

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Centro de biotecnologia
Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**A HISTÓRIA EVOLUTIVA DA FAMÍLIA DE FATORES TRANSCRICIONAIS E2F
E SEU ENVOLVIMENTO NA RESPOSTA AO DANO DE DNA**

Rafael Rauber

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular do Centro de
Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadora: Dra. Márcia M. A. N. Pinheiro Margis

Co-orientador: Dr. Rogério Margis

PORTO ALEGRE – RS

Julho, 2016

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Núcleo de Genômica Funcional de Plantas situado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UFRGS.

As agências de financiamento do projeto de pesquisa em que se enquadra o presente trabalho de doutorado foram o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Não é triste mudar de ideias, triste é não ter ideias para mudar”

(Barão de Itararé)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao CNPq e CAPES por fornecerem o suporte financeiro ao projeto e a minha bolsa de doutorado.

A banca por aceitar o convite de fazer parte da avaliação deste trabalho de quatro anos. A professora Mara da Silveira Benfato por aceitar ser relatora em tempo tão apertado e por ser membro suplente da banca desta tese.

A professora doutora Márcia Margis pela orientação, muitas vezes não apenas profissional mas também pessoal. Esse agradecimento fica ainda mais especial nos últimos dois anos desta jornada aonde contei com sua paciência quase infinita visto os inúmeros percalços. Levarei todos os conselhos e aprendizados que tive contigo para o resto da vida.

Aos professores Dr. Rogério Margis, Dra. Loreta Brandão Freitas e Dra. Andréia Turchetto Zollet pela coorientação e paciência, sem vocês ambos os trabalhos resultantes desta tese não teriam saído. Sem seus conhecimentos e ensinamentos nada disto teria acontecido.

A todos os meu amigos do laboratório de genética vegetal. Aos que ainda estão ou aos que já estiveram nele. Porque vocês são muito mais do que colegas de trabalho, vocês me mostraram o verdadeiro sentido de amizade. Em especial aos colegas do grupo de genômica funcional que sempre estavam presentes tornando essa caminhada mais fácil. Em especial ao querido amigo Douglas, pelas inúmeras horas juntos, tanto pessoal quanto profissionalmente, sem ti os nossos dias (falo pelo lab) não serão tão alegres. Além disso um agradecimento a nossa querida técnica Letícia que estava sempre disposta a ajudar. Neste agradecimento incluo meu amigo mestre cervejeiro Eliandro, que não faz muito tempo que conheço pessoalmente mas que emocionalmente parece que o conheço fazem pelo menos duas vidas.

Aos meus afilhados de casamento Dr Alexandro Cagliari e quase Dra Caroline Cabreira agora Cagliari. Vocês fazem parte da minha vida profissional e pessoal de uma forma que não sei colocar em palavras. Me inspirei e ainda me inspiro muito por vocês dois, são um grande exemplo que quero levar para toda a vida. Não apenas o exemplo mas a nossa amizade que contagiou até nossas filhas caninas.

Ao meu grande amigo Tiago Boeira Salomon, pelos muitos anos de parceria pessoal e profissional. Sempre disposto a ajudar seja com um conselho bisonho ou

com uma solução saída do nada. O gank existe, vai de nós sabermos escapar dele com a ajuda do Shen.

Ao meu psicólogo Fábio Bottari por ser este excelente profissional e ser tão dedicado aos seus pacientes. Sem o seu auxílio tudo teria sido bem mais difícil.

A minha família de origem, meu pai, minha mãe e meu irmão. Não consigo descrever tamanha gratidão pelo apoio que vocês me deram, sempre presentes e prestes a lutar comigo por tudo, em todas as situações. Vocês são um dos meus portos seguros. Assim como contei com a ajuda de vocês quero poder retribuir tudo isso um dia.

A minha família nuclear, minha esposa Cristina e minhas duas filhas caninas, Pink e Faísca. Sem vocês eu nada seria, vocês são e serão meu porto seguro para o resto da vida, vocês resumem a alegria de viver. Sem o apoio de vocês nada disto teria acontecido, nada disso seria possível. Vocês são a definição física do amor. Cris, sempre disposta a me ajudar, a me apoiar, a me suportar, a lutar comigo seja contra o que for e me fazer acreditar que um dia chegaremos a tudo o que almejamos, na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, por toda a minha vida.

Sem o apoio de todos aqui citados ou mencionados este trabalho não sairia do plano mental para o plano físico.

A todos o meu MUITO OBRIGADO

INDICE

Lista de abreviaturas	7
Resumo/Abstract.....	9
Capítulo I Introdução	10
Objetivos	21
Capítulo II Inferências filogenéticas sobre a família gênica E2F em <i>viridiplantae</i>	22
Capitulo III A família de fatores transcrpcionais E2F e seu envolvimento com o dano de DNA.....	29
Capitulo IV Discussão	52
Referências bibliográficas	60

LISTA DE ABREVIATURAS

- BLAST – ferramenta de busca por alinhamento local básico, do inglês: *Basic Local Alignment Search Tool*
- cDNA – DNA complementar
- CDS – sequência codificadora, do inglês, *Coding Sequence*
- cv – cultivar
- DBD – Domínio de ligação ao DNA, do inglês, *DNA Binding Domain*
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico, do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*
- dNTP - desoxirribonucleotídeos trifosfatados, do inglês, *Deoxynucleotide*
- DP – Parceiro de dimerização, do inglês, *Dimerization Partner*
- DSB – Quebra de fita dupla, do inglês, *Double Strand Brake*
- EST – Etiqueta de sequência expressa, do inglês, *Expressed Sequence Tag*
- G1 – fase de crescimento 1 do ciclo celular
- G2 – fase de crescimento 2 do ciclo celular
- genBank – banco de dados de sequencias genéticas do NCBI
- MCMC – Monte Carlo via Cadeia de Markov
- MEGA – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Program*
- M-MLV - Vírus Moloney da leucemia de murinos, do inglês “*Moloney Murine Leukemia Virus*”
- MMR – reparo por malpareamento, do inglês, *mismatch repair*
- MMS – Metil metano sulfonato
- NCBI – Centro Nacional para informação biotecnológica, do inglês, *National Center for Biotechnology Information*
- pb – pares de bases
- PCD – morte celular programada, do inglês, *Programmed Cell Death*
- PCR – reação em cadeia da polimerase, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*
- PFAM – banco de dados PFAM, do inglês, *Protein Family*
- RB – proteína do retinoblastoma
- RNA – Ácido Ribonucléico, do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*
- RNAm – RNA mensageiro

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa associada à transcrição reversa, do inglês, *Reverse Transcript and quantitative Polymerase Chain Reaction*

ssp - subespécie

U - unidades

UV – Ultravioleta

– Resumo –

As proteínas E2 *promoter binding factor* (E2F) estão presentes em quase todos os organismos eucarióticos e são essenciais para o controle de muitos processos celulares, como a progressão do ciclo celular, divisão celular, replicação do DNA, e apoptose. A família E2F compreende dois tipos diferentes de proteínas: os E2F típicos e os E2F atípicos, que diferem estruturalmente e possuem funções específicas. Desde a descoberta desta família gênica muitos estudos focaram nos seus aspectos funcionais, porém a história evolutiva desta família gênica estava fracamente entendida em plantas. Nossas descobertas sugerem que os E2F típicos são mais similares a proteína ancestral que os E2F atípicos (DEL). As proteínas E2F surgiram logo após a emergência das espécies eucarióticas, enquanto as proteínas DEL parecem ter surgido antes da separação entre fungos, metazoários e plantas. As proteínas DEL provavelmente emergiram por uma duplicação parcial do gene que codificava a proteína E2F ancestral. Nossos dados também sugerem que a divergência entre E2Fs ativadores e repressores emergiu duas vezes durante a evolução, uma na linhagem embriófita de plantas e outra na linhagem metazoária. Os E2Fs típicos possuem membros que são reguladores positivos para os seus genes alvo e dados recentes estabeleceram um link entre a resposta a danos ao DNA e genes E2F específicos em células de mamíferos, porém o envolvimento da família genica E2F na sinalização ao reparo de DNA em plantas ainda permanece desconhecido. Nós estudamos o envolvimento dos genes E2F em resposta a dano genotóxico em plantas de arroz e *Arabidopsis thaliana*. Foram conduzidos experimentos com plântulas de arroz e arábido usando UV-B e MMS (Methyl Methanesulfonate) como fonte de danos genotóxicos. Em resposta a estes estresses E2F ativadores específicos aumentaram sua expressão relativa quando comparados com plantas em condições controle. Os resultados obtidos nos experimentos de estresse genotóxicos nos levaram a sugerir que membros específicos da família E2F de arroz e arábido estão envolvidos com as respostas ao dano de DNA.

