

A PROTEÍNAQUINASE MONOPOLAR SPINDLE 1 (MPS1) DE PLANTAS: PAPEL  
NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVO DE  
SEMENTES.

**EDUARDO ALVES GAMOSA DE OLIVEIRA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –  
UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL – 2017



**A PROTEINA QUINASE MONOPOLAR SPINDLE 1 (MPS1) DE PLANTAS:  
PAPEL NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVO DE  
SEMENTES**

**EDUARDO ALVES GAMOSA DE OLIVEIRA**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), como parte das exigências para obtenção do Grau de Doutor em Biociências e Biotecnologia, modalidade Biologia Celular

**ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup>. ANTÔNIA ELENIR AMÂNCIOOLIVEIRA**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**ABRIL DE 2017**

**A PROTEÍNA QUINASE MONOPOLAR SPINDLE 1 (MPS1) DE PLANTAS:  
PAPEL NA DETERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVOS  
DE SEMENTES**

**EDUARDO ALVES GAMOSA DE OLIVEIRA**

Tese apresentadas ao Centro de Biociência e Biotecnologia (CBB) na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), como parte das exigências para obtenção do grau de Doutor em Biociências e Biotecnologia, modalidade Biologia Celular.

Aprovado em: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Dr<sup>a</sup>. Clícia Grativol Gaspar de Matos (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – LQFPP/CBB)

---

Dr. Daniel Basílio Zandonadi (Universidade Federal do Rio de Janeiro Campus Macaé - Professor Aloísio Teixeira – LBV/NUPEM)

---

Dr. Thiago Motta Venâncio (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – LQFPP/CBB)

---

Dr. Marco Antônio Lopes Cruz – Co-orientador (Universidade Federal do Rio de Janeiro Campus Macaé – Professor Aloísio Teixeira)

---

Dr<sup>a</sup>. Antônia Elenir Amâncio Oliveira – Orientadora (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro)

Dedico este trabalho a todos os meus familiares e a minha amada noiva Lílian Mariane de Oliveira Bento por todo apoio incondicional nesta jornada.

## **AGRADECIMENTOS:**

Agradeço aos meus orientadores, prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Antônia Elenir Amâncio Oliveira e prof. Dr. Marco Antônio Lopes Cruz por todos os anos de supervisão e ensinamentos que certamente me acompanharão pelo resto da minha vida profissional.

A banca examinadora, Dr<sup>a</sup> Clícia Grativol Gaspar de Matos, Dr. Daniel Basílio Zandonadi e Dr. Thiago Motta Venâncio.

A todos os docentes que colaboraram direta e indiretamente no desenvolvimento deste trabalho: Dr. Thiago Motta Venâncio, Dr. Vanildo Silveira, Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho, Dr<sup>a</sup>. Claudete Santa-Catarina, Dr<sup>a</sup>. Nelilma Correia Romeiro, Dr<sup>a</sup>. Elane da Silva Ribeiro e Dr<sup>a</sup> Olga Lima Tavares Machado, Dr<sup>a</sup> Kátia V. S. Fernandes e Dr<sup>a</sup>. Clícia Grativol.

Aos meus amigos, Daniel Bellieny Rabelo, Kayan Eudorico Ventury Baptista e Lupis Ribeiro por toda a interação científica que é fundamental para o crescimento intelectual de qualquer profissional e também por todos os momentos de descontração e camaradagem que são fundamentais para aliviar as pressões do dia-a-dia de trabalho que a todos afetam.

Aos meus colegas de laboratório, Janaína Macedo, Leonardo Figueira Reis de Sá, Roberta Bessa pelo companheirismo e prontidão para oferecer ajuda sempre que necessário.

Thank you Rajesh Gazara and Kanhu Moharana for all the help with bioinformatics. You were life savers!

A toda equipe do LQFPP (alunos, docentes e técnicos). Todos contribuem para o progresso da ciência, num país tão carente de conhecimento.

Agradeço também a toda equipe do laboratório de Biotecnologia Vegetal (UFRJ *Campus Macaé*), coordenado pelo meu co-orientador, prof. Dr. Marco Antônio Lopes Cruz que participaram do desenvolvimento desse projeto e continuarão a desenvolvê-lo pelos anos a seguir.

Agradeço aos meus pais Rui Alves de Oliveira e Maria do Socorro Alves Gamosa de Oliveria e a toda minha família por todo o apoio durante todos esses anos de

minha formação, desde o início da minha graduação. Foi uma caminhada longa e nem todos encontram o apoio necessário para percorrer essa jornada em seus familiares.

Finalmente, agradeço à minha noiva amada, Lílian Mariane de Oliveira Bento que me ofereceu apoio incondicional e teve temperança durante esses quatro anos para resistir à saudade constante e à distância que nos separa. Em muitos momentos nossa separação foi difícil e a fez sofrer de formas que eu jamais desejaria porém você nunca deixou de acreditar de me apoiar e de compreender que esse sacrifício vale à pena. Poucos teriam a paciência e compreensão para entender os sacrifícios que esta empreitada demanda. Também estendo este agradecimento aos meus futuros sogros Sérgio e Angelina Bento.

**Obrigado a todos!**

## SUMÁRIO:

LISTA DE FIGURAS:.....	x
LISTA DE TABELAS: .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS:.....	xvi
RESUMO: .....	xviii
ABSTRACT: .....	xx
1. INTRODUÇÃO: .....	1
1.1. O Ciclo Celular:.....	1
1.2. O ciclo celular em plantas: .....	1
1.3. Principais elementos de regulação do ciclo celular em plantas: .....	4
1.3.1. Proteínas quinase dependentes de ciclinas (CDKs): .....	4
1.3.2. Ciclinas (CYCs): .....	7
1.4. Pontos de monitoramento do ciclo celular: .....	9
1.4.1. A transição G <sub>1</sub> /S:.....	10
1.4.2. A transição G <sub>2</sub> /M: .....	11
1.4.3. A transição metáfase-anáfase (a via SAC e o APC/C):.....	11
2. OBJETIVOS:.....	14
2.1. Objetivos específicos: .....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS:.....	15
3.1. Análises computacionais:.....	15
3.1.1. Identificação dos ortólogos da MPS1 em <i>Glycine max</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> e <i>Sorghum bicolor</i> : .....	15
3.1.2. Identificação de motifs de interação proteína-proteína nos ortólogos da MPS1 de <i>Glycine max</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> e <i>Sorghum bicolor</i> : .....	15
3.1.3. Modelagem molecular dos domínios quinase da MPS1 de <i>Glycine max</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> e <i>Sorghum bicolor</i> : .....	16
3.1.4. Docking molecular da MPS1 com o inibidor SP600125: .....	17
3.2. Material vegetal: .....	18
3.3. Higienização e Condições de cultivo:.....	19
3.3.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> : .....	19
3.3.2. <i>Glycine max</i> (soja): .....	19



3.3.3. <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) e <i>Sorghum bicolor</i> (sorgo):.....	20
3.4. Inibição da atividade da MPS1 de plantas com SP600125 durante a germinação e o desenvolvimento pós-germinativo: .....	20
3.5. Reversão da inibição da MPS1 em plântulas de <i>A. thaliana</i> : .....	21
3.5.1. Revelação da atividade da $\beta$ -glucoronidase em tecidos vegetais (revelação de GUS) e quantificação da intensidade da coloração nos tecidos: .....	22
3.6. Análise proteômica: .....	23
3.6.1. Extração de proteínas e digestão protéica: .....	23
3.6.2. Espectrometria de massas: .....	24
3.6.3. Análise computacional dos resultados gerados pela espectrometria de massas: .....	24
3.7. Ensaio de inibição <i>in vitro</i> da MPS1 de <i>A. thaliana</i> :.....	25
4. RESULTADOS: .....	26
4.1. Identificação dos ortólogos da MPS1 de <i>A. thaliana</i> em <i>G.max</i> , <i>S.lycopersicum</i> e <i>S. bicolor</i> e análise computacional da presença de <i>motifs</i> de interação relevantes no contexto do ciclo celular:.....	26
4.2. Análise da conservação estrutural dos ortólogos da MPS1 de <i>A. thaliana</i> em com <i>G. max</i> , <i>S. lycopersicum</i> e <i>S. bicolor</i> :.....	44
4.3. Avaliação do potencial de interação entre os ortólogos da MPS1 com o inibidor SP600125 utilizando ancoramento molecular ( <i>docking</i> ):.....	47
4.4. Ensaio de inibição <i>in vitro</i> do domínio quinase purificado da MPS1 de <i>A. thaliana</i> : .....	67
4.5. Inibição do desenvolvimento pós-germinativo de plântulas de <i>G.max</i> , <i>S. lycopersicum</i> e <i>S. bicolor</i> após tratamento com o inibidor SP600125:.....	67
4.6. Avaliação do potencial de reversão do efeito inibitório do SP600125 sobre o desenvolvimento pós-germinativo de plântulas <i>A. thaliana</i> :.....	72
4.7. Avaliação da atividade GUS em plântulas transformadas de <i>A. thaliana</i> em experimentos e inibição e reversibilidade: .....	74
4.8. Análise proteômica de raízes de plântulas de <i>A. thaliana</i> após reversão da inibição do desenvolvimento pós-germinativo por SP600125: .....	78
5. DISCUSSÃO: .....	84
6. CONCLUSÕES: .....	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	92

## LISTA DE FIGURAS:

<b>Figura 1:</b> Exemplo da plasticidade morfológica de plantas em resposta a estímulos ambientais. Árvores controlam seu desenvolvimento de forma a seguir a direção dos ventos dominantes da região, evitando assim a quebra do tronco e galhos. Fonte: <a href="http://www.praiasdopiaui.com.br">www.praiasdopiaui.com.br</a> por Marco Félix (último acesso em 04 de Abril de 2017).....	2
<b>Figura 2:</b> Esquema da organização do ciclo celular e sua divisão em quatro etapas distintas. Fonte: traduzido e adaptado de (HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008).....	4
<b>Figura 3:</b> Esquema resumido da expressão de diferentes CYCs e CDKs ao longo das fases do ciclo celular. Fonte: (DE VEYLLDER; BEECKMAN; INZÉ, 2007). ....	5
<b>Figura 4:</b> Esquema simplificado da dinâmica de expressão das diferentes ciclinas e CDKs que atuam na regulação do ciclo celular. Essa é uma representação básica que reflete um panorama geral dos eventos que ocorrem em toda a linhagem dos eucariotos. A linha azul indica a curva de expressão de ciclinas que participam exclusivamente da fase G <sub>1</sub> ; linha vermelha ciclinas que iniciam sua atividade ao fim da fase G <sub>1</sub> até os primeiros eventos da fase M e linha verde ciclinas que atuam principalmente na transição G <sub>2</sub> /M. Fonte: (BRUCE ALBERTS, ALEXANDER JOHNSON, JULIAN LEWIS, DAVID MORGAN, MARTIN RAFF, KEITH ROBERTS, 2014). ....	6
<b>Figura 5:</b> Representação simplificada da dinâmica de expressão das ciclinas A-, B- e D-, envolvidas na regulação do ciclo celular em plantas. Fonte: (SCOFIELD; JONES; MURRAY, 2014).....	8
<b>Figura 6:</b> Esquema da distribuição dos três pontos de monitoramento do ciclo celular que ocorrem nos estágios de transição entre as 4 fases do ciclo celular.....	9
<b>Figura 7:</b> Fórmula molecular do inibidor SP600125. ....	17
<b>Figura 8:</b> Atlas de expressão dos ortólogos da MPS1 de <i>A. thaliana</i> em <i>G. max</i> . A: Glyma.04g252700.1; B: Glyma.13g083100; C: Glyma06g109800 e D: Glyma.14g164400. As barras superiores (bege) indicam todos os transcritos e as barras inferiores (azul) indicam os valores médios de transcrição, considerando diferentes tecidos da planta (vagem, folha, raiz, nódulos radiculares, semente, meristema apical, haste e flor); Fonte: <a href="http://phytozome.jgi.doe.gov/jbrowse">phytozome.jgi.doe.gov/jbrowse</a> . ....	29
<b>Figura 9:</b> Alinhamento múltiplo das seqüências do domínio quinase dos ortólogos da MPS1 de <i>A. thaliana</i> e <i>G.max</i> .. Vermelho - loop de ativação; preto – <i>motif</i> DFG; azul escuro – treoninas de ativação e verde – sitio de ligação a ATP e sitio ativo. ....	30
<b>Figura 10:</b> Alinhamento múltiplo das seqüências do domínio quinase dos ortólogos da MPS1 de <i>A. thaliana</i> e <i>S. bicolor</i> .. Vermelho - loop de ativação; preto – <i>motif</i> DFG; azul escuro – treoninas de ativação e verde: sitio de ligação a ATP e sitio ativo. ....	32
<b>Figura 11:</b> Alinhamento múltiplo das seqüências do domínio quinase dos ortólogos da MPS1 de <i>A. thaliana</i> e <i>S. lycopersicum</i> .. Vermelho - loop de ativação; preto – <i>motif</i> DFG; azul escuro – treoninas de ativação e verde – sitio de ligação a ATP e sitio ativo.....	33
<b>Figura 12:</b> Comparação da presença de <i>motifs</i> de interação proteína-proteína no domínio quinase da MPS1 de <i>A. thaliana</i> (A) e do ortólogo Glyma04g252700.1 de <i>G.max</i> (B). Vermelho: DOC_CYCLIN_1; Azul escuro:DOC_MAPK_gen_1; Preto: DEG_APCC_DBOX_1; Magenta: LIG_MAD2, 14-3-3_CanoR_1 e MOD_SUMO_rev_2, Laranja: MOD_NEK2_1; Verde limão: MOD_NEK2_2 e Verde escuro: LIG_SUMO_SIM_par_1. ....	37
<b>Figura 13:</b> Comparação da presença de <i>motifs</i> de interação proteína-proteína no domínio quinase da MPS1 de <i>A. thaliana</i> (A) e dos ortólogos da família gênica Glyma06g109800 de <i>G.max</i> (B). Vermelho: DOC_CYCLIN_1; Azul escuro:DOC_MAPK_gen_1; Preto: DEG_APCC_DBOX_1; Magenta: LIG_MAD2, 14-3-3_CanoR_1 e MOD_SUMO_rev_2, Laranja: MOD_NEK2_1; Verde limão: MOD_NEK2_2 e Verde escuro: LIG_SUMO_SIM_par_1. ....	38
<b>Figura 14:</b> Comparação da presença de <i>motifs</i> de interação proteína-proteína no domínio quinase da MPS1 de <i>A. thaliana</i> (A) e dos ortólogos da família gênica Glyma13g083100 de <i>G.max</i> (B). Vermelho: DOC_CYCLIN_1; Azul escuro:DOC_MAPK_gen_1; Preto: DEG_APCC_DBOX_1; Magenta: LIG_MAD2, 14-3-3_CanoR_1 e MOD_SUMO_rev_2, Laranja: MOD_NEK2_1; Verde limão: MOD_NEK2_2 e Verde escuro: LIG_SUMO_SIM_par_1. ....	39

<b>Figura 15:</b> Comparação da presença de <i>motifs</i> de interação proteína-proteína no domínio quinase da MPS1 de <i>A. thaliana</i> (A) e dos ortólogos da família gênica Glyma14g164400 de <i>G. max</i> (B). Vermelho: DOC_CYCLIN_1; Azul escuro:DOC_MAPK_gen_1; Preto: DEG_APCC_DBOX_1; Magenta: LIG_MAD2, 14-3-3_CanoR_1 e MOD_SUMO_rev_2, Laranja: MOD_NEK2_1; Verde limão: MOD_NEK2_2 e Verde escuro: LIG_SUMO_SIM_par_1. ....	40
<b>Figura 16:</b> Comparação da presença de <i>motifs</i> de interação proteína-proteína no domínio quinase da MPS1 de <i>A. thaliana</i> (A) e dos ortólogos da família gênica Sobicc001g122100 de <i>S. bicolor</i> (B). Vermelho: DOC_CYCLIN_1; Azul escuro:DOC_MAPK_gen_1; Preto: DEG_APCC_DBOX_1; Magenta: LIG_MAD2, 14-3-3_CanoR_1 e MOD_SUMO_rev_2, Laranja: MOD_NEK2_1; Verde limão: MOD_NEK2_2 e Verde escuro: LIG_SUMO_SIM_par_1. ....	41
<b>Figura 17:</b> Comparação da presença de <i>motifs</i> de interação proteína-proteína no domínio quinase da MPS1 de <i>A. thaliana</i> (A) e do ortólogo Solyc11g013240.1.1. Vermelho: DOC_CYCLIN_1; Azul escuro:DOC_MAPK_gen_1; Preto: DEG_APCC_DBOX_1; Magenta: LIG_MAD2, 14-3-3_CanoR_1 e MOD_SUMO_rev_2, Laranja: MOD_NEK2_1; Verde limão: MOD_NEK2_2 e Verde escuro: LIG_SUMO_SIM_par_1. ....	42
<b>Figura 18:</b> Organização estrutural básica do domínio funcional da proteína MPS1. Folhas $\beta$ 0-7 e hélice $\alpha$ C compõem o lobo N-terminal. Hélices $\alpha$ D, E, F, G, H, I, EF compõem o lobo C-terminal. ....	45
<b>Figura 19:</b> Sobreposição das estruturas dos ortólogos da MPS1 de <i>A. thaliana</i> , <i>G.max</i> , <i>S. lycopersicum</i> e <i>S. bicolor</i> . A: sobreposição da MPS1 de <i>A. thaliana</i> (ciano) contra Glyma04g252700.1 (azul escuro); B: <i>Arabidopsis</i> (ciano) contra Glyma06g109800 (vermelho) ; C: <i>Arabidopsis</i> (ciano) contra Glyma13g08300 (amarelo); D: <i>Arabidopsis</i> (ciano) contra Sobicc001g122100 (roxo); E: <i>Arabidopsis</i> (ciano) contra Solyc11g013240.1.1. (violeta). ....	46
<b>Figura 20:</b> Ortólogos com baixa identidade estrutural em relação a MPS1 de <i>A. thaliana</i> . A: sobreposição da estrutura do ortólogo Glyma06g109800.4 (amarelo) contra B: <i>Arabidopsis</i> (ciano); Glyma14g164400 (verde) contra <i>Arabidopsis</i> (ciano). ....	47
<b>Figura 21:</b> Energia de formação média para o complexo proteína-ligante computadas durante o cálculo do <i>docking</i> (menor é melhor). Cada barra representa a média entre as energias de dez conformações geradas pelo programa durante o cálculo. ....	48
<b>Figura 22:</b> Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma14g164400.2. (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio com o resíduo Glu-453 (magenta). ....	50
<b>Figura 23:</b> Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma04g252700.1. (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-435 (magenta). ....	51
<b>Figura 24:</b> Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma06g109800.1 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-477 (magenta). ....	52
<b>Figura 25:</b> Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma06g109800.2 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-447 (magenta). ....	53

<b>Figura 26:</b> Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma06g109800.3 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-477 (magenta). .....	54
<b>Figura 27:</b> Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma13g083100.1 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-451 (magenta). .....	55
<b>Figura 28:</b> Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma13g083100.5 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-329 (magenta). .....	56
<b>Figura 29:</b> Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma14g164400.1 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-450 (magenta). .....	57
<b>Figura 30:</b> Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma14g164400.5 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-266 (magenta). .....	58
<b>Figura 31:</b> Solução para o docking do inibidor com a estrutura Sobic001g122100.1 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) o retângulo tracejado indica a metionina (Met-578) que substitui uma leucina logo na entrada da cavidade e os resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante; o retângulo tracejado indica novamente Met-578. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Lys-439 (magenta). .....	59
<b>Figura 32:</b> Solução para o docking do inibidor com a estrutura Sobic001g122100.2 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) o retângulo tracejado indica a metionina (Met-552) que substitui uma leucina logo na entrada da cavidade e os resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante; o retângulo tracejado indica novamente Met-552. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Met-490 (magenta). .....	60
<b>Figura 33:</b> Solução para o docking do inibidor com a estrutura Sobic001g122100.3 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) o retângulo tracejado indica a metionina (Met-574) que substitui uma leucina logo na entrada da cavidade e os resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante; o retângulo tracejado indica novamente Met-574. Não há a formação de ligações de hidrogênio. ....	61
<b>Figura 34:</b> Solução para o docking do inibidor com a estrutura Sobic001g122100.4 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo;	

(B) o retângulo tracejado indica a metionina (Met-578) que substitui uma leucina logo na entrada da cavidade e os resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante; o retângulo tracejado indica novamente Met-578. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com os resíduos Phe-466 e Glu-469 (magenta). .....	62
<b>Figura 35:</b> Solução para o docking do inibidor com a estrutura Sobic001g122100.5 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) o retângulo tracejado indica a metionina (Met-574) que substitui uma leucina logo na entrada da cavidade e os resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante; o retângulo tracejado indica novamente Met-574. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Lys-447 (magenta). .....	63
<b>Figura 36:</b> Alinhamento múltiplo entre as seqüências do domínio quinase da MPS1 de <i>A. thaliana</i> e <i>S. bicolor</i> . Vermelho: Região de interação com o ligante (inibidor); Verde: Região do loop de ativação e Azul: indicação da substituição entre leucina ( <i>A. thaliana</i> ) e metionina ( <i>S. bicolor</i> ). .....	64
<b>Figura 37:</b> Solução para o <i>docking</i> do inibidor com a estrutura Solic11g013240.1.1 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) os resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-551 (magenta). .....	66
<b>Figura 38:</b> Experimento de inibição <i>in vitro</i> da MPS1 de <i>A. thaliana</i> purificada.....	67
<b>Figura 39:</b> Avaliação dos tratamentos no crescimento do eixo hipocótilo-radícula de <i>G. max</i> ao longo de 96h após a semeadura em placas ao nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ). Letras iguais indicam tratamentos iguais.....	68
<b>Figura 40:</b> Conjunto representativo dos eixos das plântulas analisadas em cada tratamento e intervalos de tempo considerados no experimento. Escala: 1cm (quadrado).....	69
<b>Figura 41:</b> Avaliação do efeito do inibidor sobre o desenvolvimento pós-germinativo de plântulas de <i>S. bicolor</i> (A, B e C) e <i>S. lycopersicum</i> . (A, D) crescimento do epicótilo; (B, E) crescimento da raiz principal; (C, F) formação de raízes secundárias.....	71
<b>Figura 42:</b> Conjunto representativo de plântulas de <i>S. lycopersicum</i> (A) e <i>S. bicolor</i> (B) tratadas com o inibidor durante a germinação e desenvolvimento pós-germinativo. Efeito do inibidor no desenvolvimento pós-germinativo de <i>S. lycopersicum</i> (A) e <i>S. bicolor</i> (B). Escala: barra = 1 cm; grade = 1 cm.....	72
<b>Figura 43:</b> Avaliação dos indicadores de crescimento em plântulas de <i>A. thaliana</i> submetidas ao experimento de reversibilidade. (A) Crescimento da raiz principal (RP); (B) formação de raízes secundárias (RS) e (C) formação de primórdio radiculares (PR) .....	73
<b>Figura 44:</b> Conjunto representativo das plântulas de <i>A. thaliana</i> submetidas ao experimento de reversibilidade. Barra = 1cm. ....	74
<b>Figura 45:</b> Conjunto representativo das plântulas de <i>A. thaliana</i> submetidas à inibição por SP600125 e reveladas para atividade da enzima $\beta$ -glucoronidase (GUS). Barra: 100 $\mu$ M.....	75
<b>Figura 46:</b> Quantificação da atividade da enzima $\beta$ -glucoronidase (GUS) em plântulas de <i>A. thaliana</i> submetidas à inibição. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ). .....	76
<b>Figura 47:</b> Avaliação da atividade GUS pelos valores médios de cinza (VMC). Letras - diferentes indicam diferença estatística ao nível de significância de $P < 0,05$ . .....	77
<b>Figura 48:</b> Conjunto representativo das plântulas de <i>A. thaliana</i> submetidas ao experimento de reversão e revelação da atividade GUS. Barra = 100 $\mu$ M.....	78
<b>Figura 49:</b> Diagramas de Venn indicando as intersecções entre os três agrupamentos formados durante as análises de espectrometria de massas. (A) proteínas de regulação neutra; (B) proteínas positivamente reguladas e (C) proteínas negativamente reguladas. Imagens obtidas em <a href="http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn">http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn</a> .....	80

<b>Figura 50:</b> Gráfico demonstrando a variação das proteínas identificadas no agrupamento CONTROLE-DMSO nas principais repostas celulares. Vermelho indica redução e azul aumento. Figura obtida como programa MapMan v3.15.1R2 .....	81
<b>Figura 51:</b> Gráfico demonstrando a variação das proteínas identificadas no agrupamento CONTROLE-SP1 nas principais repostas celulares. Vermelho indica redução e azul aumento. Figura obtida como programa MapMan v3.15.1R2. ....	82
<b>Figura 52:</b> Gráfico demonstrando a variação das proteínas identificadas no agrupamento CONTROLE-DMSO nas principais repostas celulares. Vermelho indica redução e azul aumento. Figura obtida como programa MapMan v3.15.1R2. ....	83

## LISTA DE TABELAS:

<b>Tabela 1:</b> Lista das estruturas de referência ( <i>templates</i> ) utilizadas para modelar cada uma das seqüências estudadas.....	16
<b>Tabela 2:</b> Lista das estruturas utilizadas nos experimentos de <i>docking</i> com o inibidor SP600125. As coordenadas XYZ referem-se a posição do átomo de oxigênio presente no resíduo de referência (glutamato) utilizado para centralizar o <i>grid</i> do cálculo. ....	18
<b>Tabela 3:</b> Listagem dos ortólogos da MPS1 de <i>A. thaliana</i> identificados em <i>G.max</i> , <i>S. bicolor</i> e <i>S. lycopersicum</i> . PPK1: <i>Putative Protein Kinase 1</i> (proteína quinase putativa 1); PF007714 e PF00069 identificadores Pfam do domínio funcional com atividade tirosina ou serina-treonina quinase, respectivamente:.....	27
<b>Tabela 4:</b> Tabela com os <i>motifs</i> de interação proteína-proteína selecionados após análise com a ferramenta ELM:.....	34
<b>Tabela 5:</b> Distribuição da ocorrência dos diferentes <i>motifs</i> de interação proteína-proteína entre as famílias gênicas avaliadas (At1g77720, Glyma04g252700, Glyma06g109800, Glyma13g083100, Glyma14g164400, Solyc11g013240 e Sobic001g122100) em Arabidopsis, soja, tomate e sorgo. Legenda: X indicam presença do <i>motif</i> e – indica ausência. Os <i>motifs</i> que ocorrem exclusivamente na região N-terminal foram realçados (cinza). ....	35
<b>Tabela 6:</b> Lista dos ortólogos da MPS1 de <i>G.max</i> que não apresentaram <i>motifs</i> identificados na seqüência do domínio quinase da MPS1 de <i>A. thaliana</i> . Os ortólogos que sofreram as maiores deleções em suas sequencias estão realçados (cinza).....	36
<b>Tabela 7:</b> Listagem dos <i>motifs</i> que não foram identificados em ortólogos da MPS1 de <i>G. max</i> . ....	43
<b>Tabela 8:</b> Listagem dos resíduos formadores de ligações de hidrogênio em cada uma das soluções encontradas para ao docking do inibidor com a estrutura do domínio quinase dos ortólogos de <i>G. max</i> ...49	49
<b>Tabela 9:</b> Listagem dos resíduos formadores de ligações de hidrogênio em cada uma das soluções encontradas para ao docking do inibidor com a estrutura do domínio quinasedos ortólogos de <i>S. bicolor</i> . ....	49
<b>Tabela 10:</b> Contagem das proteínas identificadas por grupo de variação: .....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS:

APC/C: *Anaphasepromotingcomplex/ciclosome* (Complexo promotor da anáfase/ciclossomo)

ATP: Adenosina trifosfato. Número CAS: 34369-07-8

B.O.D: *BiochemicalOxygenDemand* (Demanda Bioquímica de Oxigênio)

BUB: *Budding Uninhibited by Benzimidazol* (Brotamento não inibido por benzimidazol)

CAK: Proteína quinase ativadora de CDKs (*CKD-activating kinase*)

CDK: Proteína quinase dependente de ciclina (*Ciclin-Dependent Kinase*)

CYC: Ciclina

DSMO: Dimetilsulfóxido. Número CAS: 67-68-5

DTT: Ditioneitol. Número CAS: 3483-12-13

ESI-LC-MS/MS: *Electrospray Ionization Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*

FWHM: *Full Width at Half Maximum*

GUS:  $\beta$ -glucoronidase

HDMS: *High Definition Mass Spectrometry*

MAD1: *Mitosis Arrest Deficient 1*

MAD2: *Mitosis Arrest Deficient 2*

MAD3: *Mitosis Arrest Deficient 3*

MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinases* (proteína quinase ativada por mitógeno)

MES: ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico. Número CAS: 4432-31-9

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio. Número CAS: 7786-30-3

MPS1: *Monopolar Spindle 1*



MWCO: *Molecular Weight Cut-Off*

NaCl: Cloreto de sódio. Número CAS: 7647-14-5

NEK: *Never in mitosis kinase*

Plk; *Polo-like kinase*

PMSF: Fluoreto de fenilmetanosulfonila. Número CAS: 328-98-6

SAC: *Spindle Assembly Checkpoint* (Ponto de monitoramento do fuso mitótico)

SUMO: *Small Ubiquitin-like Modifier*

TFA: Ácido trifluoroacético. Número CAS: 76-05-1

TOF: *Time Of Flight*

UPLC: *Ultra High Performance Liquid Chromatography*

X-Gluc: ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucorônico (C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>BrClNO<sub>7</sub>). Número CAS: 129541-41-9

## RESUMO:

O ciclo celular compreende uma série de eventos precisamente regulados que são de fundamental importância para a manutenção da viabilidade celular e dos organismos. Sua arquitetura básica, subdividida em quatro fases distintas (G1, S, G2 e M), é extremamente conservada ao longo de toda a linhagem dos eucariotos. Além disso, boa parte dos elementos de regulação que atuam em momentos e compartimentos distintos também é compartilhada pela grande maioria dos eucariotos. Dentro dos eventos do ciclo celular destaca-se a transição metáfase-anáfase, na qual ocorre a segregação das cromátides irmãs. Durante esta etapa, a proteína quinase de dupla atividade MPS1 exerce papel regulatório central, sendo a principal responsável pelo monitoramento da formação do fuso mitótico, bem como pelo estado de ancoramento aos centrômeros. Problemas na atividade desta proteína têm consequências diretas na formação de novas células e na estabilidade genética do indivíduo. Neste contexto o presente trabalho se propôs avaliar o papel da proteína quinase MPS1 em *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Sorghum bicolor* e *Solanum lycopersicum*. Para isso foram utilizadas técnicas computacionais para a identificação dos ortólogos desta proteína e avaliação do potencial de uso (*docking*) do inibidor SP600125. Testes *in vivo* também foram utilizados para verificar a ação do inibidor durante a germinação e desenvolvimento pós-germinativo de plântulas das espécies selecionadas. Foi encontrado um total de vinte sequências distribuídas entre as três espécies de interesse. Em *G. max* as sequências estavam distribuídas em quatro famílias gênicas distintas, ao passo que em *S. lycopersicum* e *S. bicolor* as sequências foram agrupadas em apenas uma família gênica. A avaliação da estrutura terciária destas proteínas indicou a conservação da arquitetura básica do domínio quinase bem como da localização de diversos *motifs* de interação de relevância no contexto do ciclo celular. O ensaio *in vitro* com o inibidor revelou que este é capaz de reduzir a atividade do domínio quinase purificado da MPS1 de *A. thaliana*. Além disso, os testes de inibição *in vivo* demonstraram que plântulas de *S. bicolor* e *S. lycopersicum* sofrem retardo no desenvolvimento pós-germinativo, ao passo que plântulas de *G. max* são resistentes ao mesmo. Os ensaios de reversibilidade em plântulas de *A. thaliana* demonstraram que o efeito inibitório é reversível, permitindo que as mesmas retomem seu crescimento normal. No experimento de inibição com plântulas transformadas (CYCB1;1-GUS-Dbox) de *A. thaliana* foi revelado que a expressão da construção aumenta de maneira

proporcional à concentração do inibidor o que pode indicar um mecanismo compensatório frente ao arresto da via SAC. Em contrapartida, o experimento de reversão com as mesmas plântulas revelou que os níveis de expressão retornam a um patamar comparável ao de plântulas controle após a retirada do inibidor do meio de crescimento, reforçando a idéia da recuperação do desenvolvimento após a reversão da inibição. A proteômica de raízes de plântulas de *A. thaliana* submetidas ao experimento de reversibilidade revelou que o fenótipo de recuperação também é observado em nível molecular, visto que a grande maioria das proteínas identificadas permaneceu sem alteração de contagem nos três tratamentos avaliados. Os resultados apresentados colaboram para corroborar a hipótese de que a MPS1 de plantas possui um importante tanto na divisão celular quanto na regulação dos processos que regem o desenvolvimento pós-germinativo em plantas.

## ABSTRACT:

The cell cycle comprehends a series of fine-tuned events necessary for the maintenance of cell and organism viability. Its basic architecture, divides in four distinct phases (G1, S, G2 and M) is extremely conserved among all eukaryotes. Further, most of the regulatory elements from this pathway are shared by most of the eukaryotes. The metaphase-anaphase transition is one of the major steps during the progress of the cell cycle due to the chromosome segregation event. During this phase the MPS1 protein kinase takes a central role regulating the mitotic fuse formation and centrosome anchorage. Malfunctions of this protein can have severe consequences on the formation and genetic stability of newly formed cells. In this context this work proposed to evaluate the roles of MPS1 in *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Solanum lycopersicum* and *Sorghum bicolor*. *In silico* techniques were used to identify MPS1 orthologues and to evaluate the potential usage of SP600125 as an inhibitor. A total of 20 over three species were identified. Most of the sequences were distributed over four genes in *G. max* whether *S. lycopersicum* and *S. bicolor* only had one gene. Molecular modeling revealed that most of the sequences shared the same tertiary structure with the kinase domain architecture well conserved as well as several protein-protein interaction motifs with cell cycle relevance. An *in vitro* assay showed that SP600125 inhibits the purified MPS1 kinase domain from *A. thaliana*. Besides, *in vivo* assays also showed that SP600125 is capable of post-germinative arrest over *S. lycopersicum* and *S. bicolor* but not on *G. max* seedlings. *A. thaliana* seedlings submitted to a reversibility experiment showed that it is possible to recover to a normal development similar to what is observed in untreated plants. CYCB1;1-GUS-Dbox *A. thaliana* seedlings submitted to an inhibition experiment revealed that the construct expression rises when the inhibitor concentrations increase, which may point to a potential compensatory mechanism in response to the SAC pathway arrest. In contrast, a reversibility experiment demonstrated that the construct expression levels were the same as the control group. Finally, comparative proteomics of *A. thaliana* seedlings revealed that the recovery phenotype is also observed in a molecular level since most of the identified proteins had unchanged count levels. The results presented here corroborate the hypothesis that plant MPS1 has an important role over the regulation of both cell division and post-germinative developmental processes.

## **1. INTRODUÇÃO:**

### **1.1. O Ciclo Celular:**

Classicamente subdividido em quatro fases distintas ( $G_1$ , S,  $G_2$  e M)(VEYLDER; JOUBÈS; INZÉ, 2003), o ciclo celular compreende uma série de eventos que resulta na divisão celular. É um conjunto de eventos fundamentais, associados à regeneração tecidual, desenvolvimento e crescimento de todos os organismos (INZÉ; DE VEYLDER, 2006). Desta forma, não surpreende que este seja um evento intensamente regulado. Uma de suas características mais marcantes é a segregação temporal da duplicação do material genético e da segregação das cromátides irmãs, a qual existe apenas em eucariotos (HUNTLEY; MURRAY, 2003). Essa separação temporal permite que a célula tenha total controle operacional de todos os eventos que são fundamentais para a manutenção da viabilidade celular, garantindo o controle da passagem do material genético e estabilidade genômica na próxima geração de células formadas (YEH et al., 2009).

De maneira geral, a arquitetura e maquinaria do ciclo celular são extremamente conservadas na linhagem dos eucariotos (VANDEPOELE, 2002). Observa-se a mesma organização espaço temporal em todos os indivíduos, além de um intercâmbio de elementos de regulação (QUIMBAYA et al., 2012) entre os mesmos. Porém embora esta via seja notavelmente preservada ainda é possível observar diferenças cruciais quando diferentes espécies são observadas com maior escrutínio. De fato essas diferenças tornaram-se ainda mais evidentes quando o ciclo celular de plantas começou a ser estudado (DE VEYLDER; BEECKMAN; INZÉ, 2007; VAN LEENE et al., 2011; VEYLDER; JOUBÈS; INZÉ, 2003).

### **1.2. O ciclo celular em plantas:**

O hábito sésstil compartilhado por todos os vegetais teve papel crucial na história evolutiva destes organismos. De fato, estas apresentam características únicas tais como desenvolvimento pós-embrionário de tecidos meristemáticos (morfogênese), presença de parede celular e ausência de migração celular (VAN LEENE et al., 2011). Além disso, como são incapazes de locomoção, estão sempre expostas a todos os tipos de

fatores externos, os quais por muitas vezes atuam como sinais que prontamente desencadeiam respostas fisiológicas nas plantas. Já foi observado, por exemplo, que o metil jasmonato, que é uma molécula classicamente relacionada com as respostas contra herbivoria (BOTELHO-JÚNIOR et al., 2014; SANTIAGO et al., 2017), também inibe o crescimento mediando a repressão do ciclo celular em plantas (NOIR et al., 2013; PATIL et al., 2014; PAUWELS et al., 2008).

Como citado anteriormente, a morfogênese vegetal ocorre em âmbito pós-embriônico. Isso garante a flexibilidade morfológica necessária para circunavegar condições ambientais potencialmente danosas (Figura 1) além de abrir um leque de possibilidades em se tratando da ocupação do espaço de crescimento (MORALES; ACKERMAN; TREMBLAY, 2010).



**Figura 1:** Exemplo da plasticidade morfológica de plantas em resposta a estímulos ambientais. Árvores controlam seu desenvolvimento de forma a seguir a direção dos ventos dominantes da região, evitando assim a quebra do tronco e galhos. **Fonte:** [www.praiasdopiaui.com.br](http://www.praiasdopiaui.com.br) por Marco Félix (último acesso em 04 de Abril de 2017).

O fino controle do plano de divisão celular e, por consequência, da formação de novos órgãos (folhas, galhos, raízes, etc), parece estar intimamente ligado com o ajuste preciso que plantas conseguem imprimir em sua divisão celular (HEMERLY et al., 1999). Na realidade, tecidos vegetais apresentam dois tipos de divisão celular distintos: o proliferativo e o assimétrico (DE VEYLDER; BEECKMAN; INZÉ, 2007). O primeiro produz sempre o mesmo tipo celular e, portanto, é responsável apenas pelo

crescimento da planta. Órgãos, tecidos ou novos tipos celulares nunca são gerados a partir dessa via. O segundo está ligado diretamente aos processos relacionados ao desenvolvimento vegetal (DE VEYLDER; BEECKMAN; INZÉ, 2007). Neste caso a divisão celular é assimétrica e gera células-filha diferentes sendo, portanto diametralmente oposto ao conceito de divisão celular clássico. Chamado também de formativo (GUTIERREZ, 2016) esse é o processo responsável pela diversidade celular em plantas. Neste modo de divisão novos tipos celulares são formados, contribuindo para a especialização tecidual e para a morfogênese vegetal. As células geradas por esse processo normalmente são de tamanho e morfologia variados (RASMUSSEN; HUMPHRIES; SMITH, 2011). Processos como o início da embriogênese, formação do pólen, estômatos e raízes secundárias estão intimamente correlacionados à divisão celular assimétrica. Além disso, os meristemas (apical e radicular) são particularmente afetados, pois a produção e manutenção das linhagens meristemáticas dependem exclusivamente deste processo (GUTIERREZ, 2016).

Outra particularidade do ciclo celular que plantas utilizam é a endoreduplicação. No progresso normal do ciclo celular a célula passa por todos os estágios preparatórios (fases  $G_1$ , S,  $G_2$ ) e, finalmente, se divide (fase M) gerando novas células filhas. Porém, em algumas ocasiões é possível que estas pulem completamente a fase de divisão celular e continuem replicando o material genético por vários ciclos (GUTIERREZ, 2009; INZÉ; DE VEYLDER, 2006) gerando poliploidia no indivíduo. Plantas poliplóides geralmente apresentam ciclo de vida rápido e maior rendimento, indicando que o endociclo pode ser o alicerce necessário para sustentar ciclos de rápido desenvolvimento (BAROW; MEISTER, 2003).

