ter amido, indicando preservação de algumas propriedades das células-tronco. Além disso, as células QC possuem uma área celular maior em relação ao controle, Col-0.

4.5 Conclusão

Em conclusão, nosso estudo mostra o papel essencial do APC11 para a viabilidade das plantas, e para a manutenção adequada da divisão celular controlada pela atividade APC/C através da subunidade APC11, o qual parece desempenhar um papel importante durante o crescimento e desenvolvimento das folhas e raízes de *Arabidopsis thaliana*.

Referências

- Guo, L., Jiang, L., Zhang, Y., Lu, X. L., Xie, Q., Weijers, D., & Liu, C. M. (2016). The anaphase-promoting complex initiates zygote division in *Arabidopsis* through degradation of cyclin B1. *Plant Journal*, *86*(2), 161–174. <https://doi.org/10.1111/tpj.13158>
- Hemerly, A., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Inzé, D., & Ferreira, P. (1992). Genes regulating the plant cell cycle: Isolation of a mitotic-like cyclin from *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(8), 3295–3299. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3295>
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant.pdf. *TRENDS in Plant Science*, *7*(5), 193–195. <file:///C:/Users/Risa/Downloads/1-s2.0-S1360138502022513-main.pdf>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Menges, M., Hennig, L., Grisse, W., & Murray, J. A. H. (2003). Genome-wide gene expression in an *Arabidopsis* cell suspension. *Plant Molecular Biology*, *53*(4), 423–442. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000019059.56489.ca>
- Menges, M., & James, A. H. M. (2002). *Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity* (p. 203±212).
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio

Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 474–497.

Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., Chen, H., & Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. *The Plant Cell*, 18, 1121–1133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001829>

Schwedersky, R. P., Saleme, M. de L. S., Rocha, I. A., Montessoro, P. da F., Hemerly, A. S., Eloy, N. B., & Ferreira, P. C. G. (2021). The Anaphase Promoting Complex/Cyclosome Subunit 11 and Its Role in Organ Size and Plant Development. *Frontiers in Plant Science*, 12(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.563760>

ANEXO

Para maiores informações, o artigo completo pode ser consultado em **Frontiers in Plant Science**: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.563760/full>



The Anaphase Promoting Complex/Cyclosome Subunit 11 and Its Role in Organ Size and Plant Development

Rodrigo Porto Schwedersky^{1†}, Marina de Lyra Soriano Saleme^{2†},
Ingrid Andrade Rocha², Patricia da Fonseca Montessoro¹, Adriana Silva Hemerly¹,
Nubia Barbosa Eloy^{2*‡} and Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira^{1‡§}

OPEN ACCESS

Edited by:

José Manuel Pérez-Pérez,
Miguel Hernández University of Elche,
Spain

Reviewed by:

Renze Heidstra,
Wageningen Plant Research,
Wageningen University and Research,
Netherlands
Jefri Heyman,
Ghent University, Belgium

*Correspondence:

Nubia Barbosa Eloy
nbeloy@usp.br

† These authors have contributed
equally to this work

‡ These authors have contributed
equally to this work and share last
authorship

§ Deceased

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Development and EvoDevo,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 19 May 2020

Accepted: 02 September 2021

Published: 23 November 2021

Citation:

Schwedersky RP, Saleme MLS,
Rocha IA, Montessoro PF,
Hemerly AS, Eloy NB and
Ferreira PCG (2021) The Anaphase
Promoting Complex/Cyclosome
Subunit 11 and Its Role in Organ Size
and Plant Development.
Front. Plant Sci. 12:563760.
doi: 10.3389/fpls.2021.563760

¹ Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Instituto de Bioquímica Médica Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ² Department of Biological Sciences, Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', University of São Paulo, Piracicaba, Brazil

The anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C), a member of the E3 ubiquitin ligase family, plays an important role in recognizing the substrates to be ubiquitinated. Progression of anaphase, and therefore, of the cell cycle, is coordinated through cyclin degradation cycles dependent on proteolysis triggered by APC/C. The APC/C activity depends on the formation of a pocket comprising the catalytic subunits, APC2, APC11, and APC10. Among these, the role of APC11 outside the cell division cycle is poorly understood. Therefore, the goal of this work was to analyze the function of APC11 during plant development by characterizing *apc11* knock-down mutant lines. Accordingly, we observed decreased *apc11* expression in the mutant lines, followed by a reduction in meristem root size based on the cortical cell length, and an overall size diminishment throughout the development. Additionally, crosses of *apc11-1* and *amiR-apc11* with plants carrying a WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5 (WOX5) fluorescent marker showed a weakening of the green fluorescent protein-positive cells in the Quiescent Center. Moreover, plants with *apc11-1* show a decreased leaf area, together with a decrease in the cell area when the shoot development was observed by kinematics analysis. Finally, we observed a decreased APC/C activity in the root and shoot meristems in crosses of pCYCB1;1:D-box-GUS with *apc11-1* plants. Our results indicate that APC11 is important in the early stages of development, mediating meristematic architecture through APC/C activity affecting the overall plant growth.

Keywords: plant development, cell cycle, anaphase promoting complex (APC), organ size, meristem cells

INTRODUCTION

As sessile organisms, plants achieve growth through postembryonic development to cope with unforeseen environmental conditions. An important strategy is to regulate the balance of cell division and cell differentiation (Horiguchi et al., 2006). For that, cell proliferation and cell expansion must be coordinated, and perfectly followed by cell differentiation progression. This balance is accomplished through the presence of control systems at the division phases: gap one (G1), DNA synthesis (S), gap two (G2), and mitosis (M) to promote mitotic cell cycle or

endoreplication, a detour in which the DNA is synthesized, but cell division does not occur (Edgar et al., 2014). However, in the context of multicellular organisms, unlike other eukaryotes, plants control these processes especially in the regions designated as meristems, both on the root apical meristem (RAM) and the shoot apical meristem (SAM) (Steeves and Sussex, 1989; Scheres, 1997).

Meristems are tissues with the capacity for perennial growth. Furthermore, they can develop a plethora of plant organs (Meyerowitz, 1997). However, meristematic cell identity comes from autoregulatory signals that promote a spatial identity and a unique architecture (Van den Berg et al., 1997). The basic meristematic structure in both SAM and RAM is composed of cells in the center known as the mitotically relatively inactive organizing center (OC, SAM) and quiescent center (QC, RAM), surrounded by cells that can divide and progressively differentiate (Galinha et al., 2007; Somssich et al., 2016). The main signals regulating SAM and RAM cell proliferation and differentiation are the CLAVATA3 (CLV3)-WUSCHEL (WUS) signaling pathway. It is summarized by a negative feedback loop in which differentiation-promoting peptide, CLV3 inhibits the expression of the stem cell-promoting transcription factor, WUS cells outside of OC (Somssich et al., 2016). On the other side, PLETHORA (PLT) and SCARECROW (SCR) can interact to promote WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5 (WOX5), the WUS homolog in RAM, expression in QC (Shimotohno et al., 2018). Moreover, WOX5 can establish quiescence in cells by inhibiting CYCLIN D3;3 (CYCD3;3), a key cell cycle transition regulator (Forzani et al., 2014).

The transitions through phases of the cell cycle are regulated by cyclin-dependent kinases (CDKs) activity, with plants having a complex set of CDKs and cyclins when compared to yeast and animals (Komaki and Sugimoto, 2012). CDKA and CDKB are largely responsible for cell cycle control. Interaction studies indicate that CDKA;1 is a key regulator of G1-S transition when associated with D-type cyclins. Downstream on the cycle, CDKA;1 interacting with CYCD3 allows for the progression to M-phase (Dewitte et al., 2007; Boruc et al., 2010; Van Leene et al., 2010; Zhao et al., 2012). On the other hand, CDKB is known to interact mostly with B-type cyclins and CYCA2 to control G2 to M transition and M progression (Boudolf et al., 2009; Vanneste et al., 2011).

Cyclin accumulation is imperative for correct plant cell division (Wolgemuth, 2011). One important system restraining cyclin abundance is the ubiquitin proteasome system (UPS), which controls protein degradation of the major cell cycle regulators. The UPS works through a series of enzymatic reactions carried out by E1 ubiquitin activating, E2 ubiquitin conjugating, and E3 ubiquitin ligase enzymes. The E3 type ligases are key to these processes, selecting the target proteins for ubiquitination (Nowack et al., 2012).

In plants, the following two families of E3 ligases control DNA replication and cell division: SCF (Skp1, Cullins, and F-box proteins) and anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) (Genschik et al., 2014). The APC/C is the largest E3 ubiquitin ligase found in all organisms (Primorac and Musacchio, 2013).

Its function depends on essential subunits, such as APC2 and APC11, which together with APC10 and APC3 serve as a docking site for the coactivators, cell division cycle 20 (CDC20), or cell cycle switch52 (CCS52). Coactivators consequently interact with the inhibitors, UV-B-insensitive 4 (UVI4) and omission of second division (OSD). Besides these subunits, APC1, APC4, APC5, APC6, APC7, and APC8 are parts of the multisubunit enzyme backbone (Eloy et al., 2015).

However, the function and activity of APC/C can display multiple dimensions. First, the genes encoding the subunits are differentially expressed through plant development (Eloy et al., 2006). Additionally, coactivator, APC/C^{CDC20} is present in the early G2-M phase and cell cycle exit, while APC/C^{CCS52A} is expressed in late S and G2 phases (Heyman and De Veylder, 2012). Furthermore, coactivator, CCS52A and APC3, encode two genes in *Arabidopsis* with distinct functions and localization during plant development (Blilou et al., 2002; Vanstraelen et al., 2009). Another subunit encoded by multiple isoforms is CDC20, although, only CDC20-1 and CDC20-2 are the predominantly activating APC/C, being responsible for the control of cell number (Kevei et al., 2011). Additionally, lack of expression and the unusual gene structure of the isoforms from CDC20-3 to CDC20-5, suggest that they are pseudogenes (Heyman and De Veylder, 2012).