– Abstract –

The E2 promoter binding factor (E2F) proteins are present in almost all eukaryotic organisms and are essential to control several cellular processes, such as the cell cycle progression, cell division, DNA replication, and apoptosis. The E2F family comprises two different types of proteins: the typical E2Fs and atypical E2Fs, which differ structurally and have specific functions. Since the discovery of this gene family several studies have focused on the functional aspects, but the evolutionary history of this gene family was poorly understood in plants. Our findings suggest that typical E2F is more similar to the ancestral protein than atypical E2F (DEL). The E2F proteins arose early after the emergence of the eukaryotic species, while DEL proteins appear to have arisen after the separation of fungi, metazoan and plants. The DEL proteins probably emerged through a partial duplication from the gene that encodes the ancient E2F protein. Our data also suggest that the divergence of the E2Fs between activators and repressors emerged twice during evolution, once in the embryophyte lineage and another in the metazoan lineage. The typical E2Fs has members that are positive regulators for their target genes and recent data have established a link between response to DNA damage and specific E2F genes in mammalian cells, but the involvement of the E2F gene family in the signaling of DNA repair in plants still unknown. We studied the involvement of E2F genes in response to genotoxic damage in rice and *Arabidopsis thaliana* plants. Experiments were conducted with rice and *A. thaliana* plantlets using UV-B and MMS (Methyl Methanesulfonate) as genotoxic damage source. In response to these stresses specific activator E2F genes increased their relative expression compared to plants in control condition. The results obtained in the genotoxic stress experiments lead us to suggest that specific members of the E2F family of rice and arabidopsis are involved with responses to DNA damage.

Capítulo I

– Introdução –

1 As proteínas E2F

A família de fatores transcricionais E2F foi inicialmente descoberta em células HeLa como proteínas que se ligam ao promotor viral E2, controlando o estado transcricional desse promotor. (Kovesdi et al., 1986, 1987). Posteriormente foram caracterizadas em diversos outros organismos como *Drosophila melanogaster* (Dynlacht et al., 1994), *Xenopus levis* (Philpott e Friend, 1994), *Gallus* (Pasteau et al., 1995), 1995) *Homo sapiens* (Chittenden et al., 1993), *Nicotiana tabacum* (Sekine et al., 1999), *Triticum monococcum* (Ramírez-Parra et al., 1999) e *Arabidopsis thaliana* (Mariconti et al., 2002).

Existem dois tipos de proteínas E2F: os E2F típicos (a partir de agora chamados somente de E2F) e os E2F atípicos (daqui para frente chamados DEL). Cada um desses tipos gênicos codificam proteínas contendo domínios diferentes. Para os E2F, os domínios característicos são: um domínio de ligação ao DNA (DBD), que é responsável pela interação da proteína com a sequência consenso do promotor de genes alvo; um domínio de heterodimerização responsável pela dimerização com a proteína DP (Dimerization Partner), que será descrita posteriormente; uma região descrita como “*marked Box*”, necessária para interação proteína-proteína e que confere especificidade à resposta transcricional; um domínio de transativação, responsável pela capacidade de ativação transcricional; e um domínio de ligação à proteína do Retinoblastoma (RB). As proteínas DEL possuem uma organização diferente, com apenas dois domínios de ligação ao DNA, sem a presença de nenhum outro domínio identificado nos E2F (Kosugi e Ohashi, 2002b) (figura 1).

As proteínas E2F possuem duas formas presentes em diferentes organismos. Em *arabidopsis* três proteínas E2F foram identificadas, E2Fa, E2Fb e E2Fc (Mariconti et al., 2002). As proteínas E2Fa e E2Fb possuem o domínio de transativação completo e foram caracterizadas como ativadores da transcrição e dos processos nos quais estas proteínas estão envolvidas, especialmente ao longo do ciclo celular (De Veylder et al., 2002; Magyar et al., 2005; Sozzani et al., 2006). Já a proteína E2Fc não possui o domínio de transativação completo e em estudos realizados ela não foi capaz de ativar a expressão gênica, competindo assim com os E2F ativadores. Quando o E2Fc está ligadas aos sítios de ligação a E2F isto leva a um bloqueio do ciclo celular,

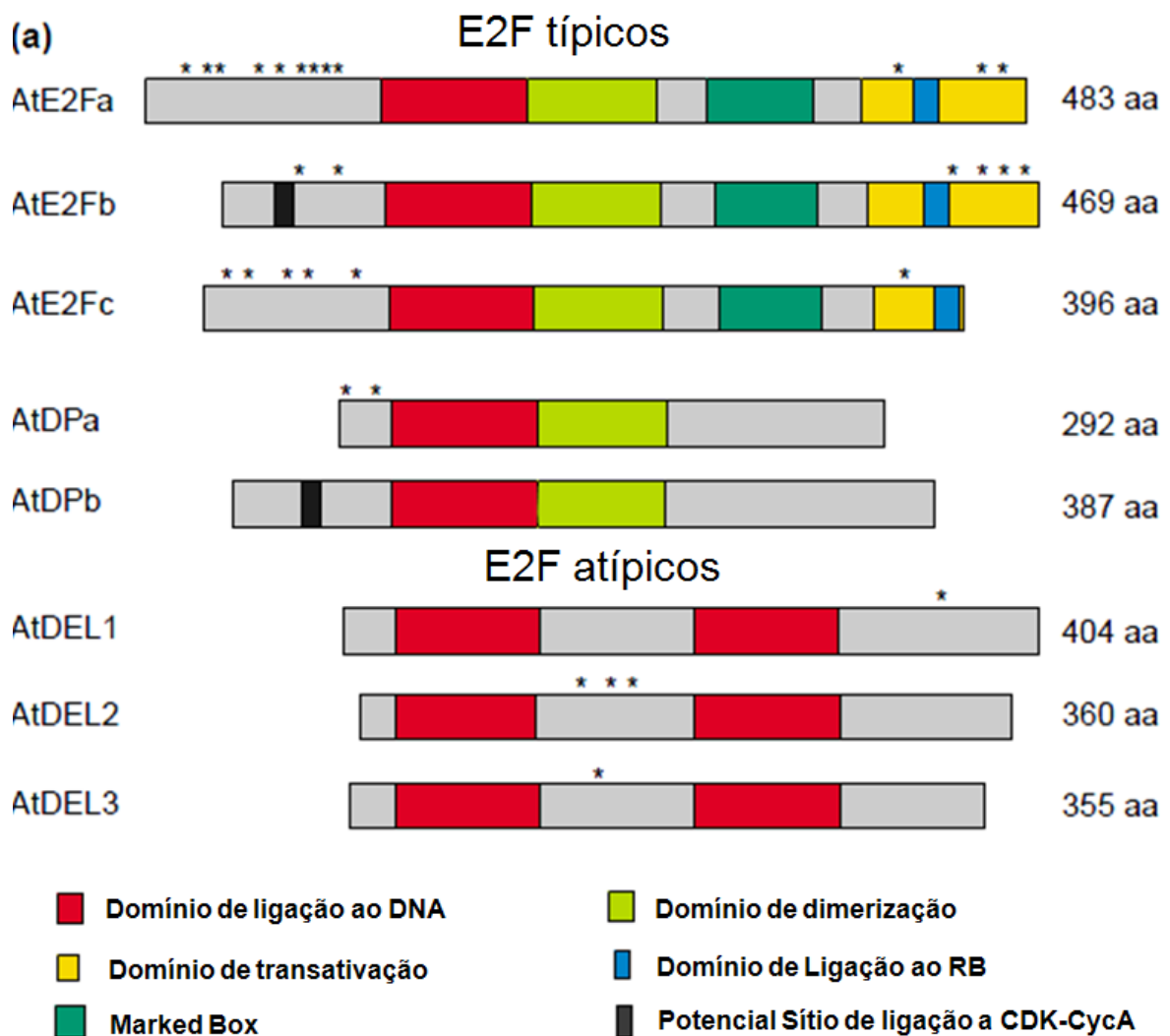
reprimindo-o e por isso sendo comumente chamada como uma repressora deste processo (del Pozo et al., 2002; del Pozo et al., 2006).