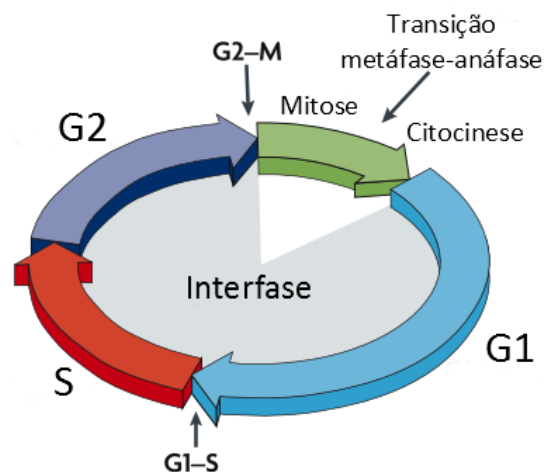
Como já introduzido, plantas apresentam uma forte conexão com o seu meio de crescimento, estando preparadas para responder frente aos constantes estímulos que este oferece. Uma das formas mais clássicas de resposta a estímulos externos são as cascatas de fosforilação mediadas por proteínas quinases ativadas de mitógenos (MAPKs). Junto aos hormônios vegetais, estas proteínas participam da percepção, sinalização e desencadeamento de diversos processos celulares (POPESCU et al., 2009; SOPORY, 1998) e muitas exercem papel de influência direta na divisão celular de plantas, principalmente durante a citocinese (JURGENS, 2005; NISHIHAMA et al., 2002; RASMUSSEN; HUMPHRIES; SMITH, 2011; RODRIGUEZ; PETERSEN; MUNDY, 2010; TAKAHASHI et al., 2004).

Mais de duas décadas se passaram desde que o ciclo celular de plantas começou a ser estudado com maior profundidade e nesse ínterim muito foi revelado sobre sua importância. Especialmente, o quanto o mesmo é fundamental para diversos aspectos da vida vegetal e não apenas a divisão celular propriamente dita (GUTIERREZ, 2016), entretanto muitas lacunas ainda necessitam ser preenchidas. Mais precisamente é necessário ir além do que já se conhece sobre o cerne do ciclo celular (*core cell cycle*) para melhor compreender como estes mecanismos estão relacionados com tantos processos diferentes no contexto celular e fisiológico da planta.

### 1.3. Principais elementos de regulação do ciclo celular em plantas:

#### 1.3.1. Proteínas quinase dependentes de ciclinas (CDKs):

Ciclinas e CDKs compõem o alicerce central (HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013) dos processos regulatórios que governam a progressão do ciclo celular. A modulação temporal da expressão destas duas famílias de proteínas permite que a célula tenha o controle preciso entre o início e fim da cada uma das quatro etapas distintas da via (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M) (Figura 2).

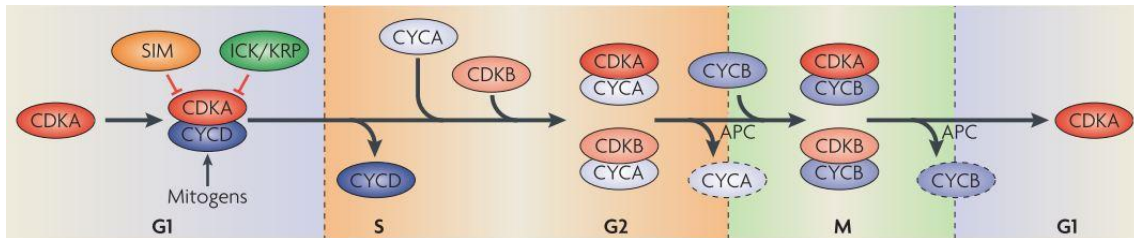


**Figura 2:** Esquema da organização do ciclo celular e sua divisão em quatro etapas distintas. **Fonte:** traduzido e adaptado de (HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008).

Basicamente a atividade das diversas CDKs que atuam durante o ciclo é precisamente regulada por sua ciclina correspondente. A correta formação do binômio



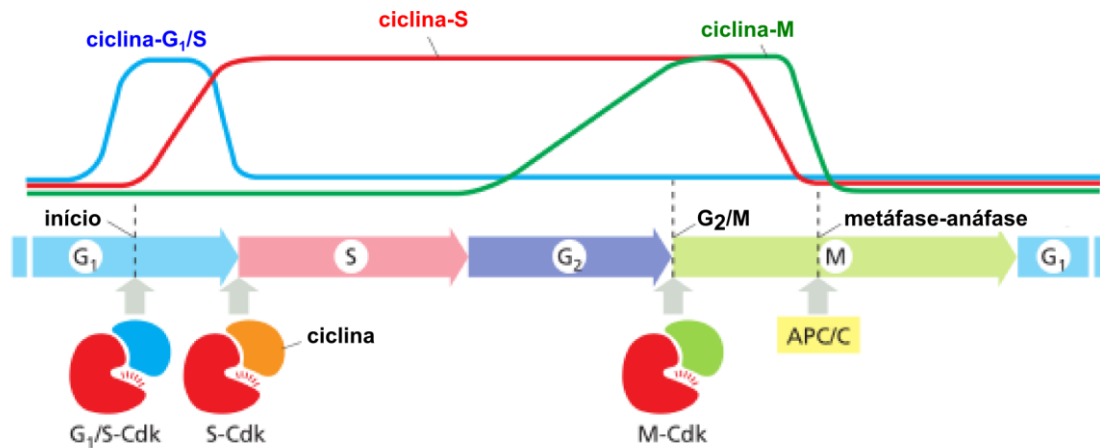
CYC-CDK possui papel fundamental no controle dos eventos que devem ocorrer em cada fase. Portanto, o grau de especificidade com que esses complexos se formam é essencial para a correta segregação temporal de todas as etapas necessárias para a devida progressão do ciclo (Figura 3).



**Figura 3:** Esquema resumido da interação de diferentes CYCs e CDKs ao longo das fases do ciclo celular. **Fonte:** (DE VEYLDER; BEECKMAN; INZÉ, 2007).

A necessidade de flexibilidade no desenvolvimento de plantas é tão notória que seus reflexos são observados diretamente na diversidade dos elementos de regulação do ciclo. Já foi observado que o número de famílias de CDK é mais extenso em plantas do que em outros reinos (DOONAN; FOBERT, 1997). Além de possuírem um grupo de CDKs homólogo a Cdk1 humana (CDKA;1), estima-se que existam pelo menos sete tipos diferentes de CDKs (MIRONOV et al., 1999). Somado ao já extenso grupo de CDKs em plantas, estas também apresentam duas famílias que ocorrem exclusivamente em sua linhagem (CDKB e CDKF). Proteínas quinase dependentes de ciclina tipo B são subdivididas em dois subgrupos; CDKB1 e CDKB2 as quais estão associadas a eventos mitóticos e de desenvolvimento respectivamente (CRUZ-RAMÍREZ et al., 2012; LAI, 2005). Já as CDKs do tipo F só foram observadas em eventos relacionados ao desenvolvimento pós-embrionário (BLOMME; INZÉ; GONZALEZ, 2014; DEWITTE; MURRAY, 2003; DOONAN; KITSIOS, 2009; GUTIERREZ, 2009)

A expressão de ciclinas e CDKs é extremamente coordenada, para que quando necessárias, todas estejam em seu pico de concentração e suas funções sejam prontamente cumpridas. O perfil de expressão destas proteínas durante as 4 fases do ciclo ocorre de forma periódica, respeitando limiares de atividades relativos ao que é necessário em cada uma das etapas e as barreiras temporais que delimitam cada etapa do processo (Figura 4) (HUNTLEY; MURRAY, 2003).



**Figura 4:** Esquema simplificado da dinâmica de expressão das diferentes ciclinas e CDKs que atuam na regulação do ciclo celular. Essa é uma representação básica que reflete um panorama geral dos eventos que ocorrem em todos os eucariotos. A linha azul indica a curva de expressão de ciclinas que participam exclusivamente da fase G<sub>1</sub>; linha vermelha ciclinas que iniciam sua atividade ao fim da fase G<sub>1</sub> até os primeiros eventos da fase M e linha verde ciclinas que atuam principalmente na transição G<sub>2</sub>/M. **Fonte:**(BRUCE ALBERTS, ALEXANDER JOHNSON, JULIAN LEWIS, DAVID MORGAN, MARTIN RAFF, KEITH ROBERTS, 2014).

Apenas CDKA dos tipos A- e B- participam diretamente da regulação do ciclo celular em plantas (NOWACK et al., 2012; SCOFIELD; JONES; MURRAY, 2014). As CDKs do tipo A atuam durante a fase S e nas transições G<sub>1</sub>/S e G<sub>2</sub>/M com picos de expressão nas duas últimas etapas (DANTE; LARKINS; SABELLI, 2014; FRANCIS, 2011) e estão implicadas em eventos bastante distintos na proliferação e diferenciação celular em plantas. Como exemplos é possível citar sua participação no final da formação das células estomáticas (processo formativo), desencadeando as divisões simétricas que ocorrem nos estágios finais do desenvolvimento dos estômatos (YANG et al., 2014); a associação aos eventos iniciais da formação de raízes laterais oriundas das células do periciclo radicular, a qual começa durante a transição G<sub>2</sub>/M (HIMANEN, 2002) e no controle do ciclo de endorreducação (SABELLI et al., 2013). As CDKs do tipo B são observadas apenas em células mitóticas, e suas duas formas (CDB1 e 2) são detectadas desde a fase G<sub>2</sub> até a fase M (SCOFIELD; JONES; MURRAY, 2014). Sabe-se ainda que as CDKs do tipo B são fundamentais para que a célula entre em mitose (GENSCHIK et al., 2014), é conhecida também por ser um dos componentes do

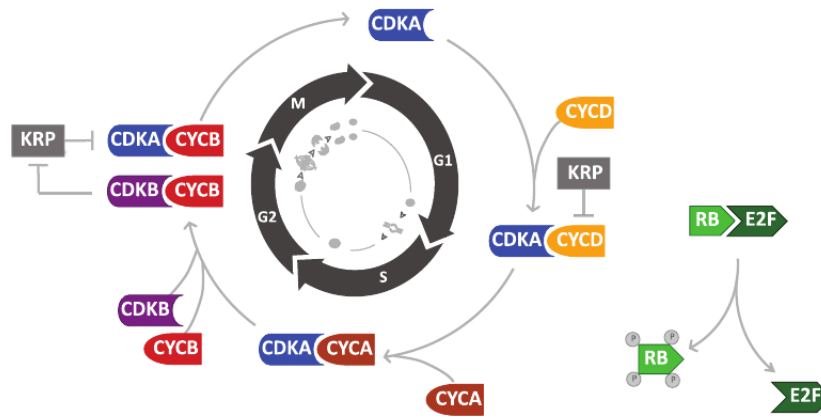
controle das divisões assimétricas que ocorrem nos tecidos radiculares (DE SMET; BEECKMAN, 2011) e no balanço entre a quantidade de células que estão em divisão celular proliferativa e endorreduplicativa (BOUDOLF, 2004). Finalmente, as CDK do tipo D-, conhecidas também como CAKs (CDK-activating kinase), atuam como ativadoras (mediante fosforilação) de outras CDKs do ciclo, mais precisamente CDKA durante a fase M (KOMAKI; SUGIMOTO, 2012), preservando a atividade mitótica (TAKATSUKA; UMEDA-HARA; UMEDA, 2015). Sua atividade regulatória também já foi documentada no recrutamento de proteínas necessárias para a florescência em plantas de *A. thaliana* (LU et al., 2017). Já foi proposto que estas também poderiam participar da percepção de sinais ambientais ou hormonais, mediando a mobilização da maquinaria celular que controla o ciclo celular e processos transcripcionais (UMEDA; SHIMOTOHNO; YAMAGUCHI, 2005).

### 1.3.2. Ciclinas (CYCs):

As ciclinas apresentam grau de diversidade similar ou até maior do que o observado em CDKs. Comparativamente, plantas possuem um número muito maior de genes de ciclinas (entre 50 e 60) do que outros eucariotos (VANDEPOELE, 2002). Estima-se que em Angiospermas existam pelo menos 10 grupos de ciclinas em plantas, subdivididas em 11 classes distintas, A-, B-, C-, D-, F-, H-, I-, L-, T-,P- e SDS (DANTE; LARKINS; SABELLI, 2014; MA et al., 2013; TORRES ACOSTA et al., 2004), sendo as do tipo SDS as mais recentes e exclusivas de plantas e exclusivas dos processos meióticos (BULANKOVA et al., 2013). Entretanto, apenas ciclinas das classes A-, B- e D- participam do ciclo celular central (BULANKOVA et al., 2013; DANTE; LARKINS; SABELLI, 2014).

Plantas possuem pelo menos 92 combinações entre ciclinas e CDKs o que permite notável flexibilidade e precisão no controle do ciclo e, conseqüentemente, nos diversos mecanismos que estão associados à proliferação celular e desenvolvimento vegetal (VAN LEENE et al., 2010).

A dinâmica de expressão de ciclinas durante o núcleo central de regulação do ciclo celular segue a mesma tendência periódica observada em CDKs (SCOFIELD; JONES; MURRAY, 2014) (Figura 5).



**Figura 5:** Representação simplificada dinâmica de expressão das ciclinas A-, B- e D-, envolvidas na regulação do ciclo celular em plantas. **Fonte:** (SCOFIELD; JONES; MURRAY, 2014).

As ciclinas do tipo D começam a ser expressas logo no início da fase  $G_1$  e permanecem com sua concentração relativamente constante ao longo de todo ciclo, iniciando seu declínio a partir da fase  $G_2$ . Estas proteínas são capazes de responder a sinais mitogênicos responsáveis por promover a divisão celular, sendo cruciais para comprometimento das células na tomada de decisão para a divisão celular (DEWITTE; MURRAY, 2003; MENGES et al., 2007). Ciclinas D se ligam a CDKA, sendo um dos principais mediadores da transição  $G_1/S$ . O dímero CYCD-CDKA inativa a proteína retinoblastoma (RB), permitindo que os fatores de transcrição E2F/DP sejam liberados para estimular os mecanismos de duplicação genômica dando início à transição para a fase S (DANTE; LARKINS; SABELLI, 2014; SCOFIELD; JONES; MURRAY, 2014). Além disso, também já foram associadas a processos de diferenciação celular, atuando diretamente da regulação densidade de raízes secundárias em raízes de *A. thaliana* (NIEUWLAND et al., 2009).

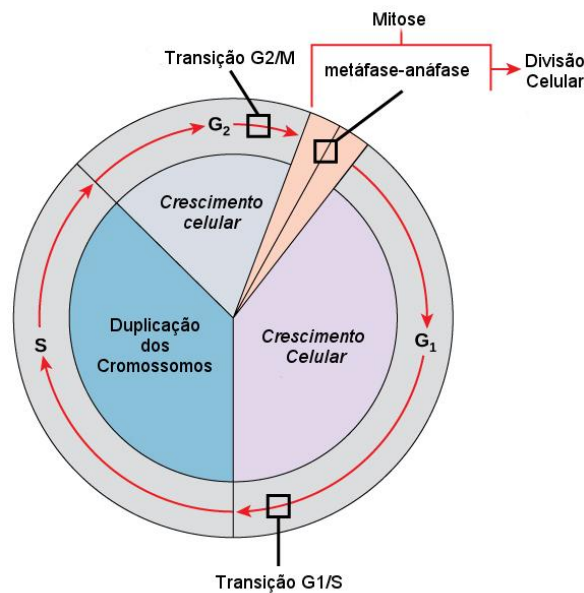
As ciclinas do tipo A atuam de forma mais restrita, sendo responsáveis pelo controle da fase S e da transição  $G_2/M$ . Já foi observado que CYCA2;3 liga-se diretamente com CDKB1;1 o que suprime os primeiros eventos do endociclo e permite que a célula termine a divisão celular e formação de duas células filhas (BOUDOLF et al., 2009). Em outro modelo de regulação também foi proposto que o conjunto CDKB1;1-CYCA2;3 atua na ativação de CDKA1;1. Assim, CDKB seria a única responsável pela regulação nos níveis de CKDA nas células em divisão tornando CYCA o fator delimitador para a decisão de finalizar a mitose ou iniciar o endociclo e em

consequência favorecer eventos formativos e de diferenciação celular (VERKEST, 2005).

Ciclinas do tipo B não são observadas em quantidades significativas até a fase S, com um pico de expressão tardio durante o ciclo durante a fase M, estando presentes numa janela temporal bastante restrita (DEWITTE; MURRAY, 2003). Esta classe de ciclinas exerce função crucial nos eventos finais da mitose. Apenas após sua destruição pelo complexo promotor da anáfase (APC/C), a célula prossegue na transição metáfase-anáfase garantindo a progressão da mitose. Quando eliminadas, CDKs do tipo A, são inibidas induzindo o desmonte do fuso mitótico, a condensação, a reconstituição do envelope nuclear e a citocinese (MARROCCO et al., 2009).

#### 1.4. Pontos de monitoramento do ciclo celular:

Em complementação à ciclinas e CDKs que compõem o cerne da regulação do ciclo celular, as células ainda apresentam três etapas,  $G_1/S$ ,  $G_2/M$  e metáfase-anáfase, temporalmente segregadas que são cruciais para o progresso da via (Figura 6).



**Figura 6:** Esquema da distribuição dos três pontos de monitoramento do ciclo celular que ocorrem nos estágios de transição entre as 4 fases do ciclo celular.

Os pontos de regulação que ocorrem nas transições entre as fases do ciclo são fundamentais para a manutenção da viabilidade celular. Caso os eventos programados em cada etapa não ocorram (ou ocorram com falhas) ou os sinais necessários não estejam disponíveis, a célula pode decidir entre a paralisação do ciclo até que as condições requeridas pela maquinaria celular estejam presentes ou então encaminhá-las para a morte celular programada (DEN BOER; MURRAY, 2000).

#### 1.4.1. A transição $G_1/S$ :

A rigor durante a fase  $G_1$  as células monitoram seu tamanho e o ambiente e em  $G_2$  se todos os cromossomos foram duplicados corretamente antes da consolidação da divisão celular durante a fase M. Na década de 60 foi observado que as raízes de plantas de milho estacionavam em  $G_1$  ou  $G_2$  quando em situação de deficiência energética (ausência de carboidratos), indicando um possível estado de transição entre  $G_1/S$  e  $G_2/M$ . De fato esta foi a primeira observação da existência de estados transitórios entre as fases do ciclo (HOF, 1966).

Das quatro fases que compõem o ciclo celular,  $G_1$  é a mais longa; logo as células que estão nesse estágio, estão mais suscetíveis a variações de fatores ambientais. No final da década de 90 foi observado que o estresse oxidativo e a transdução de sinais, mediados por glutathione reduzida (GSH), tinham influência na progressão do ciclo. Culturas de células de tabaco incapazes de produzir GSH permaneciam paralisadas em  $G_1$  até que esta molécula fosse suprida artificialmente no meio de crescimento. O mesmo foi observado em raízes de *A. thaliana*, sugerindo que GSH poderia influenciar na transição  $G_1/S$  (MAY et al., 1998; VERNOUX et al., 2000). Dentro do contexto de moléculas não protéicas que interferem durante a transição  $G_1/S$ , também é possível citar as citocininas. Já foi observado que a presença de citocininas influencia diretamente CYCD3 durante  $G_1/S$ . O hormônio foi capaz de aumentar a velocidade da duplicação do material genético, reduzindo a duração da fase S (HOUSSA et al., 1994). Entretanto, a principal via de controle durante essa transição envolve a proteína retinoblastoma (RB). Nesta via, ciclinas do tipo D associadas a CDKA fosforilam e ativam RB (NAKAGAMI, 2002). Esse evento permite que RB se dissocie dos fatores de transcrição do tipo E2F/DP. A dissociação destes complexos permite que este fator de transcrição ative e regule genes exclusivos da fase S, induzindo a saída de  $G_1$

(CHABOUTE; CLEMENT; PHILIPPS, 2002; DEWITTE; MURRAY, 2003; VEYLLDER et al., 2002).

#### 1.4.2. A transição $G_2/M$ :

A transição  $G_2/M$  é intensamente regulada pela atividade CDK porém, ainda existe pouco consenso em quais elementos participam de sua regulação. O modelo aceito para leveduras, células humanas e vegetais inferiores (KHADAROO et al., 2004) dita que durante essa fase, os complexos CYC-CDK permanecem reprimidos devido a uma fosforilação da CDK, realizada por uma proteína quinase do tipo WEE1 (MIK1 em leveduras). Em contrapartida, o complexo é liberado por uma desfosforilação mediada CDC25 (FRANCIS, 2011). Entretanto, o mesmo arranjo parece não existir em plantas. Foi observado que embora *A. thaliana* possua homólogos de WEE1 e CDC25, nenhuma das duas aparenta ter função durante esta fase, uma vez que plantas com mutações disruptivas nos genes destas duas proteínas, mantiveram crescimento e desenvolvimento normais (FRANCIS, 2011). A partir disto foi proposto que o modelo de regulação da transição  $G_2/M$  em plantas superiores incluiria apenas CDKA, CDKB e ICK (*Inhibitor of CDC2 Kinase*). No modelo, o complexo CYC-CDKA, o qual é responsável por induzir a mitose em células vegetais, permanece reprimido por ICK até que os pré-requisitos mitóticos sejam completados. A partir de então CDKB fosforila ICK liberando o complexo CYC-CDKA para iniciar a mitose (BOUDOLF; INZE; DEVEYLLDER, 2006). Mais recentemente foi observado que um conjunto de mais de 100 genes são expressos durante esse estágio e que sua transcrição é controlada por fatores de transcrição da família MYB3R que atuam como repressores e ativadores de genes em  $G_2/M$ . A atividade repressora de MYB3R3 e 5 é substituída por ativação mediada por MYB3R1 e 4 induzindo a expressão de CYCA/B e CDKA/B. Estas, por conseguinte potencializam a expressão de genes de  $G_2/M$  tardios criando um *loop* de ativação mediado por fosforilação de MYB3R1 desencadeado a transição para fase M (MAGYAR; BÖGRE; ITO, 2016).

#### 1.4.3. A transição metáfase-anáfase (a via SAC e o APC/C):

O último ponto de monitoramento antes da consolidação da divisão celular ocorre na transição metáfase-anáfase. Este é, portanto o estágio mais crítico do ciclo.

Nele a célula monitora o estado de ancoramento das cromátides irmãs o fuso mitótico. Durante a metáfase, os cromossomos duplicados e conectados ao fuso são direcionados ao equador celular, formando a placa metafásica. Portanto é imprescindível que todos os cromossomos estejam devidamente conectados ao fuso mitótico e que seja mantido um estado de tensão constante. Estes dois fatores são imprescindíveis para que a maquinaria celular seja capaz de se organizar de maneira a garantir que a segregação dos cromossomos que ocorrerá na anáfase. A interrupção desses dois eventos ou a presença de anomalias em qualquer dos elementos de regulação da via, podem resultar em danos severos para a célula e ao organismo como um todo. O surgimento de anomalias cromossômicas é o efeito mais observado nesses casos (SUIJKERBUIJK; KOPS, 2008).

Na transição metáfase-anáfase, o ponto de monitoramento do fuso mitótico (SAC – *Spindle Assembly Checkpoint*) é o responsável por impedir que a separação das cromátides irmãs ocorra prematuramente, a partir do monitoramento constante da interação entre o fuso mitótico e o centrômero dos cromossomos (CAILLAUD et al., 2009; MAO; DESAI; CLEVELAND, 2005). Durante a via SAC o complexo promotor da mitose (*MCC – Mitosis Promoting Complex*) e o complexo promotor da anáfase/ciclossomo (*APC/C – Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) atuam de formas opostas. O MCC, mediante a ação de MAD2 (*Mitosis Arrest Deficient 2*), BUBR1 (*Budding Uninhibited by Benzimidazol*), BUB3 e MPS1 (*Monopolar Spindle 1*) mantém o cofator CDC20 bloqueado, impedido que este sinalize para o APC/C desencadear a degradação proteolítica das proteínas que mantém o complexo separase-securina íntegro (CAILLAUD et al., 2009). Desta forma, mesmo sob o constante tensionamento causado pelo fuso mitótico, não há separação das cromátides irmãs. É importante ressaltar também que as proteínas citadas que compõem o MCC possuem ortólogos caracterizados em plantas (DE OLIVEIRA et al., 2012; DOUÉTTS-PERES et al., 2016; KIMBARA; ENDO; NASUDA, 2004; VLEUGEL et al., 2012; YU; MUSZYNSKI; DAWE, 1999). Em plantas foi observado que BUBR1, BUB3 e MAD2 são expressas em tecidos ricos em células em franca divisão celular e localizam-se nos cinetocoros. Contudo, nas fases anteriores e posteriores à metáfase, existe uma dissociação destas proteínas, sendo BUBR1 localizada em nucléolos e BUB3/MAD2 dentro do núcleo ou no citoplasma durante a prófase (CAILLAUD et al., 2009), indicando que sua associação é dependente da formação do fuso mitótico. Ainda nesta



via, a proteína quinase MPS1 se liga em Ndc80, também localizada nos cinetocoros, e induz a fosforilação de KLN1. Esta proteína por sua vez recruta o dímero BUB1-BUB3 responsável pelo recrutamento de BUBR1/MAD3 para o complexo do cinetocoro. Em paralelo, MPS1 fosforila BUBR1 induzindo o recrutamento de MAD1 a qual forma um dímero com MAD2 (KOMAKI; SCHNITTGER, 2016). Finalmente, MPS1 é responsável pela fosforilação de MAD2 (FAESEN et al., 2017), induzindo uma modificação conformacional, passando de seu estado inativo O-MAD2 para o ativo C-MAD2 o que permite que esta se ligue no complexo regulador em formação. É necessário que exista atividade constante de MPS1, desta forma mantendo uma via de alimentação de C-MAD2 ao sistema MAD1-MAD2 (MUSACCHIO, 2015; TIPTON et al., 2013). Após essa modificação é criado um circuito de alimentação envolvendo MAD2, BUBR1 e BUB3 que se liga diretamente em CDC20, impedindo a ativação do APC/C. No momento em que todos os cromossomos estão corretamente ancorados, o sinal emitido pelo MCC deixa de existir e todo o complexo é dissociado, permitindo que CDC20 ative o APC/C que em conseqüência, ubiquitina o complexo separase-securina sinalizando sua degradação via hidrólise proteolítica(VLEUGEL et al., 2012).

Embora a expressão de MPS1 já tenha sido observada em diversas espécies vegetais (HAERIZADEH et al., 2009; MENGES et al., 2002; ROCHE et al., 2007; RODRIGUEZ; PETERSEN; MUNDY, 2010) pouco ou nenhum destaque foi dado para suas funções dentro do contexto do ciclo celular em plantas. Porém, como já descrito, esta apresenta papel fundamental nos estágios tardios da divisão celular (HEWITT et al., 2010; JELLUMA et al., 2008; LIU, 2003; WANG et al., 2014; ZHAO; CHEN, 2006), sendo um pivô central para que a célula decida entre prosseguir com a citocinese ou ativar os mecanismos de correção necessários para evitar anomalias cromossômicas nas células filhas.

## **2. OBJETIVOS:**

O objetivo deste trabalho é avaliar o papel da proteína MPS1 durante o desenvolvimento pós-germinativo em diferentes espécies de plantas.

### **2.1. Objetivos específicos:**

1. Identificar os ortólogos da MPS1 em *Glycine max*, *Solanum lycopersicum* e *Sorghum bicolor*;
2. Identificar características estruturais presentes na MPS1 das espécies avaliadas que sejam relevantes dentro do contexto do ciclo celular em plantas;
3. Avaliar o efeito da inibição da MPS1 na germinação e desenvolvimento pós-germinativo de plântulas de *G. max*, *S. lycopersicum* e *S. bicolor*;
4. Avaliar os efeitos da reversão dos efeitos inibitórios do SP600125 no proteoma de plantas de *Arabidopsis thaliana*;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS:

#### 3.1. Análises computacionais:

##### 3.1.1. Identificação dos ortólogos da MPS1 em *Glycine max*, *Solanum lycopersicum* e *Sorghum bicolor*:

A busca pelos ortólogos da MPS1 em soja, tomate e sorgo foi feita utilizando a sequência da MPS1 de *A. thaliana* (AtMps1 – AT1G77720.1) previamente descrita (DE OLIVEIRA et al., 2012) em conjunto com o banco de dados Phytozome v12 (www.phytozome.net). Utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL; GISH; MILLER, 1990) disponível na própria plataforma do Phytozome, as sequências de interesse foram selecionadas buscando diretamente nos genomas das espécies estudadas Wm82.a2.v1 (*G. max*), iTAG2.4 (*S. lycopersicum*) e Sorghum V3.1 (*S. bicolor*). A seleção das sequências obedeceu aos critérios de *score*, *E-value* e grau de cobertura. As sequências possuíam os maiores valores de *score* e cobertura e os menores *E-value* foram escolhidos para fazer parte do estudo. A confirmação da ortologia das sequências com a MPS1 de *A. thaliana* foi realizada utilizando as sequências selecionadas numa análise de BLASTp contra o proteoma de *G.max* e *S. bicolor* com *cut-off* de cobertura  $\geq 50\%$ . Posteriormente foi feita a conferência de anotação da ontologia de cada transcrito selecionado. Os alinhamentos subsequentes foram feitos utilizando o programa MUSCLE (EDGAR, 2004), visualizados e documentados com o programa Jalview (WATERHOUSE et al., 2009).

##### 3.1.2. Identificação de motivos de interação proteína-proteína nos ortólogos da MPS1 de *Glycine max*, *Solanum lycopersicum* e *Sorghum bicolor*:

As sequências selecionadas foram analisadas na plataforma ELM (*Eukaryotic Linear Motif Resource*) (DINKEL et al., 2016) para a identificação. A localização dos motivos de interesse foi feita com o auxílio das ferramentas de alinhamento (jalview e MUSCLE) com o programa PyMOL (v1.3) (Schrödinger, EUA).

3.1.3. Modelagem molecular dos domínios quinase da MPS1 de *Glycine max*, *Solanum lycopersicum* e *Sorghum bicolor*:

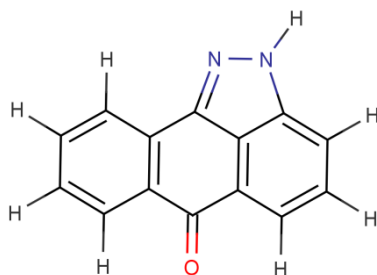
A modelagem das estruturas tridimensionais do domínio quinase da MPS1 de *G. max*, *S. lycopersicum* e *S. bicolor* foi realizada no programa Modeller v9.14 (WEBB; SALI, 2014), utilizando as estruturas de referência (*templates*) selecionadas com o auxílio da ferramenta *Template Identification* hospedada do servidor SWISS-MODEL (ARNOLD et al., 2006; GUEX; PEITSCH; SCHWEDE, 2009; KIEFER et al., 2009). Para cada sequência foram selecionadas quatro estruturas (Tabela 1) de referência, tomando como base o grau de cobertura da sequência a ser modelada e a resolução do cristal em Ångström (Å). As estruturas foram utilizadas juntamente com a sequência polipeptídica do domínio quinase dos ortólogos selecionados. Após a finalização do cálculo (o programa foi configurado para gerar nove soluções para cada sequência), a estrutura gerada com a melhor função objetiva foi escolhida.

**Tabela 1:** Lista das estruturas de referência (*templates*) utilizadas para modelar cada uma das sequências estudadas.

<b>Sequências</b>	<b>Estruturas de referência</b>	<b>Ref. Bibliográfica</b>
Glyma.04G252700.1	3HMN; 3VQU; 2ZMD; 3W1F	
Glyma.06G109800.1	5AP6; 5AP7; 3VQU; 2ZMC	
Glyma.06G109800.2	5AP6; 3HMN; 5AP7; 3H9F	
Glyma.06G109800.3	5AP6; 5AP7; 3VQU; 2ZMC	
Glyma.06G109800.4	3HMN; 2ZMD; 2ZMC; 4JS8	
Glyma.13G083100.1	3HMN; 3VQU; 2ZMD, 3W1F	
Glyma.13G083100.2	5AP6; 3HMN; 2ZMD; 2ZMC	
Glyma.13G083100.3	5AP6; 5AP7; 3VQU; 2ZMC	
Glyma.13G083100.5	4ZEG; 4JT3; 4JS8; 4O6L	(CHU et al., 2008a, 2008b, 2010a, GURDEN et al., 2015, 2015, KUSAKABE et al., 2012, 2013, QIU et al., [s.d.], [s.d.], [s.d.])
Glyma.14G164400.1	3HMN; 3VQU; 2ZMD; 3W1F	
Glyma.14G164400.2	4ZEG; 4JT3; 4JS8; 4O6L	
Glyma.14G164400.3	5AP6; 5AP7; 2ZMD; 2ZMC	
Glyma.14G164400.4	4ZEG; 4JT3; 2ZMD; 4JS8	
Glyma.14G164400.5	3HMN; 3VQU; 2ZMD; 3W1F	
Sobic.001G122100.1	3HMN; 2ZMD; 4JS8; 2ZMC	
Sobic.001G122100.2	4ZEG, 2ZMD; 4JS8, 2ZMC	
Sobic.001G122100.3	3HMN; 2ZMD; 4JS8; 2ZMC	
Sobic.001G122100.4	3HMN; 2ZMD; 2ZMC; 4D2S	
Sobic.001G122100.5	3HMN; 2ZMD, 4JS8, 2ZMC	
Solyc.11g013240.1.1	3H9F; 2ZMD; 3HMN; 2ZMC	

### 3.1.4. Docking molecular da MPS1 com o inibidor SP600125:

A avaliação da interação entre o inibidor SP600125 (Figura 7) e o domínio quinase da MPS1 das espécies selecionadas foi realizado por experimentos de *docking*, utilizando o programa AutoDock v4.2.6 em conjunto com o programa MGLTools v1.5.6 (MORRIS et al., 2009).



**Figura 7:** Fórmula estrutural do inibidor SP600125.

Primeiro, a estrutura do ligante foi desenhada no programa MarvinSkech v5.2.6 (ChemAxon, Ltd.). Posteriormente foi realizada a minimização de energia e otimização geométrica no programa Avogadro v1.1.0 (HANWELL et al., 2012). O ponto inicial de referência para o *docking* foi escolhido tomando como base os resíduos que participam da mesma interação na MPS1 de *A. thaliana* (Glu-499 e Gly-501). Nos cálculos foi utilizada uma caixa de influência (*grid*) de 50x50x50 pontos (XYZ) centralizada no oxigênio livre da carbonila do resíduo de ácido glutâmico nas sequências da MPS1 de *S. lycopersicum* e *S. bicolor* respectivamente.

**Tabela 2:** Lista das estruturas utilizadas nos experimentos de *docking* com o inibidor SP600125. As coordenadas XYZ referem-se a posição do átomo de oxigênio presente no resíduo de referência (glutamato) utilizado para centralizar o *grid* do cálculo.

<b>Ortólogo</b>	<b>Resíduo ref.</b>	<b>Coordenadas XYZ</b>
Sobic113013240.1.1	Glu-551	0.1720; 24.6800; 48.1540
Glyam04g252700.1	Glu-435	-0.6580; -31.8110; -10.0260
Glyma06g109800.1	Glu-477	-37.3350; -21.0030; -11.790
Glyma06g109800.2	Glu-477	-36.8140; -21.1310; -11.3710
Glyma06g109800.3	Glu-477	-37.3350; -21.0030; -11.7940
Glyma13g083100.1	Glu-451	-0.6190; -32.7410; -8.9470
Glyma13g083100.5	Glu-329	31.0690; 29.6570; 65.9390
Glyma14g164400.1	Glu-450	-1.6800; -28.6500; -10.3650
Glyma14g164400.2	Glu-450	20.6100; 36.4240; 74.5640
Glyma14g164400.5	Glu-266	-1.6800; -28.6500; -10.3650
Sobic001g122100.1	Glu-519	0.5110; -29.2920; -11.3570
Sobic001g122100.2	Glu-493	37.3500; 33.6790; 67.2860
Sobic001g122100.3	Glu-515	1.6220; -30.4460; -13.2320
Sobic001g122100.4	Glu-519	0.1040; -31.1950; -8.5850
Sobic001g122100.5	Glu-515	0.0650; -33.3290; -11.3720

No experimento de *docking* foi utilizado o algoritmo genético com 2.500.000 avaliações gerando 10 soluções em cada corrida. As estruturas Glyma06g109800.4, Glyma13g098100.2; Glyma13g098100.3; Glyma14g164400.3 e Glyma14g164400.4 foram excluídas do experimento por não possuírem sequências necessárias para a configuração do sistema de *docking*. Por fim, as soluções com menor energia de formação (Kcal/mol) foram selecionadas, avaliadas e documentadas com o software PyMOL v1.3 com o suporte do plug-in Autodock/Vina (SEELIGER; DE GROOT, 2010).

### 3.2. Material vegetal:

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas quatro espécies vegetais: *Arabidopsis thaliana* cultivar Columbia-0, *Glycine max* variedade BRS-284 (cedidas pela EMBRAPA Soja), *Solanum lycopersicum* cultivar Santa Cruz Kada (obtida comercialmente) e *Sorghum bicolor* variedade BRS-310 cedidas pelo prof. Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho do Laboratório de Biologia Integrativa (Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro).

Sementes transformadas de *A. thaliana* (Columbia-0) contendo a construção CYCB1;1/D-box/GUS (ELOY et al., 2011) foram cedidas pelo prof. Dr. Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira do Laboratório Biologia Molecular de Plantas (Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio de Janeiro).

### **3.3. Higienização e Condições de cultivo:**

#### *3.3.1. Arabidopsis thaliana:*

As sementes de *A. thaliana* foram cultivadas em estufa B. O. D, a 22 °C com fotoperíodo 16 h/8h claro-escuro em placas de cultura de seis poços, contendo 2 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração dos sais (meia força): 2,2 g sais MS (Sigma Aldrich, EUA), 0,25 g/L MES (Sigma Aldrich, EUA), 5 g/L sacarose (Vetec Química Fina Ltda., Brasil), pH 5,8 (ajustado com hidróxido de potássio 1M). Antes da semeadura em meio de cultura as sementes de *A. thaliana* foram higienizadas com uma lavagem em etanol 95% por 1 min e uma lavagem em solução hipoclorito de sódio comercial (assumindo uma concentração inicial de 2% de hipoclorito de sódio em solução) 50% v/v por 15 min sob agitação constante. Posteriormente foram efetuadas três lavagens com água destilada estéril por 30 seg cada. Após a higienização, as sementes foram estocadas na geladeira por 48 h para quebra de dormência. No momento da semeadura foram distribuídas de 10 a 12 sementes por poço em cada placa de cultura.

#### *3.3.2. Glycine max (soja):*

As sementes de *G. max* foram cultivadas em estufa incubadora (Nova Técnica) a 28 °C com fotoperíodo de 12 h/12 h claro-escuro em placas de Petri de 150 mm x 20 mm contendo 2 g de algodão estéril umedecido com 30 mL de água destilada estéril. As sementes foram higienizadas com uma lavagem em etanol 70% por 1 min e uma lavagem em solução de hipoclorito de sódio comercial 50% v/v por 3 min. Posteriormente foram efetuadas três lavagens com água destilada estéril por 30 seg. No momento da semeadura foram distribuídas 20 sementes por placa e cada ponto foi avaliado em triplicata.

### 3.3.3. *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Sorghum bicolor* (sorgo):

As sementes de *S.lycopersicum* e *S. bicolor* foram cultivadas em estufa B. O. D.a 28 °C com fotoperíodo de 12 h/12h claro-escuro em tubos de ensaio de 15 mm x 200 mm contendo 10 mL de meio MS meia força (descrito na seção 3.3.1) sólido (10 g/L Phytigel™, Sigma Aldrich, EUA). As sementes foram higienizadas com uma solução de etanol 70% e uma gota (medida aproximada) de Tween® 20 (Vetec Química Fina Ltda.) por 5 min. Posteriormente foram lavadas três vezes com água destilada estéril por 30 seg e semeadas individualmente nos tubos de ensaio. Os experimentos com plântulas de sorgo e tomate foram realizados em colaboração com o grupo do Prof. Marco Antônio Lopes Cruz UFRJ/Macaé com o auxílio dos alunos de iniciação científica Emanuel Victor Nogueira e Ramon Ermida Fontes.

### 3.4. Inibição da atividade da MPS1 de plantas com SP600125 durante a germinação e o desenvolvimento pós-germinativo:

Para avaliar os efeitos da inibição da MPS1 em plantas de soja, sorgo e tomate, as sementes destas espécies foram germinadas (ver seção 3.3) em contato com concentrações crescentes do inibidor específico SP600125. As sementes de soja foram cultivadas em 1, 5, 10 e 20 µM do inibidor solubilizado em DMSO, sendo os controles negativos, água e água suplementada com DMSO 0,1%. As plântulas foram coletadas em intervalos de 24 h após a semeadura (HAS) até completarem 96 h e conservadas em fixador FAA (formaldeído 37%, etanol 70% e ácido acético q. s. p.) para posterior avaliação do desenvolvimento pós-germinativo. Todas as plântulas foram fotografadas e o comprimento do eixo hipocótilo-radícula foi medido com o auxílio do programa imageJ v1.45s como suporte do *plug-in* SmartRoot (LOBET; PAGES; DRAYE, 2011). As plântulas de sorgo foram cultivadas durante sete dias em 0,1, 1, 10 e 20 µM do inibidor e as plântulas de tomate foram cultivadas sob as mesmas condições durante 10 dias. O após o período de cultivo, as plântulas foram fixadas em fixador de Karnovsky modificado (glutaraldeído 25%, formaldeído 4%, cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2). Posteriormente as plântulas foram fotografadas e o comprimento das raízes e a formação de raízes secundárias foi medido com o auxílio do programa imageJ v1.45s com o suporte do *plug-in* SmartRoot. Os resultados foram tabulados e avaliados utilizando One-way ANOVA (P<0,001) acoplado a um teste de Tukey (P<0,05) com auxílio do programa GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, Inc., EUA).