Finally, another feature on the APC/C function is derived from its targets. Among them are important cell cycle regulators in anaphase promotion, such as Securin and cyclin B (Guo et al., 2016). The recognition of its target mainly occurs *via* D-box or KEN-box protein motifs (Genschik et al., 1998). Securin poly-ubiquitination is required for sister chromatid separation and cyclin B degradation is required for correct cell division afterward (Peters, 2006). Additionally, the time of cyclin B degradation is crucial, since B-type cyclin-dependent kinase CDKB1;1 inhibition induces mitotic progression through the disassembly of the mitotic spindle, chromosome decondensation, cytokinesis, and restoration of the nuclear envelope (Genschik et al., 2014). Furthermore, APC/C^{CCS52A} has been investigated for potential targets through tandem affinity purification (Van Leene et al., 2010). The data identified, among others, the transcription factor, ERF115 as a target that is rate limiting for cell divisions on RAM QC (Heyman et al., 2013).

Although much has been learned about APC/C function in recent years, functional characterization of its essential subunit, APC11 is still lacking. In this study, we have analyzed *apc11* knock-down mutants, which exhibit smaller organs and disturbance of cell cycle gene markers expression. Furthermore, *apc11* plants show an impairment of root architecture in crosses with plants carrying a WOX5 promoter-driven fluorescent marker. Moreover, *apc11* plants show a reduced leaf area together with a decrease in the cell area, when shoot development was observed through the time by kinematics assay. Finally, we observed a diminished APC/C activity in the RAM and SAM through crosses between *pCYCB1;1:D-box*, and *apc11* plants. Our results indicate that APC11 is important during the early stages of plant development by mediating meristematic architecture through APC/C activity, leading to an overall decrease in the plant growth.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Production of Transgenic Plants

Two T-DNA insertion lines, located in the third exon, and into the 3' UTR of *APC11* gene were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC).¹ The seed code for the lines was as follows: SALK_019654 (*zyg1-2* Guo et al., 2016) and SALK_046847.33.70.x (*apc11-1*). The presence of the T-DNA insertion was confirmed by a genomic PCR from the leaves of 15-day-old plants. Plants were grown *in vitro* in half-strength Murashige and Skoog (MS) medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 1% sucrose, or on soil under long-day conditions (16 h light, 8 h darkness) at 22°C. For all analyses, the *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn accession Columbia (Col)-0 was used as wild type (WT).

For the *APC11* promoter analysis, a 3.5-kb genomic fragment (upstream of the ATG start codon) containing the putative *APC11* promoter was amplified from the genomic DNA of *Arabidopsis* plants and cloned into the pDONR201 vector (Invitrogen Corporation, CA, United States) and then transferred to pKGWFS7 destination vector (Karimi et al., 2002) *via* MultiSite LR Clonase reaction (Invitrogen Corporation, CA, United States). Thus, the construct was inserted by floral dip transformation (Clough and Bent, 1998) and eight independent homozygous lines were selected.

For the production of amiRNA-*apc11* *Arabidopsis* transgenic plants, *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 harboring the plasmid pMPP90 was used for plant transformation using the floral dip method (Clough and Bent, 1998). The amiRNA-*apc11* (miR) precursor included in the pRS300 vector was modified by directed PCR mutagenesis (Schwab et al., 2006) and introduced into the pK7WG2 vector (Karimi et al., 2002). Four independent lines were selected by seed germination on MS medium supplemented with kanamycin (50 µg ml⁻¹), under long-day conditions (16 h light, 8 h darkness) at 22°C and tested for single locus segregation.

RNA Extraction and Real-Time Quantitative Reverse-Transcription PCR

For the RT-qPCR, three biological replicates of a pool of six plants were collected for each time point analyzed. The *t*-test was used to analyze the significance of the data obtained. Total RNA was extracted from the frozen material according to Walker and Lorsch (2013). To eliminate the residual genomic DNA present in the preparation, the RNA was treated by RNase-free DNase according to the instructions of the manufacturer (GE Healthcare).² For the RT-qPCR with roots and leaves, about 25 plants were harvested at 8 days after sowing (DAS) for three biological replicates, and RNA extraction was performed.

Complementary DNA was performed with the SuperScript III first-strand synthesis system (Invitrogen Corporation, CA, United States) with the oligo (dT) primers solution according to the instructions of the manufacturer. Primers were designed

with Primer Express Software v.2.0 (Applied Biosystems, CA, United States). The primer sequences used in the qPCR experiments are listed in **Supplementary Table 1**. The complementary DNA (cDNA) was amplified on an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System in 96-well plates with Power SYBRTM Green PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, MA, United States) according to the recommendations of the manufacturer. Melting curves were analyzed to check the specificity of the primer. Normalization was done against the average of the housekeeping genes, UBQ10 and GAPDH: $DCt = Ct(\text{gene}) - Ct[\text{mean}(\text{housekeeping genes})]$ and $DDCt = DCt(\text{control}) - DCt$. The DCt values for the three biological replicates were used for statistical analysis; Ct refers to the number of cycles at which SYBR Green fluorescence reaches an arbitrary value during the exponential phase of the cDNA amplification. The data were first normalized to the expression level of the housekeeping genes for each RNA sample and then scaled to the WT expression per gene that was fixed to 1.

β -Glucuronidase Intensity Quantification and Staining

From eight independent lines selected for promoter analysis, two representative independent lines were used in this study. Seeds were plated on MS medium, and after 3 days at 4°C, the plates were placed in a growth chamber (22°C; 16 h photoperiod) for 6, 8, or 10 days to measure β -glucuronidase (GUS) staining. For later analysis, plants were grown on the soil until the organ analyzed was developed. Seedlings of p*APC11*:GUS were harvested and incubated in acetone for 10 min and, subsequently, incubated in 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide (X-Gluc) buffer [100 mM 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (TRIS)-HCl, 50 mM NaCl buffer (pH 7.0), 2 mM K₃[Fe(CN)₆], and 4 mM X-Gluc] at 37°C for 5 h or 24 h. Seedlings were washed in 100 mM TRIS-HCl, 50 mM NaCl (pH 7.0) and cleared overnight in 95% ethanol, then kept in 90% lactic acid. Samples were photographed under a differential interference contrast (DIC) microscope or stereo light microscope (Leica, Wetzlar, Germany). To quantify the intensity of the GUS staining, the stained area of each RAM and SAM of *apc11.1* × *CYCB1,1:D-box-GUS* and WT × *CYCB1,1:D-box-GUS* (Eloy et al., 2011) was marked and its intensity was measured and quantified with the ImageJ software with the values given in arbitrary units. Approximately, 15 plants were analyzed for each experiment.

Root Growth Analysis

Seeds were plated on a half-strength MS agar growth medium and placed at 4°C for 3 days to synchronize germination. Plates were then placed vertically in a growth chamber (22°C; 16 h photoperiod). Root growth was visualized through photographs taken at 8, 10, and 12 DAS. The root length of at least 22 plants per experiment was measured with the ImageJ software. The root meristem length from the quiescent center (QC) to the first elongated cell exhibiting vacuolization was measured at 7 DAS from around 15 ± 2 roots of *apc11*, *amiR-apc11*, and WT seedlings for each experiment. The samples were visualized with

¹<http://arabidopsis.info/>

²<http://www.gehealthcare.com>

Microscope Axio Imager.A2 (Carl Zeiss AG, Jena, Germany) using a DIC objective. Photographs of roots were used to measure the meristem length with ImageJ software. Lateral root density was scored as the lateral root number per centimeter of primary root and was calculated by dividing the number of lateral roots by the primary root length for each seedling (13 ± 1 seedlings were analyzed).

For *apc11* × pWOX5:ERGFP (Xu et al., 2006) crosses analysis, *Arabidopsis* roots of 12 seedlings were imaged between the slide and coverslip on a Confocal Laser Scanning Microscope (Carl Zeiss AG, Jena, Germany). Excitation was done with a multi-argon laser (458, 488, and 514 nm). Fluorescence was detected through a spectral emission window ranging from 493 to 598 nm. The *amiR-apc11* × pWOX5:ERGFP crosses analysis was done using a Fluorescence Microscope Axio Imager.A2 (Carl Zeiss AG, Jena, Germany); about 15 roots were visualized under green fluorescent protein (GFP) filter.

Starch granules in the root tips were stained with Lugol's solution for 5–7 min, then mounted on slides with chloral hydrate, and checked immediately; about 20 roots of 6 DAS for each genotype were analyzed.

Shoot Growth Analysis

Plants were grown *in vitro* in a half-strength MS medium (Murashige and Skoog, 1962) at 22°C, under 16 h photoperiod. For the measurements of rosette leaf size, six seedlings were grown on the soil until its full life cycle ≈60 DAS; photographs were taken in 25, 30, and 50 DAS. Individual rosettes were measured with ImageJ software.

Kinematic Analysis

The complete kinematics was analyzed as described (De Veylder et al., 2001) on leaves 1 and 2, from 4 or 5 *apc11.1*, and WT plants grown *in vitro* harvested daily from 7 to 22 DAS. The leaves were cleared with 100% ethanol, mounted in lactic acid on microscope slides, and photographed. The leaf area was determined with the ImageJ software.³ Abaxial epidermal cells of four to five blades of leaves 1 and 2 were photographed and drawn. Photographs of leaves and drawings were used to measure the leaf area and to calculate the average cell area, respectively, with the ImageJ software. Leaf and cell areas were subsequently used to calculate the cell numbers and cell division rate.