As proteínas E2F e as proteínas DP (Dimerization Partner) não possuem uma localização nuclear. Estudos demonstraram que as proteínas E2F interagem com as proteínas DP, formando complexos heteroméricos, e essa interação induz uma localização nuclear concomitante de uma forma cooperativa (Kosugi e Ohashi, 2002c). As DP também possuem um domínio de ligação ao DNA, além de um domínio de heterodimerização, que tem a função de auxiliar na dimerização com E2F (figura 1). O modelo de ação proposto para as proteínas E2F e seus parceiros demonstra que elas interagem formando heterodímeros com a proteína DP, gerando um complexo protéico que possui dois domínios de ligação ao DNA. Estes dois domínios próximos possuem a capacidade de se ligar na sequência consenso no promotor dos genes alvo promovendo a ativação da transcrição, via domínio de transativação (Lammens et al., 2009). A sequência consenso para ligação dos E2F é nTTssCGssAAAn (Vandepoele et al., 2005).

Por outro lado, as proteínas DEL são competidoras diretas dos E2F/DP e possuem um efeito antagônico, uma vez que possuem dois domínios de ligação ao DNA e não possuem os domínios responsáveis pela ativação da transcrição. Como estas proteínas ocupam a mesma sequência dos genes alvo, ao qual se liga o heterodímero E2F-DP, elas bloqueiam o efeito desse complexo, produzindo um efeito repressor por competição pela sequência consenso de ligação, levando a uma diminuição da ativação de genes responsivos a E2F (Kosugi e Ohashi, 2002b; Lammens et al., 2009; Mariconti et al., 2002).

Esta família gênica possui nove membros em *Arabidopsis thaliana*, sendo três E2F (AtE2Fa, AtE2Fb e AtE2Fc), três DEL (AtDELa, AtDELb e AtDELc) e dois DP (DPa e DPb) (Mariconti et al., 2002). Em humanos existem 10 proteínas E2F conhecidas, sete das quais se ligam às proteínas DP, formando assim heterodímeros capazes de ativar a transcrição gênica (E2F1, E2F2 e E2F3a) ou reprimir a expressão (E2F3b, E2F4, E2F5, E2F6). Estas sete proteínas são chamadas de E2F típicos. As outras 3 proteínas restantes (E2F7a, E2F7b e E2F8) não são capazes de se ligar as proteínas DP e se ligam ao DNA diretamente. Estas são caracterizadas como DEL sendo conhecidas como repressores da transcrição (Calzone et al., 2008).

Em arroz, foi demonstrada a presença de quatro E2F (Os E2Fa/b1, E2Fa/b2, E2Fa/b3, E2Fc1) dois DEL (DELa/b/c1 e DELa/b/c2) e três proteínas DP (DPa, DPb e DPc) (Guo et al., 2007). Em um estudo realizado com as proteínas E2F de arroz elas foram capazes de ativar a transcrição de um gene repórter quando em presença das proteínas DP de arabidopsis. A sequência consenso de ligação ao DNA dos E2F utilizada nesse estudo foi a idêntica àquela identificada em arabidopsis (Kosugi e Ohashi, 2002a).



* Potencial sítio de fosforilação CDK-ciclina

Figura 1 Representação dos motivos conservados presentes em E2F típicos, proteínas DP e E2F atípicos. Domínios caracterizados para *Arabidopsis thaliana*. Figura modificada (Shen, 2002).

A atividade transcricional dos E2F/DP e DEL pode ser regulada por outras proteínas. Esse controle é mediado pela proteína retinoblastoma (RB). Experimentos *in vitro* demonstraram alta afinidade entre a proteína RB e o complexo E2F/DP. A proteína RB se liga ao heterodímero E2F/DP em um local correspondente ao domínio de transativação C-terminal. Esta ligação promove o bloqueio deste domínio com consequente inibição da transcrição. Para o desligamento da proteína RB do complexo E2F/DP, a proteína RB deve ser fosforilada por quinases dependentes de ciclinas (CDK) específicas, fazendo com que esta perca sua afinidade pelo complexo e o libere para ativar a transcrição dos genes alvo. Este sistema é bastante conservado e está presente na maioria dos eucariotos, inclusive em plantas superiores (Shen, 2002).

A evolução das proteínas E2F foi estudada apenas por um grupo de pesquisadores no ano de 2010 (Cao et al., 2010). Este estudo utilizou várias sequências para inferir os principais caminhos evolutivos desta família, focando em metazoários. Os principais resultados deste estudo demonstram que a família gênica dos E2F apareceu inicialmente após o surgimento dos organismos eucarióticos. Além disso, foi estabelecido que os genes que codificam essas proteínas sofreram uma duplicação antes da separação entre placozoários e bilatéria, dando origem assim aos E2F ativadores e repressores (Cao et al., 2010). Para plantas, esses autores utilizaram apenas os dois modelos *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*. Isso abriu a questão sobre como ocorreu a evolução desses genes em plantas e algas, visto que estes também possuem ativadores e repressores, além de terem sofrido eventos de poliploidização levando assim, a um aumento do número de genes.

A família gênica desses fatores transcricionais do ponto de vista funcional tem sido extensivamente estudada em diversos organismos, abrangendo desde humanos e plantas até organismos unicelulares. Esta família gênica foi bem caracterizada em relação a sua função no avanço do ciclo celular. Ao longo do ciclo celular as proteínas E2F tem a habilidade de regular a transição da fase G1 para a fase S. Na entrada para fase S a família gênica E2F regula a expressão de ciclinas e quinases dependentes de ciclina específicas de entrada da fase S (Dimova e Dyson, 2005).

Em *Drosophila melanogaster* as células do folículo, durante a oogenese, sofrem a entrada em endociclo, ou seja, duplicam o DNA sem sofrer divisão celular. No final desta fase essa maquinaria é deslocada para uma região específica e isto

leva a uma amplificação de um locus específico. As proteínas ORC2, CDC45L e ORC5 regulam este reposicionamento da maquinaria de síntese. Em moscas mutantes *knockout* para os genes E2F2, as proteínas que regulam a replicação do DNA, ORC2, CDC45L e ORC5 estão distribuídas em todo o núcleo e não apenas no *locus* aonde ocorreria a duplicação gênica, permitindo endoreplicação de maneira inespecífica. Além disso, nestes organismos mutantes a proteína ORC5 possui duas vezes a quantidade de transcritos quando comparadas com moscas selvagens. Isto sugere que a rota E2F/Rb pode controlar tanto o desligamento da síntese de DNA quanto o funcionamento da origem de replicação nessas células, reprimindo componentes específicos da maquinaria de replicação (Cayirlioglu et al., 2001). Além disso, a proteína DEL também foi caracterizada como sendo repressora da entrada do endociclo em plantas (Lammens et al., 2008; Vlieghe et al., 2005).

Outros processos celulares foram posteriormente descobertos como sendo regulados pelas proteínas E2F. A expressão de E2F1 em células de mamíferos sob a ação de estresses genotóxicos levou a uma alteração na expressão de genes específicos envolvidos na apoptose enquanto que o mutante *knockout* para E2F1 não possui a capacidade de elevar a expressão de genes pro-apoptóticos (Carnevale et al., 2012; Pediconi et al., 2003). Estes dois resultados mostram uma possível regulação deste processo mediada por E2F1.

Em plantas dois estudos foram realizados visando identificar proteínas reguladas pela família de fatores transcricionais E2F. No primeiro foram encontrados genes envolvidos na replicação do DNA, dinâmica da cromatina, ciclo celular e reparo de DNA. Todos caracterizados como potenciais alvos para as proteínas E2F (Vandepoele et al., 2005). Um segundo estudo visou buscar apenas genes regulados pelas proteínas E2F por ligação da proteína ao promotor, sendo que foram identificados genes envolvidos em processos como ciclo celular, replicação do DNA, reparo ao DNA, e genes relacionados com a recombinação e controle de checkpoint do ciclo celular (Ramirez-Parra et al., 2003).