Sementes transformadas de *A. thaliana* (ELOY et al., 2011) também foram submetidas a um experimento de inibição com a finalidade de observar a influência da paralisação da atividade da MPS1 sobre a expressão do gene de CYCB1;1. Neste experimento 10-12 sementes foram utilizadas em placas de cultura de seis poços contendo 2 mL de meio de cultura MS meia-força com 1 e 5  $\mu$ M de SP600125. As sementes foram mantidas em cultivo por sete dias e posteriormente coletadas e submetidas ao protocolo de revelação de atividade da  $\beta$ -glucoronidase (GUS) (BÉZIAT; KLEINE-VEHN; FERARU, 2017) de acordo com o item 3.5.1. Após a revelação as plantas foram fotografadas em microscopia de campo claro e as fotos utilizadas para quantificação da intensidade da coloração de GUS nos tecidos.

### **3.5. Reversão da inibição da MPS1 em plântulas de *A. thaliana*:**

Com o intuito de avaliar a capacidade de plântulas de *A. thaliana* de retomar sua capacidade normal de desenvolvimento foram realizados dois experimentos distintos de inibição com posterior reversão do efeito causado pelo SP600125. No primeiro experimento sementes de *A. thaliana* foram semeadas em 2 mL de meio MS meia-força (ver seção 3.4) e expostas ao inibidor SP600125 nas concentrações de 0,1 e 1  $\mu$ M. Essas sementes foram cultivadas por 7 dias e após esse primeiro momento de crescimento as plântulas foram lavadas com meio de cultura fresco, mantidas em crescimento e recolhidas em intervalos de 24 h até completarem 12 dias (último ponto de coleta/ dias após lavagem - DAL). Em paralelo, plântulas controle foram mantidas em crescimento por 8-12 dias com coletas a cada intervalo de 24 h. Todas as plântulas foram devidamente fixadas e utilizadas para avaliação dos parâmetros morfológicos escolhidos como indicadores do desenvolvimento pós-germinativo (comprimento da raiz principal e número de raízes secundárias). Os resultados numéricos do experimento foram avaliados pelo teste de Lilliefors para a verificação da normalidade das amostras e pelo teste de Cochran e Barlett para verificação da homogeneidade entre variâncias no programa SAS v9.0 (SAS Institute, Inc.).

No segundo experimento, sementes de *A. thaliana* foram semeadas em 2 mL de meio MS meia-força contendo 1  $\mu$ M de SP600125 e mantidas em cultivo por 5 dias. Após esse período de crescimento as plântulas foram lavadas com meio de cultura fresco (livre de inibidor) e mantidas em crescimento por mais 5 dias (10 dias no total).

Paralelamente, um grupo de plantas controle, cultivadas em meio de cultura sem inibidor, foi cultivado por 10 dias. Cada tratamento consistia de 900 plântulas (3 repetições com 300 plântulas). Ao final do período de cultivo as raízes das plântulas foram coletadas, maceradas em nitrogênio líquido e estocadas a -70 °C. O material macerado foi utilizado para posterior análise proteômica.

Um grupo adicional de sementes de *A. thaliana* transformadas (ELOY et al., 2011) também foram utilizadas em experimentos de reversibilidade, utilizando o mesmo protocolo para obtenção de material para espectrometria de massas: cinco dias de crescimento em inibição, seguidos de cinco dias de crescimento em meio de cultura fresco. O material coletado foi imediatamente submetido ao protocolo de revelação de GUS (item 3.5.1) e documentado num microscópio ZEISS Axio Imager.A2 acoplado em um sistema de captura AxioCam MCr5 em modo de campo claro. As imagens foram processadas utilizando o programa AxioVision v4.8.2 SP2 (Carl Zeiss MacroImaging).

### *3.5.1. Revelação da atividade da $\beta$ -glucoronidase em tecidos vegetais (revelação de GUS) e quantificação da intensidade da coloração nos tecidos:*

Após o período de cultivo, as plântulas de *A. thaliana* foram transferidas pra micro tubos de 2 mL, lavadas com água destilada e incubadas em tampão de revelação fresco (tampão fosfato de sódio [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 M e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 M] 0,1 mM pH 7,0; EDTA 10 mM pH 8,0; Triton™ X-100 0,1%;  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  1 mM, X-Gluc [em DMSO] 2 mM e água q.s.p) por 24 h a 37 °C. Após o período de incubação o tampão de revelação foi retirado e o material lavado com uma solução de etanol e ácido acético na proporção de 3:1. Após as lavagens as amostras foram mantidas na geladeira por pelo menos 12 h (*overnight*) na mesma solução para fixação. Posteriormente as amostras foram estocadas em ácido láctico 50% para a etapa final de clareamento e armazenadas em temperatura ambiente.

O programa imageJ foi utilizado para quantificar a intensidade da atividade GUS nos tecidos corados. As fotos das plântulas obtidas por microscopia óptica de campo claro foram divididas em três canais: matiz, saturação e brilho (stack HSB) e o canal de saturação foi utilizado para a avaliação. Foi criada uma área retangular de interesse (ROI – *Region of Interest*) que foi utilizada em todas as fotos avaliadas (BÉZIAT; KLEINE-VEHN; FERARU, 2017). O resultado das leituras foram tabulados e avaliados

por One-way ANOVA ( $P < 0,001$ ) acoplado a um teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) no programa GraphPad Prism v5.0.

### **3.6. Análise proteômica:**

Para investigar mais profundamente os efeitos da inibição da MPS1 no desenvolvimento pós-germinativo de plântulas de *A. thaliana* o material coletado após o experimento de reversibilidade, descrito na seção 3.5, foi utilizado para análise proteômica por espectrometria de massas:

#### *3.6.1. Extração de proteínas e digestão protéica:*

Aproximadamente 300 mg de material fresco e congelado de cada amostra (controle e tratado) foram utilizados para extração de proteína como descrito por REIS et al., (2016). Todas as amostras foram homogeneizadas em 1 ml de tampão de extração (uréia 7M, tio-uréia 2M, Triton™ X-100, DTT 1%, PMSF 1 mM e pepstatina 5  $\mu$ M) incubadas por 30 minutos no gelo e centrifugadas a 16.000 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e quantificado utilizando o kit 2-D Quant Kit (GE Healthcare, EUA). A digestão protéica, realizada como passo preparatório para a aplicação das amostras no espectrômetro de massas, foi conduzida seguindo o protocolo modificado proposto por CALDERAN-RODRIGUES et al.,(2014). Alíquotas de 100  $\mu$ M de todas as amostras foram dessalinizadas em colunas Vivaspin 500 (MWCO 5000) (GE Healthcare, EUA) utilizando bicarbonato de amônio (Sigma Aldrich, EUA) pH 8,5 como tampão. As amostras foram incubadas a 80 °C por 15 min em 25  $\mu$ L de RapiGest® a 0,2% (Waters, EUA). Posteriormente foram adicionados 100 mM de DTT às amostras, as quais foram prontamente homogeneizadas e incubadas sob agitação por 30 min a 60 °C. Em seguida foram adicionados 300 mM de iodoacetamida às amostras as quais foram deixadas repousando por 30 min no escuro em temperatura ambiente. O passo de digestão foi conduzido *overnight* a 37 °C após a adição de 50  $\eta$ g/ $\mu$ L de tripsina (Promega, EUA) em cada amostra. Após a digestão o RapiGest® foi precipitado com uma adição de ácido trifluoroacético (TFA) 5% (v/v) seguida de incubação a 37 °C por 90 min. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas por 30 min a 16.000 x g e então transferidas para frascos do tipo *Total Recovery Vials* (Waters, Reino Unido).

### 3.6.2. Espectrometria de massas:

As análises por espectrometria de massas (ESI-LC-MS/MS) foram conduzidas como descrito por REIS et al., (2016) num cromatógrafo UPLC nanoAcquity conectado a um espectrômetro de massas Synapt G2-Si HDMS (Waters, Reino Unido). A primeira etapa de normalização foi realizada baseada em aferições estequiométricas das contagens de íons nas corridas em modo MS<sup>E</sup>. Na etapa de separação todas as amostras foram injetadas numa coluna C18 (180 µm x 20 mm) a 5 µL/min por 3 min e então transferidas para a coluna de fase reversa nanoAcquity HSS T3 (100 µm x 100 mm) a 60 °C com fluxo de 600 nL/min. O passo de eluição dos peptídeos foi realizado em gradiente binário composto por duas fases móveis (fase móvel **A**: ácido fórmico 0,1 % em água e fase móvel **B**: acetronitrila e ácido fórmico 0,1%). A eluição foi iniciada com 7% de fase móvel **B** por 3 min e então acrescida para 40% até a marca de 90,09 min para então receber um novo acréscimo para 85% até a marca de 98,09 min. O gradiente da fase móvel foi então reduzido para 7% (solução **B**) aos 100,09 min e mantido constante até o final da corrida aos 108,09 min. A espectrometria de massas foi realizada em *V mode* (resolução positiva) a 35.000 FWHM com mobilidade iônica e aquisição independente (D/A) (HDMS<sup>E</sup>). A velocidade de onda foi de 600 m/s e o modo de transferência de colisão aumentou de 19 para 45 V em modo de alta energia. A tensão do cone e dos capilares foi configurada para 30V e 2800 V respectivamente a 70 °C. O tempo de vôo (TOF) foi configurado para 0,5 segundos em modo contínuo com variação de massa entre 50 e 2000 Da. Foi utilizado o [Glu1]-fibrinopeptídeo B humano (100 fmol/µL) como padrão de calibração e a aquisição de foi realizada a cada 30 segundos.

### 3.6.3. Análise computacional dos resultados gerados pela espectrometria de massas:

O processamento e interpretação dos espectros de massa foram realizados no programa *ProgenesisQi for Proteomics* v2.0. As condições de busca nas bases de dados utilizaram os seguintes parâmetros: uma clivagem perdida, íon de fragmento mínimo por peptídeo igual a 1, íon de fragmento mínimo por proteína igual a 3, peptídeo mínimo por proteína igual a 2, modificações de carbaminoetil (C) fixas e modificações de oxidação (M) e fosforil (STY) variáveis. A taxa de falsos positivos (FDR) foi padronizada com o valor máximo de 4%, *score* maior que 5 e erro de massa máximo de 10 ppm. Após a análise no programa *Progenesis* apenas proteínas presentes em todas as

três amostras biológicas avaliadas foram incluídas na lista final. A análise de variação na expressão (*fold change*) foi realizada pelo programa *Progenesis* utilizando ANOVA ( $P < 0,05$ ) com os parâmetros nativos do programa. Proteínas com valores de *fold change* maior ou igual a 1,5 foram consideradas positivamente reguladas e proteínas com *fold change* menor ou igual a 0,666667 foram consideradas negativamente reguladas. A anotação de termos de ontologia foi realizada no programa *Bast2GO* v3.0. Todos os experimentos envolvendo espectrometria de massas foram realizados em colaboração com o doutorando Lucas Zanqueta Passamani, sob a supervisão do prof. Dr. Vanildo Silveira da Unidade de Biologia integrativa, CBB-UENF.

Os resultados obtidos na espectrometria de massas também foram avaliados no programa *MapMan* v3.15.1R2 utilizando o mapeamento do TAIR10 (Ath\_AGI\_LOCUS\_TAIR10\_Aug2012).

### **3.7. Ensaio de inibição *in vitro* da MPS1 de *A. thaliana*:**

Para confirmar se o inibidor SP600125 realmente é capaz de inibir a atividade quinase da MPS1 de *A. thaliana*, seu domínio quinase purificado (Agrisera, Suécia) foi submetido a um ensaio de quantificação de atividade. Neste experimento 10 ng do domínio quinase MPS1 purificado foram incubados em tampão de reação (tris-HCl 50 mM, pH 7,4; NaCl 0,2 M, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1mM e ATP 100 µM) (KANG et al., 2007b) em gradiente de concentração do inibidor SP600125 (0,01; 0,1, 1 µM) e DMSO 4% (v/v) foi utilizado como controle. A reação incubada foi processada como kit *Universal Fluorimetric Assay Kit* (Sigma Aldrich, EUA) e o volume final de reação, incluindo todos os reagentes fornecidos pelo kit foram de 50 µL. As reações foram distribuídas em placas de 96 poços pretas as quais foram incubadas por 15 minutos no escuro em temperatura ambiente. Após o período de incubação a intensidade da fluorescência emitida foi avaliada num leitor de microplacas (*Hidex Plate Chamaleon V 425-106 Multilabel Counter*) utilizando 544 nm no espectro de excitação e 590 nm no espectro de absorção. Foram Efetuadas quatro leituras em intervalos de 15 min (15, 30, 45 e 60 min.). Todas as reações foram realizadas em duplicadas e os valores médios foram considerados. As leituras obtidas nos controles negativos (reação apenas com os reagentes fornecidos pelo kit) foram subtraídas das leituras obtidas em cada ponto avaliado (recomendado pelo fabricante).

## 4. RESULTADOS:

### 4.1. Identificação dos ortólogos da Mps1 de *A. thaliana* em *G.max*, *S.lycopersicum* e *S. bicolor* e análise computacional da presença de *motifs* de interação relevantes no contexto do ciclo celular:

A prospecção de sequências revelou a presença de 20 ortólogos divididos entre as três espécies selecionadas. Em *G. max* foram identificados 13 transcritos divididos em quatro genes, Glyma04g252700 com apenas um transcrito, Gylma06g109800 contendo quatro transcritos, Glyma13g083100 contendo quatro transcritos e Glyma14g164400 apresentando cinco transcritos. Em *S. bicolor* foram identificados cinco ortólogos pertencentes a apenas uma família gênica, Sobic.001g122100 e em *S. lycopersicum* apenas um ortólogo Solyc.11g013241.1.1. Todos apresentaram o gene At1g77720 (MPS1 de *A. thaliana*) como melhor *hit* e foram classificados como uma proteína quinase putativa (PPK1), além de possuírem o domínio funcional serina-treonina ou tirosina quinase (anotação Pfam P00069 e P07714) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Listagem dos ortólogos da MPS1 de *A. thaliana* identificados em *G.max*, *S. bicolor* e *S. lycopersicum*. PPK1: *Putative Protein Kinase 1* (proteína quinase putativa 1); PF007714 e PF00069 identificadores Pfam do domínio funcional com atividade tirosina ou serina-treonina quinase, respectivamente:

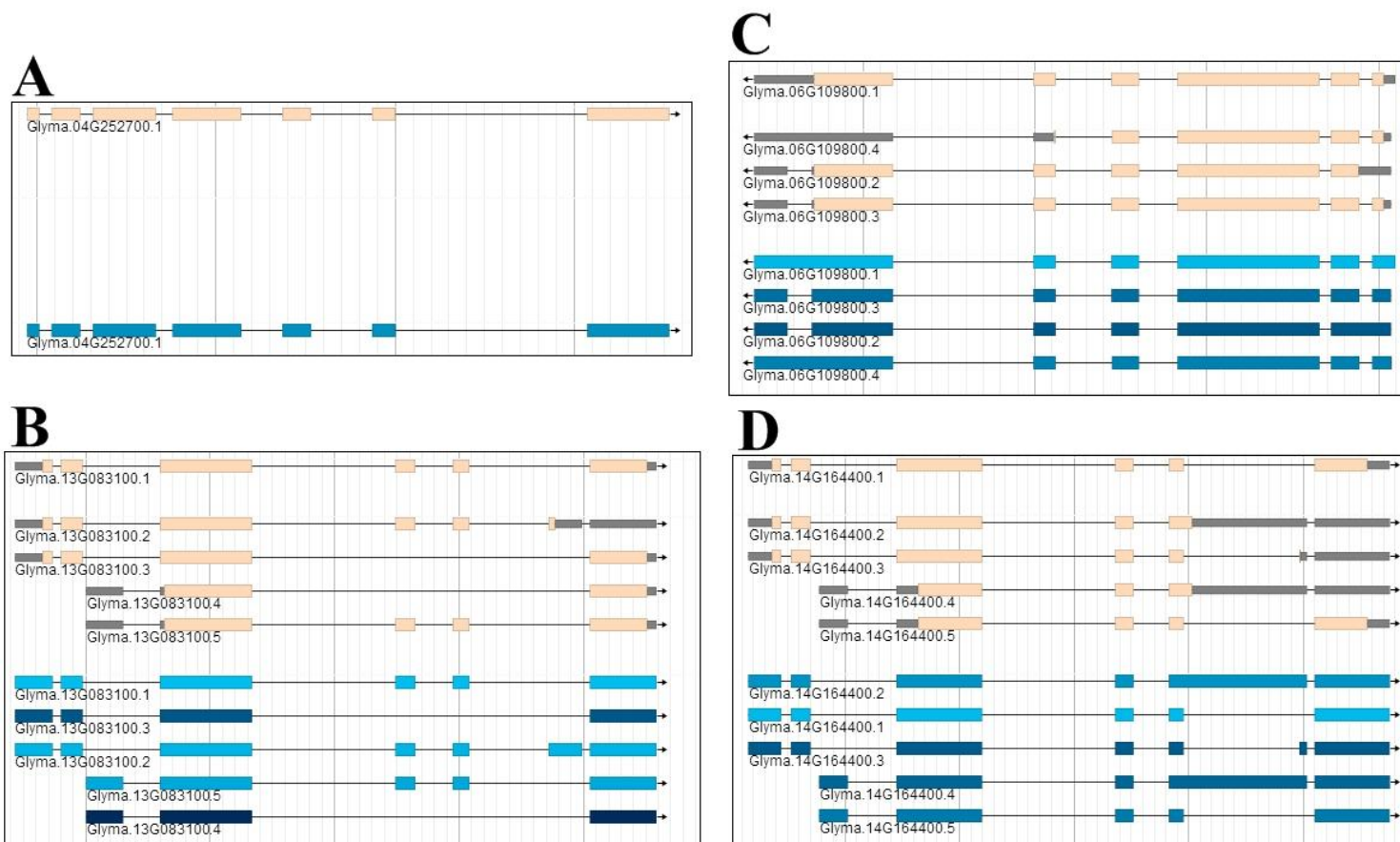
<i>Locus</i> /transcrito	Pfam	Melhor hit em <i>A. thaliana</i>	Definição
Glyma.04G252700.1	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Glyma.06G109800.1	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Glyma.06G109800.2	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Glyma.06G109800.3	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Glyma.06G109800.4	PF00069	AT1G77720.1	PPK1
Glyma.13G083100.1	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Glyma.13G083100.2	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Glyma.13G083100.3	PF00069	AT1G77720.1	PPK1
Glyma.13G083100.5	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Glyma.14G164400.1	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Glyma.14G164400.2	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Glyma.14G164400.3	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Glyma.14G164400.4	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Glyma.14G164400.5	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Sobic.001G122100.1	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Sobic.001G122100.2	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Sobic.001G122100.3	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Sobic.001G122100.4	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Sobic.001G122100.5	PF07714	AT1G77720.1	PPK1
Solyc.11g013240.1.1	PF00069	AT1G77720.1	PPK1

Avaliando de maneira mais detalhada é possível observar que essas proteínas apresentam dois blocos distintos em suas sequências. O primeiro é referente ao domínio N-terminal, o qual se mostra bastante divergente, apresentando baixo grau de identidade e um grande número de inserções, principalmente nas porções mais iniciais. Contudo, é importante salientar que as sequências peptídicas que pertencem à mesma família gênica formam agrupamentos com seus semelhantes, originando blocos de conservação ao longo do alinhamento, além de existir uma clara divisão ente monocotiledôneas (sorgo) e dicotiledôneas (*Arabidopsis*, soja e tomate). Desta forma, as avaliações subsequentes entre as diferentes sequências de MPS1 serão realizadas respeitando estes agrupamentos. Em contrapartida, o domínio quinase apresenta tendência oposta ao observado na região N-terminal. O grau de conservação é bastante elevado, apesar de haver substituições ou deleções importantes em regiões chave do domínio funcional, que podem impactar a atividade destas proteínas. Seis ortólogos de soja

(Glyma13g083100.2, Glyma13g083100.3, Glyma14g164400.2, Glyma14g164400.3, Glyma14g164400.4 e Glyma06g109800.4) apresentam uma redução significativa do domínio quinase em comparação ao domínio funcional da MPS1 de *A. thaliana*. Destes, quatro ortólogos (Glyma 13g083100.3, Glyma13g083100.2, Glyma14g164400.4 e Glyma06g109800,4) também não possuem a região que delimita o loop de ativação que é fundamental para o correto funcionamento de todas as proteínas quinases (DOU et al., 2011; KLAUS-HEISEN et al., 2011; RUSSO; JEFFREY; PAVLETICH, 1996; WANG et al., 2009) (Figura 8). A perda do loop de ativação é significativa porque nesta região está localizado o *motif* DFG (aspartato-fenilalanina-glicina), o qual já é classicamente associado a manutenção da atividade em proteínas quinase (RUSSO; JEFFREY; PAVLETICH, 1996) e um conjunto de três resíduos de treonina (Thr-579, 580 e 590 na MPS1 de *A. thaliana*), os quais estão fortemente implicados na ativação por autofosforilação, localização e seleção dos alvos das quinases da família da MPS1(LIU; WINEY, 2012). Todavia, embora tenha ocorrido essa deleção de partes das seqüências polipeptídicas dos ortólogos de soja, os atlas de expressão disponíveis ainda indicam que estes genes estão sendo expressos em diversos tecidos da planta em níveis variados (Figura 8). Na avaliação das seqüências também foi possível observar que naquelas em que não houve encurtamento do domínio quinase por deleção de resíduos, as regiões que estão relacionadas com a atividade catalítica da enzima, mais precisamente o sítio de ligação ao substrato (ATP) e o sítio ativo também foram conservados (Figura 9) (DOU et al., 2004; FISK; WINEY, 2004; MATTISON et al., 2007a).

De maneira oposta, foi observado que o grau de conservação no domínio quinase entre os ortólogos da MPS1 de *S. bicolor* é mais elevado, o que de certa forma surpreende, considerando a distância evolutiva que separa monocotiledôneas das dicotiledôneas.





**Figura 8:** Atlas de expressão dos ortólogos da MPS1 de *A. thaliana* em *G. max*. A: Glyma.04g252700.1; B: Glyma.13g083100; C: Glyma06g109800 e D: Glyma.14g164400. As barras superiores (bege) indicam todos os transcritos e as barras inferiores (azul) indicam os valores médios de transcrição, considerando diferentes tecidos da planta (vagem, folha, raiz, nódulos radiculares, semente, meristema apical, haste e flor); Fonte: [phytozome.jgi.doe.gov/jbrowse](http://phytozome.jgi.doe.gov/jbrowse).

```

AT1G77720.1/400-693 400 --YQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCTIYALNRKIKLKGRDYATAYGFCQE|GYLKKLKGKTN|QLIDYEVTDKTLLEVLNQTMSNKDGRVKEDGF| 494
Glyma.13G083100.3/350-524 350 KLYQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCTIYALNRKIKLKGRDYATAYGFCQE|EYLNRLKGGKNNI|QLIDYEV----- 419
Glyma.13G083100.1/350-645 350 KLYQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCTIYALNRKIKLKGRDYATAYGFCQE|EYLNRLKGGKNNI|QLIDYEVTDKALFEGVINGSFNSNKDGRVKDDGY| 446
Glyma.13G083100.5/228-523 228 KLYQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCTIYALNRKIKLKGRDYATAYGFCQE|EYLNRLKGGKNNI|QLIDYEVTDKALFEGVINGSFNSNKDGRVKDDGY| 324
Glyma.13G083100.2/350-461 350 KLYQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCTIYALNRKIKLKGRDYATAYGFCQE|EYLNRLKGGKNNI|QLIDYEVTDKALFEGVINGSFNSNKDGRVKDDGY| 446
Glyma.14G164400.3/349-539 349 KLYQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCTIYALNRKIKLKGRDYATAYGFCQE|EYLNRLKGGKNNI|QLIDYEVTDKALFEGVINGSFNSNKDGRVKDDGY| 445
Glyma.14G164400.4/165-335 165 KLYQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCTIYALNRKIKLKGRDYATAYGFCQE|EYLNRLKGGKNNI|QLIDYEVTDKALFEGVINGSFNSNKDGRVKDDGY| 261
Glyma.14G164400.1/349-644 349 KLYQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCTIYALNRKIKLKGRDYATAYGFCQE|EYLNRLKGGKNNI|QLIDYEVTDKALFEGVINGSFNSNKDGRVKDDGY| 445
Glyma.14G164400.5/165-460 165 KLYQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCTIYALNRKIKLKGRDYATAYGFCQE|EYLNRLKGGKNNI|QLIDYEVTDKALFEGVINGSFNSNKDGRVKDDGY| 261
Glyma.14G164400.2/349-539 349 KLYQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCTIYALNRKIKLKGRDYATAYGFCQE|EYLNRLKGGKNNI|QLIDYEVTDKALFEGVINGSFNSNKDGRVKDDGY| 445
Glyma.04G252700.1/334-629 334 KLYQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCRIYALNRKIKLKGRDYATAYGFCQE|EYLNRLKGGKNNI|QLIDYEVTDKALLEEVMKGSFNSNKDGRVKDDGC| 430
Glyma.06G109800.1/376-671 376 KLYQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCRIYALNRKIKLKGRDYATAYGFCQE|EYLNRLKGGKNNI|QLIDYEVTDKALLEEVMKGSFNSNKDGRVKDDGC| 472
Glyma.06G109800.3/376-671 376 KLYQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCRIYALNRKIKLKGRDYATAYGFCQE|EYLNRLKGGKNNI|QLIDYEVTDKALLEEVMKGSFNSNKDGRVKDDGC| 472
Glyma.06G109800.2/346-641 346 KLYQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCRIYALNRKIKLKGRDYATAYGFCQE|EYLNRLKGGKNNI|QLIDYEVTDKALLEEVMKGSFNSNKDGRVKDDGC| 442
Glyma.06G109800.4/376-509 376 KLYQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCRIYALNRKIKLKGRDYATAYGFCQE|EYLNRLKGGKNNI|QLIDYEVTDKALLEEVMKGSFNSNKDGRVKDDGC| 472

AT1G77720.1/400-693 495 YMVLE YGEIDLAHMLSQKWR|EIGSDRTIDENMLRFYMQQ|LQAVNTIHEER|VHSDLPANFLLRVGF LKLIDFGIAKAIMSDTTN|QRDSQVGT| 591
Glyma.13G083100.3/350-524 420 -----GTL 422
Glyma.13G083100.1/350-645 447 YMVLE YGEIDLAHMLSQKWR|ELNGSNQIDENMLRFYMQQ|LQAVNTIHEER|VHSDLPANFLLVKGS LKLIDFGIAKAIMSDTTN|QRDSQVGT| 543
Glyma.13G083100.5/228-523 325 YMVLE YGEIDLAHMLSQKWR|ELNGSNQIDENMLRFYMQQ|LQAVNTIHEER|VHSDLPANFLLVKGS LKLIDFGIAKAIMSDTTN|QRDSQVGT| 421
Glyma.13G083100.2/350-461 447 YMVLE YGEIDLAHML----- 461
Glyma.14G164400.3/349-539 446 YMVLE YGEIDLAHMLSQKWK|ELDGSNQTIDENMLRFYMQQ|LQAVNTIHEER|VHSDLPANFLLVKGS LKLIDFGIAKAIMSDTTN|QRDSQA|--- 539
Glyma.14G164400.4/165-335 262 YMVLE YGEIDLAHMLSQKWK|ELDGSNQTIDENMLRFYMQQ|LQAVNTIHEER|VHSDLPANFLLVKGS LKLID----- 335
Glyma.14G164400.1/349-644 446 YMVLE YGEIDLAHMLSQKWK|ELDGSNQTIDENMLRFYMQQ|LQAVNTIHEER|VHSDLPANFLLVKGS LKLIDFGIAKAIMSDTTN|QRDSQVGT| 542
Glyma.14G164400.5/165-460 262 YMVLE YGEIDLAHMLSQKWK|ELDGSNQTIDENMLRFYMQQ|LQAVNTIHEER|VHSDLPANFLLVKGS LKLIDFGIAKAIMSDTTN|QRDSQVGT| 358
Glyma.14G164400.2/349-539 446 YMVLE YGEIDLAHMLSQKWK|ELDGSNQTIDENMLRFYMQQ|LQAVNTIHEER|VHSDLPANFLLVKGS LKLIDFGIAKAIMSDTTN|QRDSQV|--- 539
Glyma.04G252700.1/334-629 431 YMVLE YGEIDLAHMLSQKWK|ELDGNNTIDENMLRFYMQQ|LLAVNTIHEER|VHSDLPANFLLVKGS LKLIDFGIAKAIMSDTTN|QRDSQVGT| 527
Glyma.06G109800.1/376-671 473 YMVLE YGEIDLAHMLSQKWK|ELDGSYQIDENMLRFYMQQ|LLAVNTIHEER|VHSDLPANFLLVKGS LKLIDFGIAKAIMSDTTN|QRDSQVGT| 569
Glyma.06G109800.3/376-671 473 YMVLE YGEIDLAHMLSQKWK|ELDGSYQIDENMLRFYMQQ|LLAVNTIHEER|VHSDLPANFLLVKGS LKLIDFGIAKAIMSDTTN|QRDSQVGT| 569
Glyma.06G109800.2/346-641 443 YMVLE YGEIDLAHMLSQKWK|ELDGSYQIDENMLRFYMQQ|LLAVNTIHEER|VHSDLPANFLLVKGS LKLIDFGIAKAIMSDTTN|QRDSQVGT| 539
Glyma.06G109800.4/376-509 473 YMVLE YGEIDLAHMLSQKWK|ELDGSYQIDENMLRFY----- 509

AT1G77720.1/400-693 592 SYMSPEAFMCN|ESDENGNTIKCGRPSDIWSLGC|LYQMYYGRTPFADYKTFWAKFKV|IDPNHE|ITYE|VSNPWLLDLMKRC|LAWHRNERWAR|PELL 688
Glyma.13G083100.3/350-524 423 SYMSPEAFMCN|ESDASGNTIKCGRPSDIWSLGC|LYQMYYGRTPFADYRTFWAKFKV|IDPNHE|ITYE|VSNPWLLDLMKRC|LAWHRNERWAR|PQLL 519
Glyma.13G083100.1/350-645 544 SYMSPEAFMCN|ESDASGNTIKCGRPSDIWSLGC|LYQMYYGRTPFADYRTFWAKFKV|IDPNHE|ITYE|VSNPWLLDLMKRC|LAWHRNERWAR|PQLL 640
Glyma.13G083100.5/228-523 422 SYMSPEAFMCN|ESDASGNTIKCGRPSDIWSLGC|LYQMYYGRTPFADYRTFWAKFKV|IDPNHE|ITYE|VSNPWLLDLMKRC|LAWHRNERWAR|PQLL 518
Glyma.13G083100.2/350-461 ----- 461
Glyma.14G164400.3/349-539 ----- 539
Glyma.14G164400.4/165-335 ----- 335
Glyma.14G164400.1/349-644 543 SYMSPEAFMCN|ESDASGNTIKCGRPSDIWSLGC|LYQMYYGRTPFADYKTFWAKFKV|IDPNHE|IMYAPVSNPWLLDLMRRC|LAWDRNERWAR|PQLL 639
Glyma.14G164400.5/165-460 359 SYMSPEAFMCN|ESDASGNTIKCGRPSDIWSLGC|LYQMYYGRTPFADYKTFWAKFKV|IDPNHE|IMYAPVSNPWLLDLMRRC|LAWDRNERWAR|PQLL 455
Glyma.14G164400.2/349-539 ----- 539
Glyma.04G252700.1/334-629 528 SYMSPEAF|LCNETDANGNTIKCGRPSDIWSLGC|LYQMYYGRTPFSDYKTFWAKFKV|IDPNHK|ITYE|VSNPWLLDLMKRC|LAWDRNQRWAR|PQLL 624
Glyma.06G109800.1/376-671 570 SYMSPEAF|LCNETDANGNTIKCGRPSDIWSLGC|LYQMYYGRTPFSDYKTFWAKFKV|IDPNHK|ITYE|VSNPWLLDLMER|LAWDRNQRWAR|PQLL 666
Glyma.06G109800.3/376-671 570 SYMSPEAF|LCNETDANGNTIKCGRPSDIWSLGC|LYQMYYGRTPFSDYKTFWAKFKV|IDPNHK|ITYE|VSNPWLLDLMER|LAWDRNQRWAR|PQLL 666
Glyma.06G109800.2/346-641 540 SYMSPEAF|LCNETDANGNTIKCGRPSDIWSLGC|LYQMYYGRTPFSDYKTFWAKFKV|IDPNHK|ITYE|VSNPWLLDLMER|LAWDRNQRWAR|PQLL 636
Glyma.06G109800.4/376-509 ----- 509

```

**Figura 9** Alinhamento múltiplo das seqüências do domínio quinase dos ortólogos da MPS1 de *A. thaliana* e *G.max.*. Vermelho - loop de ativação; preto – motif DFG; azul escuro – treoninas de ativação e verde – sítio de ligação a ATP e sítio ativo.

Observando o alinhamento múltiplo entre os domínios quinase dos cinco ortólogos da MPS1 em *S. bicolor* (Sobic.001g122100.1, 011g122100.2, 011g122100.3, 011g122100.4 e 011g122100.5) nota-se que apenas os transcritos Sobic.011g122100.4 e 011g122100.5 apresentam alguma divergência na porção C-terminal do domínio funcional. O loop de ativação bem como as regiões de importância catalítica são inteiramente conservados, incluindo o *motif* DFG e as três treoninas responsáveis pela ativação da enzima por autofosforilação (Figura 10). A mesma tendência pode ser observada na comparação com o ortólogo de *S. lycopersicum* (Solyc.11g013240.1.1), entretanto chama a atenção uma inserção de 30 resíduos entre as posições 586 e 616 (Figura 11).

```

AT1G77720.1/400-693      400 - - YQRLGKIGSGGSSEVHKV I SSDCT I YALYK IKLKRGRDYATAYGFCQE I GYLKKLKGK TN I IQL IDYEVTDKTLLQEVNLNGTMSNKDGRVKEDGF I 494
Sobic.001G122100.1/421-713 421 KLYQKLGKIGSGGSSEVHKV I SSDC I IYALYK IKLRGRDYPTAYGFCQE I EYLNKLGKSN I IQMIDYEVTDKSLL - - - LESSVPPRDGR IKDDHF I 514
Sobic.001G122100.3/417-719 417 KLYQKLGKIGSGGSSEVHKV I SSDC I IYALYK IKLRGRDYPTAYGFCQE I EYLNKLGKSN I IQMIDYEVTDKSLL - - - LESSVPPRDGR IKDDHF I 510
Sobic.001G122100.2/395-687 395 KLYQKLGKIGSGGSSEVHKV I SSDC I IYALYK IKLRGRDYPTAYGFCQE I EYLNKLGKSN I IQMIDYEVTDKSLL - - - LESSVPPRDGR IKDDHF I 488
Sobic.001G122100.4/421-655 421 KLYQKLGKIGSGGSSEVHKV I SSDC I IYALYK IKLRGRDYPTAYGFCQE I EYLNKLGKSN I IQMIDYEVTDKSLL - - - LESSVPPRDGR IKDDHF I 514
Sobic.001G122100.5/417-665 417 KLYQKLGKIGSGGSSEVHKV I SSDC I IYALYK IKLRGRDYPTAYGFCQE I EYLNKLGKSN I IQMIDYEVTDKSLL - - - LESSVPPRDGR IKDDHF I 510

AT1G77720.1/400-693      495 YMVLEYGEIDL AHMSLQKWRE I EGS DRT I DENMLRFYWQQ I LQAVNT I HEER I VHSDLK PANFLLV RGF LKL I DFG I AKA I NSD TTN I QRDSQVGT L 591
Sobic.001G122100.1/421-713 515 YMVLEYGEIDL ANMVALKWK ERHNCNMK I DENMLRFYWQQM LEAVST I HEER I VHSDLK PANFMLVRGSLKL I DFG I AKA I MND TTN I QRDAQVGT L 611
Sobic.001G122100.3/417-719 511 YMVLEYGEIDL ANMVALKWK ERHNCNMK I DENMLRFYWQQM LEAVST I HEER I VHSDLK PANFMLVRGSLKL I DFG I AKA I MND TTN I QRDAQVGT L 607
Sobic.001G122100.2/395-687 489 YMVLEYGEIDL ANMVALKWK ERHNCNMK I DENMLRFYWQQM LEAVST I HEER I VHSDLK PANFMLVRGSLKL I DFG I AKA I MND TTN I QRDAQVGT L 585
Sobic.001G122100.4/421-655 515 YMVLEYGEIDL ANMVALKWK ERHNCNMK I DENMLRFYWQQM LEAVST I HEER I VHSDLK PANFMLVRGSLKL I DFG I AKA I MND TTN I QRDAQVGT L 611
Sobic.001G122100.5/417-665 511 YMVLEYGEIDL ANMVALKWK ERHNCNMK I DENMLRFYWQQM LEAVST I HEER I VHSDLK PANFMLVRGSLKL I DFG I AKA I MND TTN I QRDAQVGT L 607

AT1G77720.1/400-693      592 SYMSPEAFMCN ESDENGNT I KCGRPSD I WSLGC I LYQMVYGR TPFADYKTFWAKFKV I TDPNHE I TYNQLSNPWL I DLMKKCLAWDRNQRWR I PELL 688
Sobic.001G122100.1/421-713 612 NYMSPEAFMCND TDSGGNV I KCGRPSD I WSLGC I LYQMVYGK TPFADYKTFWAKYK EVDTRNHK I MYEPVDNPWL I DLMQRCLAWDRNERWR I PQLL 708
Sobic.001G122100.3/417-719 608 NYMSPEAFMCND TDSGGNV I KCGRPSD I WSLGC I LYQMVYGK TPFADYKTFWAKYK EVDTRNHK I MYEPVDNPWL I DLMQRCLAWDRNERWR I PQLL 704
Sobic.001G122100.2/395-687 586 NYMSPEAFMCND TDSGGNV I KCGRPSD I WSLGC I LYQMVYGK TPFADYKTFWAKYK EVDTRNHK I MYEPVDNPWL I DLMQRCLAWDRNERWR I PQLL 682
Sobic.001G122100.4/421-655 612 NYMSPEAFMCND TDSGGNV I KCGRPSD I WSLGC I LYQMVYGVSP - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 655
Sobic.001G122100.5/417-665 608 NYMSPEAFMCND TDSGGNV I KCGRPSD I WSLGC I LYQMVYGVSPGTEMND - - GGYNLFSS - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 665

AT1G77720.1/400-693      689 QHPFL - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 693
Sobic.001G122100.1/421-713 709 KHPFL - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 713
Sobic.001G122100.3/417-719 705 KHPFLNPPVPKDLPP - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 719
Sobic.001G122100.2/395-687 683 KHPFL - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 687
Sobic.001G122100.4/421-655 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 655
Sobic.001G122100.5/417-665 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 665

```

**Figura 10:** Alinhamento múltiplo das seqüências do domínio quinasedos ortólogos da MPS1 de *A. thaliana* e *S. bicolor*.. Vermelho - loop de ativação; preto – *motif* DFG; azul escuro – treoninas de ativação e verde: sítio de ligação a ATP e sítio ativo

```

AT1G77720.1/400-693      400 - -YQRLGKIGSGGSSEVHKV|SSDCTIYALKKIKLKGRDYATAYGFCQEI GYLKCLKGKTN|IQLIDYEVDKTL LQEVLNGTMSNKDGRVKEDGF|Y495
Solyc11g013240.1.1/450-737 450 KLYQRLGKIGSGGSSEVHKV|ASDCSIYALKKIKLKGRDYATAYGFCQEI EYLKRLKGKNN|IQLIDYEVDKNLLDEVMNGSMSNNE TRVKEDGY|Y547

AT1G77720.1/400-693      496 MVL EYGEIDLAHMLSQKWAREIEGSDRTIDENWLRFYWQ-----QILQAVNTIHEERIVHSDLKPANFL LVRG562
Solyc11g013240.1.1/450-737 548 MVL EYGEIDLAHMLSQKWARELDGSDSIDENWLRFYWQA IQGEFEDES YKLSCKRMLTKKGSVIGMSGGQILLAVNTIHEERIVHSDLKPANFL LVRG645

AT1G77720.1/400-693      563 FLKLIDFGIAKA INSDTTN|QRDSQVGTLSYMSPEAFMCNESDENGNTIKCGRPSDIWSLGCILYQM VYGRTPFADYKTFWAKFKVI TDPNHEITYNQ660
Solyc11g013240.1.1/450-737 646 SLKLIDFGIAKA IMCDTTN|QRDSQVGTLSYMSPEAFMCNETDANGNTIKCGRPSDIWSLGCILYQM VYGRTPFSEFKTFWAKFKVI TPNH-----737

AT1G77720.1/400-693      661 LSNPWLIDLMKKCLAWDRNQQRWRIPELLQHPFL
Solyc11g013240.1.1/450-737 -----

```

**Figura 11:** Alinhamento múltiplo das seqüências do domínio quinase dos ortólogos da MPS1 de *A. thaliana* e *S. lycopersicum*.. Vermelho - loop de ativação; preto – motif DFG; azul escuro – treoninas de ativação e verde – sítio de ligação a ATP e sítio ativo.