RESULTS

APC11 Expression Through Development and Organs

To investigate the APC11 function during plant growth and development, we analyzed two T-DNA insertion lines. For the *SALK_019654* (*zyg1-2*), we confirmed the heterozygous insertion located in the third exon according to that described by Guo et al. (2016). However, for this study, we obtained an extra line, *SALK_046847.33.70.x*, hereafter referred to as *apc11-1*. In contrast with *zyg1-2*, a homozygous mutant

was found harboring a T-DNA insertion located in the 3' UTR; although *APC11* expression was not completely abolished in this homozygous mutant, instead, the knock-down expression was observed. Additionally, *amiRNAAPC11* (*amiR-apc11*) mutants were generated. Four independently transformed plants were obtained, and three representative lines expressing the construct and showing downregulation of *APC11* were analyzed (**Supplementary Figure 1**).

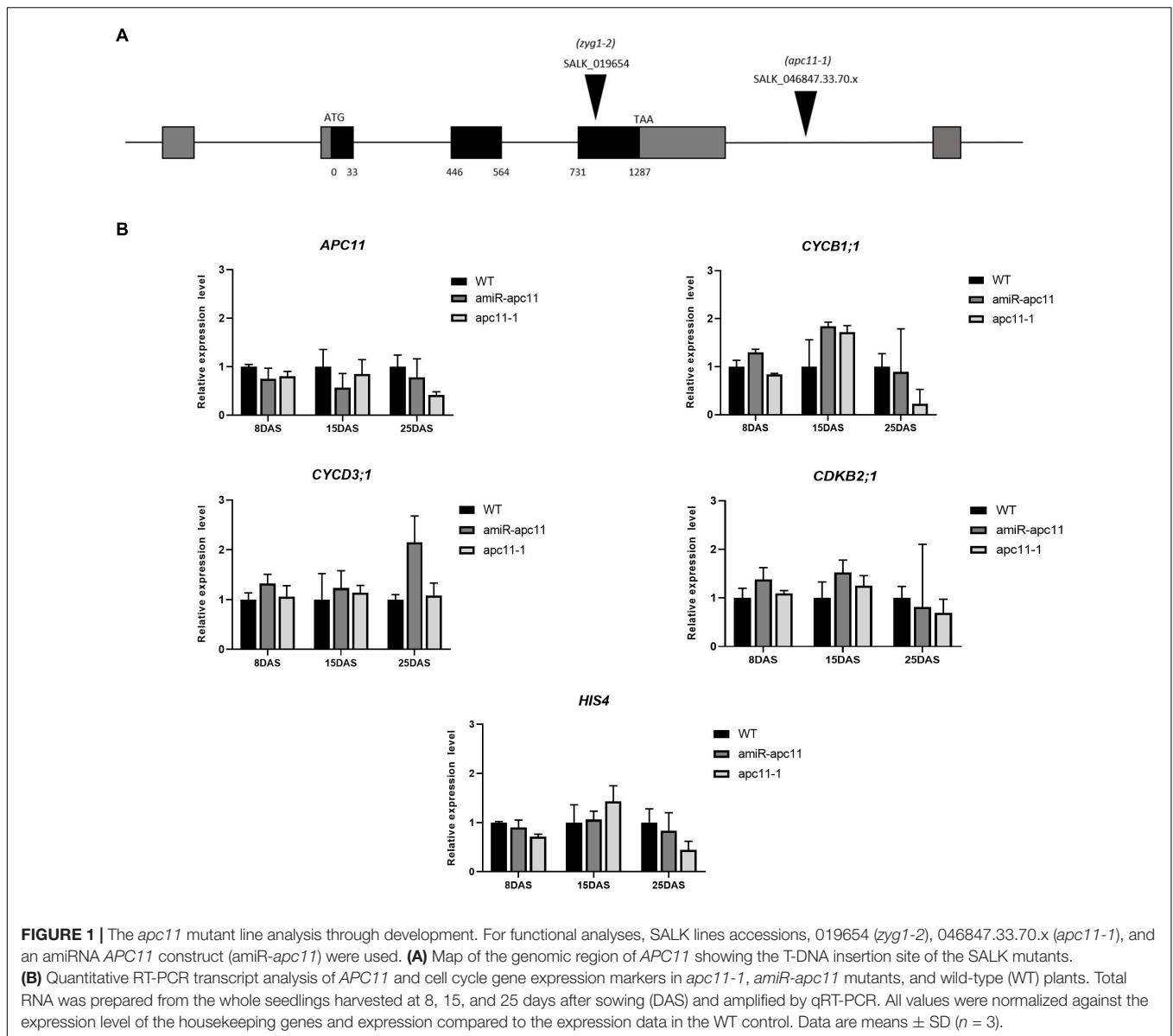
To assess the *APC11* mRNA levels in the mutants selected, the expression profile of whole seedlings was analyzed by RT-qPCR on 8, 15, and 25 DAS. In agreement with the published data (Guo et al., 2016), the *APC11* expression was not completely abolished in the T-DNA mutants analyzed (*apc11-1* and *zyg1-2*), confirming the essential nature of APC11 for plant development. Instead, we observed a reduced *APC11* mRNA expression level on both T-DNA mutant lines (**Supplementary Figure 1B**), as well as in the *amiRNA-apc11* lines compared to the wild type (WT), Columbia-0 in all time points analyzed (**Figure 1B** and **Supplementary Figure 1**). However, *amiRNA-apc11* showed a pronounced reduction in the expression levels at 15 DAS, while *apc11-1* showed the most prominent reduction at 25 DAS. To carry out the deeper analyses of the effect of *APC11* downregulation in plant growth, we followed our characterization using both homozygous lines, *apc11-1* T-DNA and *amiR-apc11*.

To investigate which phase of the cell cycle is affected by APC11 downregulation, we analyzed the expression levels of selected DNA synthesis (S) and mitosis (M) phase marker genes: *CYCB1;1*, *CDKB2;1*, *CYCD3;1*, and *HIS4*. *CYCB1;1* and *CDKB2;1* are involved in the control of gap two (G2)-M transition (Hemerly et al., 1992; Segers et al., 1996), while *CYCD3;1* and *HIS4* are G1/S phase-specific genes (Menges and Murray, 2002; Menges et al., 2003), which also influence the M phase (Schnittger et al., 2002). Our results showed a very similar expression profile of the two G2-M specific genes in both the lines during the time points analyzed, showing slight upregulation on 8 DAS, increasing the expression at 15 DAS, and downregulating their expression levels at 25 DAS (**Figure 1B**). While the G1/S phase-specific genes, *CYCD3;1* and *HIS4* did not show any significant variation on their transcripts levels in almost all time points analyzed, with the exception for *CYCD3;1* transcript in *amiR-apc11* line at 25 DAS (**Figure 1B**).

To study the expression pattern of *APC11* in plant tissues, a 3.5-kb fragment upstream to the ATG start codon of *APC11* was fused to a β-glucuronidase (GUS)-GFP tandem reporter cassette and introduced into *Arabidopsis* plants. Staining for β-glucuronidase (GUS) activity revealed a strong and more or less constitutive expression in the whole plant. We observed expression during the initial phase of plant development: at mature embryo, appearing stronger in mitotically active regions of RAM, SAM, cotyledons, and young leaves (**Figures 2A,B,D,F**, and **Supplementary Figure 11A**).

Further in development, *APC11* expression is still high in vascular cambium tissues on both the leaves and the roots (**Figure 2C** and **Supplementary Figure 11E**). Furthermore, we continue to observe the presence of *APC11* in the meristematic regions of the secondary roots (**Figures 2D,G**). We also

³<http://rsb.info.nih.gov/ij>



investigated the expression pattern in the floral organs, and we detected expression in floral buds, carpels, stamen, and gynoecium (**Figure 2E** and **Supplementary Figures 11B,C**), confirming its importance for the female and male gametogenesis as reported previously (Guo et al., 2016). Together, this data points toward *APC11* function on plant development, mainly in meristematic tissue on both the shoots and the roots. The next step was to further analyze those sites on *apc11* mutants.

To test the possibility that *APC11* is involved in seed development, both T-DNA mutant lines were self-crossed and seed production was analyzed. We observed a reduced viable seed set in *apc11-1* and *zyg1-2* lines (**Supplementary Figure 2**). In *apc11-1* siliques, approximately 30% of ovules did not develop into mature seeds, being aborted compared to WT, which supports the importance of *APC11* for seed development. To test male viability on *apc11-1* and *zyg1-2* plants, we utilized

Alexander stain (Alexander, 1969) to observe pollen integrity. Interestingly, both *apc11* mutants do not show any problem in pollen production as seen in anthers colored by intense red (**Supplementary Figure 3**).