As proteínas E2F também já foram apontadas como possíveis reguladores de alguns genes de resposta ao dano de DNA. Majoritariamente essas respostas foram encontradas em células de mamíferos. Já foi relatado que o gene E2F1 de humanos pode ser estimulado pelo citomegalovírus humano e levar a uma ativação de genes

de resposta ao dano de DNA focada na ativação mediada por proteínas quinase ATM (Pickering et al., 2011). Outro estudo demonstrou que E2F1 é fosforilado pela quinase ATM durante o dano envolvendo quebra de fita dupla do DNA. Esta fosforilação ocorre em um sítio amino terminal da proteína E2F1 e promove sua realocação durante este estresse para possivelmente promover uma resposta transcricional envolvendo a apoptose e genes de reparo de dano ao DNA (Lin et al., 2001). Além disso, E2F1 foi capaz de ativar as rotas de reparo mediadas por ATM em um modelo de células exposto a radiação UV demonstrando assim o envolvimento de E2F1 com reparo do DNA após lesão por luz UV (Carcagno et al., 2012).

Além destes genes, ainda em mamíferos, foi caracterizado um novo papel para E2F7 e E2F8 durante a resposta a danos no DNA. Estes genes correspondem a E2Fs atípicos em humanos. Observou-se que ambos os genes são induzidos em células tratadas com agentes que produzem danos ao DNA. E2F7 e E2F8 também têm a capacidade de regular a expressão de genes da própria família dos E2F sendo essencial para as alterações que ocorrem no ciclo celular em decorrência do dano. Juntos, estes resultados indicam que ambos E2F7 e E2F8 estão intimamente envolvidos com a resposta celular ao dano no DNA (Zalmas et al., 2008).

No contexto das respostas ao dano de DNA em plantas um estudo apontou que alguns genes envolvidos com o reparo de DNA são alvos diretos de E2F (Ramirez-Parra et al., 2003). Um estudo de transcriptoma mostrou que vários genes envolvidos em vias de reparo de DNA estavam modulados quando E2Fa e DPb estavam superexpressos (Vandepoele et al., 2005). Ainda foi demonstrada a atividade regulatória exercida pelas proteínas E2F sobre a proteína MSH6, um componente da rota de reparo de bases mal pareadas. O estudo mostrou que MSH6 possui um nível aumentado dos transcritos quando os ativadores E2Fa e E2Fb são superexpressos individualmente (Lario et al., 2011). A proteína codificada pelo gene MSH6 possui três sítios de ligação a E2F. Juntos estes resultados sugerem que fatores de transcrição E2F regulam a expressão de MSH6 e, conseqüentemente, a atividade MMR (mismatch repair) durante a progressão do ciclo celular.

Análises genéticas e bioquímicas têm permitido um avanço no entendimento dos mecanismos de percepção e da sinalização de estresses genotóxicos (Lario et al., 2011; Lidon e Ramalho, 2011; Sakamoto et al., 2009; Tuteja et al., 2009). Entretanto, os componentes específicos de sinalização que são ativados nas plantas

em resposta a esses estresses são ainda pouco conhecidos. A comparação entre os diferentes modelos eucarióticos e a integração entre análises moleculares, bioquímicas e fisiológicas fornecerá uma visão mais abrangente a respeito das respostas geradas pelas plantas ao dano no DNA.

2 Os estresses genotóxicos

Os organismos vivos estão expostos a agentes que podem, direta ou indiretamente, causar danos ao seu DNA. Esses agentes são conhecidos como agentes genotóxicos e podem ser químicos ou físicos. Ambos têm a capacidade de interagir com o DNA e induzir mutações, as quais podem culminar com o bloqueio de diversos processos celulares. Os mutagênicos químicos podem ser classificados em função do seu modo de ação como: análogos de bases, os compostos químicos que alteram a estrutura e modificam propriedades das bases nitrogenadas, os agentes intercalantes e os agentes que alteram a estrutura do DNA. Já entre os fatores físicos podemos citar as radiações, sendo estas compostas por comprimentos de onda ionizantes e não-ionizantes (Mielecki e Grzesiuk, 2014).

Os agentes alquilantes podem levar a diferentes lesões no DNA ou RNA, as quais podem ser citotóxicas, mutagênicas ou neutras. As lesões citotóxicas podem ocasionar um bloqueio de processos como replicação e transcrição, enquanto que as mutagênicas podem introduzir erros de pareamento (Mielecki e Grzesiuk, 2014). Alguns inseticidas comerciais possuem atividade de alquilação, como por exemplo o composto endosulfan. Por esta razão este tipo de dano pode ocorrer pela ação desses agentes dispersos no meio ambiente devido a ação antrópica. (Pérez et al., 2008).

Um exemplo clássico de agente alquilante é o MMS (Methyl Methane Sulfonate). Este composto químico é utilizado como controle positivo para testes de genotoxicidade (Rank, 2003). O MMS é um agente modificador de bases do DNA que geralmente causa mutações por substituição de bases, gera defeitos no fuso mitótico e possui capacidade de produzir aberrações cromossômicas (Kandasamy et al., 2009; Rank, 2003).

As radiações ionizantes compreendem comprimentos de onda que podem interagir com as bases nitrogenadas e gerar uma grande variedade de lesões no DNA, incluindo quebras de fita dupla, quebras de fitas simples e oxidação de bases (Nikitaki et al., 2016). As quebras de fita dupla são considerados os danos mais relevantes induzidos pela radiação ionizante (Kuefner et al., 2015). O composto químico bleomicina possui capacidade de gerar quebras no DNA e é considerado um agente radiomimético. Este agente possui a capacidade de mimetizar os danos gerados pelas radiações ionizantes (Gill et al., 2015).

Já as radiações não ionizantes não tem a capacidade de gerar tantos danos, porém elas também podem provocar alterações no DNA. A luz ultravioleta é o exemplo mais importante de radiação não-ionizantes. A radiação ultravioleta (UV) que atinge a superfície da terra tem implicações importantes na saúde humana, nos ecossistemas terrestres e aquáticos, nos ciclos biogeoquímicos, na qualidade do ar (McKenzie et al., 2011).

A luz UV está dividida em 3 componentes principais, de acordo com o seu comprimento de onda. A UV-A compreende comprimentos entre 320 nm e 400 nm, a UV-B entre 280 nm e 320 nm e a UV-C abrange de 100nm a 280 nm (Parihar et al., 2015). Todos esses comprimentos de onda são emitidos pelo sol, porém o mais energético a atingir a superfície terrestre é o espectro da luz UV-B. A luz UV-C possui capacidade de gerar muitos danos porém toda ela é filtrada pela camada de ozônio.(Mpoloka, 2008).

A luz do tipo UV-B interage com o DNA, modificando suas bases ou provocando a interação entre estas, bloqueando, assim, os processos nos quais o DNA encontra-se envolvido (por exemplo replicação do DNA). Esta interação da luz UV-B com o DNA pode afetar a integridade do genoma (Mpoloka, 2008). Uma vez que esta radiação é prontamente absorvida, ela pode provocar uma série de efeitos, como a fotoexcitação de um grande número de biomoléculas (por exemplo ácidos nucleicos, proteínas e lipídios), resultando em mudanças genéticas, bioquímicas e fisiológicas dentro das células (Tian e Yu, 2009).

Quando o DNA é danificado, a capacidade de reparo é fundamental para evitar que uma alteração genética se torne permanente. Alguns passos que levam a detecção efetiva deste dano, uma remoção completa dos nucleotídeos danificados e

a correta substituição por bases não danificadas permite a manutenção da integridade do genoma. Se o reparo não estiver ativo, este organismo poderá perder sua capacidade de sobrevivência em ambientes onde danos genotóxicos são frequentes (Gill et al., 2015).

Até o momento já foram identificadas mais de 50 proteínas que são recrutadas para os locais de lesão ao DNA (Polo e Jackson, 2011). Essas proteínas são capazes de modular as interações proteína-proteína e regular finamente a atividade enzimática para que o reparo do DNA ocorra corretamente (Polo e Jackson, 2011). Nem todas as rotas bioquímicas e genéticas envolvidas nesse reparo ao DNA danificado são conhecidas ou bem compreendidas.