A busca por *motifs* de interação proteína-proteína utilizando a ferramenta disponível no servidor ELM revelou que as seqüências estudadas apresentam diversos sítios de interesse dentro do contexto do ciclo celular. Novamente a análise foi dividida entre as regiões N-terminal e o domínio funcional. A porção C-terminal não foi incluída na análise por não ter apresentado nada de relevante, além de na grande maioria das seqüências ser praticamente inexistente. Abaixo seguem os *motifs* identificados (Tabela 4):

**Tabela 4:** Tabela com os *motifs* de interação proteína-proteína selecionados após análise com a ferramenta ELM:

<i>Motif</i>	Definição	Referência
DEG_APCC_DBOX_1	Ligação ao APC/C e degradação	(GLOTZER; MURRAY; KIRSCHNER, 1991)
DOC_CYCLIN_1	Sítio de reconhecimento de ciclina	(TAKEDA; WOHLSCHLEGEL; DUTTA, 2001)
DOC_MAPK_gen_1	Sítio de <i>docking</i> a MAPKs	(TANOUE, 2001)
LIG_14-3-3_CanoR_1	Fosfopeptídeo de ligação a proteínas 14_3_3	(MUSLIN et al., 1996)
LIG_MAD2	Ligação a MAD2	(MUSACCHIO; HARDWICK, 2002)
LIG_SUMO_SIM_par_1 LIG_SUMO_SIM_anti_2	Sítio de interação com SUMO	(ENDTER et al., 2001) (HECKER et al., 2006)
MOD_NEK2_1 MOD_NEK2_2	Sítio de fosforilação por NEK2	(ALEXANDER et al., 2011)
MOD_PLK	Sítio de fosforilação por Plk	(NAKAJIMA et al., 2003)
MOD_SUMO_for_1 MOD_SUMO_rev_2	Sítio de sumonilação	(HECKER et al., 2006)
TRG-NLS_MonoExtC_3 TRG-NLS_MonoExtN_4 TRG-NLS_Bipartite_1 TRG-NLS_MonoCore_2	Sinal de localização nuclear	(DINGWALL; LASKEY, 1991)

A distribuição e ocorrência dos *motifs* selecionados é relativamente uniforme entre as famílias gênicas avaliadas (Tabela 5). Contudo, o mesmo não pode ser afirmado quando são considerados os ortólogos individualmente. A grande variabilidade observada entre as seqüências de soja, incluindo os longos trechos de deleção no domínio quinase dessas proteínas foi significativa para ocorrência desses *motifs*. Observa-se também que os *motifs* de localização nuclear (TRG-NLS\_MonoExtC\_3, TRG-NLS\_MonoExtN\_4, TRG-NLS\_Bipartite\_1 e TRG-NLS\_MonoCore\_2) ocorrem exclusivamente na porção N-terminal de todos os ortólogos avaliados, o que pode indicar uma especialização funcional para essa região na família da MPS1.

**Tabela 5:** Distribuição da ocorrência dos diferentes *motifs* de interação proteína-proteína entre as famílias gênicas avaliadas (At1g77720, Glyma04g252700, Glyma06g109800, Glyma13g083100, Glyma14g164400, Solyc11g013240 e Sobic001g122100) em Arabidopsis, soja, tomate e sorgo. Legenda: **X** indicam presença do *motif* e – indica ausência. Os *motifs* que ocorrem exclusivamente na região N-terminal foram realçados (cinza).

<b>N-terminal</b>				
<i>Motif</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>G.max</i>	<i>S.lycopersicum</i>	<i>S. bicolor</i>
DEG_APCC_DBOX_1	-	-	-	-
DOC_CYCLIN_1	X	X	X	X
DOC_MAPK_gen_1		X	X	X
LIG_14-3-3_CanoR_1	X	X	X	X
LIG_MAD2	-	-	-	-
LIG_SUMO_SIM_par_1	X	-	-	X
LIG_SUMO_SIM_anti_2	-	X	X	X
MOD_NEK2_1	X	X	X	X
MOD_NEK2_2	-	X	-	-
MOD_PLK	X	X	X	-
MOD_SUMO_for_1	X	X	-	X
MOD_SUMO_rev_2	X	X	X	X
TRG-NLS_MonoExtC_3	X	X	X	X
TRG-NLS_MonoExtN_4	X	-	-	-
TRG-NLS_Bipartite_1	-	X	-	-
TRG-NLS_MonoCore_2	-	-	-	X
<b>Domínio quinase</b>				
DEG_APCC_DBOX_1	X	-	X	X
DOC_CYCLIN_1	X	X	X	X
DOC_MAPK_gen_1	X	-	X	X
LIG_14-3-3_CanoR_1	X	X	X	X
LIG_MAD2	X	X	X	X
LIG_SUMO_SIM_par_1	-	X	X	-
LIG_SUMO_SIM_anti_2	-	-	-	-
MOD_NEK2_1	X	X	X	X
MOD_NEK2_2	X	X	X	X
MOD_PLK	X	X	X	X
MOD_SUMO_for_1	-	-	-	-
MOD_SUMO_rev_2	X	X	X	X
TRG-NLS_MonoExtC_3	-	-	-	-
TRG-NLS_MonoExtN_4	-	-	-	-
TRG-NLS_Bipartite_1	-	-	-	-
TRG-NLS_MonoCore_2	-	-	-	-

Conforme mencionando anteriormente, a distribuição dos *motifs* entre as famílias gênicas avaliadas é relativamente uniforme. Nenhuma delas apresenta um número muito superior de *motifs* reconhecidos (de fato, a diferença não é superior a três

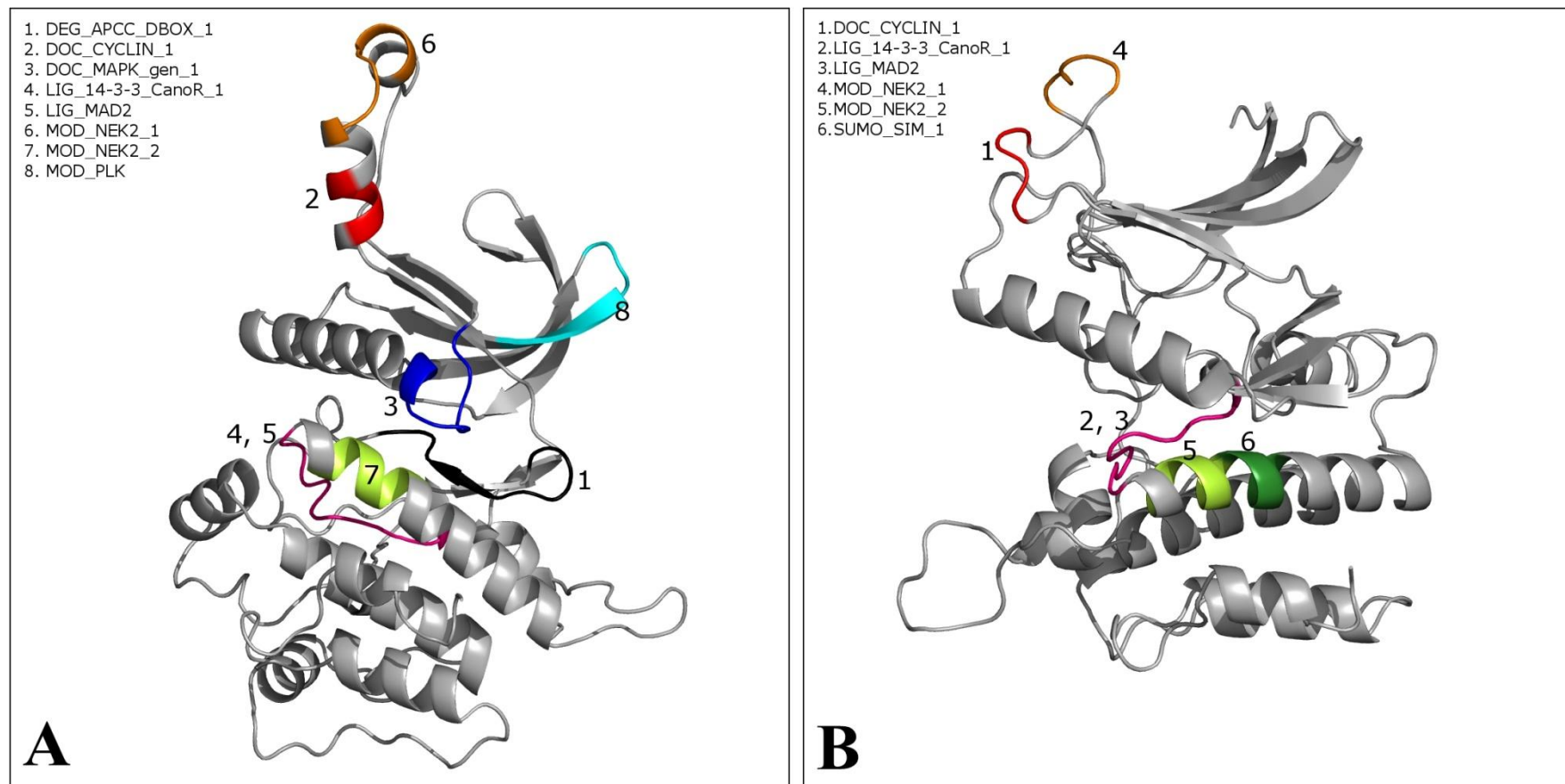
*motifs*, considerando todas as seqüências). Entretanto, a diferenças observadas entre os ortólogos precisam ser pontuadas, pois podem significar diferenças funcionais importantes no contexto celular e fisiológico. Na região do domínio quinase, os ortólogos de soja foram aqueles que apresentaram o maior número de diferenças (Tabela 6). De maneira pouco surpreendente essas diferenças surgem exatamente nos ortólogos que apresentam regiões onde ocorreram deleções (Figura 9) e que divergem da seqüência do domínio quinase de *A. thaliana*.

**Tabela 6:** Lista dos ortólogos da MPS1 de *G.max* que não apresentaram *motifs* identificados na seqüência do domínio quinase da MPS1 de *A. thaliana*. Os ortólogos que sofreram as maiores deleções em suas sequencias estão realçados (cinza)

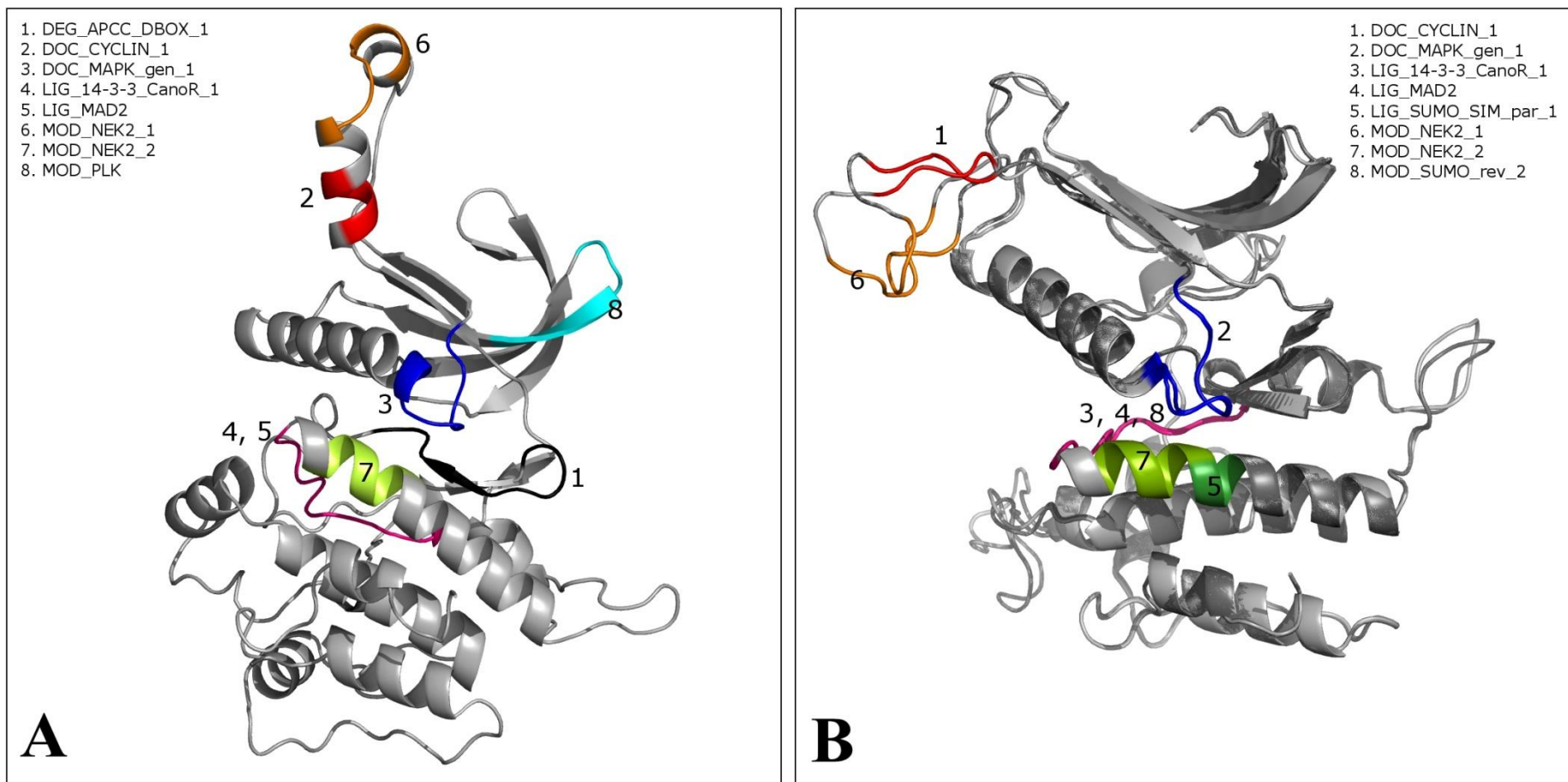
<b>Domínio quinase</b>	
<b>Motif</b>	<b>Ortólogo</b>
DOC_CYCLIN_1	Glyma13g038100.3
LIG_14-3-3_CanoR_1	Glyma13g038100.3; <span style="background-color: #cccccc;">Glyma13g083100.2;</span> <span style="background-color: #cccccc;">Glyma06g109800.4</span>
LIG_MAD2	Glyma13g038100.3; Glyma13g083100.2; Glyma06g109800.4
LIG_SUMO_SIM_par_1	Glyma13g083100.1; Glyma13g083100.2; Glyma13g083100.3; Glyma13g083100.5; Glyma06g109800.4; Glyma14g164400.1; <span style="background-color: #cccccc;">Glyma14g164400.2;</span> <span style="background-color: #cccccc;">Glyma14g164400.3,</span> <span style="background-color: #cccccc;">Glyma14g164400.4;</span> Glyma14g164400.5
MOD_NEK2_1	Glyma13g083100.3
MOD_NEK2_2	Glyma13g083100.3; Glyma13g083100; Glyma06g109800.4
MOD_SUMO_for_1	Glyma04g252700.1; Glyma06g109800.1; Glyma06g109800.2; Glyma06g109800.3; Glyma06g109800.4
MOD_SUMO_rev_2	Glyma13g083100.2; Glyma13g083100.3; Glyma06g109800.4

Os ortólogos da MPS1 em *S. bicolor* e *S. lycopersicum* seguem a mesma tendência observada na MPS1 de *A. thaliana*. Todos os *motifs* que estão presentes na AtMPS1 também ocorrem nas seqüências polipeptídicas de sorgo e tomate (Figuras 12-17).

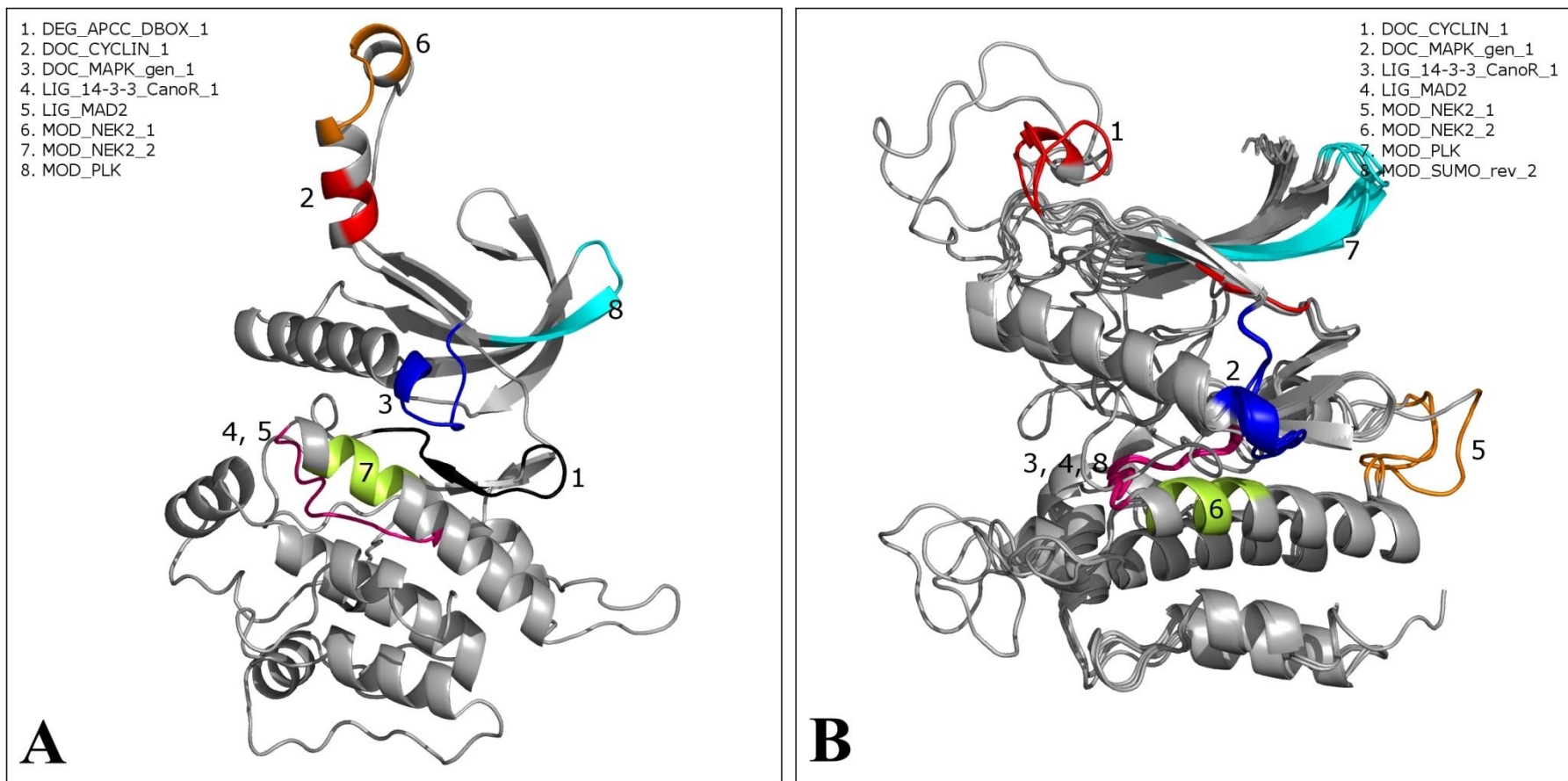




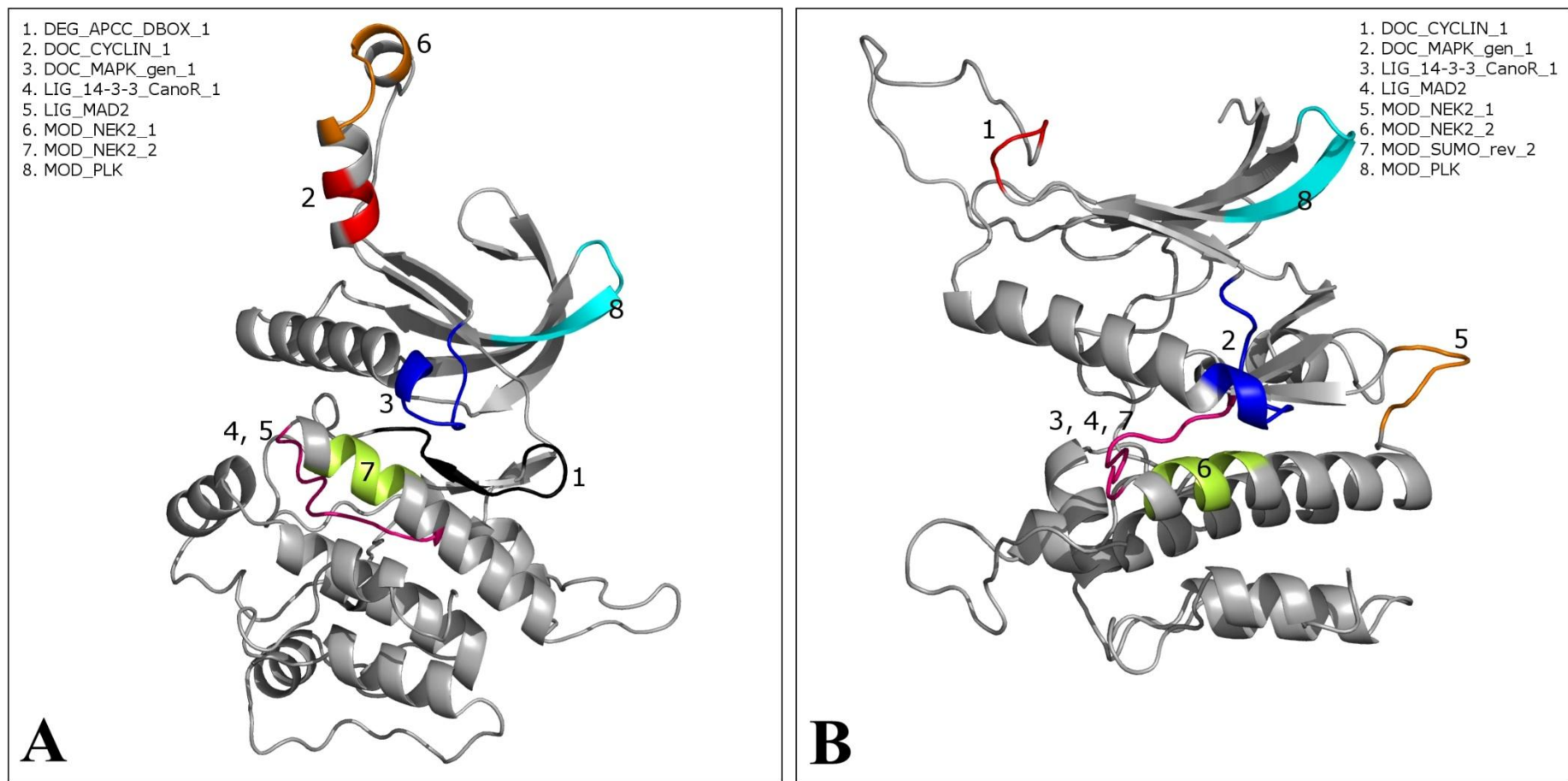
**Figura 12:** Comparação da presença de *motifs* de interação proteína-proteína no domínio quinase da MPS1 de *A. thaliana* (A) e do ortólogo Glyma04g252700.1 de *G.max* (B). Vermelho: DOC\_CYCLIN\_1; Azul escuro:DOC\_MAPK\_gen\_1; Preto: DEG\_APCC\_DBOX\_1; Magenta: LIG\_MAD2, 14-3-3\_CanoR\_1 e MOD\_SUMO\_rev\_2, Laranja: MOD\_NEK2\_1; Verde limão: MOD\_NEK2\_2 e Verde escuro: LIG\_SUMO\_SIM\_par\_1.



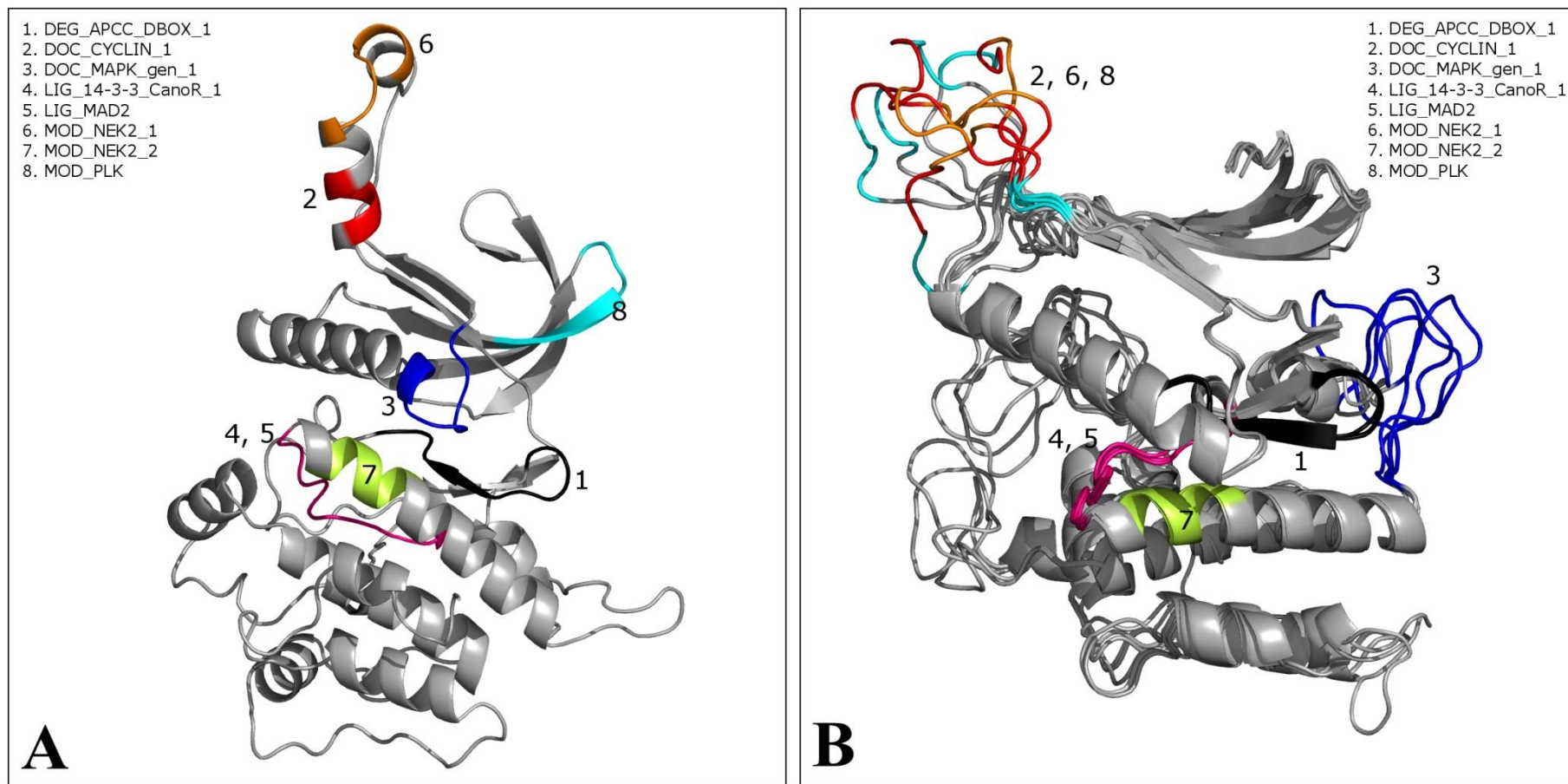
**Figura 13:** Comparação da presença de *motifs* de interação proteína-proteína no domínio quinase da MPS1 de *A. thaliana* (A) e dos ortólogos da família gênica Glyma06g109800 de *G. max* (B). Vermelho: DOC\_CYCLIN\_1; Azul escuro: DOC\_MAPK\_gen\_1; Preto: DEG\_APCC\_DBOX\_1; Magenta: LIG\_MAD2, 14-3-3\_CanoR\_1 e MOD\_SUMO\_rev\_2, Laranja: MOD\_NEK2\_1; Verde limão: MOD\_NEK2\_2 e Verde escuro: LIG\_SUMO\_SIM\_par\_1.



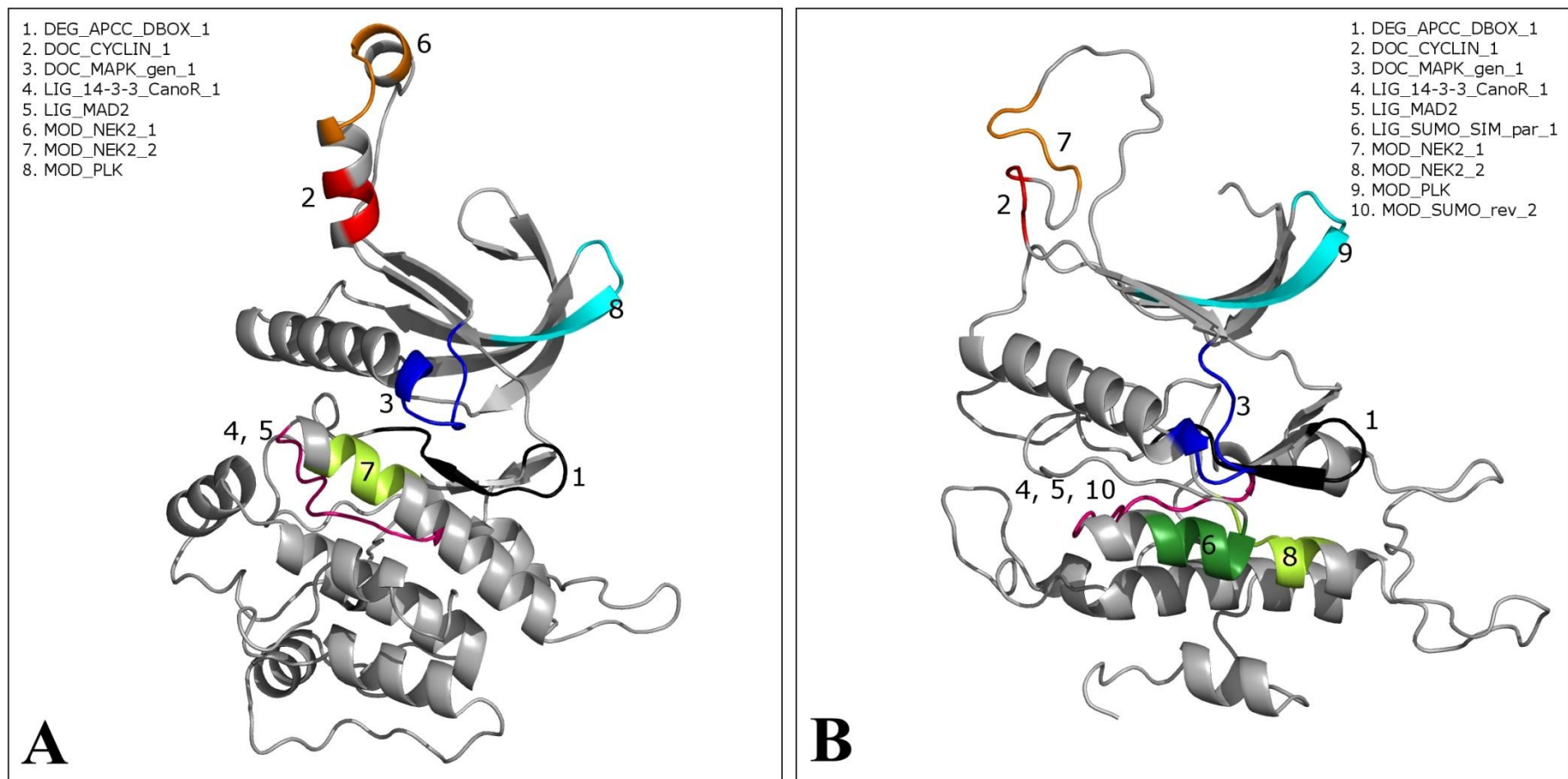
**Figura 14:** Comparação da presença de *motifs* de interação proteína-proteína no domínio quinase da MPS1 de *A. thaliana* (A) e dos ortólogos da família gênica Glyma13g083100 de *G.max* (B). Vermelho: DOC\_CYCLIN\_1; Azul escuro:DOC\_MAPK\_gen\_1; Preto: DEG\_APCC\_DBOX\_1; Magenta: LIG\_MAD2, 14-3-3\_CanoR\_1 e MOD\_SUMO\_rev\_2, Laranja: MOD\_NEK2\_1; Verde limão: MOD\_NEK2\_2 e Verde escuro: LIG\_SUMO\_SIM\_par\_1.



**Figura 15:** Comparação da presença de *motifs* de interação proteína-proteína no domínio quinase da MPS1 de *A. thaliana* (A) e dos ortólogos da família gênica Glyma14g164400 de *G. max* (B). Vermelho: DOC\_CYCLIN\_1; Azul escuro: DOC\_MAPK\_gen\_1; Preto: DEG\_APCC\_DBOX\_1; Magenta: LIG\_MAD2, 14-3-3\_CanoR\_1 e MOD\_SUMO\_rev\_2, Laranja: MOD\_NEK2\_1; Verde limão: MOD\_NEK2\_2 e Verde escuro: LIG\_SUMO\_SIM\_par\_1.



**Figura 16:** Comparação da presença de *motifs* de interação proteína-proteína no domínio quinase da MPS1 de *A. thaliana* (A) e dos ortólogos da família gênica Sobicc001g122100 de *S. bicolor* (B). Vermelho: DOC\_CYCLIN\_1; Azul escuro: DOC\_MAPK\_gen\_1; Preto: DEG\_APCC\_DBOX\_1; Magenta: LIG\_MAD2, 14-3-3\_CanoR\_1 e MOD\_SUMO\_rev\_2, Laranja: MOD\_NEK2\_1; Verde limão: MOD\_NEK2\_2 e Verde escuro: LIG\_SUMO\_SIM\_par\_1.



**Figura 17:** Comparação da presença de *motifs* de interação proteína-proteína no domínio quinase da MPS1 de *A. thaliana* (A) e do ortólogo Solyc11g013240.1.1. Vermelho: DOC\_CYCLIN\_1; Azul escuro: DOC\_MAPK\_gen\_1; Preto: DEG\_APCC\_DBOX\_1; Magenta: LIG\_MAD2, 14-3-3\_CanoR\_1 e MOD\_SUMO\_rev\_2, Laranja: MOD\_NEK2\_1; Verde limão: MOD\_NEK2\_2 e Verde escuro: LIG\_SUMO\_SIM\_par\_1.

A avaliação da presença de *motifs* da região N-terminal revelou que os ortólogos e *G. max* apresentam uma tendência semelhante em relação ao que foi observado nas análises das seqüências do domínio quinase. Resumindo, existe pouca conservação destes *motifs* nas diferentes seqüências de soja, principalmente naquelas mais divergentes (Tabela 7).

**Tabela 7:**Listagem dos *motifs* que não foram identificados em ortólogos da MPS1 de *G. max*.

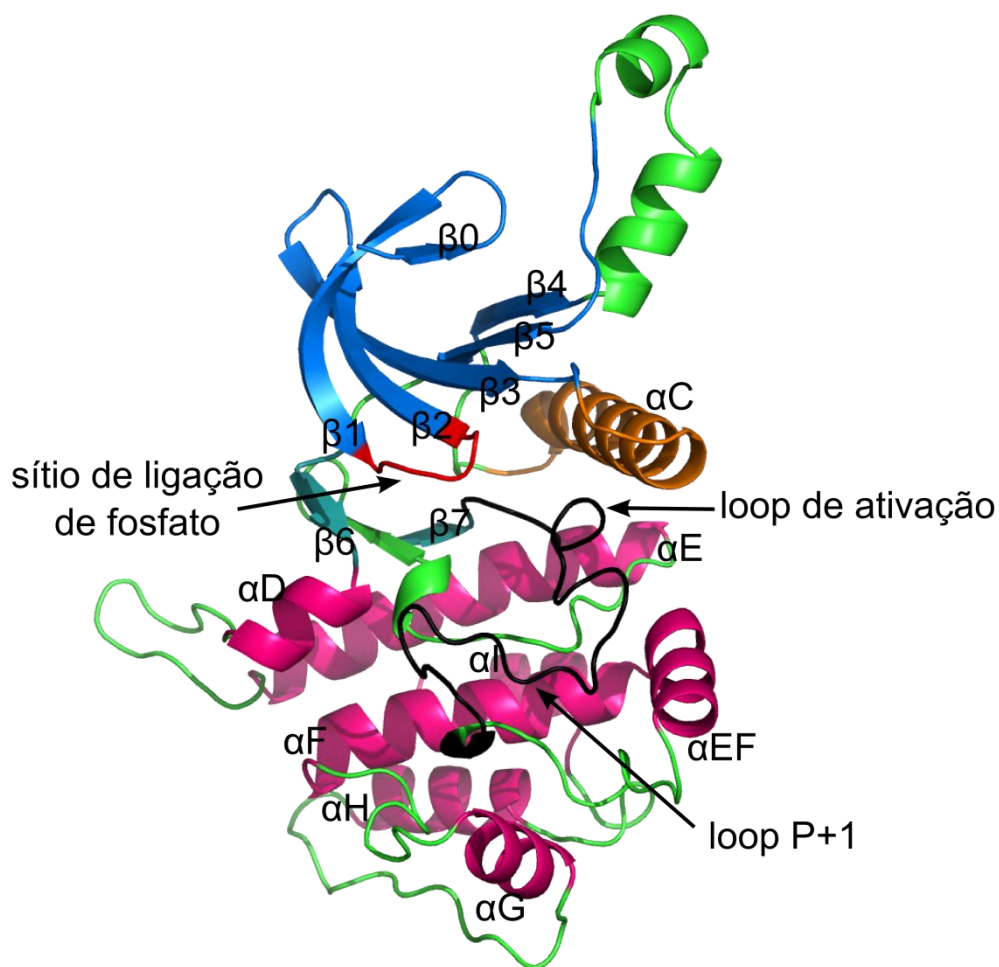
<b>N-terminal</b>	
<b>Motif</b>	<b>Ortólogo</b>
DOC_CYCLIN_1	Glyma13g083100.1; Glyma13g083100.2; Glyma13g083100.3; Glyma13g083100.5; Glyma14g164400.4; Glyma14g164400.5
DOC_MAPK_gen_1	Glyma13g083100.5; Glyma14g164400.4; Glyma14g164400.5; Glyma04g252700.1; Glyma06g109800.1, Glyma06g109800.2; Glyma06g109800.3; Glyma06g109800.4
LIG_SUMO_SIM_par_1	Todos os ortólogos de soja

Novamente os ortólogos de *G.max* não apresentaram muitos dos *motifs* que naturalmente ocorrem na MPS1 de *A. thaliana*, *S. lycopersicum* e *S. bicolor*. É importante ressaltar também que neste caso, *motifs* que ocorrem exclusivamente e/ou mais freqüentemente na região do domínio funcional, como por exemplo LIG\_MAD2(MUSACCHIO; HARDWICK, 2002) e DEG\_APCC\_BOX\_1 (GLOTZER; MURRAY; KIRSCHNER, 1991) foram desconsiderados. Além disso *motifs* redundantes como o NEK2\_1 e NEK2\_2 (ALEXANDER et al., 2011) e os de translocação e localização nuclear (TRG-NLS\_MonoExtC\_3; TRG-NLS\_MonoExtN\_4; TRG-NLS\_Bipartite\_1; TRG-NLS\_MonoCore\_2) (DINGWALL; LASKEY, 1991; KALDERON et al., 1984) também foram desconsiderados, pois embora não ocorram em todas as seqüências, a presença de apenas um deles é suficiente uma vez que apresentam a mesma função. Nesse caso foi observado que todos esses *motifs* se distribuem por todas as seqüências avaliadas sem a formação de um padrão específico.