Phenotypic Analyses of the Roots of *apc11* Mutants

To investigate the effects of the *apc11* downregulation on root development, we first investigated *apc11-1* and *amiR-apc11* root size throughout the time. The main root length of *apc11-1* and *amiR-apc11* were analyzed at 8, 10, and 12 DAS. As showed in **Figure 3**, the main root length was statistically shorter in both mutants, during all time points analyzed. Observing the clear expression of *APC11* in the lateral root primordia, we investigated the effect on the lateral root development, by assessing the lateral

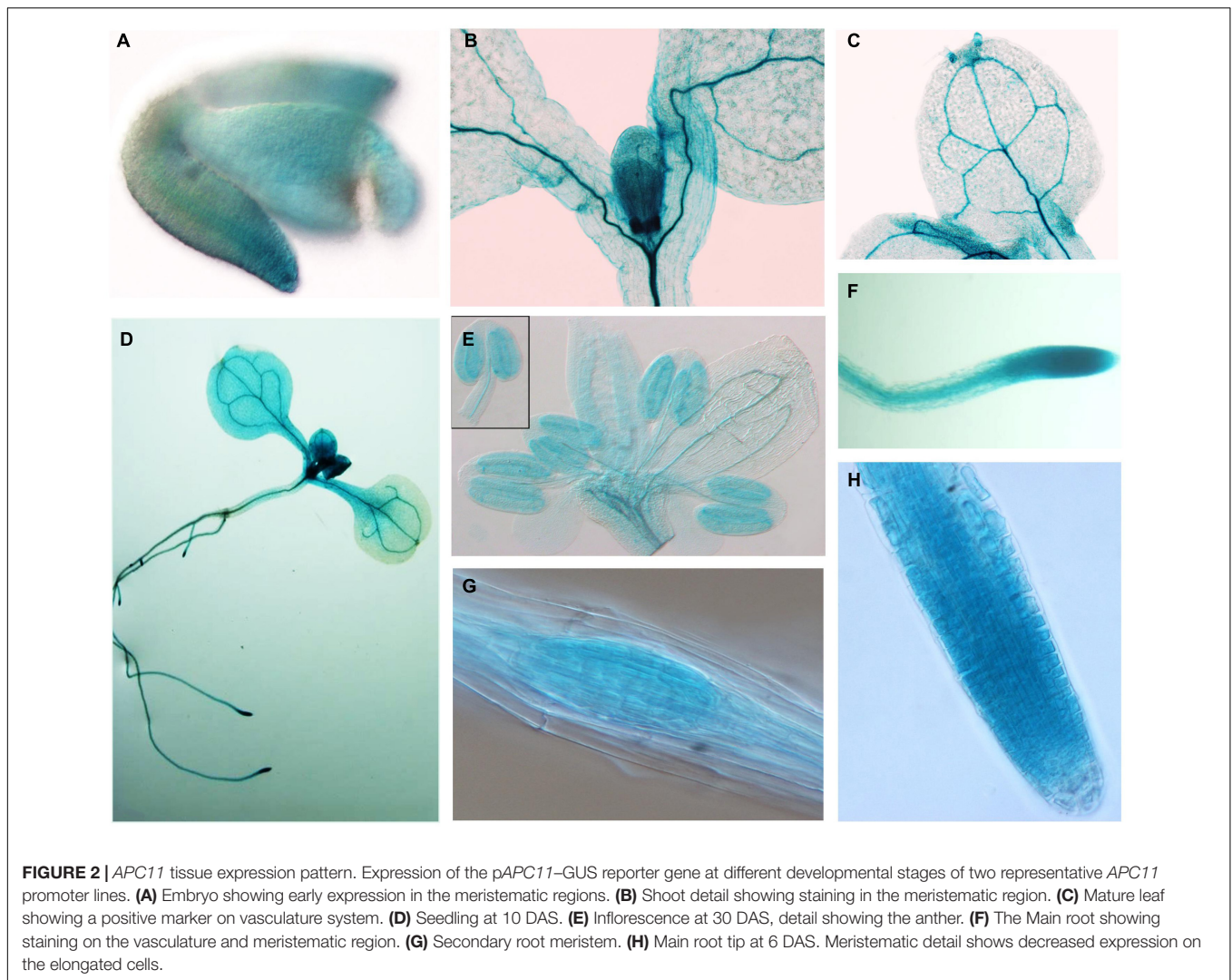


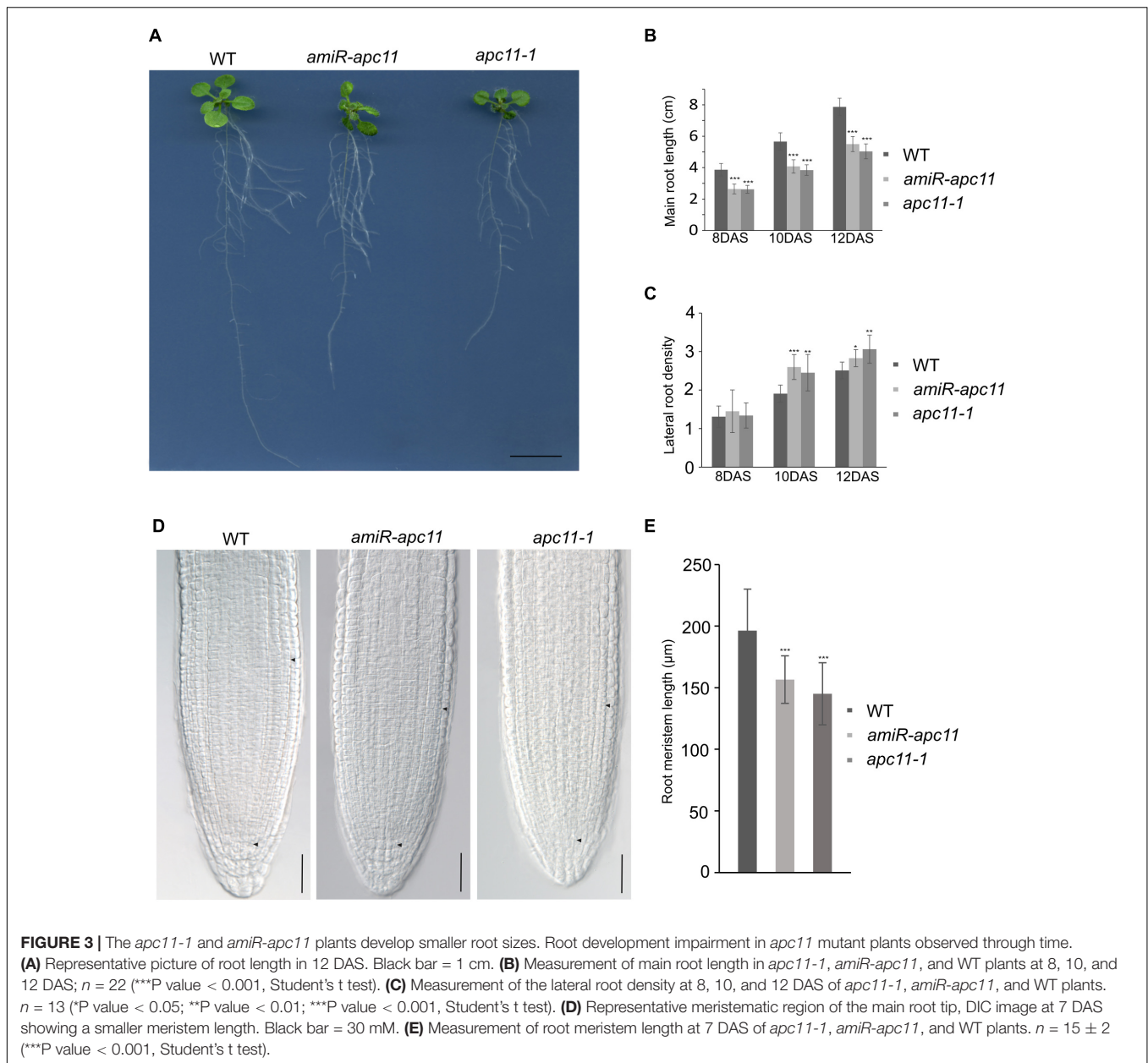
FIGURE 2 | *APC11* tissue expression pattern. Expression of the p*APC11*-GUS reporter gene at different developmental stages of two representative *APC11* promoter lines. **(A)** Embryo showing early expression in the meristematic regions. **(B)** Shoot detail showing staining in the meristematic region. **(C)** Mature leaf showing a positive marker on vasculature system. **(D)** Seedling at 10 DAS. **(E)** Inflorescence at 30 DAS, detail showing the anther. **(F)** The Main root showing staining on the vasculature and meristematic region. **(G)** Secondary root meristem. **(H)** Main root tip at 6 DAS. Meristematic detail shows decreased expression on the elongated cells.

root density on *apc11* mutants. Based on the main root size and the number of lateral roots, we were able to calculate the lateral root density, and we observed an increase in the root density measurements, especially at 10 and 12 DAS, this difference being significantly higher in both mutants. Additionally, roots from two other *amiR-apc11* lines were evaluated at 12 and 15 DAS displaying also the same phenotype (**Supplementary Figure 6**). Similarly, measurements of the root length of *zyg1-2* at 10, 12, and 15 DAS (**Supplementary Figure 7**), showed the same root length phenotype observed with the other *apc11* mutant lines.

The RAM was measured from the QC toward the point where cortical cells start to elongate (black arrow, **Figure 3D**), and the results were statistically analyzed revealing that *apc11-1* and *amiR-apc11* plants exhibited smaller root meristem size compared to WT as seen in the graphic representation (**Figure 3E**). These data suggest an important role of *APC11* on the root development starting probably before the time point analyzed (8 DAS).

To pinpoint what is possibly causing the root phenotype, we used the *apc11-1* mutant to cross with the markers lines,

pSCR:YFP (Koizumi et al., 2012) and *pWOX5:GFP* (Xu et al., 2006). The *SCR* gene is related to formative cell divisions, which originate from the cortex and endodermis, organizing the ground tissue in the roots (Fukaki et al., 1998). The F1 crosses, *apc11-1* × *pSCR:YFP*, did not show visible differences compared to the control crosses, WT × *pSCR:YFP* (**Supplementary Figure 8**). In contrast, the *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5* (*WOX5*) gene is expressed specially in the QC, and *apc11-1* crossed with *pWOX5:erGFP* plants showed a visible lower expression in 40% of the F1 seedlings (**Figure 4**). Additionally, we noticed a larger area expressing the *WOX5* marker in the mutant, indicating there are more or bigger cells with QC identity. Indeed, when we carefully looked at the QC cells (**Figure 4B**), we observed a bigger cell area of the QC compared to the control. Additionally, we observed a difference in the pattern of columella stem cells (CSC). As can be seen in **Figure 4B**, the *apc11.1* mutant shows starch granules in the cell layer below the QC, indicating that this layer is a differentiated columella cell (DCC), and not the CSC. To support the data obtained with *apc11-1* × *pWOX 5:erGFP*, the *amiR-apc11* line was also crossed with the *pWOX5:erGFP*



marker, and the results presented similar outcomes. The crossing displayed lower expression in QC cells compared to the WT (**Supplementary Figure 9**). The *amiR-apc11* also shows starch granules in the layer below the QC, and therefore these cells are differentiating. However, the cells next to it appear to be devoid of starch, suggesting that some properties of the stem cells remain. This would be in agreement with the QC-restricted expression of *WOX5:erGFP*.