As plantas terrestres por possuírem caráter sésil e dependência da luz solar não têm a capacidade de escapar dos estresses genotóxicos existentes no meio ambiente. Para isso elas devem conseguir lidar com esse estresse. Além disso, é provável que as plantas tenham que conviver com os níveis aumentados de UV-B nas próximas décadas, o que leva à necessidade de pesquisas contínuas para melhor compreensão a respeito das estratégias de resposta aos estresses genotóxicos (Lidon e Ramalho, 2011).

– Objetivos –

Objetivo Geral

Visto a escassez de dados a respeito da história evolutiva da família gênica E2F em *viridiplantae* e visando esclarecer o envolvimento destas proteínas frente aos estresses genotóxicos em plantas a presente tese de doutorado teve como objetivo o estudo evolutivo através de uma abordagem filogenética e caracterização do envolvimento dos E2F com a resposta a danos ao DNA.

Objetivos específicos

- 1) Através de abordagem filogenética analisar a história evolutiva da família gênica E2F em plantas.
- 2) Verificar a resposta gênica dos E2F frente a estresses genotóxicos.
- 3) Relacionar os padrões de expressão da família E2F e seu envolvimento com os processos celulares de reparo de DNA, ciclo celular e apoptose durante estresses genotóxicos

Capítulo II

– Inferências filogenéticas sobre a família gênica E2F em *viridiplantae* –

The Evolutionary History of the E2F and DEL Genes in Viridiplantae

Rafael Rauber ^{a,b}, Caroline Cabreira ^b, Loreta Brandão de Freitas ^b, Andréia Carina
Turchetto-Zolet ^b, Marcia Margis-Pinheiro^{a, b, *}

^aPrograma de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Campus do Vale, Bento Gonçalves avenue, nº 9500, building 43421, mailbox 15005, Postal code 91501-970, Porto Alegre, Brazil.

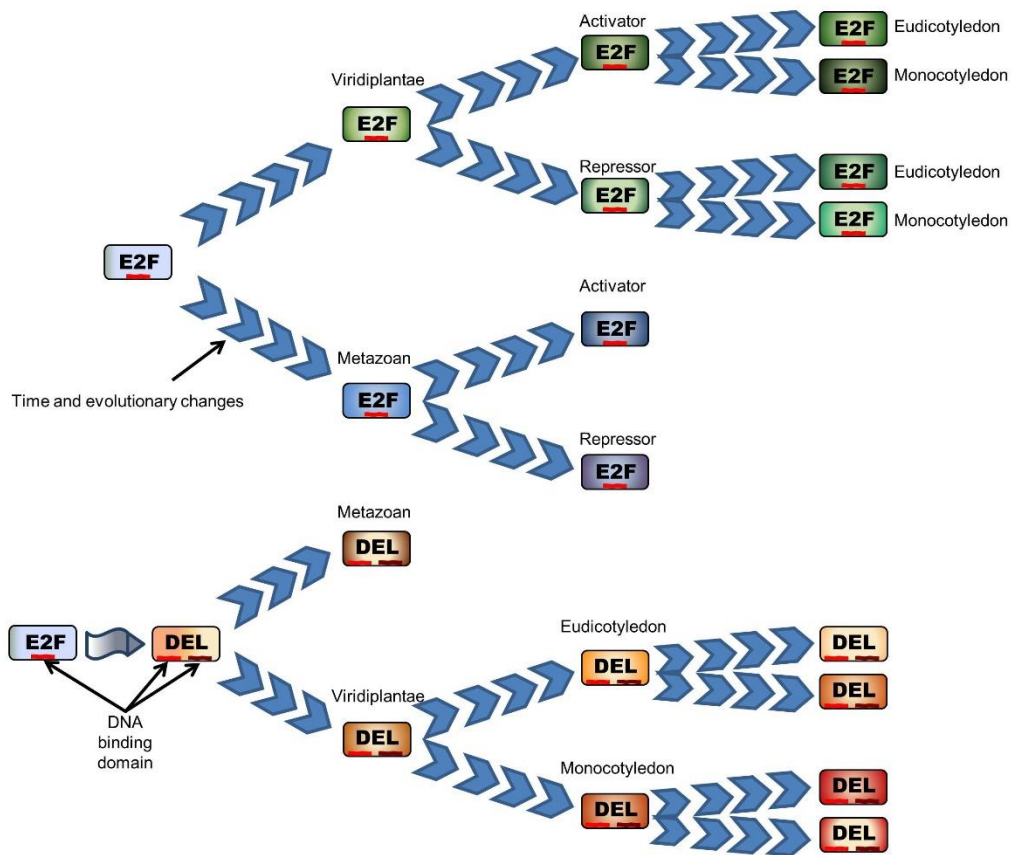
^b Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Campus do Vale, Bento Gonçalves avenue, n 9500, building 43323, mailbox 15053, Postal Code 91-501-970, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author +55 (51) 3308-9814

Email addresses: Margis-Pinheiro, M: marcia.margis@ufrgs.br, Rauber, R. rauber_rafa@yahoo.com.br, Cabreira, C. carol.cabreira@yahoo.com.br, Freitas, L. loreta.freitas@ufrgs.br, Turchetto Zolet, A. aturchetto@gmail.com

Artigo publicado na revista molecular phylogenetics and evolution

Graphical abstract



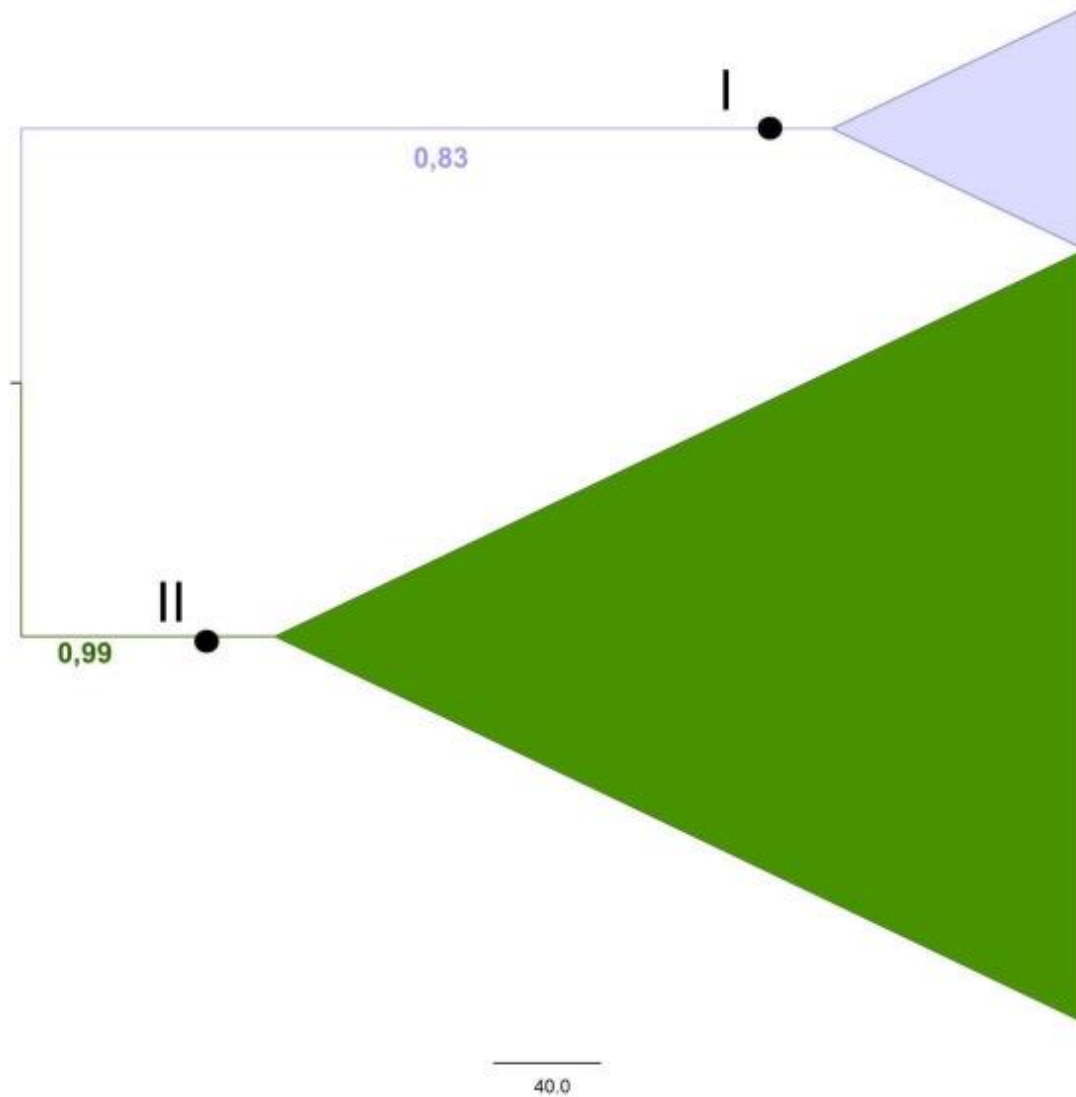
Highlights

- The typical E2F proteins arose early after the emergence of the eukaryotic species.
- The atypical E2F proteins (DEL) have arisen after the separation of fungi, metazoan and plants.
- The E2F is more similar to the ancestral gene than DEL.
- The DEL proteins probably emerged through a partial duplication of an ancient E2F protein.
- The divergence of the E2Fs between activators and repressors emerged twice during evolution.