#### **4.2. Análise da conservação estrutural dos ortólogos da MPS1 de *A. thaliana* em com *G. max*, *S. lycopersicum* e *S. bicolor*:**

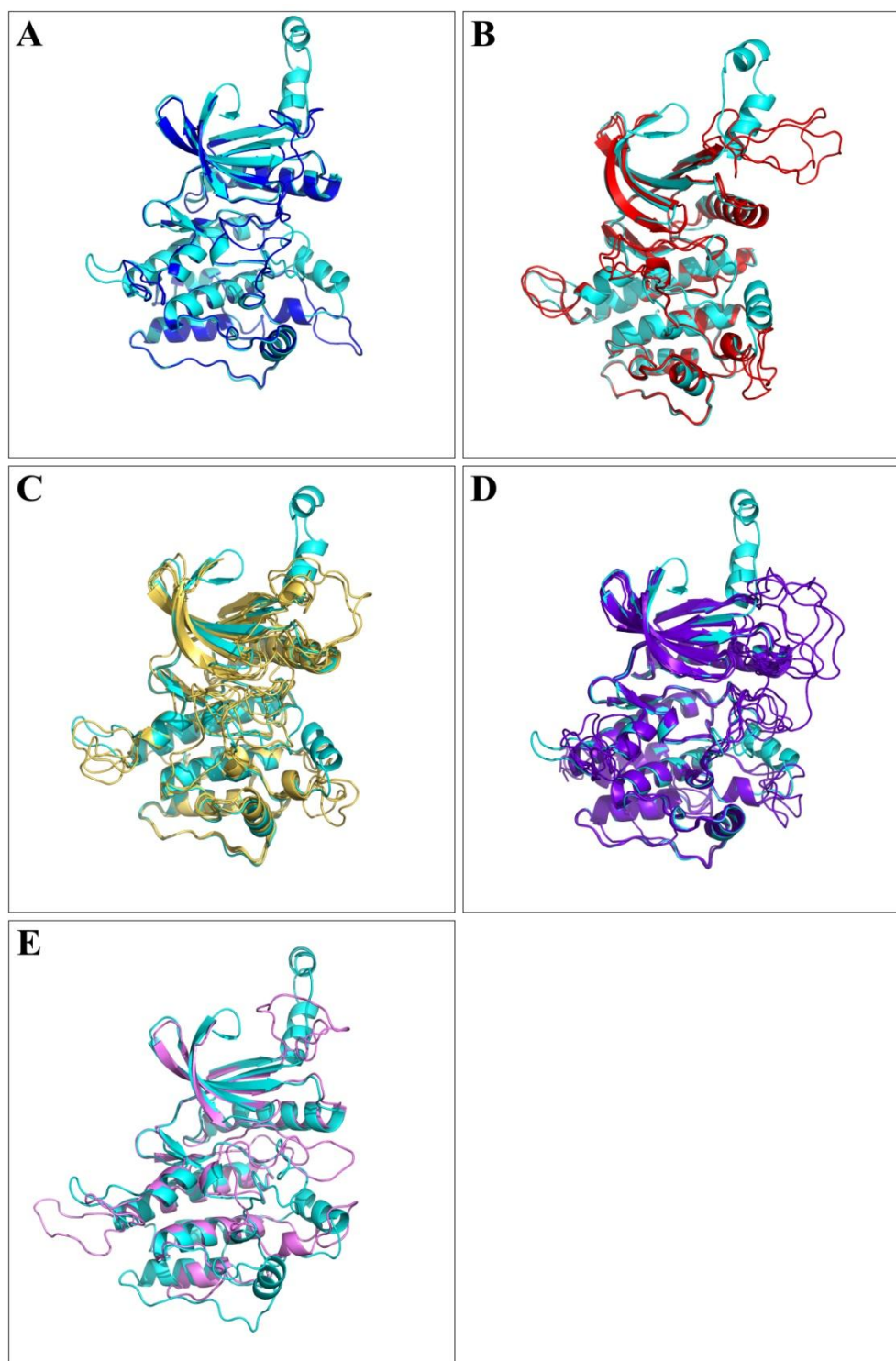
A organização estrutural da proteína quinase MPS1 é a mesma observada na família das proteínas quinase, apresentando uma divisão em dois lobos N e C-terminal (FISK; MATTISON; WINEY, 2004; LIU; WINEY, 2012) (Figura 18). A porção N-terminal é composta de cinco folhas- $\beta$  ( $\beta$ 1-5) antiparalelas, uma região em  $\alpha$ -hélice denominada hélice  $\alpha$ C e mais uma folha beta ( $\beta$ 0) na terminação do lobo menor. As folhas  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 são conectadas por um *loop* posicionado na borda da cavidade do sítio ativo que é funcionalmente associado à ligação de grupamentos fosfato durante eventos de fosforilação (CHU et al., 2008a). A região C-terminal do domínio é formada por sete  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ D, E, F, G, H, I e EF) interconectadas por alças sem definição estrutural denominadas regiões de desordem intrínseca. O loop de ativação e o loop P+1 ficam localizados entre as duas porções e formam o segmento de ativação que é fundamental para atividade em toda a família de proteínas quinase (SCHEEFF et al., 2009).



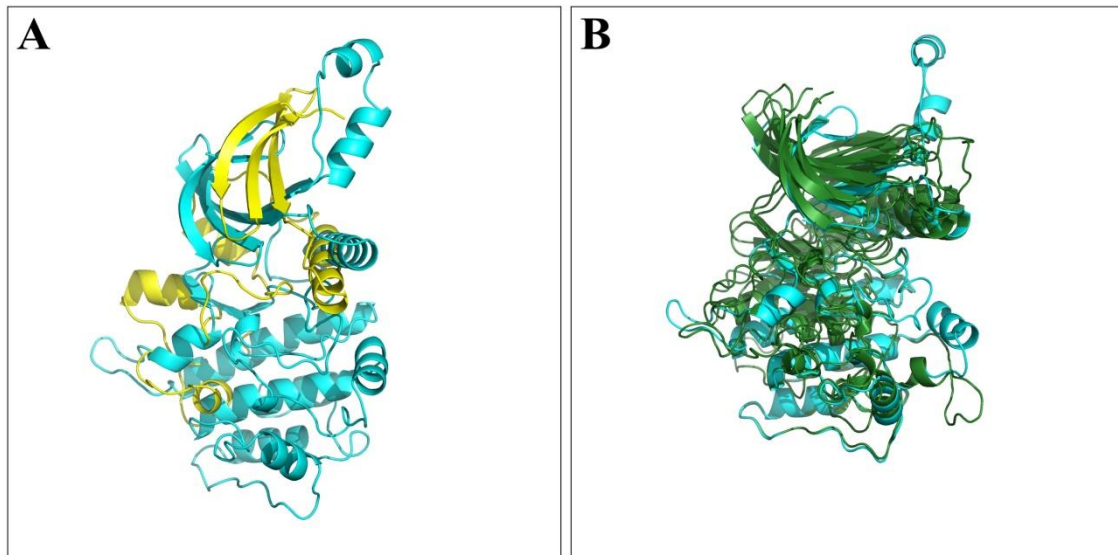


**Figura 18:** Organização estrutural básica do domínio funcional da proteína MPS1. Folhas  $\beta$ 0-7 e hélice  $\alpha$ C compõem o lobo N-terminal. Hélices  $\alpha$ D, E, F, G, H, I, EF compõem o lobo C-terminal.

Para avaliar o grau de conservação da estrutura terciária dos ortólogos estudados a modelagem molecular foi utilizada para obter modelos tridimensionais do domínio quinase de cada uma das seqüências. Foi observado que, a maioria das seqüências estudadas compartilha de grande similaridade estrutural (Figura 19), entretanto as isoformas Glyma14g164400.2, Glyma14g164400.3, Glyma14g164400.4 e o gene Glyma06g108900.4 apresentaram alinhamento estrutural pobre em relação a todas as outras seqüências (Figura 19). Muito provavelmente isso ocorre devido aos grandes trechos de deleção observados no domínio funcional destas proteínas. A redução significativa na estrutura primária afeta diretamente no grau de cobertura das estruturas(Figura 20).



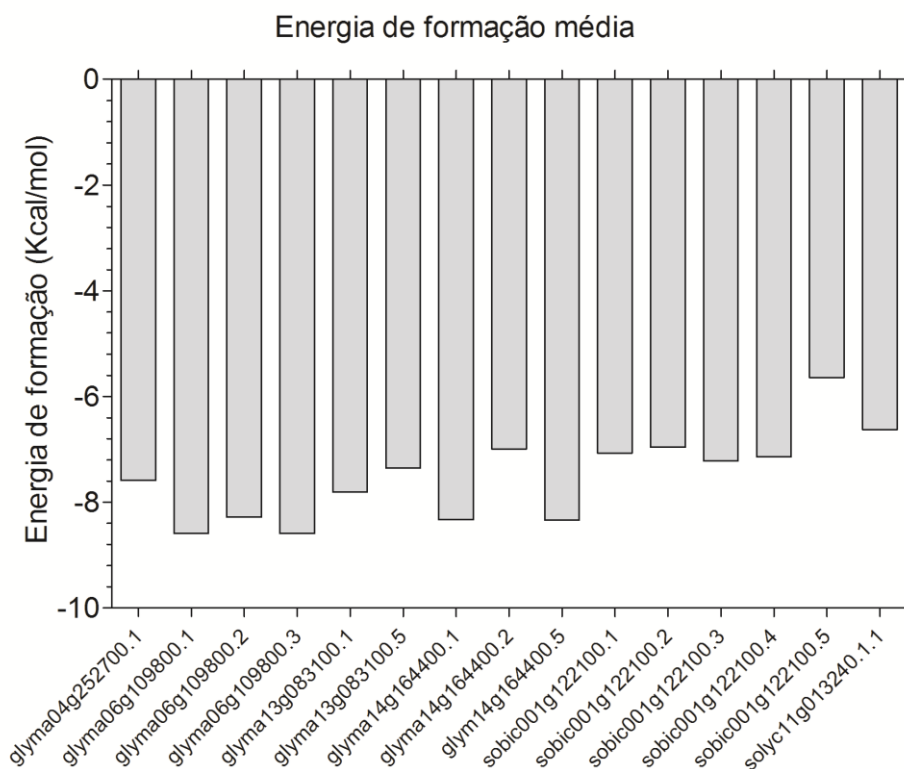
**Figura 19:** Sobreposição das estruturas dos ortólogos da MPS1 de *A. thaliana*, *G.max*, *S. lycopersicum* e *S. bicolor*. A: sobreposição da MPS1 de *A. thaliana* (ciano) contra Glyma04g252700.1 (azul escuro); B: *Arabidopsis* (ciano) contra Glyma06g109800 (vermelho) ; C: *Arabidopsis* (ciano) contra Glyma13g08300 (amarelo); D: *Arabidopsis* (ciano) contra Sobic001g122100 (roxo); E: *Arabidopsis* (ciano) contra Solyc11g013240.1.1. (violeta).



**Figura 20:** Ortólogos com baixa identidade estrutural em relação a MPS1 de *A. thaliana*. **A:** sobreposição da estrutura do ortólogo Glyma06g109800.4 (amarelo) contra **B:** *Arabidopsis* (ciano); Glyma14g164400 (verde) contra *Arabidopsis* (ciano).

#### **4.3. Avaliação do potencial de interação entre os ortólogos da MPS1 como inibidor SP600125 utilizando ancoramento molecular (*docking*):**

O *docking* foi utilizado como ferramenta para avaliar o potencial de ligação do inibidor (ligante) ao domínio funcional das proteínas selecionadas neste trabalho. De maneira geral, com exceção das seqüências previamente excluídas, o experimento revelou a formação de um cluster de soluções dentro da cavidade do sítio ativo orientadas para o resíduo de referência. A interação ligante-proteína é favorável (Figura 21) com uma energia de formação média na ordem de -7 Kcal/mol, considerando todas as soluções obtidas.



**Figura 21:** Energia de formação média para o complexo proteína-ligante computadas durante o cálculo do *docking* (menor é melhor). Cada barra representa a média entre as energias de dez conformações geradas pelo programa durante o cálculo

Foi possível observar a formação de ligações de hidrogênio entre o ligante e pelo menos um resíduo da cavidade do sítio ativo na grande maioria das interações observadas (Tabela 8 e 9). A formação de ligações de hidrogênio permite interações mais estáveis e perenes no sistema. Além disso, há um componente hidrofóbico forte na região. Os resíduos da cavidade do sítio ativo formam um “sanduíche” em torno do ligante, criando um efeito hidrofóbico que auxilia na estabilização da molécula na região. É importante ressaltar que o ligante é de natureza altamente hidrofóbica, desta forma, quanto maior a hidrofobicidade do sistema de ligação, mais favorável será a interação entre as moléculas. Contudo, algumas estruturas demonstraram modo de ligação diferente do normalmente observado (CHU et al., 2008a, 2010b). A solução obtida para a estrutura Glyma14g164400.2 foi particularmente ruim. A organização da estrutura terciária deste ortólogo diverge consideravelmente das demais. O resíduo formador de ligação de hidrogênio (Glu-453) está posicionado numa  $\alpha$ -hélice, o que significa que parte dos resíduos que atuam como auxiliares na estabilização da molécula estão voltados para o exterior da cavidade. Além disso os outros resíduos da

região que também participam do componente hidrofóbico da ligação estão afastados da região, reduzindo drasticamente sua influência sob o ligante. Uma possível causa seria a deleção de uma porção significativa da seqüência polipeptídica (pelo menos 83 resíduos) na região C-terminal do domínio quinase. A diminuição da seqüência certamente teve impacto negativo na organização da estrutura terciária desse ortólogo (Figura 22). As interações calculadas para as outras seqüências de *G. max* (Figuras 23-30; Tabela 8) seguem a tendência observada na literatura (CHU et al., 2008a, 2010b).

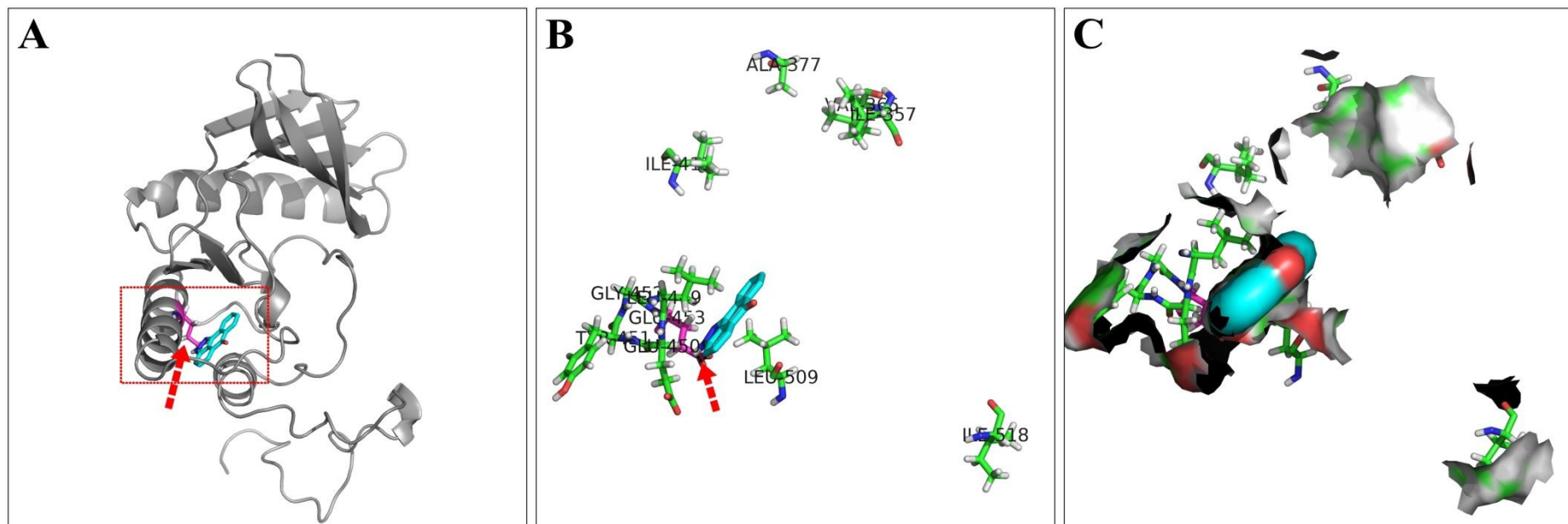
**Tabela 8:** Listagem dos resíduos formadores de ligações de hidrogênio em cada uma das soluções encontradas para ao docking do inibidor com a estrutura do domínio quinase dos ortólogos de *G. max*.

<b>Ortólogo</b>	<b>Resíduo</b>
Glyma04g252700.1	Glu-435
Glyma06g109800.1	Glu-477
Glyma06g109800.2	Glu-447
Glyma06g109800.3	Glu-477
Glyma13g083100.1	Glu-451
Glyma13g083100.5	Glu-329
Glyma14g164400.1	Glu-450
Glyma14g164400.2	Glu-450
Glyma14g164400.5	Glu-266

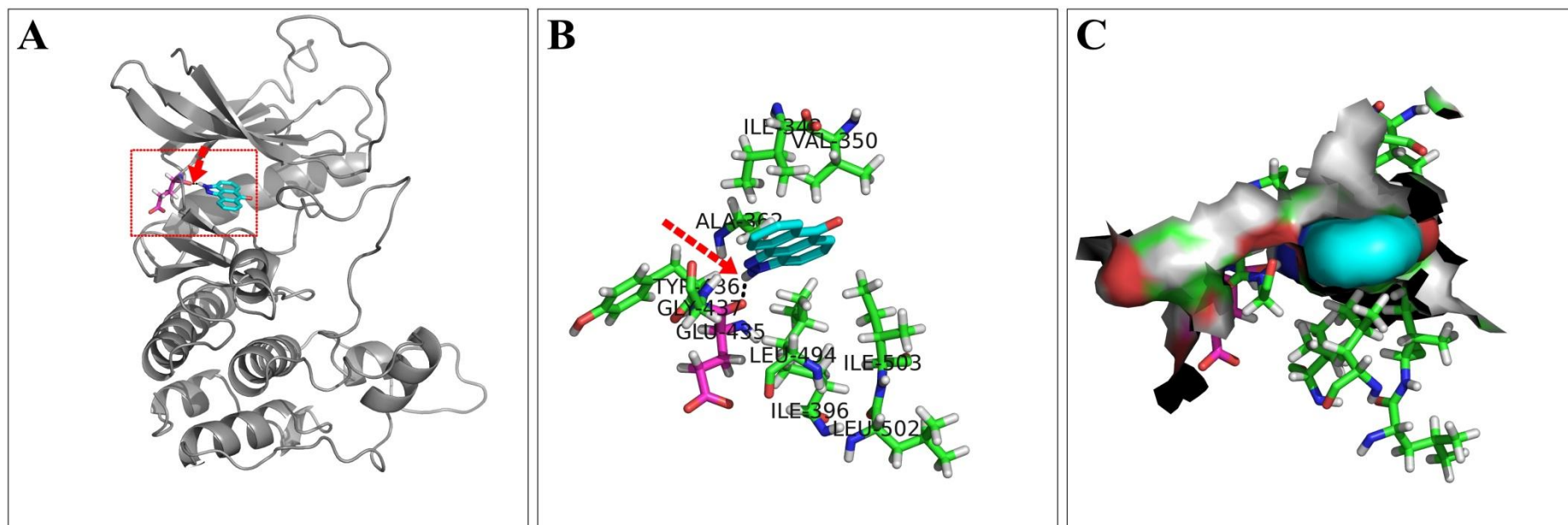
As soluções encontradas para as estruturas de *S. bicolor*, também apresentaram boa estruturação, contudo a substituição de uma leucina (Leu-558 em *A. thaliana*) por uma metionina (Figura 36) entre os resíduos e a região que delimita o início do *loop* de ativação e o sítio ativo da enzima trouxe conseqüências. A presença de metionina nessa posição reduz a acessibilidade na região e força a interação para uma região mais interna da cavidade, provavelmente causada pelo dipolo formado pelo átomo de enxofre na sua estrutura. O deslocamento do ligante permitiu a formação de ligação de hidrogênio com outros resíduos dentro da cavidade (Figuras 31-36, Tabela 9).

**Tabela 9:** Listagem dos resíduos formadores de ligações de hidrogênio em cada uma das soluções encontradas para ao docking do inibidor com a estrutura do domínio quinase dos ortólogos de *S. bicolor*.

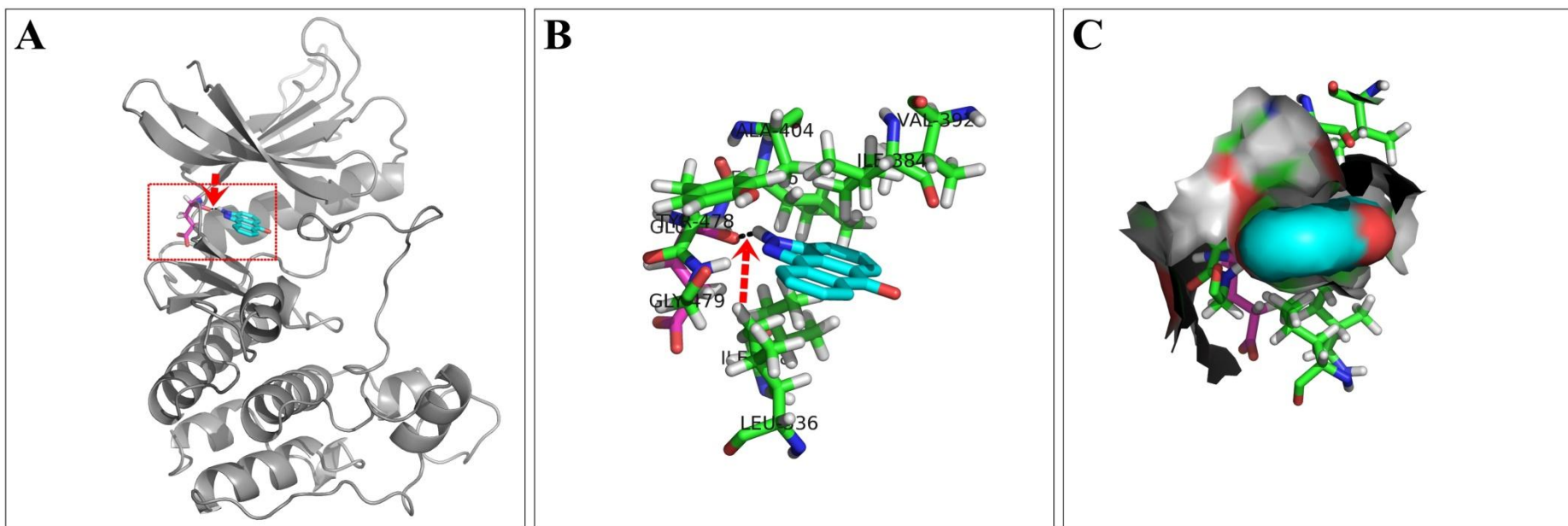
<b>Ortólogo</b>	<b>Resíduo</b>
Sobic001g122100.1	Lys-439
Sobic001g122100.2	Met-490
Sobic001g122100.3	-
Sobic001g122100.4	Phe-466; Glu-469
Sobic001g122100.5	Lys-447



**Figura 22:** Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma14g164400.2. (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio com o resíduo Glu-453 (magenta).

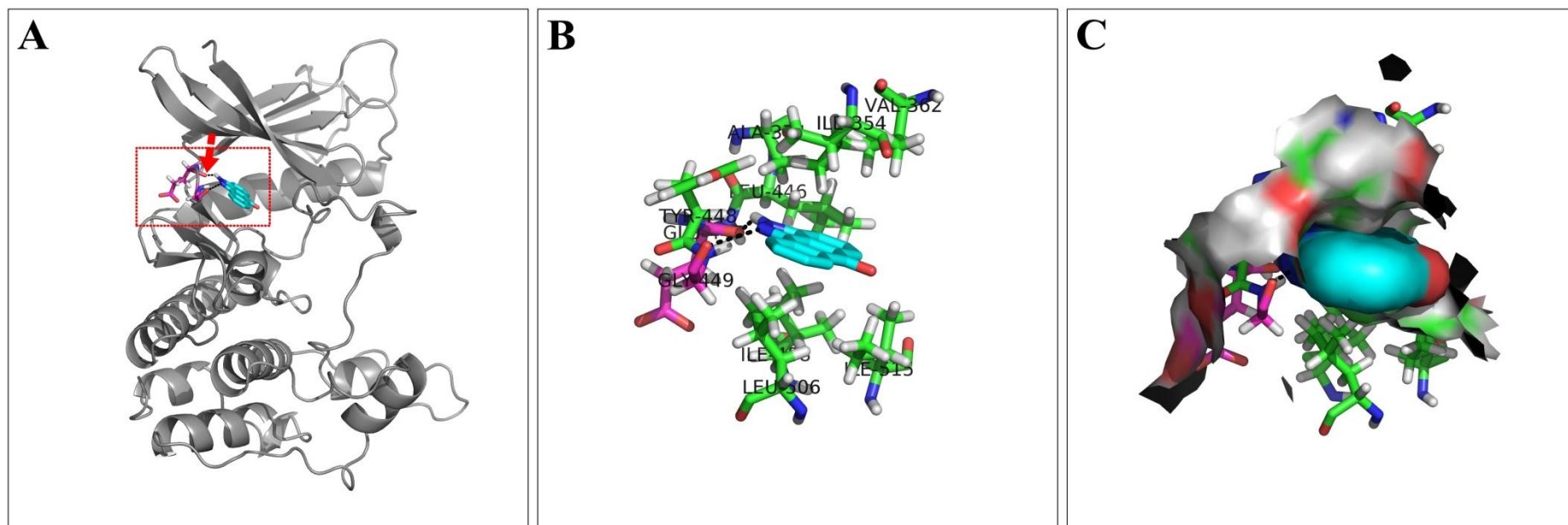


**Figura 23:** Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma04g252700.1. (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-435 (magenta).

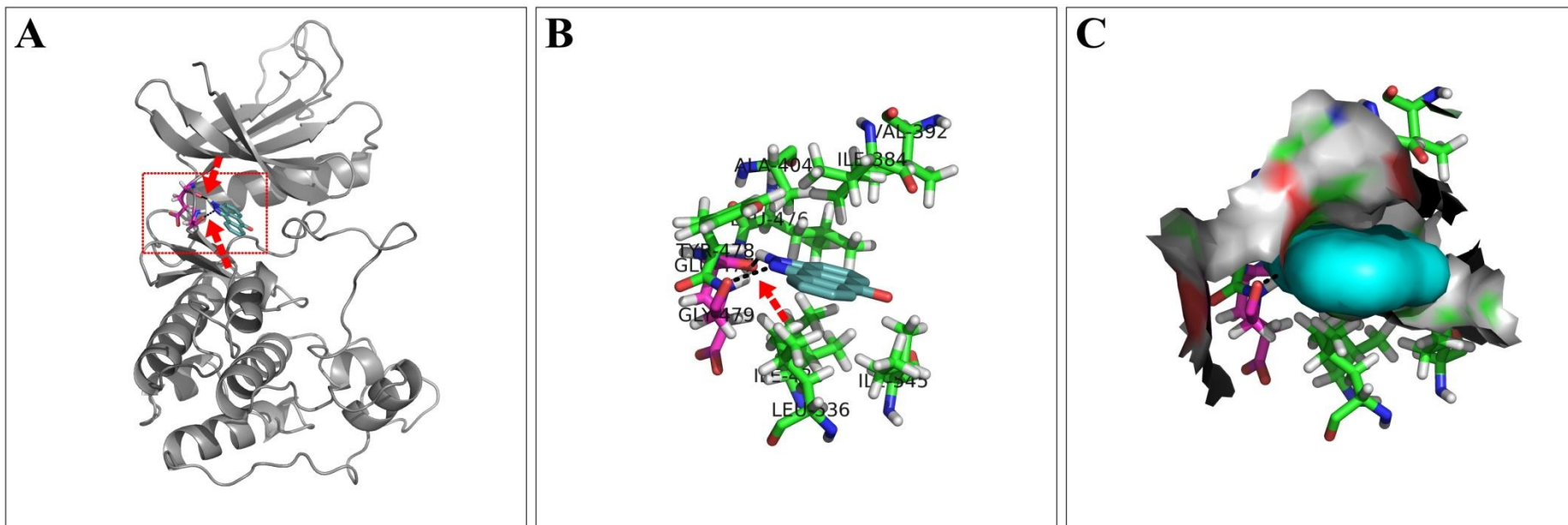


**Figura 24:** Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma06g109800.1 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-477 (magenta).

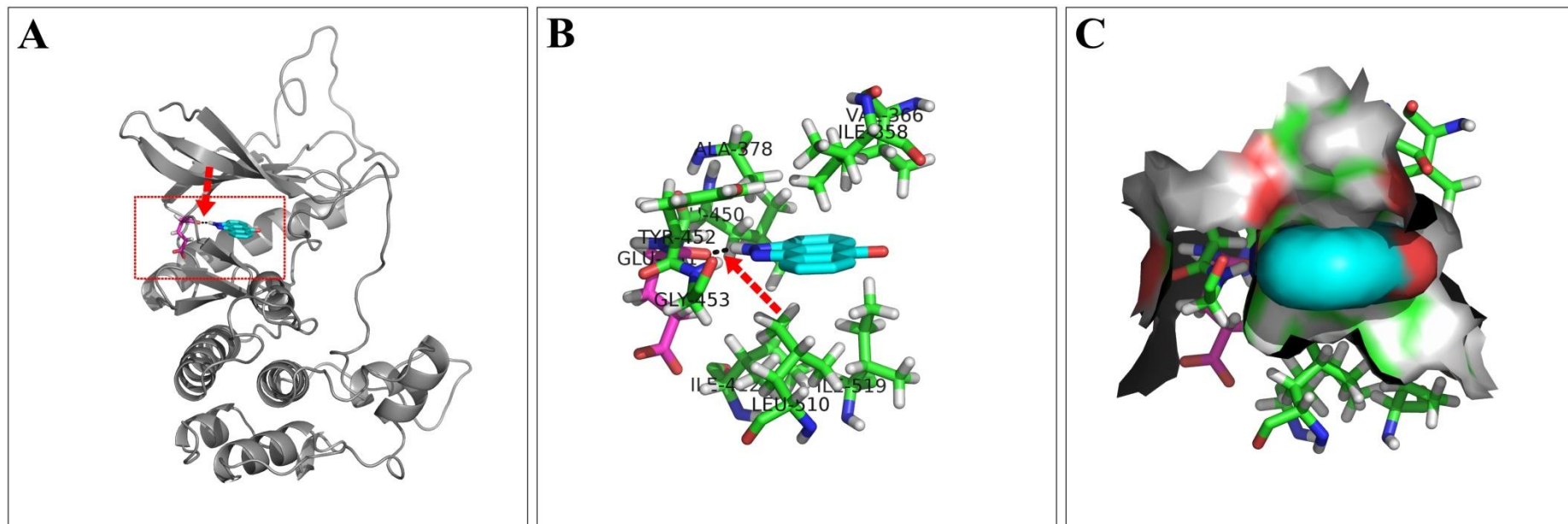




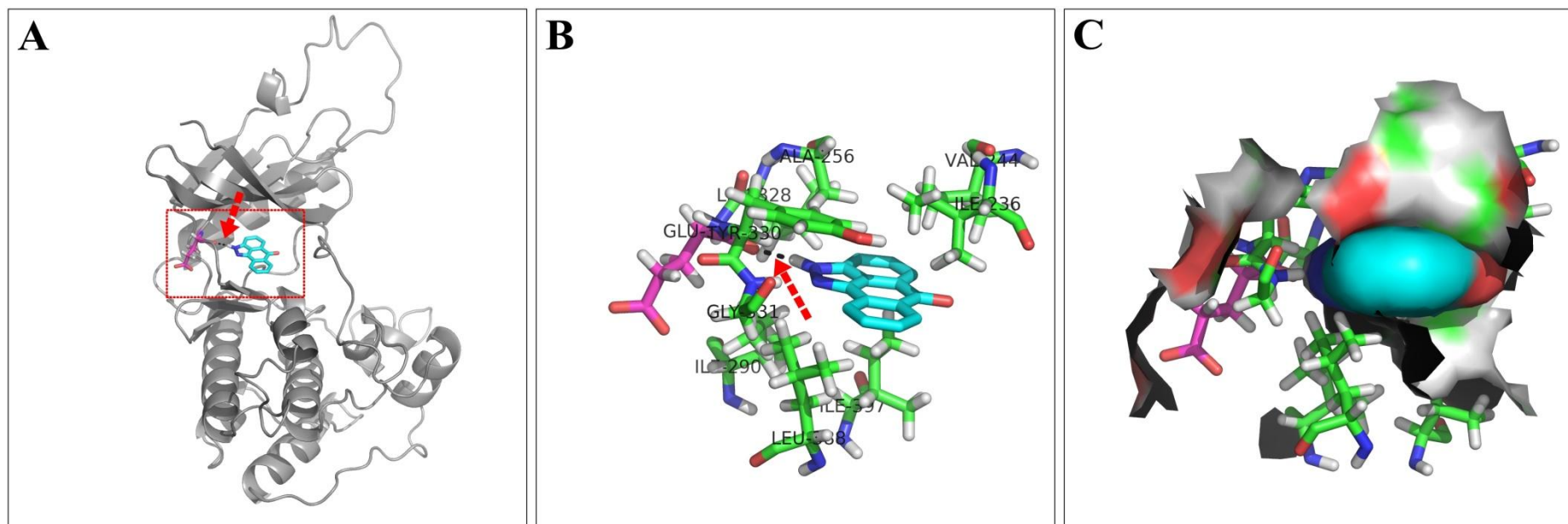
**Figura 25:** Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma06g109800.2 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-447 (magenta).



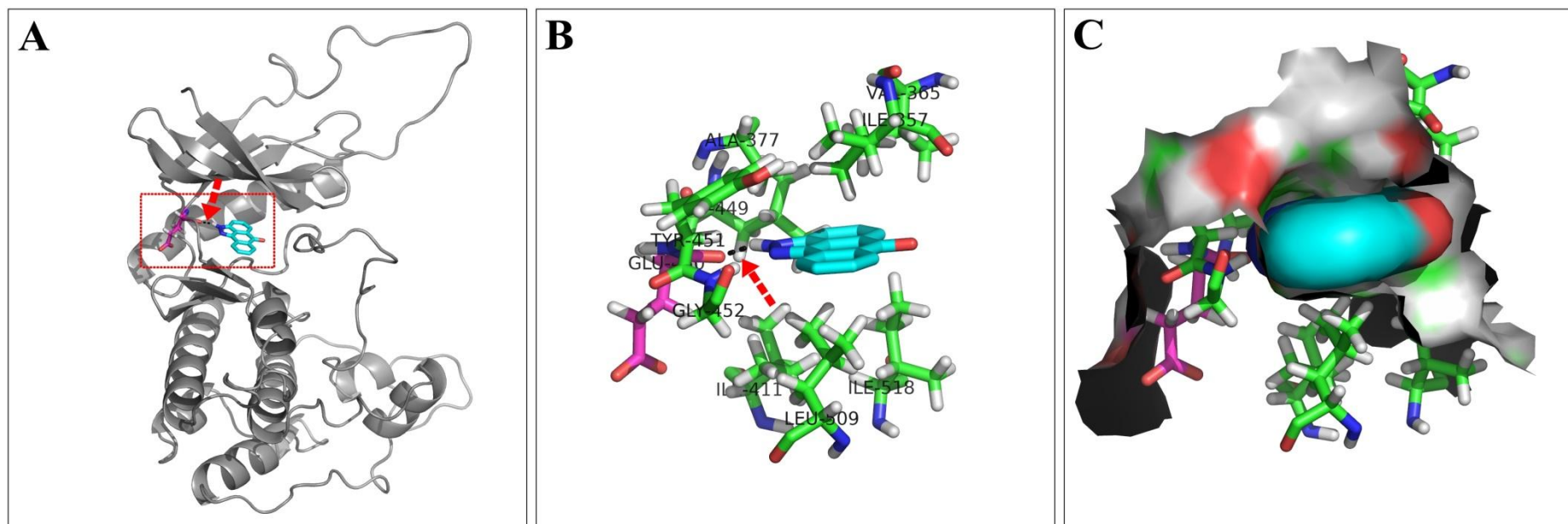
**Figura 26:** Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma06g109800.3 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-477 (magenta).



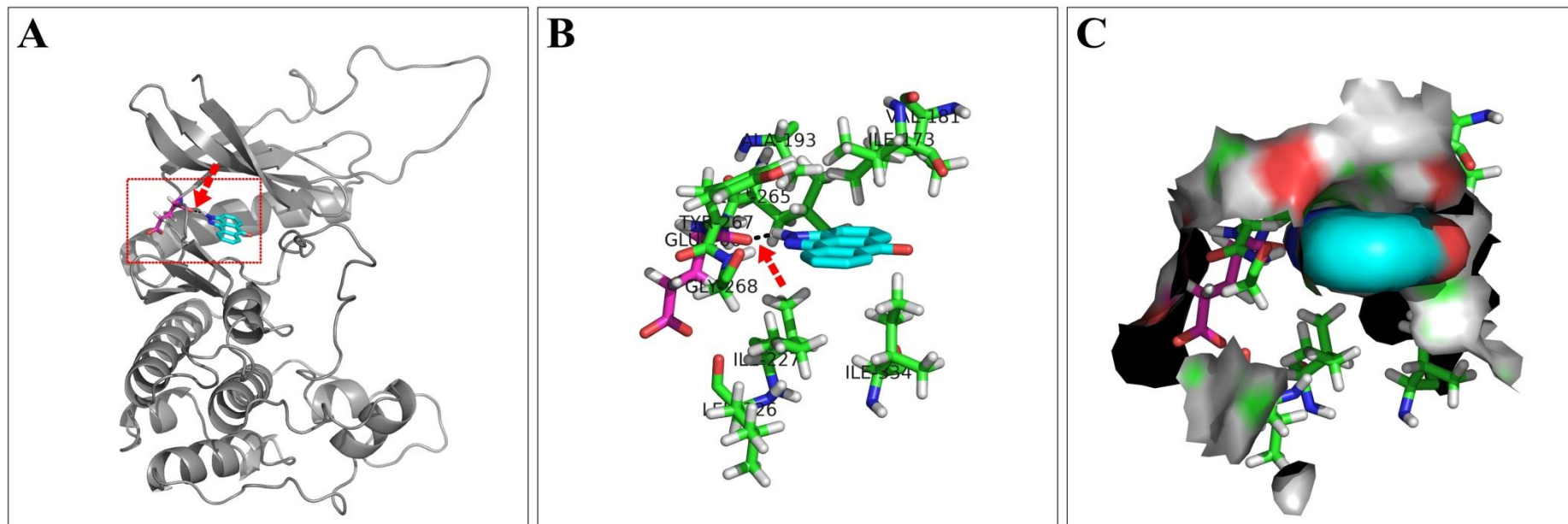
**Figura 27:** Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma13g083100.1 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-451 (magenta).



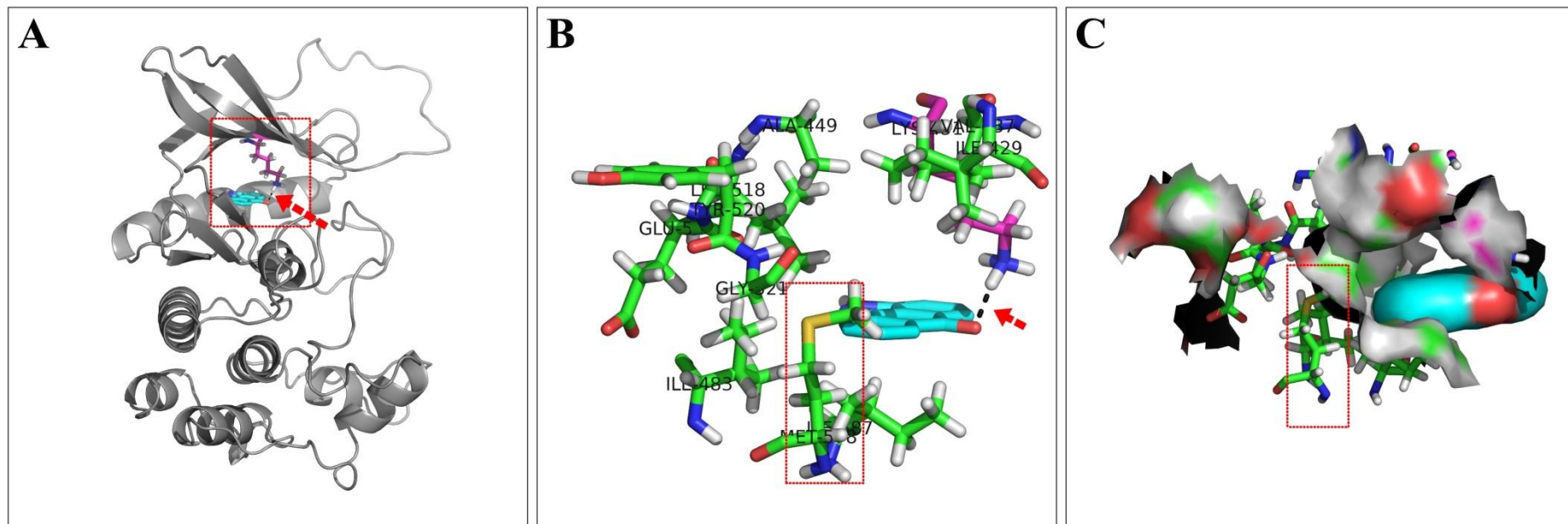
**Figura 28:** Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma13g083100.5 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-329 (magenta).