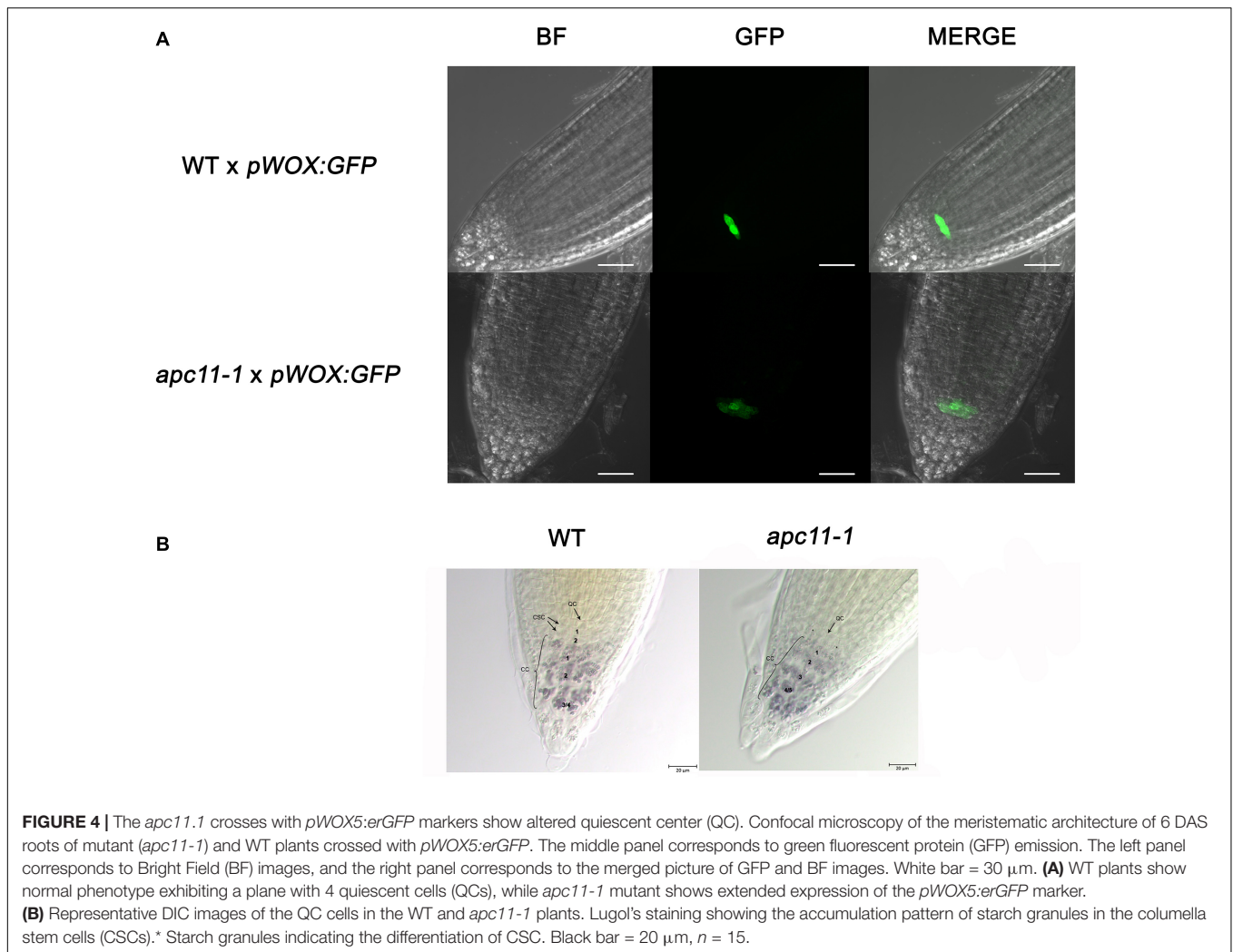
Together, our study on the role of APC11 in root development points toward an early effect of APC/C during the root development leading to a shorter RAM and overall root size.

To exclude the possibility that the observed phenotype on *apc11* roots is due to a disturbance in auxin distribution or localization, we tested the effect of APC11 downregulation in

the DR5 auxin responsive promoter (Sabatini et al., 1999). Our *apc11-1* mutant crossed with *pDR5:RFP* plants showed no effect in auxin response (**Supplementary Figure 10**).

Role of APC11 in Shoot Development

To address the effects of *apc11* mutation in shoot development, rosettes from *apc11-1* and *zyg1-2* were measured through development (**Supplementary Figure 4**). The data obtained showed a similar decrease in rosette size of the two *apc11* T-DNA mutant plants at 15, 35, and 50 DAS (**Supplementary Figure 5A**). The difference can be seen through consecutive time points (**Supplementary Figures 4B, 5A**), suggesting that the source of the observed phenotype may be from previous stages of development. Such observation implies that *apc11-1* and *zyg1-2*



plants did not manage to circumvent the APC/C impairment in the early development stages, leading to smaller plants in the final stages of development.

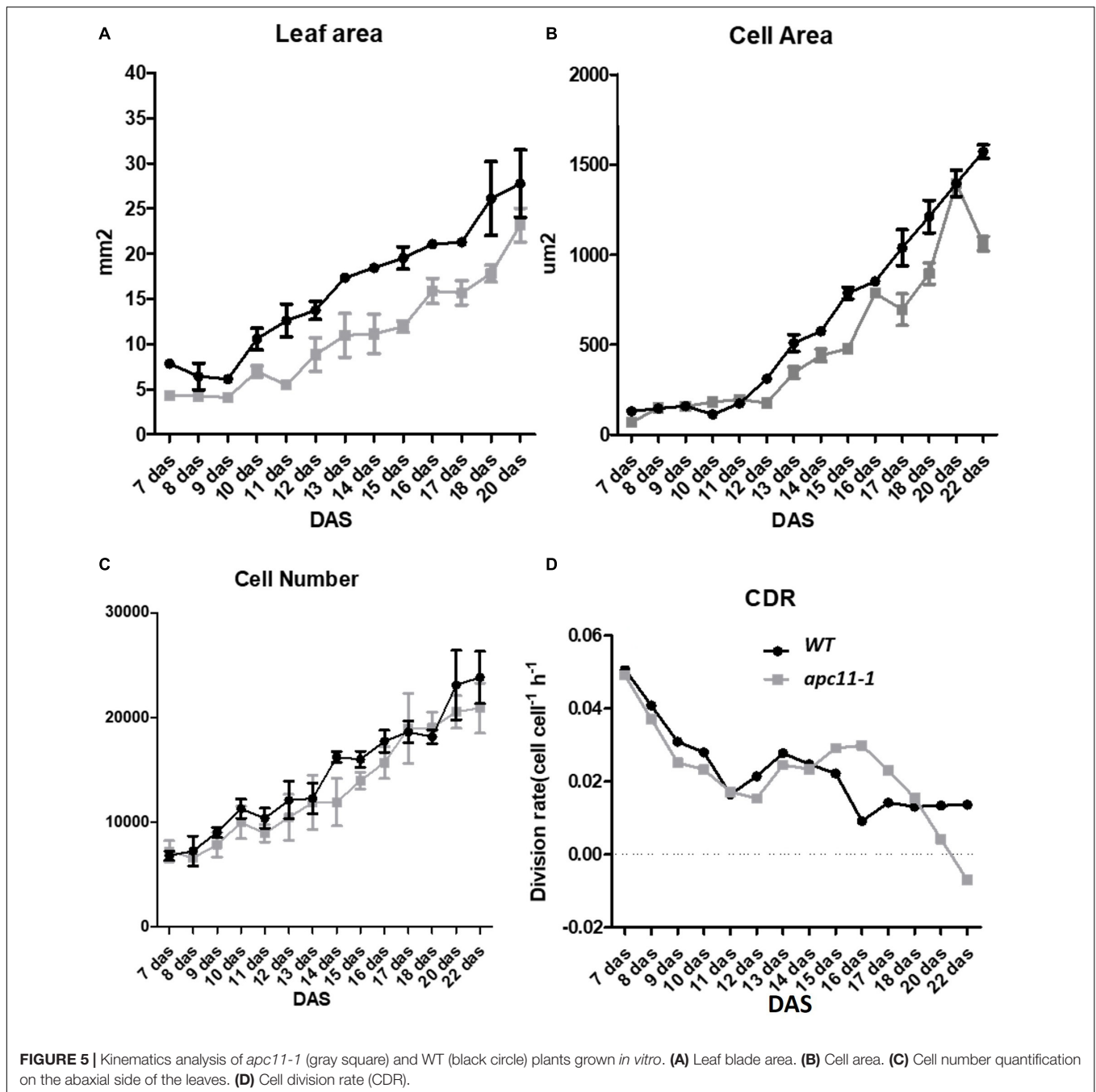
To shed light on the question about the difference observed in the rosette area during later development stages, and the cellular basis of this trait, the daily quantitative image of the first leaf pair were obtained from 7 to 22 DAS and used to measure the leaf blade area, the cell area, and the cell number of the abaxial epidermis from the *apc11-1* mutant. Together, the data were used to evaluate the cell division rate (CDR) (De Veylder et al., 2001).