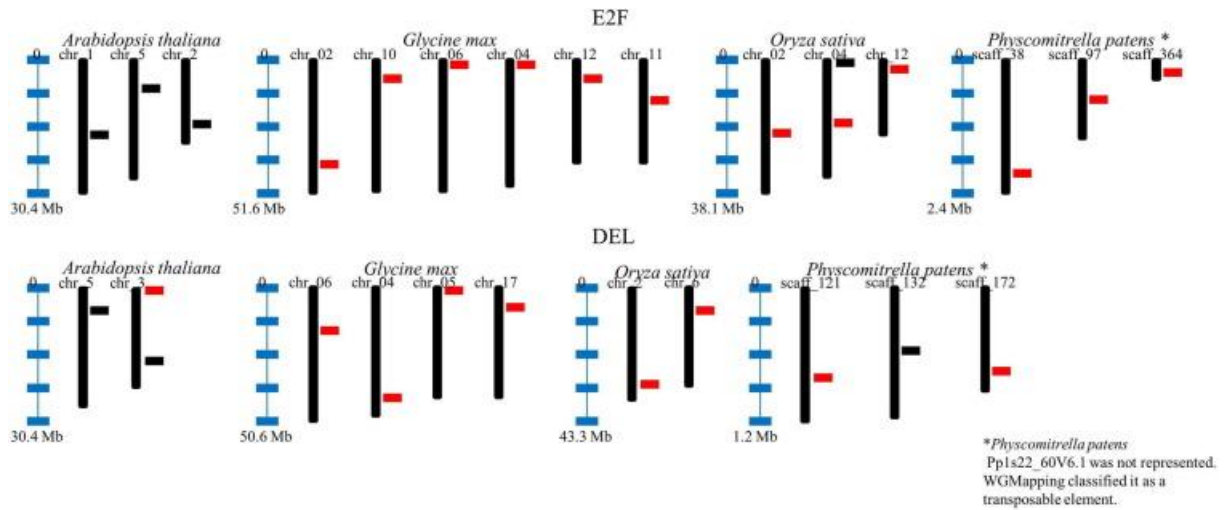
Devido a legislação de direitos autorais e a cessão dos direitos do artigo, avaliado nesta tese, para a revista *Molecular Phylogenetics and evolution* não poderemos publicar ele nesta tese, este permanecendo disponível no link:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790316300203>

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2016.03.028>.



Supplementary Fig. 1. Phylogenetic tree of the DNA binding domain (DBD) present in E2F, DEL and DP proteins of all species. The two DBD domains of the DEL proteins were considered two evolutive units (DEL-DBDa and DEL-DBDb). **(I)** Cluster comprising the sequences of DP-DBD. **(II)** Cluster comprising the sequences of E2F-DBD, DEL-DBDa and DEL-DBDb. The genes names were excluded from the tree.



Supplementary Fig. 2. Analysis using WGMapping with the genes of E2F and DEL present in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Physcomitrella patens*, and *Glycine max*. The red blocks indicate a block duplication of the region that had this gene. Black blocks indicate that duplication does not occur in the segment where the gene is present.

Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790316300203>

Supplementary Table 1. Sequences obtained and used in this paper. **Order:** name of the order of the organism. **Family:** name of the family of the specie. **Specie:** name of the species present in this paper. **Taxa terminologies:** abbreviation of the taxa used in the paper. **Name:** name of the gene used. **Access:** Access code of the sequence of the genes used. **Length:** Length of the protein (in aa). **EST:** presence of EST in databases. **DBD (1):** Position of the aminoacids present in the first DBD in the specific sequence of the total 71 aminoacids present entire domain (*i.e.* 1-71 means the entire 71 aminoacids are present) **DBD(2):** Position of the aminoacids present in the second DBD (present only in DEL proteins) in the specific sequence of the total 71 aminoacids present entire domain (*i.e.* 1-71 means the entire 71 aminoacids are present in that sequence).

Capítulo III

– A família de fatores transcricionais E2F e seu envolvimento com o dano de DNA –

The involvement of E2F transcription factor family in DNA repair in plants

Rafael Rauber ^{a, b}, Andréia Caverzan ^c, Rogério Margis^a, Marcia Margis-Pinheiro^{a, b, *}

^aPrograma de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Campus do Vale, Av. Bento Gonçalves, nº 9500, prédio 43421, caixa postal 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, Brasil.

^b Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Campus do Vale, Av. Bento Gonçalves, nº 9500, prédio 43421, caixa postal 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, Brasil.

^c Programa de Pós Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Caixa postal 99-001-970, Passo Fundo, Brasil.

Corresponding author +55 (51) 3308-9814

Email addresses:

Margis-Pinheiro, M. marcia.margis@ufrgs.br

Rauber, R. rauber_rafa@yahoo.com.br

Caverzan, A. acaverzan@hotmail.com

Margis, R. rogerio.margis@ufrgs.br

Abstract

The E2F gene family has members participating in several processes such as cell cycle progression, condensation and segregation of chromosome, DNA replication and apoptosis. Some studies have established a link between responses to double strand breaks (DSB) and up regulation of E2F target genes, but the involvement of the E2F gene family in the signaling of DNA repair in plants is still unknown. Here we described the involvement of this gene family in the responses to genotoxic damage in rice (*Oryza sativa*) and *Arabidopsis thaliana*. Experiments with UV-B treatment were conducted in rice plantlets and in *Arabidopsis thaliana*. Besides, MMS (Methyl Methanesulfonate) treatment effects were analyzed in rice. In response to UV-B light, in both models, specific activator E2F encoding genes increased their relative expression. To understand which processes could be regulated by E2F transcription factor in response to genotoxic stress, we also analyzed the transcript levels of genes known to be involved with cell cycle, apoptosis and DNA repair pathways. The DNA repair genes were upregulated, while the cell cycle related genes were down-regulated in response to UV-B light. Corroborating these results, in the seedlings exposed to MMS, all genes related to cell cycle were down-regulated. In addition, a specific activator E2F gene responded by increasing its expression. *In silico* analysis at the *Arabidopsis* eFP browser showed that a specific activator E2F of *Arabidopsis* has also a similar pattern of expression, with a higher expression in response to bleomycin treatment. All together, these results revealed that specific members of the E2F family of rice and *Arabidopsis* are involved with responses to DNA damage and that other members of the E2F gene family could act to repress the cell cycle.

Introduction

Due to their sessile nature and dependence on the light, the plants have to survive under constant environmental changes. They have to deal with many different factors that can affect their life cycles. Plants are exposed to environmental mutagenic agents, including UV light and some alkylating agents (Kimura, Satome 2005). The ultraviolet wave length is divided into UV-A (320 – 400 nm), UV-B (280 – 320 nm) and UV-C (100 – 280 nm) (Parihar et al., 2015). The UV-B band corresponds to the most energetic component of the daylight spectrum that reaches the earth surface, although it represents only 0.5% of the total sunlight energy (Ballaré et al., 2011; Mpoloka, 2008). The anthropogenic activity led to an increasing quantity of UV-B light that reaches the earth surface due to the depletion of the ozone layer that occurred between 1980s and 1990s (Ballaré et al., 2011; McKenzie et al., 2011; Parihar et al., 2015). The plants will have to deal with higher UV-B levels in the next decades and the understanding of how the plants respond to this stress is essential.