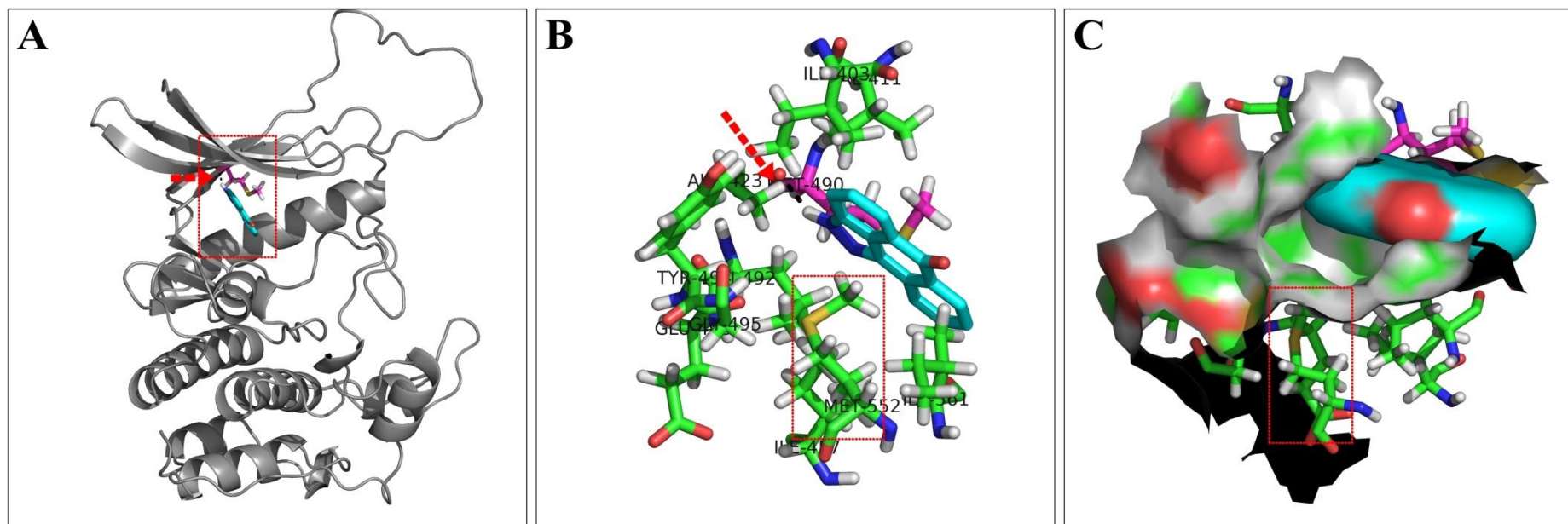
**Figura 29:** Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma14g164400.1 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-450 (magenta).



**Figura 30:** Solução para o docking do inibidor com a estrutura Glyma14g164400.5 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-266 (magenta).

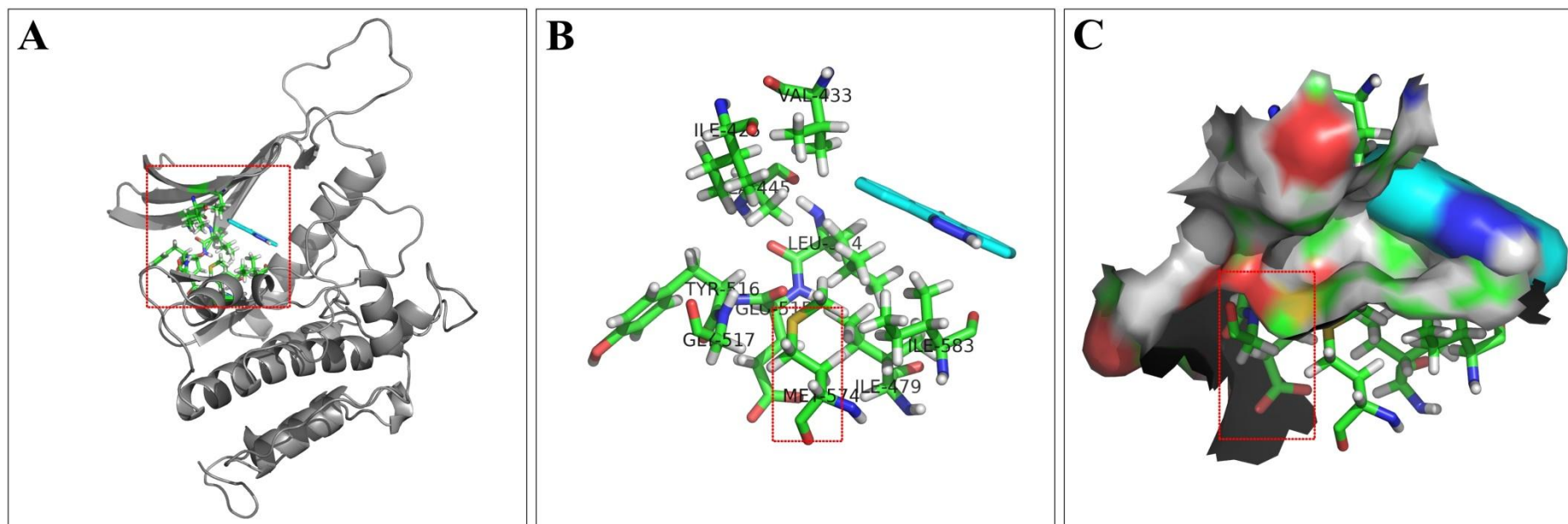


**Figura 31:** Solução para o docking do inibidor com a estrutura Sobic001g122100.1 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) o retângulo tracejado indica a metionina (Met-578) que substitui uma leucina logo na entrada da cavidade e os resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante; o retângulo tracejado indica novamente Met-578. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Lys-439 (magenta).

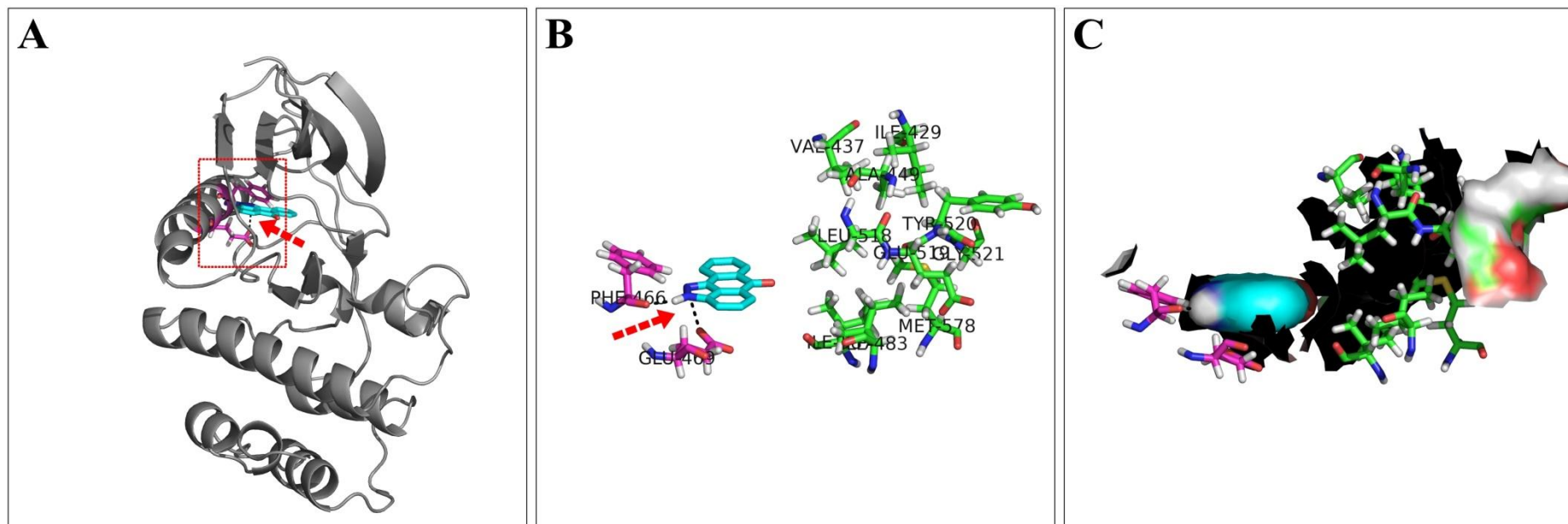


**Figura 32:** Solução para o docking do inibidor com a estrutura Sobic001g122100.2 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) o retângulo tracejado indica a metionina (Met-552) que substitui uma leucina logo na entrada da cavidade e os resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante; o retângulo tracejado indica novamente Met-552. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Met-490 (magenta).

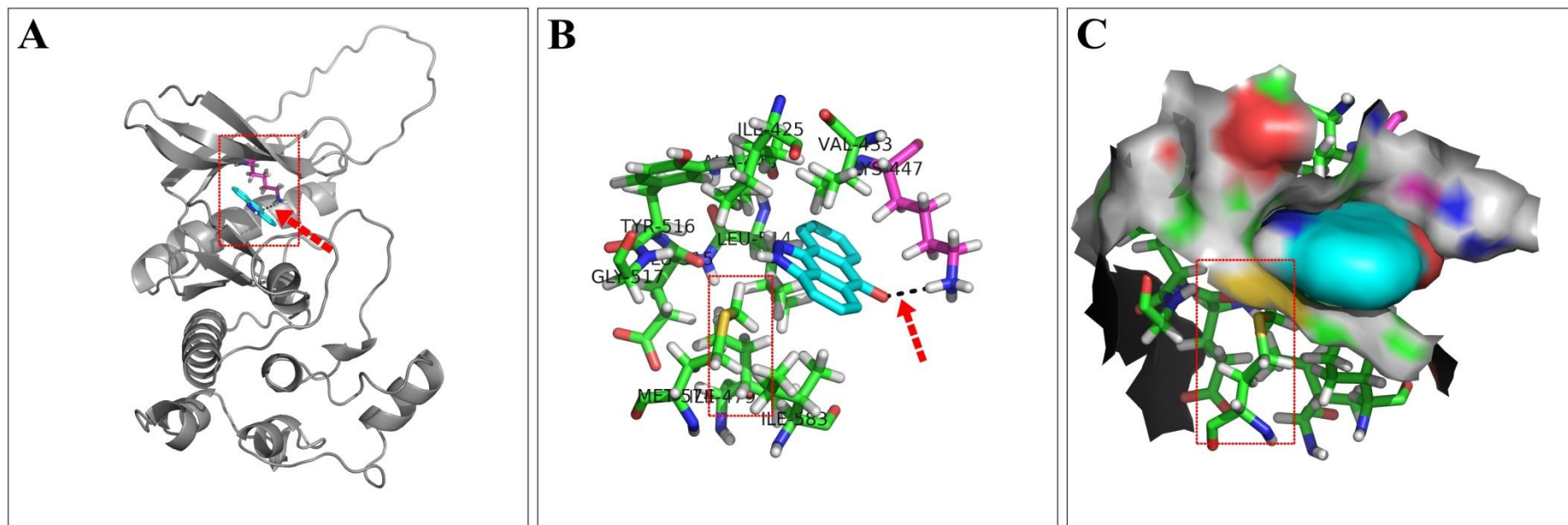




**Figura 33:** Solução para o docking do inibidor com a estrutura Sobic001g122100.3 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) o retângulo tracejado indica a metionina (Met-574) que substitui uma leucina logo na entrada da cavidade e os resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante; o retângulo tracejado indica novamente Met-574. Não há a formação de ligações de hidrogênio.



**Figura 34:** Solução para o docking do inibidor com a estrutura Sobic001g122100.4 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) o retângulo tracejado indica a metionina (Met-578) que substitui uma leucina logo na entrada da cavidade e os resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante; o retângulo tracejado indica novamente Met-578. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com os resíduos Phe-466 e Glu-469 (magenta).



**Figura 35:** Solução para o docking do inibidor com a estrutura Sobic001g122100.5 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) o retângulo tracejado indica a metionina (Met-574) que substitui uma leucina logo na entrada da cavidade e os resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante; o retângulo tracejado indica novamente Met-574. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Lys-447 (magenta).

```

AT1G77720.1/400-693      400 - - YQRLGK IGSGGSSEVHKV ISSDC I IYALKK IKLRGRDYATAYGFCQE IGYLKKLKGKTN I IQL IDYEVTDK TLLQEVLNGTMSNKDGRVKEDGF I494
Sobic.001G122100.1/421-713 421 KLYQKLGK IGSGGSSEVHKV ISSDC I IYALKK IKLRGRDYPTAYGFCQE IEYLNKLGKSN I IQMIDYEVTDKSLL - - - LESSVPPRDGR IKDDHF I514
Sobic.001G122100.3/417-719 417 KLYQKLGK IGSGGSSEVHKV ISSDC I IYALKK IKLRGRDYPTAYGFCQE IEYLNKLGKSN I IQMIDYEVTDKSLL - - - LESSVPPRDGR IKDDHF I510
Sobic.001G122100.2/395-687 395 KLYQKLGK IGSGGSSEVHKV ISSDC I IYALKK IKLRGRDYPTAYGFCQE IEYLNKLGKSN I IQMIDYEVTDKSLL - - - LESSVPPRDGR IKDDHF I488
Sobic.001G122100.4/421-655 421 KLYQKLGK IGSGGSSEVHKV ISSDC I IYALKK IKLRGRDYPTAYGFCQE IEYLNKLGKSN I IQMIDYEVTDKSLL - - - LESSVPPRDGR IKDDHF I514
Sobic.001G122100.5/417-665 417 KLYQKLGK IGSGGSSEVHKV ISSDC I IYALKK IKLRGRDYPTAYGFCQE IEYLNKLGKSN I IQMIDYEVTDKSLL - - - LESSVPPRDGR IKDDHF I510

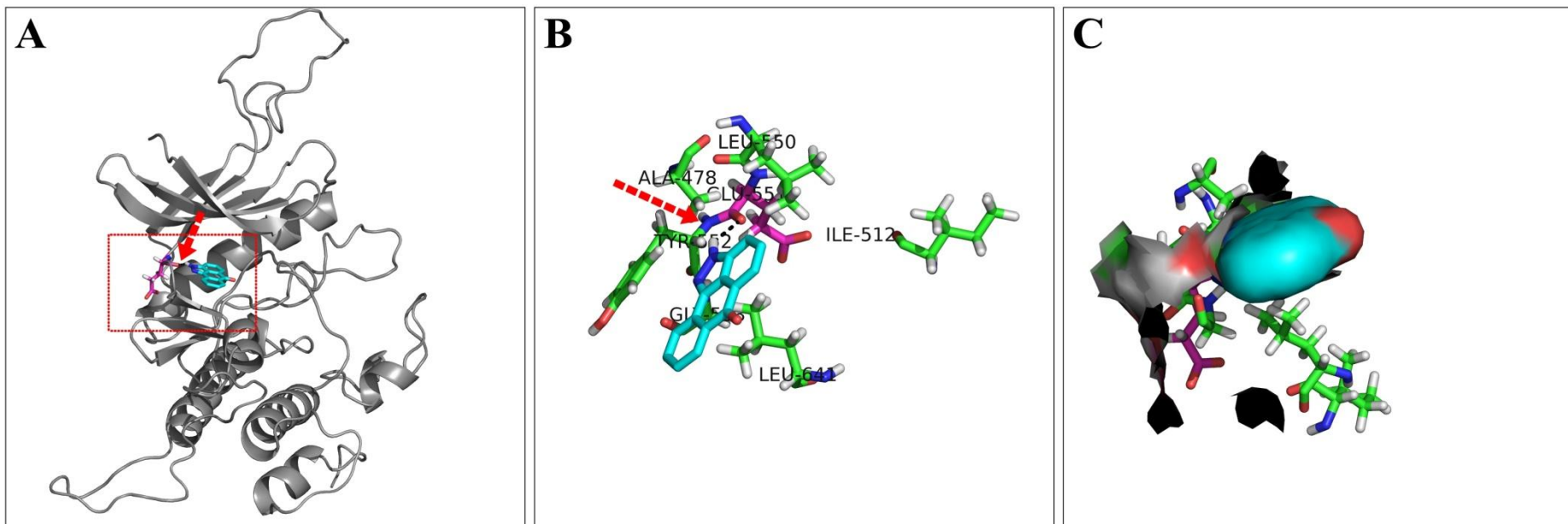
AT1G77720.1/400-693      495 YMVLE YGE IDLAHMLSQKWR E IEGSDRT IDENWLR FYWQQ I LQAVNT IHEER I VHS DLK PAN F L LVRGFLKL I DFG I AKA I NSD TTN I QRDSQVGT L 591
Sobic.001G122100.1/421-713 515 YMVLE YGE IDLANMVALKWK ERHNCNMK IDENWLR FYWQQML EAVST IHEER I VHS DLK PAN F M LVRGSLKL I DFG I AKA I MND TTN I QRDAQVGT L 611
Sobic.001G122100.3/417-719 511 YMVLE YGE IDLANMVALKWK ERHNCNMK IDENWLR FYWQQML EAVST IHEER I VHS DLK PAN F M LVRGSLKL I DFG I AKA I MND TTN I QRDAQVGT L 607
Sobic.001G122100.2/395-687 489 YMVLE YGE IDLANMVALKWK ERHNCNMK IDENWLR FYWQQML EAVST IHEER I VHS DLK PAN F M LVRGSLKL I DFG I AKA I MND TTN I QRDAQVGT L 585
Sobic.001G122100.4/421-655 515 YMVLE YGE IDLANMVALKWK ERHNCNMK IDENWLR FYWQQML EAVST IHEER I VHS DLK PAN F M LVRGSLKL I DFG I AKA I MND TTN I QRDAQVGT L 611
Sobic.001G122100.5/417-665 511 YMVLE YGE IDLANMVALKWK ERHNCNMK IDENWLR FYWQQML EAVST IHEER I VHS DLK PAN F M LVRGSLKL I DFG I AKA I MND TTN I QRDAQVGT L 607

AT1G77720.1/400-693      592 SYMSPEAFMCNESDENGT IKCGRPSD IWSLGC I LYQM VYGR TPFADYK TFWAKFKV I TDPNHE I TYNQLSNPWL IDLMKKCLAWDRNQRWR I PELL688
Sobic.001G122100.1/421-713 612 NYMSPEAFMCND TDSGGNV IKCGRPSD IWSLGC I LYQM VYGK TPFADYK TFWAKYK EVTDRNHK IMYEPVDN PWL IDLMQRCLAWDRNERWR I PQLL708
Sobic.001G122100.3/417-719 608 NYMSPEAFMCND TDSGGNV IKCGRPSD IWSLGC I LYQM VYGK TPFADYK TFWAKYK EVTDRNHK IMYEPVDN PWL IDLMQRCLAWDRNERWR I PQLL704
Sobic.001G122100.2/395-687 586 NYMSPEAFMCND TDSGGNV IKCGRPSD IWSLGC I LYQM VYGK TPFADYK TFWAKYK EVTDRNHK IMYEPVDN PWL IDLMQRCLAWDRNERWR I PQLL682
Sobic.001G122100.4/421-655 612 NYMSPEAFMCND TDSGGNV IKCGRPSD IWSLGC I LYQM VYGVSP -----655
Sobic.001G122100.5/417-665 608 NYMSPEAFMCND TDSGGNV IKCGRPSD IWSLGC I LYQM VYGVSPGTEMND --GGYLNFS -----665

```

**Figura 36:** Alinhamento múltiplo entre as seqüências do domínio quinase da MPS1 de *A. thaliana* e *S.bicolor*. Vermelho: Região de interação com o ligante (inibidor); Verde: Região do loop de ativação e Azul: indicação da substituição entre leucina (*A. thaliana*) e metionina (*S. bicolor*).

Por fim, a solução do *docking* para a ligação do inibidor com o ortólogo de *S. lycopersicum* segue a mesma tendência observada nas seqüências de *G. max*, com a formação de uma ligação de hidrogênio com Glu-551 e os resíduos da cavidade do sítio ativo contribuindo com o componente hidrofóbico da interação (Figura 37).



**Figura 37:** Solução para o *docking* do inibidor com a estrutura Solic11g013240.1.1 (A) O retângulo tracejado vermelho indica a zona de influência do grid configurado durante os preparativos do cálculo; (B) os resíduos (verde) da cavidade do sítio ativo que participam do componente hidrofóbico da interação (C) representação da superfície da estrutura considerando apenas os resíduos que fazem parte das interações com o ligante. A seta indica a posição da ligação de hidrogênio (linha tracejada preta) com o resíduo Glu-551 (magenta).

#### 4.4. Ensaio de inibição *in vitro* do domínio quinase purificado da MPS1 de *A. thaliana*:

O ensaio de inibição revelou que a atividade quinase, neste caso mensurada a partir da formação de ADP, foi reduzida ao longo do tempo devido a presença do inibidor de maneira dose dependente (Figura 38). No experimento foram preparadas quatro reações independentes as quais foram avaliadas em intervalos de 15 minutos. O menor valor de intensidade absoluta foi logo nos 15 minutos iniciais do ensaio, permanecendo relativamente constante sem apresentar grandes alterações, mesmo com o aumento da concentração do inibidor. Nas aferições subsequentes foi observado um aumento da atividade, entretanto a mesma reduz com o aumento da concentração do inibidor para 0,1  $\mu\text{M}$  e assume tendência constante até o fim do experimento após 60 minutos de incubação.

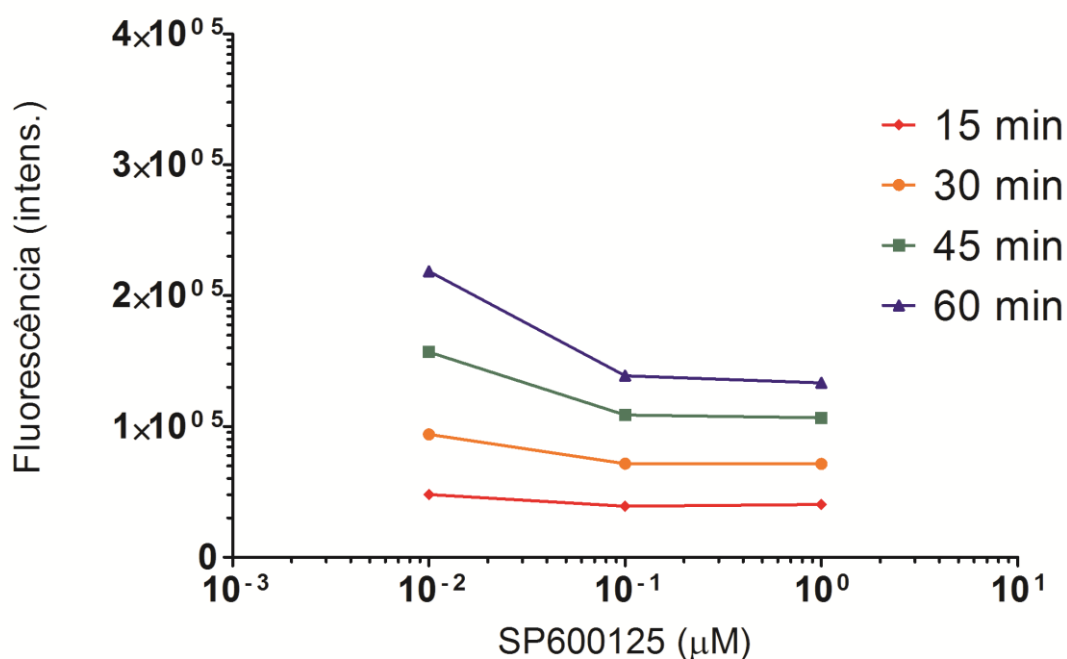
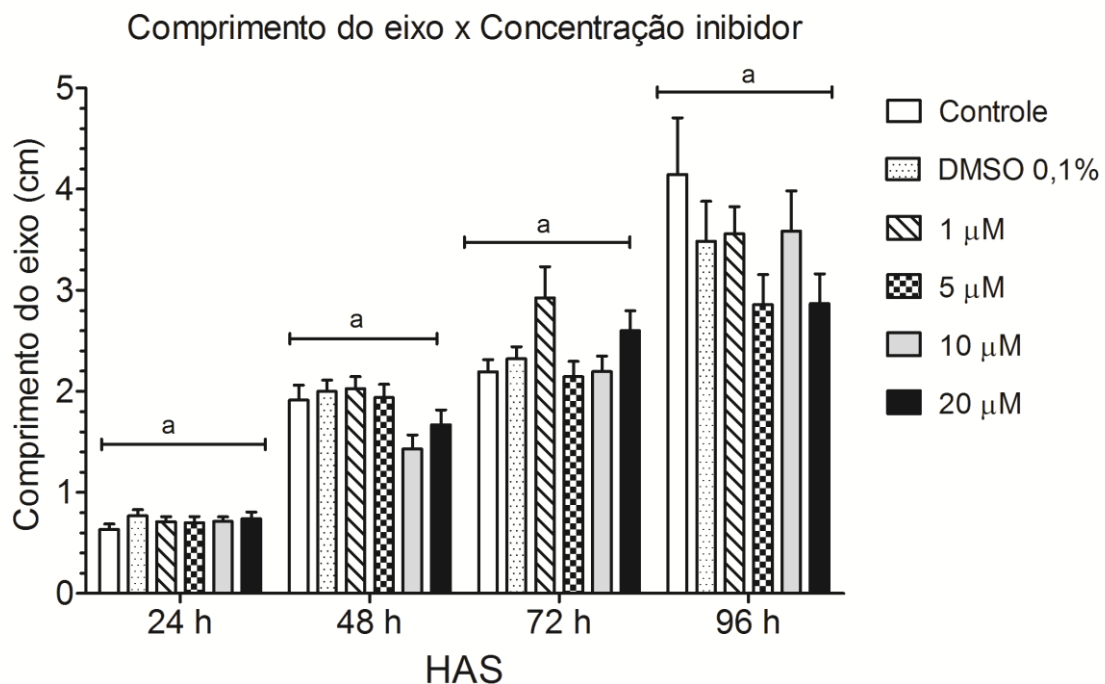


Figura 38: Experimento de inibição *in vitro* da MPS1 de *A. thaliana* purificada.

#### 4.5. Inibição do desenvolvimento pós-germinativo de plântulas de *G.max*, *S. lycopersicum* e *S. bicolor* após tratamento com o inibidor SP600125:

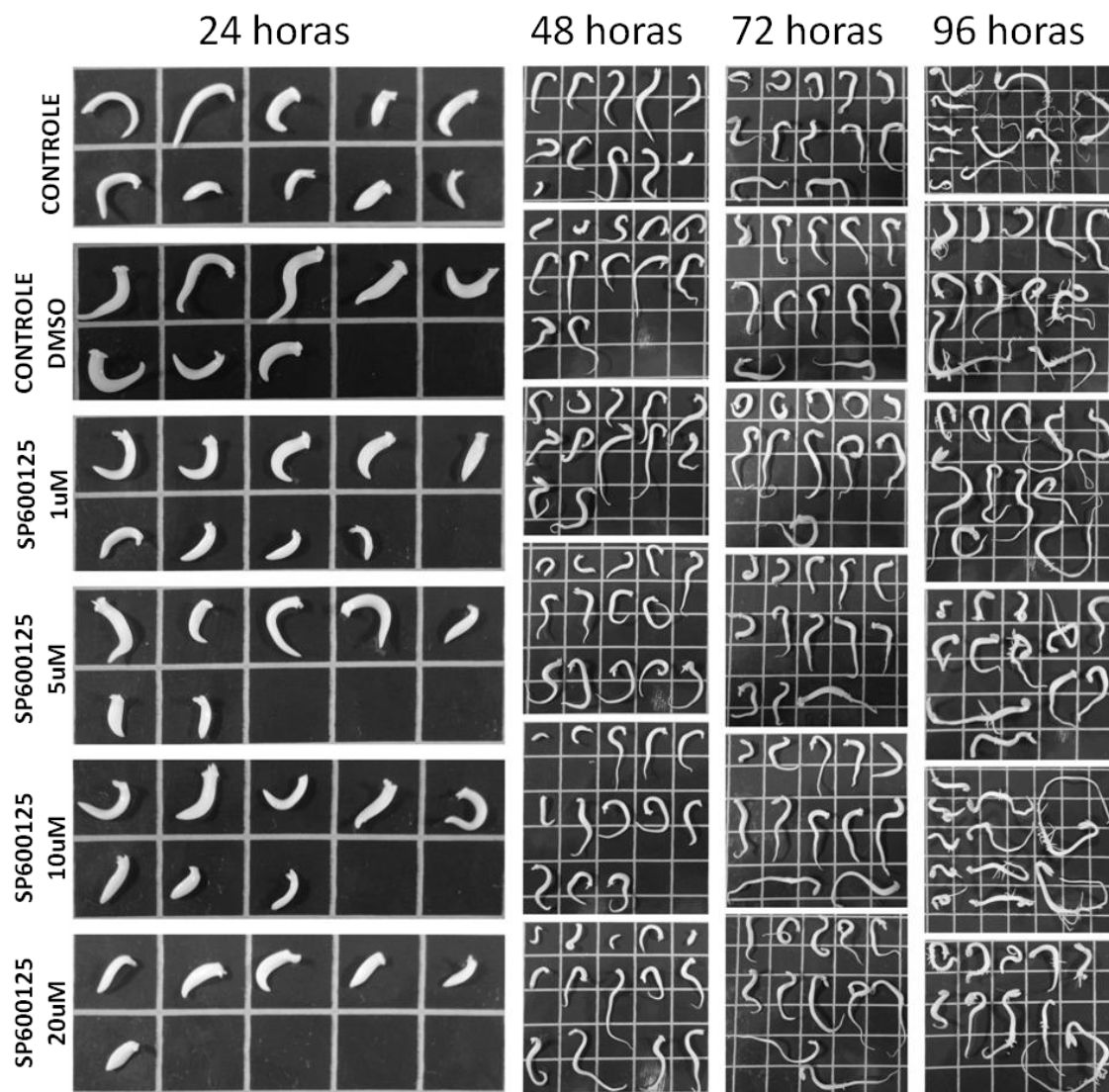
Para avaliar os efeitos fisiológicos da inibição da MPS1, sementes de *G. max*, *S. lycopersicum* e *S. bicolor* foram germinadas e mantidas em crescimento em meio contendo inibidor. Ao final dos experimentos o comprimento das raízes principais (RP),

do epicótilo (EP) a formação de raízes secundárias (RS) e no caso de *G. max* o comprimento do eixo epicótilo-radícula (EER) foram utilizados como parâmetro para avaliação do inibidor no desenvolvimento pós-germinativo das plântulas das espécies estudadas. Em *G. max*, foi observado que ao fim do experimento não houve diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre o grupos controle e tratado. Nenhuma das concentrações de inibidor utilizadas (1, 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ ) foi capaz de causar qualquer tipo de retardo no desenvolvimento dos tecidos avaliados (Figuras 39 e 40) em nenhum dos pontos de coleta (horas após a semeadura - HAS).



**Figura 39:** Avaliação dos tratamentos no crescimento do eixo hipocótilo-radícula de *G. max* ao longo de 96h após a semeadura em placas ao nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ). Letras iguais indicam tratamentos iguais.

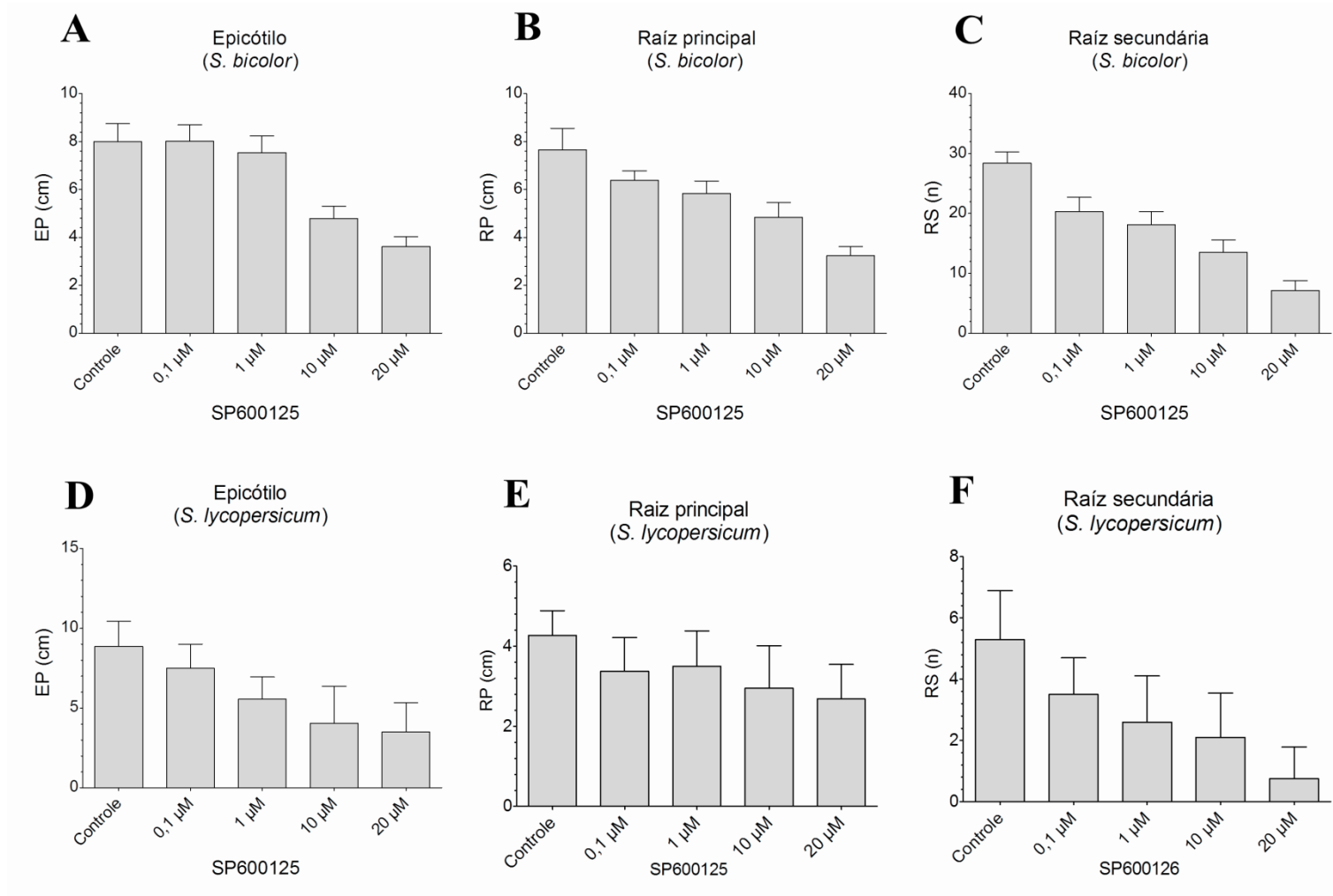




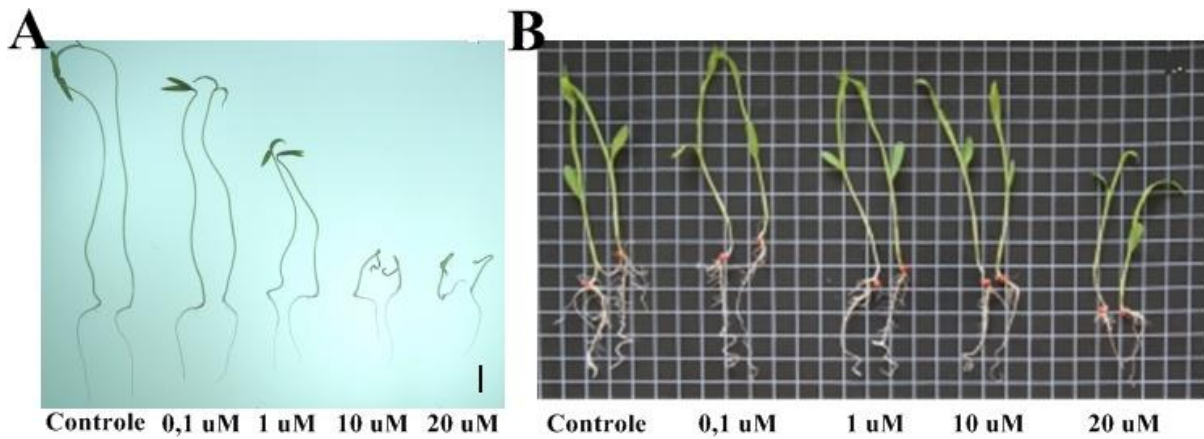
**Figura 40:** Conjunto representativo dos eixos das plântulas analisadas em cada tratamento e intervalos de tempo considerados no experimento. Escala: 1cm (quadrado).

Os resultados obtidos nos experimentos com *S. lycopersicum* e *S. bicolor* foram opostos aos observados em *G. max*. Ambas as espécies se mostraram sensíveis à presença do inibidor, porém em níveis diferentes em cada órgão avaliado. As partes aéreas se mostraram menos sensíveis aos efeitos do inibidor em ambas as espécies, exibindo resposta significativa apenas a partir de 10  $\mu\text{M}$  ao passo que o sistema radicular foi mais susceptível, apresentando retardo no desenvolvimento pós-germinativo a partir de 1  $\mu\text{M}$  de inibidor (Figuras 41e 42). Embora estas tenham exibido retardo no crescimento do sistema radicular principal, não houve diferença detectável entre os tratamentos. Em contrapartida, a formação de raízes secundárias nas duas espécies apresentou comportamento semelhante (Figura 41C e F). Ambas as espécies

foram afetadas proporcionalmente com o aumento da concentração de inibidor no meio de crescimento. Esse efeito inclusive é mais proeminente da formação de raízes secundárias do que no crescimento da raiz principal nas plântulas de ambas as espécies.



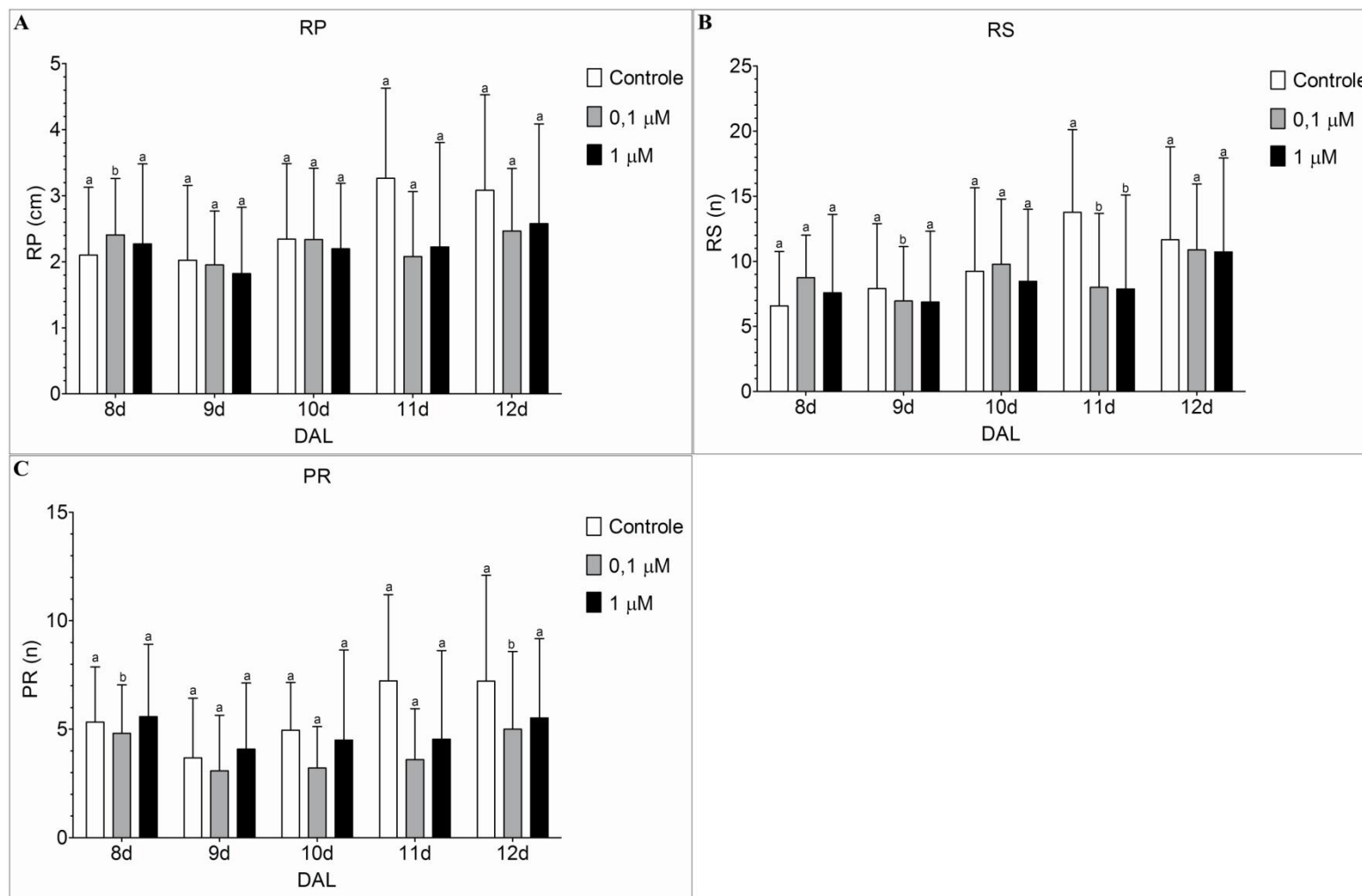
**Figura 41:** Avaliação do efeito do inibidor sobre o desenvolvimento pós-germinativo de plântulas de *S. bicolor* (A, B e C) e *S. lycopersicum*. (A, D) crescimento do epicótilo; (B, E) crescimento da raiz principal; (C, F) formação de raízes secundárias.