In agreement with the reduced rosette phenotype observed, in the first days of leaf development, the *apc11-1* plants already displayed a smaller leaf area. This difference increased through 10 DAS, and at 13 DAS, leaves in the mutants were about 40% smaller than in the WT plants. At the mature stage, the *apc11-1* plants exhibited leaf blade area only 25% smaller (Figure 5A). Cellular measurements showed a similar cell number overall in the two groups, ranging from 7×10^4 up to 2×10^5 (Figure 5C). The average cell size in the control plants and *apc11-1* mutant was approximately the same from 7 to 11 DAS (Figure 5B). However, after 12 DAS onward, we observed an

average smaller cell area on *apc11-1* mutant compared to the WT, which became more pronounced at 15 DAS. Additionally, CDRs were calculated based on the cell number measurements, showing higher values between days 15 and 17 in the *apc11-1* (Figure 5D), and significantly dropping after this period, which is in agreement with what was observed in the expression profile of *CYCB1;1* and *CDKB2;1*, increase at 8 and 15 DAS, followed by a decrease at 25 DAS (Figure 1B). Taken together, the kinematics analyses indicate the influence of APC11 on leaf growth. Such difference is mainly due to a decrease in the cell area, with no difference in cell numbers, leading to a significant decrease in the CDR after 17 DAS.

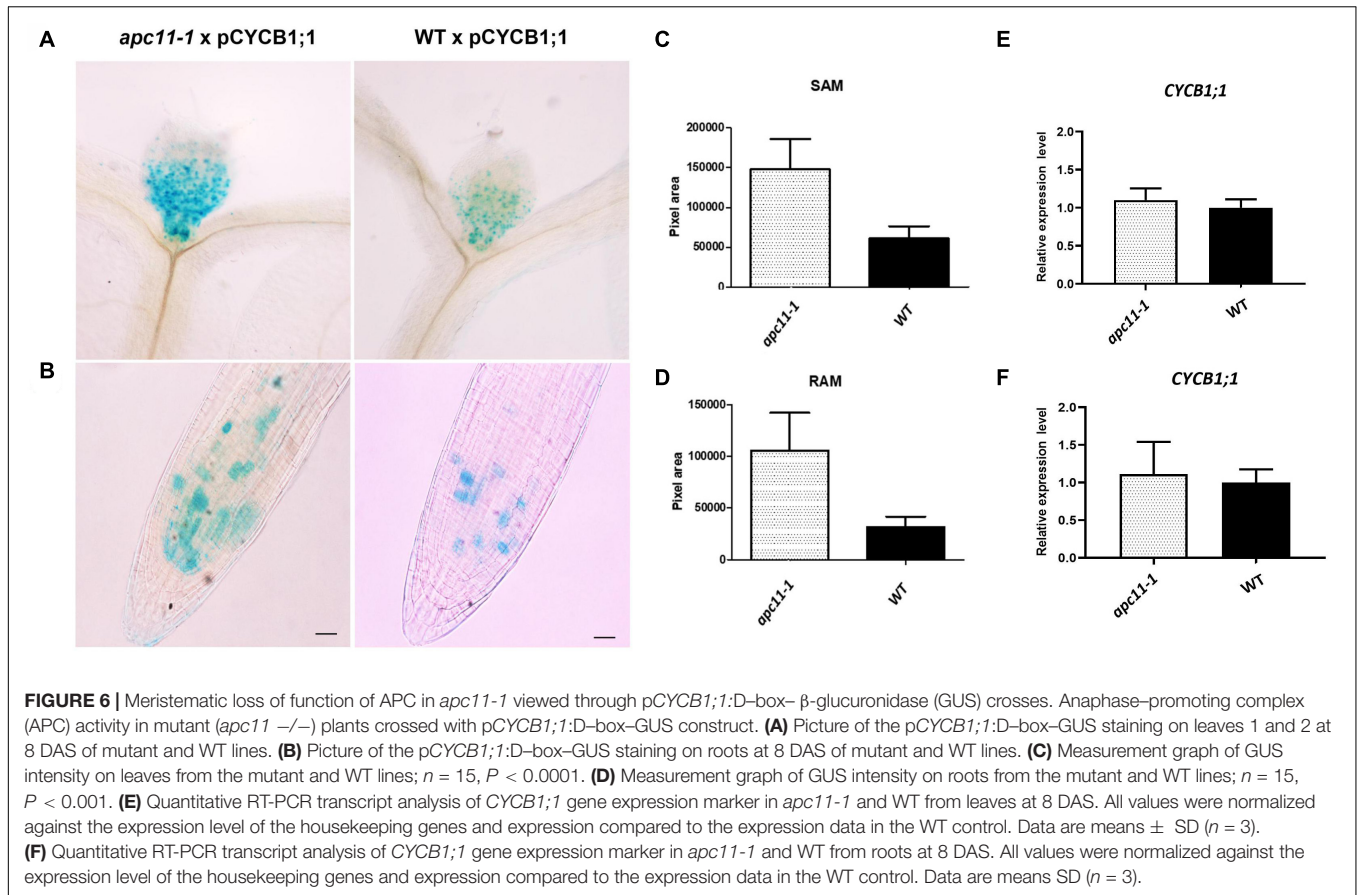
The Anaphase Promoting Complex/Cyclosome-Mediated CYCB1;1 Degradation on *apc11* Plants

Although our data pinpointed APC11 expression on meristems through GUS staining and involvement in both RAM and SAM development, a question regarding APC/C activity on these tissues still remained. To address it, we crossed



pCYCB1;1:D-box-GUS with *apc11-1* plants. The *pCYCB1;1:D-box-GUS* construct is expressed only in G₂/M transition and contains D-box, ensuring APC/C targeting proteolysis, and enabling quantitative analyses of transient mitotic and indirect APC/C activity (Colón-Carmona et al., 1999). We used *pCYCB1;1:D-box-GUS* crossed with WT as a control. Both SAM and RAM of 15 F₁ plants from each cross (*apc11.1* × *pCYCB1;1:D-box-GUS* and WT × *pCYCB1;1:D-box-GUS*) were collected, stained for GUS activity, and cleared with lactic acid. Magnified photographs were taken at 8 DAS and images were analyzed on ImageJ software (see “Materials

and Methods”). The GUS activity was positive in both groups in the meristem tissues (Figure 6). However, at 8 DAS, SAM and RAM patterns of *apc11* × *pCYCB1;1:D-box-GUS* crosses show more cells expressing the marker ($p < 0.0001$) with GUS staining positive cells. To exclude the possibility that the higher protein accumulation observed is due to the increased *CYCB1;1* expression, rather than the increased protein stabilization, the expression levels of *CYCB1;1* was checked by RT-qPCR in roots and leaves of *apc11-1* and WT plants at 8 DAS (Figures 6E,F). As shown in Figures 6E,F, the mRNA levels of *CYCB1;1* were not changed at this specific time point, which strongly suggests



that the knock-down of the *APC11* gene causes a decrease in the D-box-dependent proteolysis of *CYCB1;1*.

DISCUSSION

The anaphase promoting complex/cyclosome is a large multisubunit complex highly conserved through species (Capron et al., 2003; Eloy et al., 2011; Wang et al., 2012). As an enzyme that ubiquitylates target proteins for cell cycle progression, its main function is to recognize and mark proteins fated to degradation by UPS. The ability to ubiquitylate substrates depends on essential subunits, APC2 and APC11 (Tang et al., 2001), which together with APC10 and APC3 serve as a docking site for coactivators cell division cycle 20 (CDC20) or cell cycle switch52 (CCS52), that comprise the catalytic core (Heyman and De Veylder, 2012).

In this study, we provide insights into the functional characterization of the essential APC/C subunit, APC11, from *Arabidopsis thaliana*. We approached the function of the gene by using the T-DNA lines available, and generating *APC11* amiRNA lines, all of them showing decreased mRNA levels, confirmed through RT-qPCR. The *APC11* expression was diminished at all time points analyzed (8, 15, and 25 DAS) compared to WT (Figure 1 and Supplementary Figure 1). We also observed

the essential nature of *APC11*; as for the T-DNA lines, we could not restore any homozygous plants from full knock-out, confirming previous results (Guo et al., 2016). Indeed, inactivation of several APC/C subunits is lethal in all organisms studied; mutations in most APC/C subunits affect female and/or male gametogenesis, showing the essentiality of the core subunits (Yu et al., 1998; Yamashita et al., 1999; Cullen et al., 2000; Bentley et al., 2002; Garbe et al., 2004; Pál et al., 2007; Jin et al., 2010; Saleme et al., 2021).

Based on the analysis of the GUS reporter lines, *APC11* was expressed in almost all tissues analyzed. Initially, the GUS staining showed *APC11* promoter activity in cotyledonary stage embryos (Figure 2). At 6 DAS, *pAPC11:GUS* expression was observed in root meristems and secondary roots meristems. Additionally, *pAPC11:GUS* staining was present in both SAM and vascular cambium tissues of leaves. The expression pattern of *APC11* seems to be similar to what was observed for *APC4*, *NOMEGA*, *APC10*, and APC/C coactivator *CDC20* and the APC/C inhibitor, *UVI4* (Kwee and Sundaresan, 2003; Wang et al., 2012; Heyman et al., 2017) with the exception of APC/C coactivator, *CDC20* and *APC10*, which were not expressed in the vascular tissue and at RAM, respectively (Eloy et al., 2011; Kevei et al., 2011). Based on the GUS-staining pattern, *APC11* is present in combination with various APC/C subunits and regulators, indicating that the origin

of the observed phenotype depends on the activity of the complex as a whole.

The *apc11* mutants produced short roots as a result of the reduced root meristem, besides higher lateral root density (Figures 3C,E), which the latter being explained by higher expression levels of the cell division marker, *CYCB1;1* till 15 DAS (Figure 1B; Beeckman et al., 2001; Branco and Masle, 2019). Furthermore, *pWOX5:erGFP* plants crossed with *apc11-1* mutant showed weak and diffuse patterns on the QC GFP-WOX5 positive cells in 40% of the progenies (Figure 4 and Supplementary Figure 9) showing a larger area expressing the marker (Figure 4). As shown in Figure 4B, there is a disturbance in the QC cells, which display a bigger cell area compared to the WT plants; moreover, Lugol's staining indicates that *apc11-1* leads to a differentiation of the CSCs. Interestingly, there is also an extension of WOX5 marker expression in these cells, suggesting that these cells may have an intermediate differentiation status. Furthermore, in the *amiR-apc11* line, starch granules were observed in at least one of the CSCs, suggesting that differentiation of CSCs occurs only sporadically. In this mutant, there was no extent of WOX5 expression, suggesting that the *amiR-apc11* lines do not reduce the *APC11* levels to the same extent observed in the *apc11-1* mutant.