The UV-B light acts in the DNA causing crosslinking between adjacent cytosine and thymine blocking some cellular processes, like DNA replication, and affecting the genome integrity (Mpoloka, 2008). In order to avoid the blocking of cellular processes and, the lesions in DNA, plants developed complex mechanisms that allow them to detect and remove this damage (Manova and Gruszka, 2015; Mpoloka, 2008). Extensive studies are being conducted in order to understand the mechanism of perception and signaling of the genotoxic stress (Lario et al., 2011; Lidon and Ramalho, 2011; Sakamoto et al., 2009; Tuteja et al., 2009). Meanwhile all the specific components of response to stress pathways, especially in plants, were not yet described.

The E2 promoter binding factor (E2F) gene family encodes transcription factors that possess members acting in various functions such as cell cycle progression, segregation and condensation of chromosome, DNA replication and apoptosis (Harbour and Dean, 2000; Lammens et al., 2009; van den Heuvel and Dyson, 2008). This family of proteins was extensively studied in mammalian due to their involvement in cancer (Tsantoulis and Gorgoulis, 2005). In plants, the E2F family was first identified in *Arabidopsis thaliana*. Plants and mammalian E2F show similarities both at structural and functional levels (Ramirez-Parra et al., 1999). Two different proteins, the typical E2F and the atypical E2F, compose the E2F gene family. The typical E2F (from now named as E2F) has only one DNA binding domain and can act repressing or enhancing the expression of their target genes. The atypical E2F (from now named as DEL) possess two DNA binding domains and acts like a repressor protein due to the lack of the transactivation domain that is present in some E2Fs (Kosugi and Ohashi, 2002; Mariconti et al., 2002).

In the DNA damage context, the involvement of the E2F gene family in mammalian was already described (Lin et al., 2001; Pediconi et al., 2003). The E2F1, E2F7 and E2F8 proteins had their expression altered due to the treatment of cells with genotoxic stressors (Zalmas et al., 2008). In plants, some evidences established a link between the response to Double Strand Brake (DSB) and the activation of target genes of E2F (Blais and Dynlacht, 2004; Inze, 2005). The objective of this study was to investigate the relation between the DNA damage repair pathways and the E2F transcription factor in plants. To achieve this objective, the expression pattern of E2F genes in response to genotoxic stresses was analyzed in two model plants, *Oryza Sativa* and *Arabidopsis thaliana*. Our results showed that the expression of specific members of the E2F family correlated with the expression of genes involved with DNA damage repair after genotoxic stresses. At the same time, the progression of the cell cycle is arrested.

Materials and Methods

Sequence identification

All the sequences used in this paper were retrieved from Phytozome v 9.1 (<http://www.phytozome.net/>) using the BLASTn tool and the default settings. The identification of rice E2F genes was previously described (Rauber et al., 2016). The analysis to confirm the presence of the DNA binding domain (DBD) characteristic of the E2F transcription factor family was made using the PFAM website (Finn et al., 2014).

In silico expression analysis.

The *in silico* expression data from Arabidopsis were retrieved from the efp-browser webpage (http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Abiotic_Stress) (Kilian et al., 2007) using the accession number of the E2F/DEL genes. The experiments used were UV-B and bleomycin, in the data on abiotic stress. These data were transformed in graphics using a tabulation program. The DEL1 gene did not have a probe present in these arrays.

Plant material

Arabidopsis thaliana (Columbia 0) and *Oryza sativa* (L. ssp. japonica cv. Nipponbare) seedlings were used in the experiments for the gene expression analysis. The Rice seedlings were grown in a greenhouse at 28°C and under light regimen of 12h/12h for 2 months in flooded soil. Arabidopsis plantlets were grown for 1 month in a growth room at 20°C and light regimen of 12h/12h in soil.

UV-B and MMS stresses

For the treatment of UV-B exposition, two UV-B bulbs (Philips TL 40W/01 RS) were used as the only source of light during the stress period. The distance between the lamps and the plants were 30 cm.

Two months old rice plants were separated into two groups. The control group was maintained in normal conditions of light. The treatment group had the UV-B light as the only source of light during the time of stress. All the experiments were defined using pilot experiments aiming the right dose to stress the plants but not to kill them. We used a pretreatment of 4 hours a week before the stress. After the recovery week, the treatment consisted of another 4 hours of stress, 20 hours of recovery under control conditions and a second exposition of UV-B light of 4 hours. Samples were collected at time 0 hours (just after the treatment), 30 minutes, 2 hours, 6 hours and 24 hours after the exposure (times 30m, 2h, 6h and 24h, respectively).

Three weeks old *Arabidopsis* plantlets were also stressed. They were separated into two groups, control and UV-B -treated. The time of exposure to UV-B light was 30 minutes for the stressed plants. After the exposure, the following collection times were made: 0 h (immediately after the stress), 30 minutes, 2 hours, 6 hours, 12 hours and 24 hours after the stress. All samples (control and stressed) were collected in four biological replicates and each sample was composed by two different leaves from two different plants.

For the methylmethane sulfonate (MMS) treatment, rice seedlings were grown in hydroponic conditions using MS media as the source of nutrients. Three weeks old plants were treated with 2.5 mmol/l MMS added to the nutritive solution and kept 24 hours. The control plants received only nutritive solution without MMS. After the stress, the nutritive solution was replaced by a new solution without MMS and the shoot from the treated and non-treated plants were collected. Samples were collected as biological triplicates, each one containing two leaves from two different plants (four leaves per biological replicate). The times of collection was 0h (after the stress), 30 minutes, 2 hours, 6 hours, 12 hours and 24 hours after the stress. The samples of all experiments were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and stocked at -80°C, until the RNA extraction.

RNA extraction and cDNA synthesis

The total RNA extraction was carried out using TRIZOL reagent (Invitrogen) following the manufacturing instructions.

The cDNA was synthesized from the total RNA using the M-MLV Reverse transcriptase (Promega) according to the recommendations of the manufacturer. The quality of the cDNAs was verified by PCR using primers to the housekeeping gene formaldehyde dehydrogenase (FDH – GenBank: U77637.1) for rice and polyubiquitin10 (UBQ10 – GenBank: L05361.1) for *Arabidopsis thaliana*.

Expression analysis by quantitative PCR analysis (RT-qPCR)

The relative expression of the genes was determined by the reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The reactions followed the parameters: first denaturation of 5 min at 94°C followed by 40 cycles of 10s at 94°C, 15s at 60°C and 15s at 72°C. After the amplification, the samples were kept for 2 min at 40°C to reannealing and then heated from 55 until 99°C with an increasing rate of 0.4 °C/s to achieve the melting curve. The reactions were made in a final volume of 20µl, containing 10µl of reverse transcription product (diluted 100 times in sterile water), 2µl of PCR buffer (Invitrogen), 1.2 µl of 50 mmol/l MgCl₂, 0.4 µl of 5 mmol/l dNTPs, 0.2 µl of 10µmol/l primer mix, 3.95 µl ultra-pure water, 2 µl SYBR green (1:100,000, Molecular probes), and 0.05 µl Platinum Taq DNA

polymerase (2U/reaction). Housekeeping genes were used as internal control to normalize the input of RNA in each sample. All results were expressed through relative quantification to a set of housekeeping genes, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ methodology (Livak and Schmittgen, 2001). All the experiments were made in technical quadruplicates.

The RT-qPCR reactions were carried out using specific primers for each gene. The CDS sequences of the genes evaluated in these paper were used to design primers using the primer 3 site (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Rozen and Skaletsky, 2000). The primers were designed to produce 180-250 bp length fragments. All the primers had a T_m between 59.5 °C to 60.5°C.