**Figura 42:**Conjunto representativo de plântulas de *S. lycopersicum* (A) e *S. bicolor* (B) tratadas com o inibidor durante a germinação e desenvolvimento pós-germinativo. Efeito do inibidor no desenvolvimento pós-germinativo de *S. lycopersicum* (A) e *S. bicolor* (B). Escala: barra = 1 cm; grade = 1 cm.

#### **4.6. Avaliação do potencial de reversão do efeito inibitório do SP600125 sobre o desenvolvimento pós-germinativo de plântulas *A. thaliana*:**

Utilizando dados anteriores (DE OLIVEIRA et al., 2012) aliados aos preceitos da quimiogenômica, o experimento de reversibilidade foi concebido com o intuito de avaliar se as plântulas de *A. thaliana* seriam capazes de retomar seu desenvolvimento/crescimento naturalmente após um período de inibição. Foi possível observar que após a retirada do inibidor, utilizando lavagens sucessivas com meio de cultura fresco, as plântulas em inibição foram capazes de retomar o ritmo de crescimento normal e se igualarem ao grupo controle que haviam sido cultivadas pelo mesmo período de tempo (total de 12 dias de crescimento). A avaliação dos parâmetros selecionados como indicadores de crescimento/desenvolvimento (crescimento da raiz principal –RP; número de raízes secundárias – RS e número de primórdio radiculares – PR) revelou que não havia diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre o grupo controle e tratado (Figuras 43 e 44).



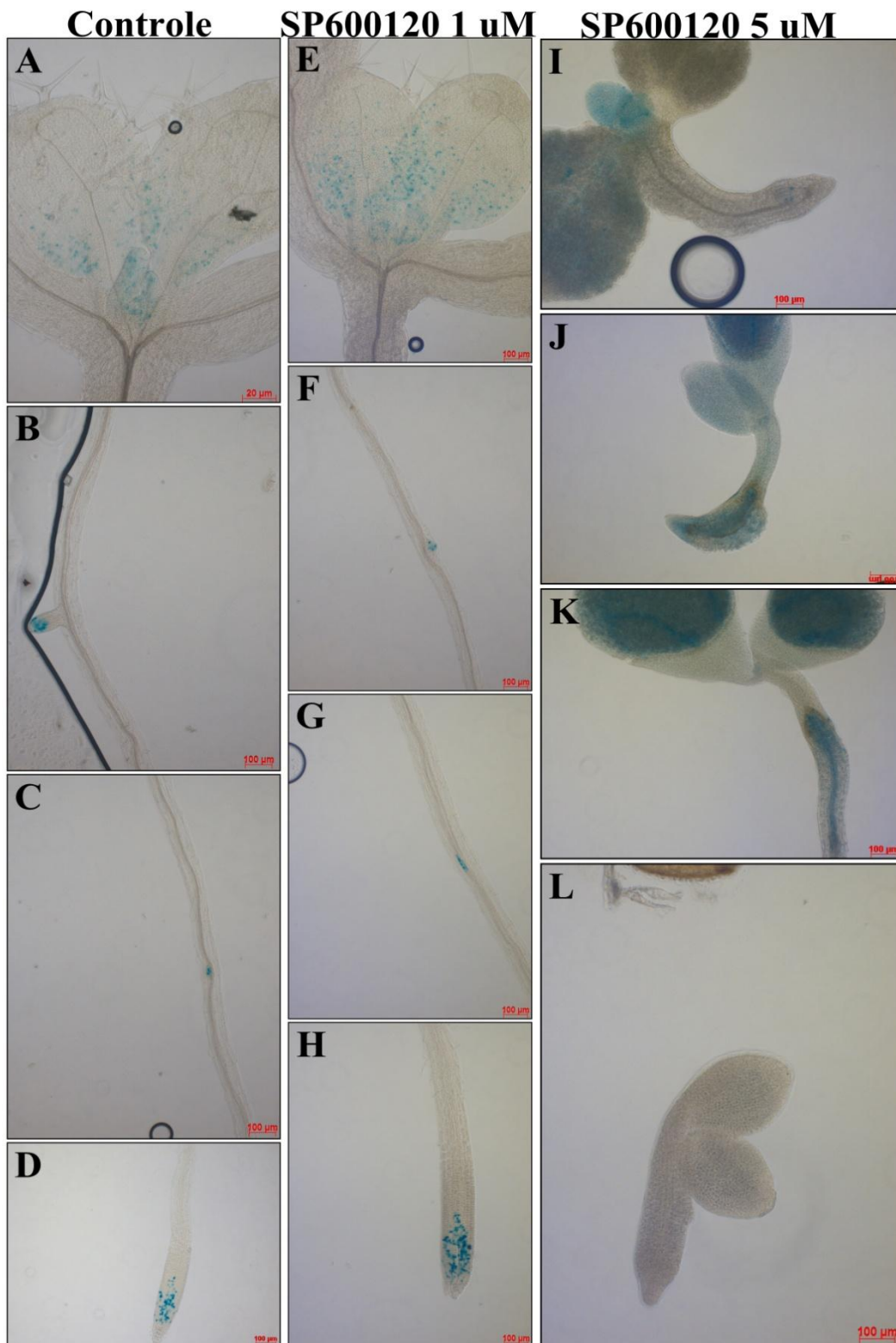
**Figura 43:** Avaliação dos indicadores de crescimento em plântulas de *A. thaliana* submetidas ao experimento de reversibilidade. (A) Crescimento da raiz principal (RP); (B) formação de raízes secundárias (RS) e (C) formação de primórdio radiculares (PR)



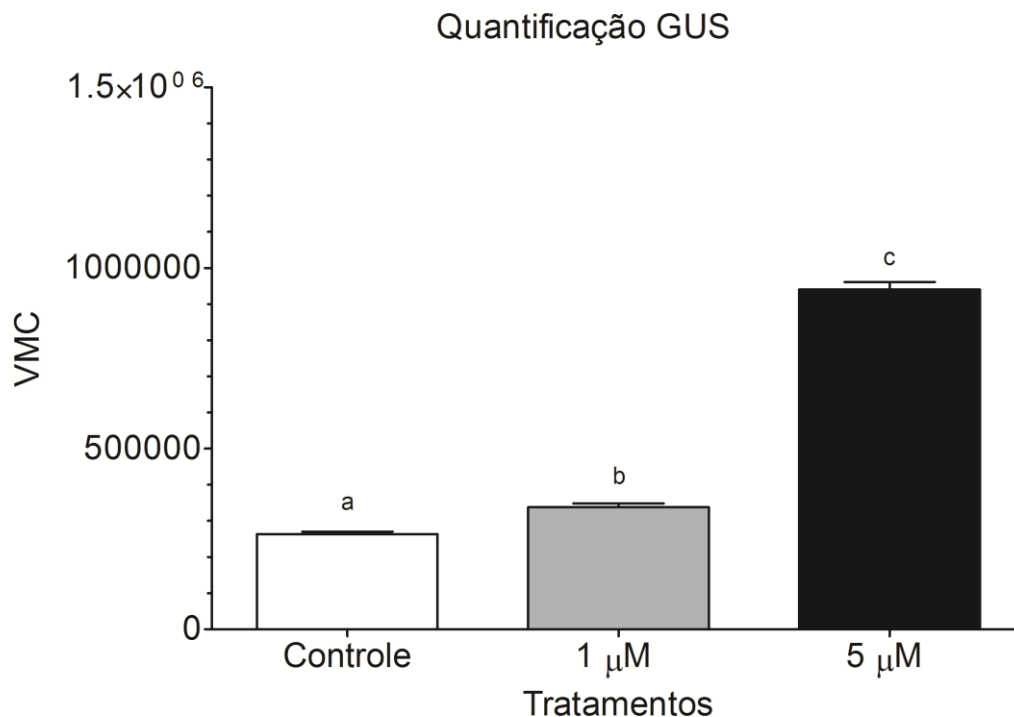
**Figura 44:** Conjunto representativo das plântulas de *A. thaliana* submetidas ao experimento de reversibilidade. Barra = 1cm.

#### **4.7. Avaliação da atividade GUS em plântulas transformadas de *A. thaliana* em experimentos e inibição e reversibilidade:**

Por se tratar de uma ciclina mitótica (CYCB1;1) a expressão da construção contida nas sementes utilizadas neste experimento ficou contida nos tecidos meristemáticos (Figura 45), a saber: na base do meristema apical (MA) onde surgem os primórdios foliares e na base das folhas mais jovens (em menor escala), nos primórdios radiculares (PR) e no meristema da raiz (MR). A quantificação, dada pelo valor médio de cinza (VMC) obtido no canal de saturação das imagens obtidas, revelou que o nível de expressão aumentou de maneira proporcional ao aumento da concentração de inibidor utilizado nos tratamentos (Figura 46).



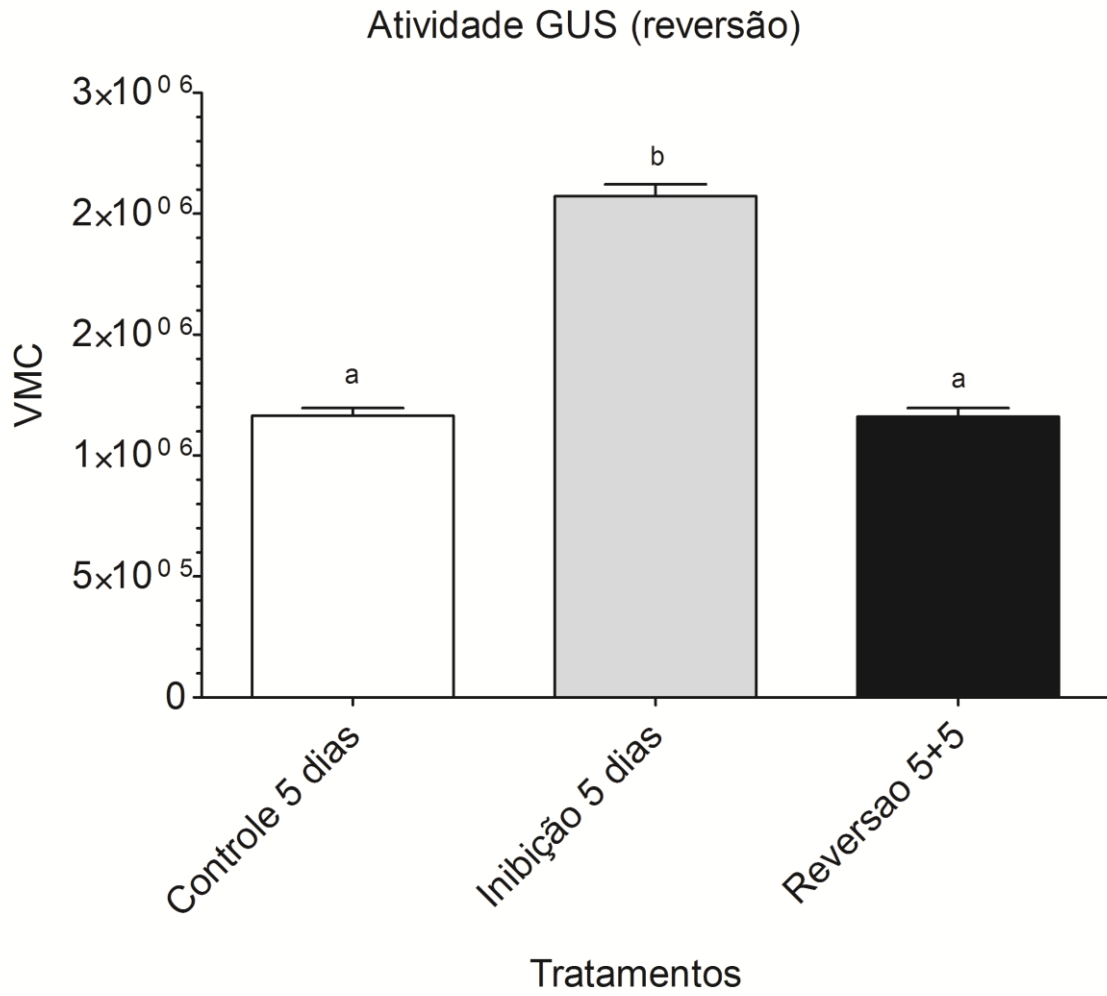
**Figura 45:** Conjunto representativo das plântulas de *A. thaliana* submetidas à inibição por SP600125 e reveladas para atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase (GUS). Barra: 100  $\mu\text{M}$ .



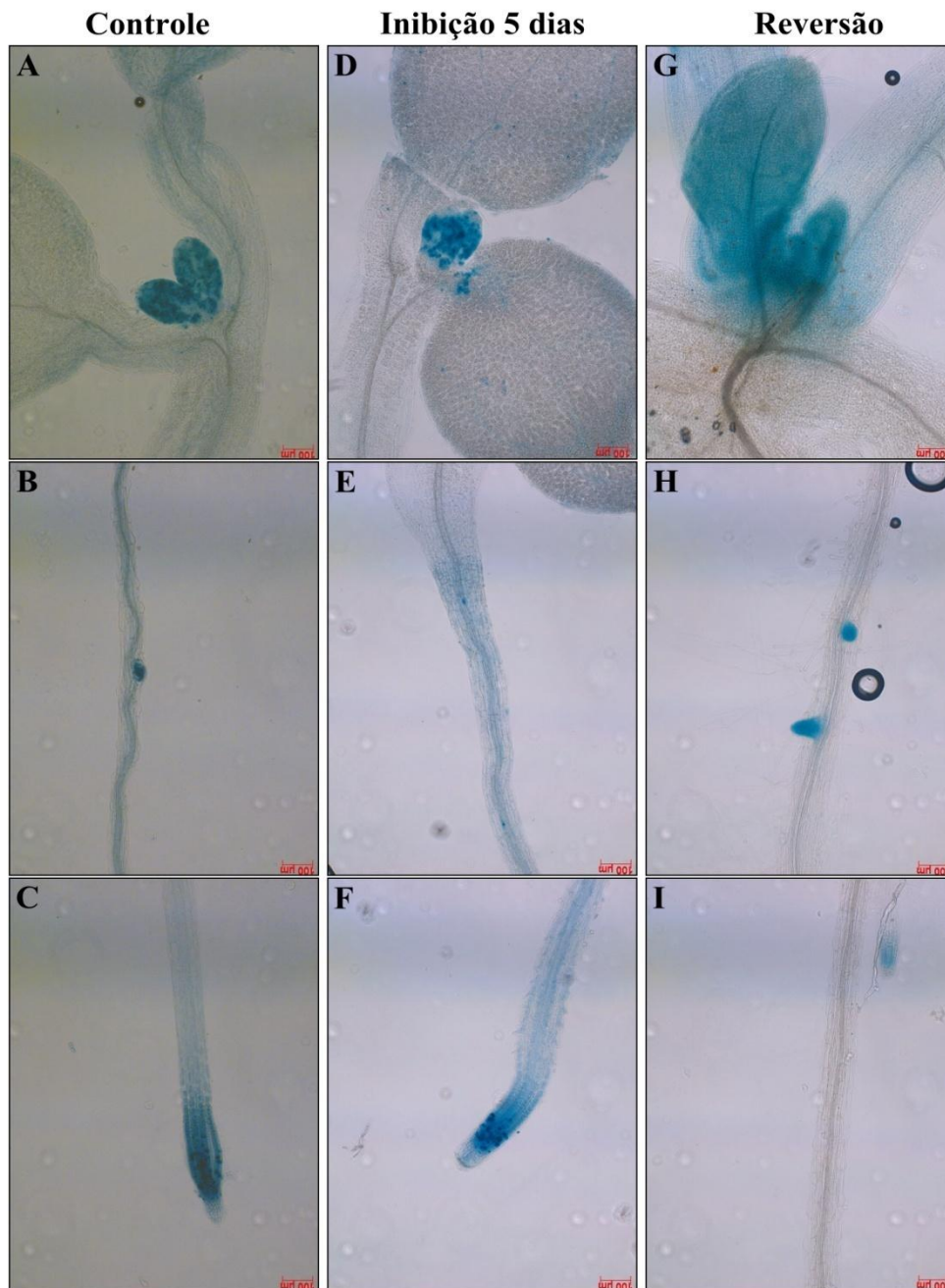
**Figura 46:** Quantificação da atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase (GUS) em plântulas de *A. thaliana* submetidas à inibição. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

Sementes transformadas (CYCB1;1-GUS-Dbox) de *A. thaliana* também foram submetidas a um experimento de reversão. Neste ensaio as plântulas foram cultivadas por cinco dias em meio de cultura suplementado com 1  $\mu$ M de inibidor, lavadas e mantidas em crescimento por mais cinco dias. Paralelamente, para fins comparativos, foi mantido um grupo controle com 5 dias de cultivo. A avaliação dos tecidos apresentando atividade GUS revelou que após a lavagem (reversão) as plantas retornaram a um patamar de expressão observado em plantas de cinco dias. Neste experimento o grupo de plântulas submetidas a inibição com subsequente liberação da influência do inibidor apresentaram padrão de crescimento semelhante às plântulas cultivadas apenas em meio de cultura. Isso demonstra que a reversão do efeito inibitório é possível e as plântulas retomam o desenvolvimento pós-germinativo normal. Em contrapartida, as plântulas que foram mantidas em inibição constante por cinco dias exibiram comportamento semelhante ao observado nos experimentos de inibição simples, apresentando aumento da atividade GUS nos tecidos meristemáticos (Figuras 47 e 48)





**Figura 47:** Avaliação da atividade GUS pelos valores médios de cinza (VMC). Letras - diferentes indicam diferença estatística ao nível de significância de  $P < 0,05$ .



**Figura 48:** Conjunto representativo das plântulas de *A. thaliana* submetidas ao experimento de reversão e revelação da atividade GUS. Barra = 100  $\mu$ M.

#### **4.8. Análise proteômica de raízes de plântulas de *A. thaliana* após reversão da inibição do desenvolvimento pós-germinativo por SP600125:**

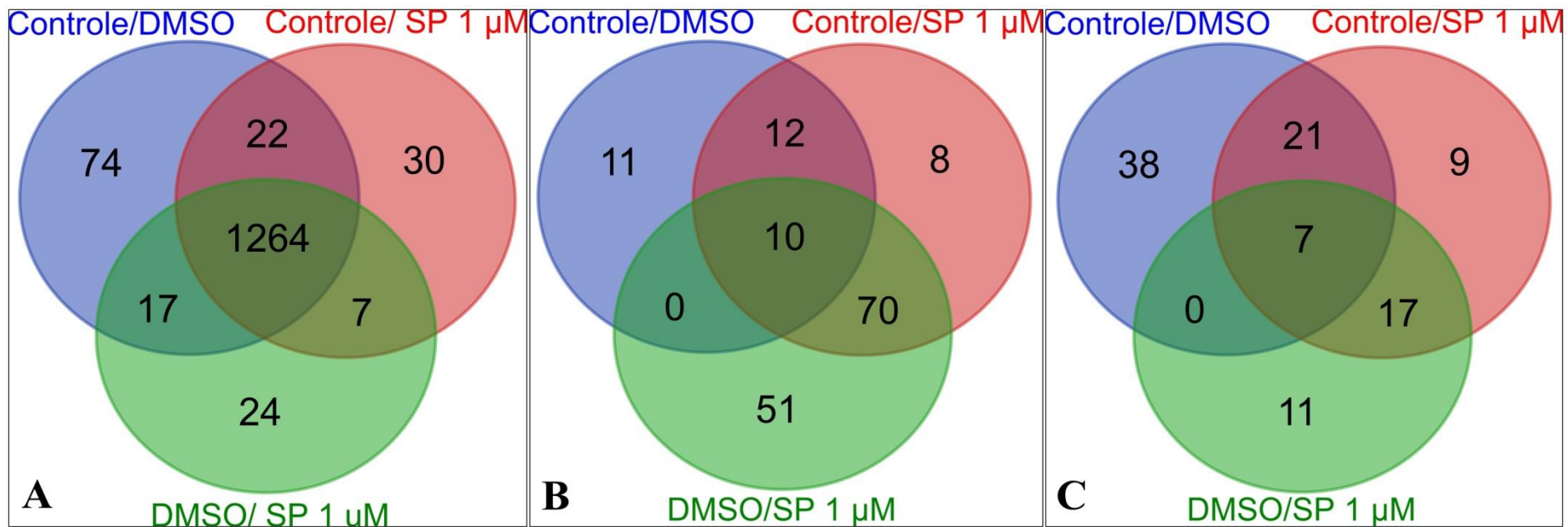
A análise de proteômica comparativa foi realizada considerando três grupos distintos: um grupo controle de plântulas cultivadas apenas em meio de cultura MS meia-força, um grupo controle de plântulas cultivadas em meio MS meia-força

suplementado com DMSO (solvente do inibidor) e um grupo tratado com 1  $\mu$ M do inibidor. Estes três grupos foram denominados, CONTROLE, DMSO e SP1 respectivamente. Após a obtenção e interpretação dos espectros de massa foram identificadas 1479 proteínas que apresentaram pelo menos 2 peptídeos mapeados em sua sequência e portanto consideradas como identificações positivas. Os três tratamentos foram então avaliados par a par formando os grupos CONTROLE-DMSO; CONTROLE-SP 1 e DMSO-SP1. Estes três agrupamentos foram avaliados quanto à variação da expressão destas proteínas considerando os valores de *fold change* calculados (neutras, reguladas positivamente e reguladas negativamente). De maneira geral, a grande maioria das proteínas não apresentou variação entre os tratamentos. De fato a maior quantidade de proteínas com *fold change* alterado foi observado no conjunto DMSO-SP (131 proteínas ou 8,86% do total) (Tabela 10).

**Tabela 10:** Contagem das proteínas identificadas por grupo de variação:

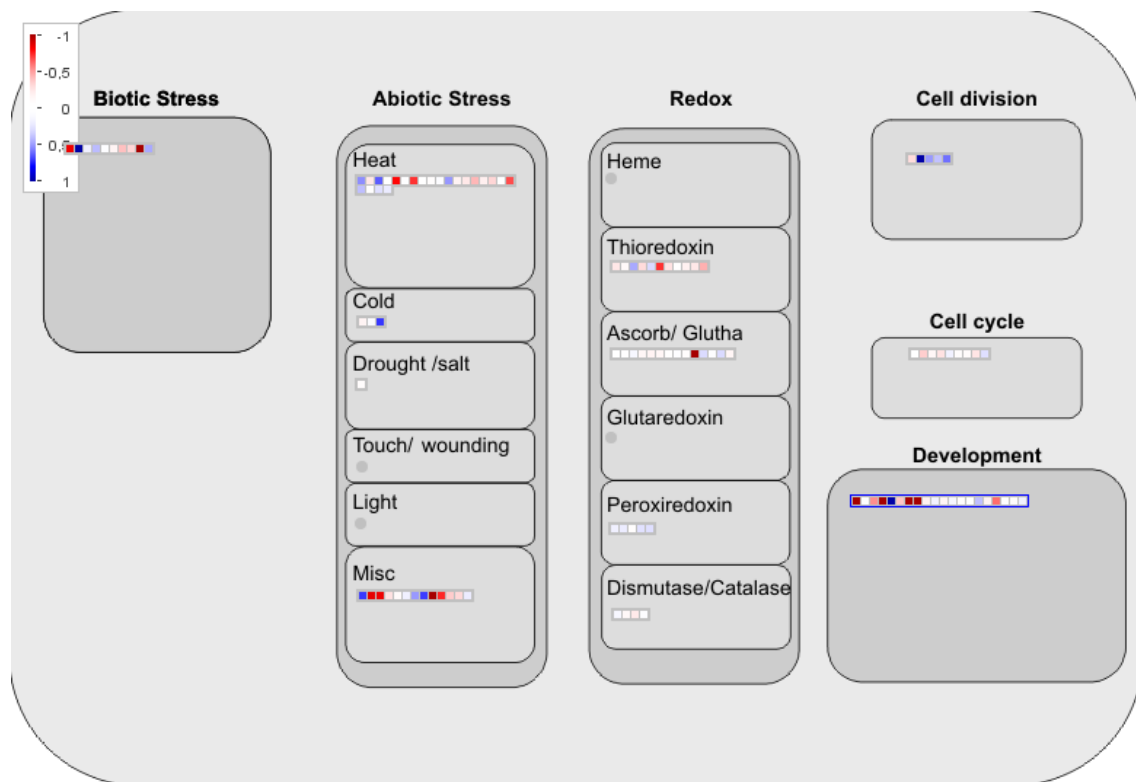
	<b>Neutras</b>	<b>Positivas</b>	<b>Negativas</b>	<b>TOTAL</b>
CONTROLE-DMSO	1380 - 93,3%	33 - 2,23%	66 - 4,46%	
CONTROLE-SP1	1325 - 89,58%	100 - 6,76	54 - 3,65%	1479
DMSO-SP1	1313 - 88,77%	131 - 8,86%	35 - 2,37%	

Adicionalmente, foi observado que das proteínas de regulação neutra a grande maioria está presente nos três tratamentos avaliados (Figura 49A).

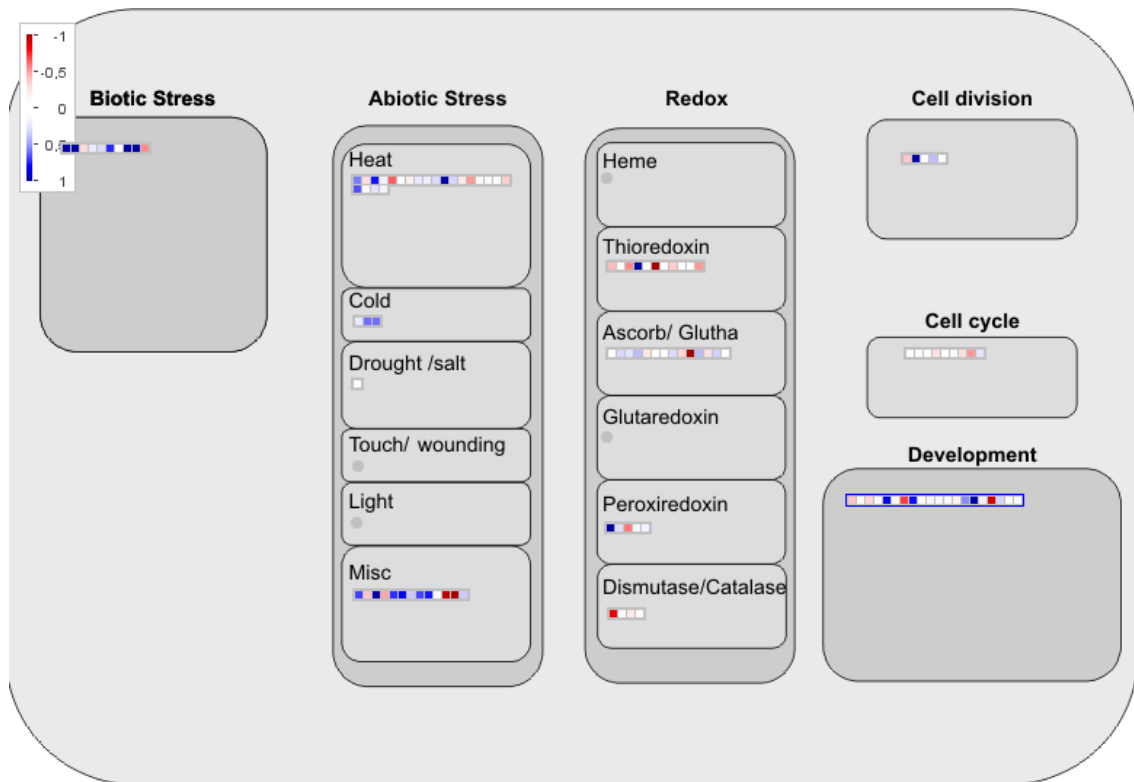


**Figura 49:** Diagramas de Venn indicando as intersecções entre os três agrupamentos formados durante as análises de espectrometria de massas. (A) proteínas de regulação neutra; (B) proteínas positivamente reguladas e (C) proteínas negativamente reguladas. Imagens obtidas em <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn>

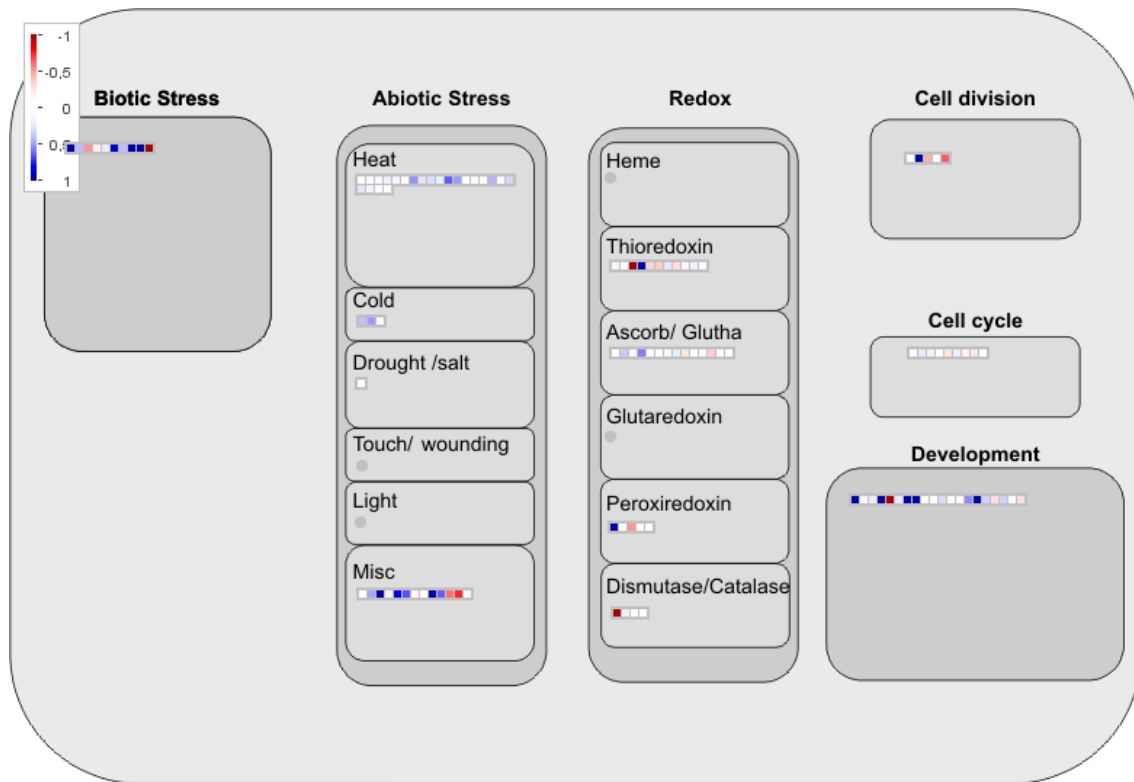
Nas análises conduzidas no programa MapMan todos os valores de *fold change* foram normalizados pelo  $\log_2$  e foi estabelecido um *cutt-off* de 1. Os resultados não indicaram variações significativas em nenhuma das vias avaliadas (Figuras50-52). De modo geral todos os três grupos demonstraram o mesmo comportamento, indicando que as plantas submetidas à reversão são capazes de retomar sua fisiologia normal sem alterações drásticas na maquinaria celular.



**Figura 50:** Gráfico demonstrando a variação das proteínas identificadas no agrupamento CONTROLE-DMSO nas principais repostas celulares. Vermelho indica redução e azul aumento. Figura obtida como programa MapMan v3.15.1R2



**Figura 51:**Gráfico demonstrando a variação das proteínas identificadas no agrupamento CONTROLE-SP1 nas principais repostas celulares. Vermelho indica redução e azul aumento. Figura obtida como programa MapMan v3.15.1R2.



**Figura 52:** Gráfico demonstrando a variação das proteínas identificadas no agrupamento CONTROLE-DMSO nas principais repostas celulares. Vermelho indica redução e azul aumento. Figura obtida como programa MapMan v3.15.1R2.

## 5. DISCUSSÃO:

O ciclo celular é um evento extremamente bem conservado ao longo da linhagem dos eucariotos (KOMAKI; SUGIMOTO, 2012; QUIMBAYA et al., 2012). A sua arquitetura básica e subdivisão em quatro fases distintas já foi observada e bem documentada em diversos organismos (HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013). Na sua atual configuração, o ciclo celular caracteriza-se por apresentar um amplo conjunto de mecanismos de regulação que controlam de maneira extremamente precisa a progressão dos eventos que culminam na divisão celular e conseqüentemente na produção de novas células filhas. Tal precisão permite o controle espaço temporal da forma como as células de um organismo se multiplicam. De fato a hipótese vigente é a de que o ciclo celular evoluiu para garantir que a divisão celular não ocorra antes da correta segregação dos cromossomos (VLEUGEL et al., 2012). Entretanto, mesmo com uma notável conservação entre os eucariotos ainda é possível observar diferenças cruciais que estão diretamente relacionadas com os caminhos evolutivos que as diferentes linhagens eucarióticas apresentam. Talvez as mais notáveis sejam as que ocorrem em plantas.

Plantas são organismos sésseis, desta forma todas as decisões tomadas durante seu desenvolvimento devem considerar o ambiente a sua volta (DANTE; LARKINS; SABELLI, 2014; DEN BOER; MURRAY, 2000; SCOFIELD; JONES; MURRAY, 2014; STALS; INZÉ, 2001). As modificações de forma e ritmo de crescimento ocorrem em resposta aos diversos estímulos oriundos do meio (KOMAKI; SUGIMOTO, 2012). Um exemplo importante de como as condições ambientais influenciam diretamente nas decisões que uma célula vegetal toma no curso do ciclo celular pode ser notada nos eventos que ocorrem na citocinese, ao fim da mitose. Neste momento diversas cascatas de sinalização mediadas por MAPKs influenciam diretamente na escolha do plano de divisão celular. MAPKs são, talvez a principal via de transdução de sinais externos para o interior celular em plantas (SOPORY, 1998). A escolha do plano de divisão celular em plantas é fundamental para o destino da nova célula em formação. A divisão celular que ocorre em planos simétricos, direciona para processos proliferativos, os quais são direcionados para o crescimento e aumento de biomassa vegetal. De maneira oposta, células que apresentam planos de divisão assimétricos participam dos processos formativos de produção de novos órgãos e tecidos (morfogêneses) e especialização



celular(DE SMET et al., 2008; DE SMET; BEECKMAN, 2011; GUTIERREZ, 2016; VAN DAMME et al., 2011).

Nos últimos 25 anos em que se estuda o ciclo celular de plantas muito foi descoberto sobre as minúcias que permeiam a regulação desta via tão importante (GUTIERREZ, 2016). Entretanto, muitos elos de ligação permanecem desconhecidos. Um bom exemplo são os mecanismos de controle associados à transição metáfase-anáfase, que é um ponto crucial da divisão celular. Nesta etapa é monitorado o estado de ancoramento do fuso mitótico e a tomada de decisão entre prosseguir com a divisão celular ou de outro destino para a célula (FRANCIS, 2011; VEYLDER; JOUBÈS; INZÉ, 2003). Já foram descritos diversos elementos de regulação que atuam diretamente desta etapa, entretanto um deles se destaca por seu papel central: a proteína quinase de dupla atividade MPS1. A partir de sua descoberta em leveduras e células animais, no início da década de 90 (WINEY, 1996; WINEY et al., 1991) esta passou a figurar em diversos estudos envolvendo os mecanismos do controle da progressão do ciclo celular especialmente naqueles envolvendo o surgimento de neoplasias malignas e sua relação com a correta segregação dos cromossomos (DORER et al., 2005; GURDEN et al., 2015; LENG et al., 2006; SLIEDRECHT et al., 2010). Esta proteína é responsável por criar um circuito de sinalização envolvendo a proteína MAD2 e CDC20 e mantendo reprimido o complexo promotor da anáfase até que todos os cromossomos estejam corretamente alinhados para sua separação (DE ANTONI et al., 2005; MUSACCHIO, 2015). Mesmo com toda a importância dada a MPS1 e a grande quantidade de estudos abordando diferentes aspectos estruturais e funcionais desta proteína, muito pouco se sabe sobre ela em vegetais. Apenas mais recentemente sua presença e função em plantas começaram a ser observadas (DE OLIVEIRA et al., 2012; DING; MUTHUSWAMY; MEIER, 2012; DOUÉTTS-PERES et al., 2016), embora o conhecimento produzido seja ainda superficial se comparado com o que se conhece em levedura e mamíferos. Neste trabalho foi possível observar que as espécies selecionadas apresentam ortólogos para o gene da MPS1 e que muitos componentes estruturais, já observados na MPS1 de *A. thaliana* e *Araucaria. angustifolia*, também estão presentes nas estruturas das proteínas aqui identificadas. Um destaque especial pode ser dado para a tríade de treoninas que ocorre no loop de ativação desta proteína. Estes resíduos já foram intensamente estudados e estão diretamente implicados nos mecanismos de ativação e fosforegulação por autofosforilação, além de participarem do recrutamento

de proteínas para o cinetócoro (ABRIEU et al., 2001; HAUF, 2008; MACIEJOWSKI et al., 2010; TYLER et al., 2009; VIGNERON et al., 2004). A conservação destes resíduos nas sequências polipeptídicas identificadas é um bom indicador que estas proteínas conservam dinâmicas e funções semelhantes nestas espécies. Outra tendência observada nestas proteínas foi a presença de inúmeros *motifs* de interação proteína-proteína já identificados na MPS1 de plantas. Neste caso foram selecionados aqueles que apresentam alguma relação com processos do ciclo celular e do desenvolvimento vegetal. Os *motifs* *LIG\_MAD2*, *DOC\_CYCLIN\_1*, *DOC\_MAPK\_gen\_1* e *DEG\_APCC\_DBOX\_1* indicam a capacidade destas proteínas em interagir com estes elementos. Já foi indicado que MAPKs atuam na ativação da MPS1 por fosforilação dos resíduos de treonina que ocorrem no *loop* de ativação (KANG et al., 2007a; ZHAO; CHEN, 2006) e a interação ente MPS1 e MAD2 já é extensamente compreendida (BALLISTER; LAMPSON, 2012; HACHED et al., 2011; HAUF, 2008; HEWITT et al., 2010; TIGHE; STAPLES; TAYLOR, 2008). O *motif* *DEG\_APCC\_DBOX\_1* direciona proteínas para degradação proteolítica mediada pelo APC/C na saída da anáfase, e é um bom indicador que esta proteína é imediatamente eliminada uma vez que todos os cromossomos estejam devidamente ligados ao fuso mitótico, permitindo a direta progressão do ciclo em direção a divisão celular propriamente dita (GLOTZER; MURRAY; KIRSCHNER, 1991; MARROCCO et al., 2009; VAN DAMME et al., 2011). Entretanto, este é o *motif* menos conservado entre as sequências avaliadas, o que pode indicar que diferentes espécies podem apresentar diferentes maneiras de lidar com estas proteínas, uma vez que estas não sejam mais necessárias. Os *motifs* de interação com outras proteínas como por exemplo SUMO (*LIG\_SUMO\_SIM\_par\_1*, *LIG\_SUMO\_SIM\_anti\_2*, *MOD\_SUMO\_for\_1* e *MOD\_SUMO\_rev\_2*), 14-3-3 (*LIG-14-3-3\_CanoR\_1*), NEK (*NEK2\_1* e *NEK2\_2*) e Polo-*like*quinase (*MOD\_PLK*) também foram investigados. A sumonilação é um tipo de modificação pós-traducional com três funções propostas: localização (importação de proteínas para o núcleo), estabilização por competição com mecanismos de ubiquitinação e controle transcricional (ENDTER et al., 2001; SONG et al., 2004). Já foi relatado que a MPS1 humana sofre modificações por SUMO-1 e -2 e que este evento auxilia na sua localização junto aos cinetócoros, afetando o ritmo de progressão da mitose (RESTUCCIA et al., 2016). A identificação de regiões de interação e modificação por SUMO, associada a presença de *motifs* de translocação nuclear na porção N-terminal de todas as sequências estudadas (*TRG-NLS\_MonoExtC\_3*,

TRG-NLS\_MonoExtN\_4, TRG-NLS\_Bipartite\_1, TRG-NLS\_MonoCore\_2) apontam para um mesmo destino da MPS1 de plantas. Além disso já foi descrito que a sumonilação em plantas é responsável por uma gama, ainda maior, de sinais celulares em resposta a estresses ambientais bióticos e abióticos (PARK et al., 2011) e no crescimento e desenvolvimento celular (HUANG et al., 2009; ISHIDA et al., 2009). O fato de a sumonilação proteger contra degradação via APC/C pode ser uma forma de garantir a presença da MPS1 durante a formação do fuso mitótico, evitando que ela seja degradada de forma prematura, comprometendo o andamento do ciclo e a viabilidade celular.