Downregulation of *APC11* can be correlated as an indicator of APC/C impairment observed by *pCYCB1;1: D-box-GUS* × *apc11* crosses. Our data present a clear increase in the number of GUS positive cells on RAM at 8 DAS (Figure 6B), suggesting a defective *CYCB1;1* degradation and its later accumulation. Moreover, the accumulation of *CYCB1;1* GUS positive cells observed in the *pCYCB1;1:D-box-GUS* × *apc11* SAM crosses (Figure 6A), pinpoints toward an APC/C failure in *CYCB1;1* degradation in the SAM as well.

Based on the kinematics analysis, the leaf size of *apc11-1* exhibited differences already at 7–10 DAS (Figure 5A), indicating a common control in the shoot and root size development through *APC11*. On the other hand, leaf analyses between 7 and 10 DAS do show neither cell number nor cell area alterations (Figures 5B,C). On consecutive days until 13 DAS, the *apc11-1* leaves had 40% less area than WT. Furthermore, after the 13th DAS, the cell area in the *apc11-1* mutant was also compromised in our kinematic analyses (Figure 5B). From 17 to 22 DAS, the *apc11-1* mutants could restore some of the differences in the leaf area, exhibiting only a 25% smaller leaf blade area (Figure 5A). In this regard, cell division compensation could be occurring in *apc11-1* after 15 DAS (Figure 5D). Indeed, at the same time frame, an increasing trend in *CYCB1;1* and *CDKB2;1* expression could be driving such process (Figure 1). It is noteworthy a difference in the division rate observed from 15 to 17 days, showing a higher CDR in the mutant plants; indeed when we observed the expression profile on those plants, both cell cycle markers for division are upregulated at 15 DAS. However, after 17 DAS, the CDR drastically fell down compared to WT, which is again followed by a decrease in the expression profile of *CYCB1;1* and *CDKB2;1*. Although our expression data showed *CYCB1;1* upregulation at 15 DAS, followed by downregulation at 25 DAS. We could speculate that

this difference would be more visible if the sampling of the material used for the expression analysis were from the roots or the young leaves.

Our results indicate that it is possible, to a large extent, that defects in *APC11* activity interfere with cell expansion, since the cell area in *apc11-1* mutants display a smaller area at several time points (Figure 5B), and less differences in cell numbers compared to WT plants (Figure 5C). A shift of APC/C action through mechanisms influenced by other subunits, such as *APC2* and *APC7* could explain the compensatory leaf growth effect on later time points (Eloy et al., 2006). Furthermore, as the plant develops, it is expected that cell cycle genes progressively diminish their expression (Eloy et al., 2006) as seen in the transcription profile of *APC11*, consequently lessening the role of *APC11* in the phenotypic appearance. In fact, reports on tomato *CCS52A* downregulation lead to *CYCA3;1* accumulation (Mathieu-Rivet et al., 2010) and S-specific controller likely involved in endoreplication, thus resulting in cell expansion (Takahashi et al., 2010). In tomato fruits, in the overexpressing *CCS52A*, the endoreplication was initially delayed, altering the fruit size, but later in time, a compensatory effect recovers the fruit size (Mathieu-Rivet et al., 2010).

Apc11 mutant plants showed diminished mRNA levels causing a reduced function of the complex in both SAM and RAM, as a consequence of an impaired APC/C ubiquitination activity leading to deficient proteolysis of *CYCB1;1*, resulting in a clear protein accumulation (Figure 6). Such impairment of the APC/C brings early effects on embryogenesis, with decreased expression levels of the WOX5 marker in the root QC with more cells expressing it, in addition to a smaller meristem size and overall root length. Further, on plant development, the shoot analyses also show the effect of *APC11* knockdown on rosette size, probably interfering with the sophisticated mode of activity of APC/C through its subunit interaction, culminating in reduced cell area, hence smaller leaf size.

In conclusion, our study shows the essential role of *APC11* for plant viability, and for the proper maintenance of cell division controlled by the regulation of APC/C activity through the *APC11* subunit, which seems to play an important role during leaf and root growth and development.

AUTHOR'S NOTE

This study is dedicated to the memory of the last author, Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira, who passed away on July 22, 2020. He will be greatly missed by many, both inside and outside of the scientific community.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PCGF, NBE, and ASH conceived and designed the experiments. RPS, MLSS, IAR, and PFM performed the experiments. RPS, MLSS, and NBE analyzed the data. RPS, NBE, and PCGF wrote the manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

FUNDING

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for graduate fellowships (RPS and PFM) and research grants to ASH and PCGF. São Paulo Research Foundation (FAPESP), NBE (2017/1033-8); MLSS (2020/00888-5) and IAR (2020/02353-1). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

REFERENCES

- Alexander, M. P. (1969). Differential staining of aborted and non aborted pollen. *J. Stain Technol.* 44, 117–122. doi: 10.3109/10520296909063335
- Beeckman, T., Bursens, S., and Inzé, D. (2001). The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 52, 403–411. doi: 10.1093/jexbot/52.suppl_1.403
- Bentley, A. M., Williams, B. C., Goldberg, M. L., and Andres, A. J. (2002). Phenotypic characterization of *Drosophila* ida mutants: defining the role of APC5 in cell cycle progression. *J. Cell Sci.* 115, 949–961.
- Blilou, I., Frugier, F., Folmer, S., Serralbo, O., Willemsen, V., Wolkenfelt, H., et al. (2002). The *Arabidopsis* HOBBIT gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes Dev.* 16, 2566–2575. doi: 10.1101/gad.237302
- Boruc, J., Van den Daele, H., Hollunder, J., Rombauts, S., Mylle, E., Hilson, P., et al. (2010). Functional modules in the *Arabidopsis* core cell cycle binary protein-protein interaction network. *Plant Cell* 22, 1264–1280. doi: 10.1105/tpc.109.073635
- Boudolf, V., Lammens, T., Boruc, J., Van Leene, J., Van Den Daele, H., Maes, S., et al. (2009). CDKB1;1 forms a functional complex with CYCA2;3 to suppress endocycle onset. *Plant Physiol.* 150, 1482–1493. doi: 10.1104/pp.109.140269
- Branco, R., and Masle, J. (2019). Systemic signalling through translationally controlled tumour protein controls lateral root formation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 15, 3927–3940. doi: 10.1093/jxb/erz204
- Capron, A., Serralbo, O., Fülöp, K., Frugier, F., Parmentier, Y., Dong, A., et al. (2003). The *Arabidopsis* anaphase-promoting complex or cyclosome: molecular and genetic characterization of the APC2 subunit. *Plant Cell* 15, 2370–2382. doi: 10.1105/tpc.013847
- Clough, S. J., and Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., and Doerner, P. (1999). Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20, 503–508. doi: 10.1046/j.1365-313x.1999.00620.x
- Cullen, C. F., May, K. M., Hagan, I. M., Glover, D. M., and Ohkura, H. (2000). A new genetic method for isolating functionally interacting genes: high plo1(+)-dependent mutants and their suppressors define genes in mitotic and septation pathways in fission yeast. *Genetics* 155, 1521–1534.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beeckman, G. T., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., et al. (2001). Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1653–1668. doi: 10.1105/tpc.010087
- Dewitte, W., Scofield, S., Alcasabas, A. A., Maughan, S. C., Menges, M., Braun, N., et al. (2007). *Arabidopsis* CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 14537–14542. doi: 10.1073/pnas.0704166104

(CAPES) for fellowships and FAPERJ for research grants to ASH and PCGF.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ben Scheres for the WOXY5-ERGFP marker line, and Mariana Andrade Rocha for her contribution in preparing the figures.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.563760/full#supplementary-material>

- Edgar, B. A., Zielke, N., and Gutierrez, C. (2014). Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 197–210. doi: 10.1038/nrm3756
- Eloy, N. B., Coppens, F., Beeckman, G. T., Hemery, A. S., and Ferreira, P. C. (2006). The *Arabidopsis* anaphase promoting complex (APC): regulation through subunit availability in plant tissues. *Cell Cycle* 5, 1957–1965. doi: 10.4161/cc.5.17.3125
- Eloy, N. B., de Freitas Lima, M., Van Damme, D., Vanhaeren, H., Gonzalez, N., De Milde, L., et al. (2011). The APC/C subunit 10 plays an essential role in cell proliferation during leaf development. *Plant J.* 68, 351–363. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04691.x
- Eloy, N. B., Lima, M. F., Ferreira, P. C. G., and Inzé, D. (2015). The role of the anaphase-promoting complex/cyclosome in plant growth. *Crit. Rev. Plant Sci.* 34, 487–505. doi: 10.1080/07352689.2015.1078613
- Forzani, C., Aichinger, E., Sornay, E., Willemsen, V., Laux, T., Dewitte, W., et al. (2014). WOXY5 suppresses CYCLIN D activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Curr. Biol.* 24, 1939–1944. doi: 10.1016/j.cub.2014.07.019
- Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Kato, T., Fujisawa, H., Benfey, P. N., and Tasaka, M. (1998). Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 14, 425–430. doi: 10.1046/j.1365-313X.1998.00137.x
- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., et al. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* 449, 1053–1057. doi: 10.1038/nature06206
- Garbe, D., Doto, J. B., and Sundaram, M. V. (2004). *Caenorhabditis elegans* lin-35/Rb, efl-1/E2F and other synthetic multivulva genes negatively regulate the anaphase-promoting complex gene mat-3/APC8. *Genetics* 167, 663–672. doi: 10.1534/genetics.103.026021
- Genschik, P., Criqui, M. C., Parmentier, Y., Derevier, A., and Fleck, J. (1998). Cell cycle -dependent proteolysis in plants. Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor mg132. *Plant Cell* 10, 2063–2076. doi: 10.1105/tpc.10.12.2063
- Genschik, P., Marrocco, K., Bach, L., Noir, S., and Criqui, M. C. (2014). Selective protein degradation: a rheostat to modulate cell-cycle phase transitions. *J. Exp. Bot.* 65, 2603–2615. doi: 10.1093/jxb/ert426
- Guo, L., Jiang, L., Zhang, Y., Lu, X. L., Xie, Q., Weijers, D., et al. (2016). The anaphase-promoting complex initiates zygote division in *Arabidopsis* through degradation of cyclin B1. *Plant J.* 86, 161–174. doi: 10.1111/tpj.13158
- Heyman, J., and De Veylder, L. (2012). The anaphase-promoting complex/cyclosome in control of plant development. *Mol. Plant.* 5, 1182–1194. doi: 10.1093/mp/sss094
- Heyman, J., Cools, T., Vandebussche, F., Heyndrickx, K. S., Van Leene, J., Vercauteren, I., et al. (2013). ERF115 controls root quiescent center cell