As proteínas 14-3-3 estão envolvidas na regulação de diversos processos celulares, desde apoptose até o ciclo celular (PENG et al., 1997; ZHA et al., 1996). A atividade desta classe de proteínas depende diretamente da associação de resíduos fosforilados de serina e/ou treonina e já foi relatado que a MPS1 humana controla a translocação de c-Alb para o núcleo, em conjunto com a ação de uma proteína 14-3-3 num evento de fosforilação acoplada em resposta a estresse oxidativo na célula (NIHIRA et al., 2008). Desta forma, a presença de *motifs* de interação com 14-3-3 na MPS1 de plantas pode ser uma ponte para associar esta proteína a respostas e estímulos externos, uma vez que a produção de espécies reativas de oxigênio é um dos principais mecanismos de defesa observado em plantas (KRISHNAMURTHY; RATHINASABAPATHI, 2013).

A atividade da MPS1 é inteiramente dependente de fosforegulação (MATTISON et al., 2007b; TYLER et al., 2009; WANG et al., 2009, 2014; ZHAO; CHEN, 2006). De fato esta proteína é fosforilada por diferentes proteínas quinases (incluindo autofosforilação) ao longo do andamento do ciclo celular. Desta forma não surpreende a presença de *motifs* de modificação por NEK2 e Polo-like quinases (MOD\_NEK2\_1, MOD\_NEK2\_2 e MOD\_PLK). Proteínas quinase do tipo NEK2 já forma descritas como reguladoras do ciclo celular, apresentando pico de expressão nas fases S e G<sub>2</sub>, com influência direta na formação do fuso mitótico e dos centrossomos. A inibição da atividade de quinases tipo NEK2 resultou na formação de células multinucleadas (JEONG et al., 2007; MONIZ et al., 2011; RELLOS et al., 2006). Também já foi relatado que a Plk1 atua na fosforilação de KNL-1 (que é um substrato reconhecido da própria MPS1 humana) e da MPS1 e em contra partida a própria MPP1 também fosforila a KNL-1 e a Plk1. Esse circuito de fosforilação é responsável pela ativação do

complexo de monitoramento da mitose (MCC – *Mitosis Checkpoint Complex*) o qual mantém o APC/C reprimido, impedindo o progresso prematuro da mitose, antes da segregação dos cromossomos. Isso pode evidenciar uma rede de sinalização envolvendo NEK e PLK atuando diretamente sobre a MPS1 de plantas, entretanto é importante ressaltar que mesmo com a presença do *motif* de modificação por PLK estas ainda não foram identificadas em plantas (ARCHAMBAULT; GLOVER, 2009) deixando uma lacuna ainda a ser preenchida.

Ainda que a maioria das seqüências avaliadas neste trabalho apresente boa conservação das estruturas primária e terciária em relação a MPS1 humana e de *A. thaliana* é importante relatar que quatro dos ortólogos identificados em *G. max* (Glyma06109800.4, Glyma13g083100.3, Glyma13g083100.2 e Glyma14g164400.4) sofreram grandes deleções em suas seqüências polipeptídicas, perdendo toda a região que compreende os resíduos que formam a cavidade do sítio ativo e o loop de ativação. Isso é um indicativo que de estas proteínas, se apresentarem alguma função celular, muito provavelmente não atuam como proteínas quinase já que não possuem nenhuma forma de receber o ATP para efetuar a transferência do radical fosfato para seus possíveis substratos.

A genômica química permite o estudo de vias de sinalização utilizando pequenas moléculas de efeito reversível, de maneira simples, rápida e por uma fração dos custos das estratégias mais tradicionais que envolvem a obtenção de mutantes por meio de transformação genética (CARLSON; WHITE, 2012; O' CONNOR; LARAIA; SPRING, 2011). Esta técnica inclusive já é utilizada extensivamente no estudo do ciclo celular, incluindo plantas (BÖHMER; ROMEIS, 2007; PLANCHAIS et al., 2000). Ademais, também já foi utilizada para elucidar diferentes funções da própria MPS1 em humana incluindo sua relação com a formação do fuso mitótico (JONES et al., 2005), a regulação da atividade da proteína quinase Aurora B durante a formação do fuso (SLIEDRECHT et al., 2010), sua influência na formação com complexo MAD1-MAD2 e sua ligação aos cinetócoros durante a metáfase (KWIATKOWSKI et al., 2010), a manutenção do estado de tensionamento dependente da atividade da MPS1 (DORER et al., 2005) e a formação do complexo Cdc20 e a subsequente repressão da atividade do APC/C durante a transição metáfase-anáfase (MACIEJOWSKI et al., 2010). O inibidor SP600125 também já foi extensivamente utilizado para estudar a função da MPS1 em

diversos tipos celulares. A presença desta molécula no meio de crescimento de células animais (principalmente de linhagens tumorais) causa a desagregação do fuso mitótico e afeta o recrutamento de BUBR1 para os cinetócoros (SCHMIDT et al., 2005) perturbando completamente os eventos que ocorrem durante o ponto de monitoramento do fuso (HEWITT et al., 2010; TIGHE; STAPLES; TAYLOR, 2008; TIPTON et al., 2013). Também já foi observado que este inibidor afeta diretamente a capacidade de autofosforilação da MPS1 e, potencialmente sua ativação durante os eventos a qual participa (KANG et al., 2007b). Neste contexto foram utilizadas ferramentas de química computacional para avaliar o potencial de ligação do inibidor selecionado para este estudo bem como para comparar seu modo de interação com informações disponíveis na literatura. Nos experimentos de *docking* foi possível observar, com algumas exceções, que o inibidor interage com a MPS1 de plantas da mesma forma já observada em outros estudos (CHU et al., 2008b, 2010a), formando ligações com resíduos importantes (Gly e Glu) dentro da cavidade do sítio ativo, bloqueando a entrada e interação com o ATP. Contudo, embora o potencial de ligação tenha sido observado *in silico*, na prática a inibição foi observada em plântulas de *A. thaliana* (DE OLIVEIRA et al., 2012), *S. bicolor* e *S. lycopersicum*. Em plântulas de *G. max* nenhuma das concentrações utilizadas nos experimento surtiu qualquer efeito inibitório. Uma das explicações poderia a ser o número elevado de cópias do gene (quatro famílias gênicas com 14 transcritos), que estariam gerando um efeito compensatório, aumentando o nível de expressão da MPS1 nos tecidos em resposta a presença do inibidor. Efeito parecido é observado em algumas linhagens celulares de tumores, que ao sofrerem duplicação no número dos genes que codificam os alvos de certos quimioterápicos, passam a apresentar um fenótipo de resistência ao medicamento (KIM et al., 2017). Entretanto, *S. bicolor* apresenta 4 transcritos do mesmo gene e as plântulas tratadas responderam como o esperado ao tratamento. Isso sugere que talvez existam outros mecanismos envolvidos na resposta da soja à presença do inibidor.

A utilização de plântulas de *A. thaliana* transformadas com CYCB1;1-GUS (ELOY et al., 2011) num experimento de inibição permitiu a observação de um efeito interessante. Mesmo com a repressão da atividade da MPS1 e o conseqüente retardo no desenvolvimento pós-germinativo das plântulas, foi observado um aumento na expressão de CYCB1;1 nos tecidos meristemáticos que apresentaram coloração em resposta a atividade GUS. Como esta ciclina atua especificamente desencadeando a

transição G<sub>2</sub>/M (INZÉ; DE VEYLDER, 2006) e o inibidor bloqueia a transição metáfase-anáfase é possível que a células estejam interpretando esse retardo como um sinal para compensar a expressão de CYCB1;1 nos tecidos meristemáticos.

Finalmente, o experimento de proteômica comparativa por espectrometria de massas permitiu obter um panorama geral do conjunto de proteínas presentes em raízes da *A. thaliana* além de demonstrar que a reversão do efeito inibitório causado por SP600125 é completa. Entretanto, nem MPS1 nem proteínas classicamente descritas como alvos de interação com a mesma foram observados na listagem gerada. Esse é um dado que vai na direção oposta ao que já foi observado na proteômica de células em suspensão de *Araucária angustifolia* (DOUÉTTS-PERES et al., 2016) e em outros experimentos de proteômica e transcriptômica, ainda que esta proteína não fosse o objeto de estudo (MENGES et al., 2002; NEMOTO et al., 2011; ROCHE et al., 2007). É possível que a natureza efêmera da expressão de MPS1, ocorrendo numa janela temporal relativamente pequena (entre G<sub>2</sub> até a metade da fase M) associada à sua tendência a degradação por atividade proteolítica pode ter reduzido a probabilidade de detectar esta proteína no *pool* de amostras avaliado (CUI et al., 2010; JELLUMA et al., 2008; SAURIN et al., 2011; STUCKE; BAUMANN; NIGG, 2004).

## 6. CONCLUSÕES:

- As espécies estudadas neste trabalho apresentam ortólogos da MPS1 conservados em seu genoma;
- Os ortólogos avaliados compartilham características estruturais já observadas em outras MPS1 e de relevância dentro do contexto do ciclo celular como por exemplo, a arquitetura básica do domínio quinase, a presença de três resíduos de treonina na alça do loop de ativação e a distribuição de *motifs* de interação proteína-proteína de relevância no contexto do ciclo celular;
- Os experimentos de *docking* revelaram o potencial de interação entre o inibidor SP600125 e a estrutura dos ortólogos identificados nas espécies estudadas;
- As plântulas de *S. bicolor* e *S. lycopersicum* são susceptíveis ao tratamento com o inibidor de maneira proporcional a concentração do mesmo, sendo o desenvolvimento do sistema radicular diretamente afetado;
- Em contrapartida, plântulas de *G. max* não apresentaram fenótipo de resposta observável mediante o tratamento com o inibidor, sugerindo a presença de mecanismos compensatórios da inibição da MPS1 em seus tecidos;
- A expressão de CYCB1;1 aumenta quando plântulas de *A. thaliana* são tratadas com o inibidor da MPS1, sugerindo que a maquinaria celular interpreta o bloqueio da transição metáfase-anáfase como um sinal para manter a expressão de CYCB1;1 durante a G<sub>2</sub>/M;
- A análise proteômica revelou que o fenótipo de inibição é totalmente reversível do ponto de vista fisiológico porém não detectou a presença da MPS1 ou de qualquer um de seus alvos preferenciais durante a progressão do ciclo celular;
- O domínio quinase da proteína MPS1 purificado teve sua atividade inibida *in vitro* quando tratada com o inibidor SP600125.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABRIEU, A. et al. Mps1 Is a Kinetochores-Associated Kinase Essential for the Vertebrate Mitotic Checkpoint. **Cell**, v. 106, p. 83–93, 2001.
- ALEXANDER, J. et al. Spatial Exclusivity Combined with Positive and Negative Selection of Phosphorylation Motifs Is the Basis for Context-Dependent Mitotic Signaling. **Science Signaling**, v. 4, n. 179, p. ra42-ra42, 28 jun. 2011.
- ALTSCHUL, S.; GISH, W.; MILLER, W. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular ...**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- ARCHAMBAULT, V.; GLOVER, D. M. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 4, p. 265–275, abr. 2009.
- ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 22, n. 2, p. 195–201, 15 jan. 2006.
- BALLISTER, E. R.; LAMPSON, M. A. Chromosomal Instability: Mad2 beyond the spindle checkpoint. **Current biology : CB**, v. 22, n. 7, p. R233-5, 10 abr. 2012.
- BAROW, M.; MEISTER, A. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, n. 4, p. 571–584, abr. 2003.
- BÉZIAT, C.; KLEINE-VEHN, J.; FERARU, E. Histochemical Staining of beta-glucuronidase and its spatial quantification. In: KLEINE-VEHN, J.; SAUER, M. (Eds.). **. Plant Hormones: Methods and Protocols**. 3. ed. New York, NY: Humana Press, 2017. v. 1497p. 73–80.
- BLOMME, J.; INZÉ, D.; GONZALEZ, N. The cell-cycle interactome: a source of growth regulators? **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 10, p. 2715–2730, 1 jun. 2014.
- BÖHMER, M.; ROMEIS, T. A chemical-genetic approach to elucidate protein kinase function in planta. **Plant Molecular Biology**, v. 65, p. 817–827, 2007.
- BOTELHO-JÚNIOR, S. et al. Defense response in non-genomic model species: methyl jasmonate exposure reveals the passion fruit leaves' ability to assemble a cocktail of functionally diversified Kunitz-type trypsin inhibitors and recruit two of them against papain. **Planta**, v. 240, n. 2, p. 345–356, 22 ago. 2014.
- BOUDOLF, V. The Plant-Specific Cyclin-Dependent Kinase CDKB1;1 and



Transcription Factor E2Fa-DPa Control the Balance of Mitotically Dividing and Endoreduplicating Cells in Arabidopsis. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 16, n. 10, p. 2683–2692, 1 out. 2004.

BOUDOLF, V. et al. CDKB1;1 Forms a Functional Complex with CYCA2;3 to Suppress Endocycle Onset. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 150, n. 3, p. 1482–1493, 1 jul. 2009.

BOUDOLF, V.; INZE, D.; DEVEYLDER, L. What if higher plants lack a CDC25 phosphatase? **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 10, p. 474–479, out. 2006.

BRUCE ALBERTS, ALEXANDER JOHNSON, JULIAN LEWIS, DAVID MORGAN, MARTIN RAFF, KEITH ROBERTS, P. W. **The Molecular Biology of the Cell**. 6. ed. [s.l.] Garland Science, 2014.

BULANKOVA, P. et al. Identification of Arabidopsis Meiotic Cyclins Reveals Functional Diversification among Plant Cyclin Genes. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 5, p. e1003508, 9 maio 2013.

CAILLAUD, M.-C. et al. Spindle assembly checkpoint protein dynamics reveal conserved and unsuspected roles in plant cell division. **PloS one**, v. 4, n. 8, p. e6757, 2009.

CALDERAN-RODRIGUES, M. J. et al. Cell wall proteomics of sugarcane cell suspension cultures. **PROTEOMICS**, v. 14, n. 6, p. 738–749, mar. 2014.

CARLSON, S. M.; WHITE, F. M. Expanding applications of chemical genetics in signal transduction. **Cell Cycle**, v. 11, n. 10, p. 1903–1909, 15 maio 2012.

CHABOUTE, M.-E.; CLEMENT, B.; PHILIPPS, G. S Phase and Meristem-specific Expression of the TobaccoRNR1b Gene Is Mediated by an E2F Element Located in the 5' Leader Sequence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 17845–17851, 17 maio 2002.

CHU, M. L. H. et al. Crystal Structure of the Catalytic Domain of the Mitotic Checkpoint Kinase Mps1 in Complex with SP600125. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 31, p. 21495–21500, 1 ago. 2008a.

CHU, M. L. H. et al. Crystal structure of the catalytic domain of the mitotic checkpoint kinase Mps1 in complex with SP600125. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 31, p. 21495–500, 1 ago. 2008b.

CHU, M. L. H. et al. Biophysical and X-ray Crystallographic Analysis of Mps1 Kinase Inhibitor Complexes. **Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1689–1701, 2 mar. 2010a.

CHU, M. L. H. et al. Biophysical and X-ray Crystallographic Analysis of Mps1 Kinase

Inhibitor Complexes ,. **Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1689–1701, 2 mar. 2010b.

CRUZ-RAMÍREZ, A. et al. A Bistable Circuit Involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA Integrates Cues to Inform Asymmetric Stem Cell Division. **Cell**, v. 150, n. 5, p. 1002–1015, ago. 2012.

CUI, Y. et al. Degradation of the Human Mitotic Checkpoint Kinase Mps1 Is Cell Cycle-regulated by APC-cCdc20 and APC-cCdh1 Ubiquitin Ligases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 43, p. 32988–32998, 22 out. 2010.

DANTE, R. A.; LARKINS, B. A.; SABELLI, P. A. Cell cycle control and seed development. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. September, p. 1–14, 23 set. 2014.

DE ANTONI, A. et al. The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. **Current Biology**, v. 15, p. 214–225, 2005.

DE OLIVEIRA, E. A. G. et al. Structural and functional characterization of the protein kinase Mps1 in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS one**, v. 7, n. 9, p. e45707, jan. 2012.

DE SMET, I. et al. Receptor-Like Kinase ACR4 Restricts Formative Cell Divisions in the *Arabidopsis* Root. **Science**, v. 322, n. 5901, p. 594–597, 24 out. 2008.

DE SMET, I.; BEECKMAN, T. Asymmetric cell division in land plants and algae: the driving force for differentiation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 3, p. 177–88, mar. 2011.

DE VEYLDER, L.; BEECKMAN, T.; INZÉ, D. The ins and outs of the plant cell cycle. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. August, p. 655–665, 2007.

DEN BOER, B. G. W.; MURRAY, J. A H. Triggering the cell cycle in plants. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 0, p. 245–250, 2000.

DEWITTE, W.; MURRAY, J. A H. The plant cell cycle. **Annual review of plant biology**, v. 54, p. 235–264, 2003.

DING, D.; MUTHUSWAMY, S.; MEIER, I. Functional interaction between the *Arabidopsis* orthologs of spindle assembly checkpoint proteins MAD1 and MAD2 and the nucleoporin NUA. **Plant molecular biology**, v. 79, n. 3, p. 203–16, jun. 2012.

DINGWALL, C.; LASKEY, R. A. Nuclear targeting sequences--a consensus? **Trends in biochemical sciences**, v. 16, n. 12, p. 478–481, dez. 1991.

DINKEL, H. et al. ELM 2016—data update and new functionality of the eukaryotic linear motif resource. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D294–D300, 4 jan. 2016.

DOONAN, J.; FOBERT, P. Conserved and novel regulators of the plant cell cycle. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, p. 824–830, 1997.

DOONAN, J. H.; KITSIOS, G. Functional evolution of cyclin-dependent kinases. **Molecular Biotechnology**, v. 42, p. 14–29, 2009.

DORER, R. K. et al. A small-molecule inhibitor of Mps1 blocks the spindle-checkpoint response to a lack of tension on mitotic chromosomes. **Current biology : CB**, v. 15, n. 11, p. 1070–6, 7 jun. 2005.

DOU, Z. et al. TTK kinase is essential for the centrosomal localization of TACC2. **FEBS Letters**, v. 572, p. 51–56, 2004.

DOU, Z. et al. Quantitative mass spectrometry analysis reveals similar substrate consensus motif for human Mps1 kinase and Plk1. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

DOUÉTTS-PERES, J. C. et al. Mps1 (Monopolar Spindle 1) Protein Inhibition Affects Cellular Growth and Pro-Embryogenic Masses Morphology in Embryogenic Cultures of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153528, 11 abr. 2016.

EDGAR, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC bioinformatics**, v. 5, p. 113, 2004.

ELOY, N. B. et al. The APC/C subunit 10 plays an essential role in cell proliferation during leaf development. **The Plant Journal**, v. 68, n. 2, p. 351–363, out. 2011.

ENDTER, C. et al. SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 20, p. 11312–11317, 25 set. 2001.

FAESEN, A. et al. Basis of catalytic assembly of the mitotic checkpoint complex. **Nature**, v. 0, n. 0, p. 1–23, 2017.

FISK, H. A.; MATTISON, C. P.; WINEY, M. **A field guide to the Mps1 family of protein kinases** *Cell Cycle*, 2004.

FISK, H. A.; WINEY, M. Spindle regulation: Mps1 flies into new areas. **Current Biology**, v. 14, p. 1058–1060, 2004.

FRANCIS, D. A commentary on the G<sub>2</sub>/M transition of the plant cell cycle. **Annals of botany**, v. 107, n. 7, p. 1065–70, maio 2011.

GENSCHIK, P. et al. Selective protein degradation: a rheostat to modulate cell-cycle phase transitions. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 10, p. 2603–2615, 1 jun. 2014.

GLOTZER, M.; MURRAY, A. W.; KIRSCHNER, M. W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. **Nature**, v. 349, p. 132–138, 1991.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure

modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **ELECTROPHORESIS**, v. 30, n. S1, p. S162–S173, jun. 2009.

GURDEN, M. D. et al. Naturally Occurring Mutations in the MPS1 Gene Predispose Cells to Kinase Inhibitor Drug Resistance. **Cancer Research**, v. 75, n. 16, p. 3340–3354, 15 ago. 2015.

GUTIERREZ, C. The Arabidopsis Cell Division Cycle. **The Arabidopsis Book**, v. 7, p. e0120, jan. 2009.

GUTIERREZ, C. 25 Years of Cell Cycle Research: What's Ahead? **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 10, p. 823–833, out. 2016.

HACHED, K. et al. Mps1 at kinetochores is essential for female mouse meiosis I. **Development (Cambridge, England)**, v. 138, p. 2261–2271, 2011.

HAERIZADEH, F. et al. Genome-wide analysis of gene expression in soybean shoot apical meristem. **Plant Molecular Biology**, v. 69, p. 711–727, 2009.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, p. 1–17, 2012.

HARASHIMA, H.; DISSMEYER, N.; SCHNITTGER, A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 7, p. 345–356, jul. 2013.

HAUF, S. Mps1 Checks Up on Chromosome Attachment. **Cell**, v. 132, n. 1995, p. 181–182, 2008.

HECKER, C.-M. et al. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting Motifs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 23, p. 16117–16127, 9 jun. 2006.

HEMERLY, A. S. et al. Cell cycle control and plant morphogenesis: Is there an essential link? **BioEssays**, v. 21, p. 29–37, 1999.

HEWITT, L. et al. Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex. **Journal of Cell Biology**, v. 190, p. 25–34, 2010.

HIMANEN, K. Auxin-Mediated Cell Cycle Activation during Early Lateral Root Initiation. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 14, n. 10, p. 2339–2351, 1 out. 2002.

HOCHEGGER, H.; TAKEDA, S.; HUNT, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions : does one fit all ? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. November, 2008.

HOF, J. V. Experimental Control of Dna Synthesizing and Dividing Cells in Excised Root Tips of Pisum. **American Journal of Botany**, v. 53, n. 10, p. 970, nov. 1966.

HOUSSA, C. et al. Activation of latent DNA-replication origins: a universal effect of cytokinins. **Planta**, v. 193, n. 2, p. 247–250, mar. 1994.

HUANG, L. et al. The Arabidopsis SUMO E3 ligase AtMMS21, a homologue of NSE2/MMS21, regulates cell proliferation in the root. **The Plant Journal**, v. 60, n. 4, p. 666–678, nov. 2009.

HUNTLEY, R. P.; MURRAY, J. A. H. The plant cell cycle. **Annual review of plant biology**, v. 54, p. 235–264, 2003.

INZÉ, D.; DE VEYLDER, L. Cell cycle regulation in plant development. **Annual review of genetics**, v. 40, p. 77–105, 2006.

ISHIDA, T. et al. SUMO E3 Ligase HIGH PLOIDY2 Regulates Endocycle Onset and Meristem Maintenance in Arabidopsis. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 21, n. 8, p. 2284–2297, 1 ago. 2009.

JELLUMA, N. et al. Mps1 Phosphorylates Borealin to Control Aurora B Activity and Chromosome Alignment. **Cell**, v. 132, p. 233–246, 2008.

JEONG, Y. et al. Characterization of NIP2/centrobin, a novel substrate of Nek2, and its potential role in microtubule stabilization. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 12, p. 2106–2116, 22 maio 2007.

JONES, M. H. et al. Chemical genetics reveals a role for Mps1 kinase in kinetochore attachment during mitosis. **Current Biology**, v. 15, p. 160–165, 2005.

JURGENS, G. Cytokinesis in Higher Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 281–299, 2005.

KALDERON, D. et al. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. **Cell**, v. 39, n. 3, p. 499–509, dez. 1984.

KANG, J. et al. Autophosphorylation-dependent activation of human Mps1 is required for the spindle checkpoint. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 51, p. 20232–20237, 2007a.

KANG, J. et al. Autophosphorylation-dependent activation of human Mps1 is required for the spindle checkpoint. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 51, p. 20232–20237, 18 dez. 2007b.

KHADAROO, B. et al. The First Green Lineage cdc25 Dual-Specificity Phosphatase. **Cell Cycle**, v. 3, n. 4, p. 511–516, 2 abr. 2004.

KIEFER, F. et al. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. October 2008, p. 387–392, 2009.

KIM, S. Y. et al. Acquired resistance to LY2874455 in FGFR2 -amplified gastric cancer through an emergence of novel FGFR2-ACSL5 fusion. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 15014–15022, 2017.

KIMBARA, J.; ENDO, T. R.; NASUDA, S. Characterization of the genes encoding for MAD2 homologues in wheat. **Chromosome Research**, v. 12, p. 703–714, 2004.

KLAUS-HEISEN, D. et al. Structure-function similarities between a plant receptor-like kinase and the human interleukin-1 receptor-associated kinase-4. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 13, p. 11202–10, 1 abr. 2011.

KOMAKI, S.; SCHNITTGER, A. The spindle checkpoint in plants—a green variation over a conserved theme? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 34, p. 84–91, dez. 2016.

KOMAKI, S.; SUGIMOTO, K. Control of the Plant Cell Cycle by Developmental and Environmental Cues. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 6, p. 953–964, 1 jun. 2012.

KRISHNAMURTHY, A.; RATHINASABAPATHI, B. Oxidative stress tolerance in plants: Novel interplay between auxin and reactive oxygen species signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. September, p. 1–5, 2013.

KUSAKABE, K. et al. Diaminopyridine-Based Potent and Selective Mps1 Kinase Inhibitors Binding to an Unusual Flipped-Peptide Conformation. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, n. 7, p. 560–564, 12 jul. 2012.

KUSAKABE, K. et al. Indazole-Based Potent and Cell-Active Mps1 Kinase Inhibitors: Rational Design from Pan-Kinase Inhibitor Anthrapyrazolone (SP600125). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 4343–4356, 13 jun. 2013.

KWIATKOWSKI, N. et al. Small-molecule kinase inhibitors provide insight into Mps1 cell cycle function. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 5, p. 359–368, 11 maio 2010.

LAI, L. B. The Arabidopsis R2R3 MYB Proteins FOUR LIPS and MYB88 Restrict Divisions Late in the Stomatal Cell Lineage. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 17, n. 10, p. 2754–2767, 1 out. 2005.

LENG, M. et al. MPS1-dependent mitotic BLM phosphorylation is important for chromosome stability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 31, p. 11485–11490, 2006.

LIU, S.-T. Human MPS1 Kinase Is Required for Mitotic Arrest Induced by the Loss of CENP-E from Kinetochores. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, n. 4, p. 1638–1651, 1 abr. 2003.

LIU, X.; WINEY, M. The MPS1 Family of Protein Kinases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, p. 561–585, 2012.

LOBET, G.; PAGES, L.; DRAYE, X. A Novel Image-Analysis Toolbox Enabling Quantitative Analysis of Root System Architecture. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 157,

n. 1, p. 29–39, 1 set. 2011.

LU, C. et al. Phosphorylation of SPT5 by CDKD;2 Is Required for VIP5 Recruitment and Normal Flowering in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, v. 29, n. 2, p. 277–291, 10 fev. 2017.

MA, Z. et al. Phylogenetic analysis reveals the evolution and diversification of cyclins in eukaryotes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 66, n. 3, p. 1002–1010, mar. 2013.

MACIEJOWSKI, J. et al. Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. **The Journal of cell biology**, v. 190, n. 1, p. 89–100, 12 jul. 2010.

MAGYAR, Z.; BÖGRE, L.; ITO, M. DREAMs make plant cells to cycle or to become quiescent. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 34, p. 100–106, dez. 2016.

MAO, Y.; DESAI, A.; CLEVELAND, D. W. Microtubule capture by CENP-E silences BubR1-dependent mitotic checkpoint signaling. **Journal of Cell Biology**, v. 170, n. 6, p. 873–880, 2005.

MARROCCO, K. et al. The APC/C E3 ligase remains active in most post-mitotic *Arabidopsis* cells and is required for proper vasculature development and organization. **Development**, v. 136, n. 9, p. 1475–1485, 1 maio 2009.

MATTISON, C. P. et al. Mps1 activation loop autophosphorylation enhances kinase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30553–30561, 2007a.

MATTISON, C. P. et al. Mps1 Activation Loop Autophosphorylation Enhances Kinase Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30553–30561, 15 ago. 2007b.

MAY, M. J. et al. Glutathione homeostasis in plants : implications for environmental sensing and plant development. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 321, p. 649–667, 1998.

MENGES, M. et al. Cell cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 44, p. 41987–42002, 2002.

MENGES, M. et al. Genomic organization and evolutionary conservation of plant D-type cyclins. **Plant physiology**, v. 145, n. December, p. 1558–1576, 2007.

MIRONOV, V. et al. Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- the nexus. **The Plant cell**, v. 11, n. April, p. 509–522, 1999.

MONIZ, L. et al. Nek family of kinases in cell cycle, checkpoint control and cancer. **Cell Division**, v. 6, n. 1, p. 18, 2011.

MORALES, M.; ACKERMAN, J. D.; TREMBLAY, R. L. Morphological flexibility across an environmental gradient in the epiphytic orchid, *Tolumnia variegata*: complicating patterns of fitness. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 163, n. 4, p. 431–446, 25 ago. 2010.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.

MUSACCHIO, A. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. **Current Biology**, v. 25, n. 20, p. R1002–R1018, out. 2015.

MUSACCHIO, A.; HARDWICK, K. G. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 10, p. 731–741, out. 2002.

MUSLIN, A. J. et al. Interaction of 14-3-3 with Signaling Proteins Is Mediated by the Recognition of Phosphoserine. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 889–897, 15 mar. 1996.

NAKAGAMI, H. Phosphorylation of Retinoblastoma-Related Protein by the Cyclin D/Cyclin-Dependent Kinase Complex Is Activated at the G1/S-Phase Transition in Tobacco. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 14, n. 8, p. 1847–1857, 1 ago. 2002.

NAKAJIMA, H. et al. Identification of a Consensus Motif for Plk (Polo-like Kinase) Phosphorylation Reveals Myt1 as a Plk1 Substrate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 28, p. 25277–25280, 3 jul. 2003.

NEMOTO, K. et al. Autophosphorylation profiling of Arabidopsis protein kinases using the cell-free system. **Phytochemistry**, v. 72, n. 10, p. 1136–1144, 2011.

NIEUWLAND, J. et al. The D-type cyclin CYCD4;1 modulates lateral root density in Arabidopsis by affecting the basal meristem region. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 22528–22533, 2009.

NIHIRA, K. et al. TTK/Mps1 controls nuclear targeting of c-Abl by 14-3-3-coupled phosphorylation in response to oxidative stress. **Oncogene**, v. 27, p. 7285–7295, 2008.

NISHIHAMA, R. et al. Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. **Cell**, v. 109, n. 1, p. 87–99, 5 abr. 2002.

NOIR, S. et al. Jasmonate Controls Leaf Growth by Repressing Cell Proliferation and the Onset of Endoreduplication while Maintaining a Potential Stand-By Mode. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 161, n. 4, p. 1930–1951, 1 abr. 2013.



NOWACK, M. K. et al. Genetic Framework of Cyclin-Dependent Kinase Function in Arabidopsis. **Developmental Cell**, v. 22, n. 5, p. 1030–1040, maio 2012.

O' CONNOR, C. J.; LARAIA, L.; SPRING, D. R. Chemical genetics. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 8, p. 4332, 2011.

PARK, H. J. et al. SUMO and SUMOylation in plants. **Molecules and Cells**, v. 32, n. 4, p. 305–316, 9 out. 2011.

PATIL, R. A. et al. Methyl jasmonate represses growth and affects cell cycle progression in cultured Taxus cells. **Plant Cell Reports**, v. 33, n. 9, p. 1479–1492, set. 2014.

PAUWELS, L. et al. Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured Arabidopsis cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 4, p. 1380–1385, 29 jan. 2008.

PENG, C. et al. Mitotic and G2 Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. **Science**, v. 227, n. 14, p. 1501–1505, 1997.

PLANCHAIS, S. et al. Chemical inhibitors: A tool for plant cell cycle studies. **FEBS Letters**, v. 476, p. 78–83, 2000.

POPESCU, S. et al. MAPK target networks in Arabidopsis thaliana revealed using functional protein microarrays. **Genes & Development**, v. 23, p. 80–92, 2009.

QIU, W. et al. Crystal structure of TTK kinase domain in complex with a pyrazolopyrimidine inhibitor. **A ser publicado**, [s.d.].

QIU, W. et al. Crystal Structure of TTK kinase domain with an inhibitor: 401498. **A ser publicado**, [s.d.].

QIU, W. et al. Crystal structure of TTK kinase domain with an inhibitor: 401348. **A ser publicado**, [s.d.].

QIU, W. et al. Crystal Structure of TTK kinase domain with an inhibitor: 400740. **A ser publicado**, [s.d.].

QUIMBAYA, M. et al. Identification of putative cancer genes through data integration and comparative genomics between plants and humans. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 69, n. 12, p. 2041–55, jun. 2012.

RASMUSSEN, C. G.; HUMPHRIES, J. A.; SMITH, L. G. Determination of symmetric and asymmetric division planes in plant cells. **Annual review of plant biology**, v. 62, p. 387–409, 2011.

REIS, R. S. et al. Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. **Journal of Proteomics**, v. 130, p. 170–179, jan. 2016.

RELLOS, P. et al. Structure and Regulation of the Human Nek2 Centrosomal Kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 9, p. 6833–6842, 28 dez. 2006.

RESTUCCIA, A. et al. Mps1 is SUMO-modified during the cell cycle. **Oncotarget**, v. 5, n. 3, 18 jan. 2016.

ROCHE, J. et al. Transcriptional profiles of primary metabolism and signal transduction-related genes in response to water stress in field-grown sunflower genotypes using a thematic cDNA microarray. **Planta**, v. 226, n. 3, p. 601–17, ago. 2007.

RODRIGUEZ, M. C. S.; PETERSEN, M.; MUNDY, J. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 621–649, 2010.

RUSSO, A. A.; JEFFREY, P. D.; PAVLETICH, N. P. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 8, p. 696–700, ago. 1996.

SABELLI, P. A. et al. Control of cell proliferation, endoreduplication, cell size, and cell death by the retinoblastoma-related pathway in maize endosperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 19, p. E1827–E1836, 7 maio 2013.

SANTIAGO, R. et al. Defensive changes in maize leaves induced by feeding of Mediterranean corn borer larvae. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 44, 15 dez. 2017.

SAURIN, A. T. et al. Aurora B potentiates Mps1 activation to ensure rapid checkpoint establishment at the onset of mitosis. **Nature communications**, v. 2, n. May, p. 316, 2011.

SCHEEFF, E. D. et al. Structure of the Pseudokinase VRK3 Reveals a Degraded Catalytic Site, a Highly Conserved Kinase Fold, and a Putative Regulatory Binding Site. **Structure**, v. 17, n. 1, p. 128–138, jan. 2009.

SCHMIDT, M. et al. Ablation of the spindle assembly checkpoint by a compound targeting Mps1. **EMBO reports**, v. 6, n. 9, p. 866–872, 2005.

SCOFIELD, S.; JONES, A.; MURRAY, J. A. H. The plant cell cycle in context. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 10, p. 2557–2562, 1 jun. 2014.

SEELIGER, D.; DE GROOT, B. L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 24, n. 5, p. 417–422, 17 maio 2010.

SLIEDRECHT, T. et al. Chemical genetic inhibition of Mps1 in stable human cell lines reveals novel aspects of Mps1 function in mitosis. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10251, jan. 2010.

SONG, J. et al. Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 40, p. 14373–14378, 5 out. 2004.

SOPORY, S. Protein Kinases and Phosphatases and Their Role in Cellular Signaling in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 3, p. 245–318, 1998.

STALS, H.; INZÉ, D. When plant cells decide to divide. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 8, p. 359–364, 2001.

STUCKE, V. M.; BAUMANN, C.; NIGG, E. A. Kinetochore localization and microtubule interaction of the human spindle checkpoint kinase Mps1. **Chromosoma**, v. 113, p. 1–15, 2004.

SUIJKERBUIJK, S. J. E.; KOPS, G. J. P. L. Preventing aneuploidy: the contribution of mitotic checkpoint proteins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1786, n. 1, p. 24–31, set. 2008.

TAKAHASHI, Y. et al. A MAP kinase cascade that controls plant cytokinesis. **Journal of Biochemistry**, v. 136, n. 2, p. 127–132, 2004.

TAKATSUKA, H.; UMEDA-HARA, C.; UMEDA, M. Cyclin-dependent kinase-activating kinases CDKD;1 and CDKD;3 are essential for preserving mitotic activity in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 82, n. 6, p. 1004–1017, jun. 2015.

TAKEDA, D. Y.; WOHLSCHLEGEL, J. A.; DUTTA, A. A Bipartite Substrate Recognition Motif for Cyclin-dependent Kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 3, p. 1993–1997, 19 jan. 2001.

TANOUE, T. Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 3, p. 466–479, 1 fev. 2001.

TIGHE, A.; STAPLES, O.; TAYLOR, S. Mps1 kinase activity restrains anaphase during an unperturbed mitosis and targets Mad2 to kinetochores. **Journal of Cell Biology**, v. 181, p. 893–901, 2008.

TIPTON, A. R. et al. Monopolar spindle 1 (MPS1) kinase promotes production of closed MAD2 (C-MAD2) conformer and assembly of the mitotic checkpoint complex. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 49, p. 35149–35158, 2013.

TORRES ACOSTA, J. A. et al. Molecular characterization of *Arabidopsis* PHO80-like

proteins, a novel class of CDKA;1-interacting cyclins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 12, p. 1485–1497, jun. 2004.

TYLER, R. K. et al. Phosphoregulation of human Mps1 kinase. **The Biochemical journal**, v. 417, n. 1, p. 173–81, 1 jan. 2009.

UMEDA, M.; SHIMOTOHNO, A.; YAMAGUCHI, M. Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 46, n. 9, p. 1437–1442, 2005.

VAN DAMME, D. et al. Arabidopsis  $\alpha$  Aurora Kinases Function in Formative Cell Division Plane Orientation. **The Plant Cell**, v. 23, n. 11, p. 4013–4024, nov. 2011.

VAN LEENE, J. et al. Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in Arabidopsis thaliana. **Molecular Systems Biology**, v. 6, n. 397, p. 397, 10 ago. 2010.

VAN LEENE, J. et al. A kaleidoscopic view of the Arabidopsis core cell cycle interactome. **Trends in plant science**, v. 16, n. 3, p. 141–50, mar. 2011.

VANDEPOELE, K. Genome-Wide Analysis of Core Cell Cycle Genes in Arabidopsis. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 14, n. 4, p. 903–916, 1 abr. 2002.

VERKEST, A. The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor KRP2 Controls the Onset of the Endoreduplication Cycle during Arabidopsis Leaf Development through Inhibition of Mitotic CDKA;1 Kinase Complexes. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 17, n. 6, p. 1723–1736, 1 jun. 2005.

VERNOUX, T. et al. The ROOT MERISTEMLESS1 / CADMIUM SENSITIVE2 Gene Defines a Glutathione-Dependent Pathway Involved in Initiation and Maintenance of Cell Division during Postembryonic Root Development. **The Plant Cell**, v. 12, n. January, p. 97–109, 2000.

VEYLDER, L. DE et al. Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 6, p. 1360–1368, 2002.

VEYLDER, L. DE; JOUBÈS, J.; INZÉ, D. Plant cell cycle transitions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 6, p. 536–543, dez. 2003.

VIGNERON, S. et al. Kinetochore Localization of Spindle Checkpoint Proteins: Who Controls Whom? **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. October, p. 4584–4596, 2004.

VLEUGEL, M. et al. Evolution and Function of the Mitotic Checkpoint. **Developmental Cell**, v. 23, n. 2, p. 239–250, ago. 2012.

WANG, W. et al. Structural and mechanistic insights into Mps1 kinase activation.

**Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 8b, p. 1679–1694, 2 ago. 2009.

WANG, X. et al. Dynamic Autophosphorylation of Mps1 Kinase Is Required for Faithful Mitotic Progression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e104723, 29 set. 2014.

WATERHOUSE, A. M. et al. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 25, n. 9, p. 1189–91, 1 maio 2009.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. In: **Current Protocols in Bioinformatics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. v. 2014p. 5.6.1-5.6.32.

WINEY, M. et al. MPS1 and MPS2: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication. **The Journal of cell biology**, v. 114, n. 4, p. 745–54, ago. 1991.

WINEY, M. Genome stability: Keeping the centrosome cycle on track. **Current Biology**, v. 6, p. 962–964, 1996.

YANG, K. et al. Requirement for A-type cyclin-dependent kinase and cyclins for the terminal division in the stomatal lineage of Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 9, p. 2449–2461, 1 jun. 2014.

YEH, Y.-H. et al. The cell cycle checkpoint kinase CHK2 mediates DNA damage-induced stabilization of TTK/hMps1. **Oncogene**, v. 28, n. 10, p. 1366–1378, 12 mar. 2009.

YU, H.; MUSZYNSKI, M. G.; DAWE, R. K. The Maize Homologue of the Cell Cycle Checkpoint Protein MAD2 Localization Patterns. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 425–435, 1999.

ZHA, J. et al. Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-X L. **Cell**, v. 87, p. 619–628, 1996.

ZHAO, Y.; CHEN, R. H. Mps1 Phosphorylation by MAP Kinase Is Required for Kinetochores Localization of Spindle-Checkpoint Proteins. **Current Biology**, v. 16, p. 1764–1769, 2006.