- division and stem cell replenishment. *Science* 342, 860–863. doi: 10.1126/science.1240667
- Hemerly, A., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Inzé, D., and Ferreira, P. (1992). Genes regulating the plant cell cycle: isolation of a mitotic-like cyclin from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89, 3295–3299. doi: 10.1073/pnas.89.8.3295
- Heyman, J., Polyn, S., Eekhout, T., and De Veylder, L. (2017). Tissue-specific control of the endocycle by the anaphase promoting complex/cyclosome inhibitors UVI4 and DEL1. *Plant Physiol.* 175, 303–313. doi: 10.1104/pp.17.00785
- Horiguchi, G., Ferjani, A., Fujikura, U., and Tsukaya, H. (2006). Coordination of cell proliferation and cell expansion in the control of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* 119, 37–42. doi: 10.1007/s10265-005-0232-4
- Jin, F., Hamada, M., Malureanu, L., Jeganathan, K. B., Zhou, W., Morbeck, D. E., et al. (2010). Cdc20 is critical for meiosis I and fertility of female mice. *PLoS Genet.* 6:e1001147. doi: 10.1371/journal.pgen.1001147
- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7, 193–195. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02251-3
- Kevei, Z., Baloban, M., Da Ines, O., Tiricz, H., Kroll, A., Regulski, K., et al. (2011). Conserved CDC20 cell cycle functions are carried out by two of the five isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 6:e20618. doi: 10.1371/journal.pone.0020618
- Koizumi, K., Hayashi, T., and Gallagher, K. L. (2012). SCARECROW reinforces SHORT-ROOT signaling and inhibits periclinal cell divisions in the ground tissue by maintaining SHR at high levels in the endodermis. *Plant Signal. Behav.* 7, 1573–1577. doi: 10.4161/psb.22437
- Komaki, S., and Sugimoto, K. (2012). Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues. *Plant Cell Physiol.* 53, 953–964. doi: 10.1093/pcp/pcs070
- Kwee, H. S., and Sundaresan, V. (2003). The NOMEA gene required for female gametophyte development encodes the putative APC6/CDC16 component of the anaphase promoting complex in *Arabidopsis*. *Plant J.* 36, 853–866. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01925.x
- Mathieu-Rivet, E., Gévaudan, F., Sicard, A., Salar, S., Do, P. T., Mouras, A., et al. (2010). Functional analysis of the anaphase promoting complex activator CCS52A highlights the crucial role of endo-reduplication for fruit growth in tomato. *Plant J.* 62, 727–741. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04198.x
- Menges, M., and Murray, J. A. (2002). Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J.* 30, 203–212. doi: 10.1046/j.1365-313x.2002.01274.x
- Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W., and Murray, J. A. (2003). Genome-wide gene expression in an *Arabidopsis* cell suspension. *Plant Mol. Biol.* 53, 423–442. doi: 10.1023/B:PLAN.0000019059.56489.ca
- Meyerowitz, E. M. (1997). Plants and the logic of development. *Genetics* 145, 5–9. doi: 10.1016/S0962-8924(99)01649-9
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–477. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nowack, M. K., Harashima, H., Dissmeyer, N., Zhao, X., Bouyer, D., Weimer, A. K., et al. (2012). Genetic framework of cyclin-dependent kinase function in *Arabidopsis*. *Dev. Cell.* 22, 1030–1040. doi: 10.1016/j.devcel.2012.02.015
- Pál, M., Nagy, O., Ménesi, D., Udvardy, A., and Deák, P. (2007). Structurally related TPR subunits contribute differently to the function of the anaphase-promoting complex in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Sci.* 120, 3238–3248. doi: 10.1242/jcs.004762
- Peters, J. M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 644–656. doi: 10.1038/nrm1988
- Primorac, I., and Musacchio, A. (2013). Pantarhei: the APC/C at steady state. *J. Cell Biol.* 201, 177–189. doi: 10.1083/jcb.201301130
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., et al. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99, 463–472.
- Saleme, M., Andrade, I. R., and Eloy, N. B. (2021). The role of anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) in plant reproduction. *Front. Plant Sci.* 12:642934. doi: 10.3389/fpls.2021.642934
- Scheres, B. (1997). Cell signaling in root development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 501–506. doi: 10.1016/S0959-437X(97)80077-9
- Schnittger, A., Schöbinger, U., Bouyer, D., Weigl, C., Stierhof, Y. D., and Hülskamp, M. (2002). Ectopic D-type cyclin expression induces not only DNA replication but also cell division in *Arabidopsis* trichomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99, 6410–6415. doi: 10.1073/pnas.092657299
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., and Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1121–1133. doi: 10.1105/tpc.105.039834
- Segers, G., Gadisseur, I., Bergounioux, C., de Almeida Engler, J., Jacqmar, A., Van Montagu, M., et al. (1996). The *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase gene *cdc2bAt* is preferentially expressed during S and G₂ phases of the cell cycle. *Plant J.* 10, 601–612. doi: 10.1046/j.1365-313x.1996.10040601.x
- Shimotomoh, A., Heidstra, R., Bilou, I., and Scheres, B. (2018). Root stem cell niche organizer specification by molecular convergence of PLETHORA and SCARECROW transcription factor modules. *Genes Dev.* 32, 1085–1100. doi: 10.1101/gad.314096.118
- Somssich, M., Je, B. I., Simon, R., and Jackson, D. (2016). CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Development* 143, 3238–3248. doi: 10.1242/dev.133645
- Steeves, T. A., and Sussex, I. M. (1989). Patterns in plant development. *Nor. J. Bot.* 11, 204–204. doi: 10.1111/j.1756-1051.1991.tb01820.x
- Takahashi, I., Kojima, S., Sakaguchi, N., Umeda-Hara, C., and Umeda, M. (2010). Two *Arabidopsis* cyclin A3s possess G1 cyclin-like features. *Plant Cell Rep.* 29, 307–315. doi: 10.1007/s00299-010-0817-9
- Tang, Z., Li, B., Bharadwaj, R., Zhu, H., Ozkan, E., Hakala, K., et al. (2001). APC2 Cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. *Mol. Biol. Cell* 12:3839. doi: 10.1091/mbc.12.12.3839
- Van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390, 287–289. doi: 10.1038/36856
- Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., et al. (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Syst. Biol.* 6:397. doi: 10.1038/msb.2010.53
- Vanneste, S., Coppens, F., Lee, E., Donner, T. J., Xie, Z., Isterdael, G. V., et al. (2011). Developmental regulation of CYCA2s contributes to tissue-specific proliferation in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 30, 3430–3441.
- Vanstraelen, M., Baloban, M., Da Ines, O., Cultrone, A., Lammens, T., Boudolf, V., et al. (2009). APC/C-CCS52A complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 11806–11811. doi: 10.1073/pnas.0901193106
- Walker, S. E., and Lorsch, J. (2013). RNA purification–precipitation methods. *Methods Enzymol.* 530, 337–343. doi: 10.1016/B978-0-12-420037-1.00019-1
- Wang, Y., Hou, Y., Gu, H., Kang, D., Chen, Z., Liu, J., et al. (2012). The *Arabidopsis* APC4 subunit of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is critical for both female gametogenesis and embryogenesis. *Plant J.* 69, 227–240. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04785.x
- Wolgemuth, D. J. (2011). Function of the A-type cyclins during gametogenesis and early embryogenesis. *Results Probl. Cell Differ.* 53, 391–413. doi: 10.1007/978-3-642-19065-0_17
- Xu, J., Hofhuis, H., Heidstra, R., Sauer, M., Friml, J., and Scheres, B. (2006). A molecular framework for plant regeneration. *Science* 311, 385–388. doi: 10.1126/science.1121790
- Yamashita, Y. M., Nakaseko, Y., Kumada, K., Nakagawa, T., and Yanagida, M. (1999). Fission yeast APC/cyclosome subunits, Cut20/Apc4 and Cut23/Apc8, in regulating metaphase-anaphase progression and cellular stress responses. *Genes Cells* 4, 445–463. doi: 10.1046/j.1365-2443.1999.00274.x

Yu, H., Peters, J. M., King, R. W., Page, A. M., Hieter, P., and Kirschner, M. W. (1998). Identification of a cullin homology region in a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science* 279, 1219–1222. doi: 10.1126/science.279.5354.1219

Zhao, X., Harashima, H., Dissmeyer, N., Pusch, S., Weimer, A. K., Bramsipe, J., et al. (2012). A general G1/S-phase cell-cycle control module in the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 8:e1002847. doi: 10.1371/journal.pgen.1002847

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Schwedersky, Saleme, Rocha, Montessoro, Hemerly, Eloy and Ferreira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.