Besides the primers for E2F genes, we have also projected primers to amplify genes involved in three different cellular processes: DNA repair, Cell cycle and apoptosis. In rice the UVR3 and PHO acts as a photolyases, RAD1 is involved in the nucleotide excision repair system, meanwhile the Uracil DNA glycosylase (UGLY) acts in the base excision repair. We also tested SNM that acts as a regulator of inter strand crosslinks. For the genes involved in cell cycle we have analyzed cyclin B 1_1 (CYCB1_1) and cyclin dependent kinase B2 (CDKB2), which are related to the G2/M passage (La et al., 2006; Lee et al., 2003), the genes cyclin D4 and cyclin D6, which are specific for the G1 phase (La et al., 2006), and the gene for histone H4 (Reichheld et al., 1998). Two marker genes for programmed cell death were also used: BAG (BAG-domain protein 1 / regulator of cell death – NCBI) and MXK3 (cell death C-terminal domain-containing protein – Phytozome). In the experiments using *Arabidopsis* we used primers for MSH2 and MSH6 genes, which are involved in the mismatch repair. In addition UVR2, UVR3 and UVR7, which are two photolyases and a nucleotide excision repair protein, respectively were also used (Lario et al., 2013). For the cell cycle genes we have used cyclin A3 that are specifically involved in G1 phase (Takahashi et al., 2010), the cyclin dependent kinase B2 that is related to G2/M passage (Takahashi et al., 2010), and also the histone H4 (Rosa et al., 2014).

Results

E2F family in rice

The searches through the rice genome led to the identification of six genes encoding the E2F transcription factors. Four of them encode E2F, named OsE2Fa/b1, OsE2Fa/b2, OsE2Fa/b3 e OsE2Fc1, and the two others DEL proteins, named OsDELa/b/c1 and OsDELa/b/c2. All the gene names followed the nomenclature used in our previous work (Rauber et al., 2016). The number of the sequences encoding E2F found in the rice genome was the same reported previously by others (Guo et al., 2007).

Expression of rice E2F genes in response to exposure to genotoxic stresses.

In order to verify the E2F involvement during genotoxic stresses responses in rice, two different experiments were made, using two different stressors. The first one was UV-B, the most powerful UV wavelength that reaches the earth surface (Mpoloka, 2008). The second stress was the alkylating agent MMS.

Under UV-B treatment, rice plants respond with the up-regulation of OsE2Fa/b3 (6h after treatment) and OsE2Fc1 (30min after the treatment) when compared to the non-treated plants (Figure 1). In contrast, the two other E2F genes (OsE2Fa/b1 and OsE2Fa/b2) were both downregulated 2h, 6h and 24h after the stress. After UV-B stress, the gene OsDELa/b/c1 presented a complex response, reducing the expression just after the onset of the treatment (time 0h), increasing after 30 min, but downregulating again after 6 hours of the treatment. The other DEL gene (OsDELa/b/c2) presented upregulation up to 6h going back to normal levels in the time 24h.

The MMS treatment also upregulates two E2F genes meanwhile the other two E2Fs were downregulated. The OsE2Fa/b2 and OsE2Fc1 expression was downregulated up to 2h, returning to normal levels in the time 6h, but increasing later in the time 12 h. The OsE2Fa/b3 and OsE2Fa/b1 showed only downregulation during the stress (times 0 h, 30 min, 2 h and 24 h for OsE2Fa/b3 and 0, 30 min, 2 h, 6 h and 24 h for OsE2Fa/b1). The two OsDEL genes were upregulated during the MMS stress, at 0 h, 30 min, 2 h, 6 h and 24 h for OsDELa/b/c1 and in the times 0 h and 24 h for the OsDELa/b/c2 (Figure 1).

The DP genes were not upregulated at any time during the UV-B stress, which is different of the results obtained from the MMS experiment, where OsDPa and OsDPc were upregulated (Figure 1).

Other genes were also tested, including loci that responds to DNA damaged, genes linked to cell cycle and involved in apoptosis. For the DNA repair genes, we measured five genes (Figure 1). Three of them (RAD1, UVR3 and PHO) were upregulated at time 30min in the UV-B experiment but were later repressed 2h and 6h after treatment. The other two genes (UGLY and SNM) were downregulated during the experiment. With the MMS stressor, two genes were not tested. Three genes related to DNA repair showed a complex modulation during the stress. UVR3 was downregulated 30 minutes and 2 hours after the stress, upregulates in time 6h and goes back to normal levels 12 hours after the stress. PHO and SNM presented a downregulation during the first 6 hours of experiment, upregulation in time 12h it upregulates and downregulated again at 24h.

The cell cycle genes were downregulated in response to the treatment. The genes related to apoptosis were also downregulated during the UV-B experiment, but the MXK3 genes showed an up-regulation in the time 12h in the MMS experiment.

The Arabidopsis expression array in genotoxic stresses.

In order to verify if the response to genotoxic stress also involves the E2F genes in other plants we analyzed the array expression data available for Arabidopsis in the eFP browser (http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Abiotic_Stress). In order to compare with the results obtained for rice, the first stress accessed in the efp browser was the UV-B. The analysis showed that, in response to UV-B in shoot two genes, AtE2Fb and AtE2Fc, had an increased expression (Figure 2A). The E2Fc and E2Fb genes were upregulated up to 12 hours of treatment, decreasing later, at time point of 24 hours. The AtDEL 3 gene had a little increase in its expression after 15minutes of stress. The AtE2Fa and AtDEL 2 gene expression did not change in the experiment.

The response to UV-B in root, as accessed via microarray database, was very subtle compared to the one found in shoot. The E2FB had a slight increase after 30 minutes of stress, with a maximum of expression in 1 hour after the stress exposure and then it started to decrease until 6 hours when it presented a relative expression near to 1. The AtDELb and AtDELc genes had the same response but in different times, having a peak of expression after 30 minutes and after 1 hour of the stress, respectively. The AtE2Fa and AtE2Fc were not upregulated (Figure 2B).

The other genotoxic stress that was accessed in eFP browser was bleomycin and mitomycin treatment. In shoots, AtE2Fb and AtE2Fc were up-regulated with a peak at 6 hours and 12 hours after the stress, respectively. The AtE2Fa, AtDELb and AtDELc did not change their expression during the experiment. In roots, the response differs a little, but the AtE2Fb and AtE2Fc also increased their expression. The AtDELc gene was also up-regulated showing a peak 1 hour after the stress going to downregulation in the next time, 3h after the stress. The AtE2Fa and AtDELb expression did not increase during the experiment (figure 2C and 2D).

UV-B experiment in Arabidopsis.

To confirm the results of the array experiment, we have analyzed the expression profiles of all these genes in UV-B treated Arabidopsis plantlets (Figure 3). As predicted by the array expression analysis, the AtE2Fa relative expression was not altered by the stress. Meanwhile the AtE2Fb expression increased 30 minutes after the stress, reaching the maximum of expression 2 hours after the stress, and then returned to the normal levels. In the same way, AtDELa expression increased up to 2hrs and returned to normal levels 6 hours

after the stress. The AtDELb gene expression showed a downregulation in times 0h, 6h, 12h and 24h. The AtDELc had no alteration in the relative quantity of mRNA in response to UV-B treatment. AtE2Fc expression was not detected in both samples, treated and control.

All the cell cycle genes tested had reduced levels of expression, but this down-regulation did not occur at same time but varied from 2 hours for CYCA3_1 up to 24 hour for H4. Other genes, such as CDKB2, was repressed at the analyzed times. On the other hand, genes which are involved in the response to DNA damage such as UVR2, UVR3 and UVR7 genes, were up-regulated but with different kinetics. The three genes were upregulated 30 minutes after the stress. UVR2 and UVR7 maintained increased levels of expression up to 2 hours after the stress. Other two genes involved in DNA repair, MSH2 and MSH6, were downregulated. The BAG gene, which is involved in PCD, had an altered expression just after the stress (time 0h) and also 2 hours after the stress.

Discussion

The E2F transcription factor family is known for its role in cell cycle control and many others cellular processes (Carnevale et al., 2012; Harbour and Dean, 2000; Ramirez-Parra et al., 1999). The involvement of this family in DNA damage was observed in mammalian cells but how the gene family responds to genotoxic stress in plants is still poorly known. Here we analyzed the involvement of the E2Fs in response to two genotoxic agents, UV-B and MMS, in two different model plants, rice and Arabidopsis.

To measure the effectiveness of the stresses, some genes involved in the DNA repair were tested. The genes that responds positively in rice were RAD1, UVR3 and PHO, in the UV-B stress. The UVR3 and PHO genes are related to photolyases, which are expected to be activated in UV stress since these proteins are responsible for the direct repair of base dimers. The same type of proteins responded to UV-B damage in the *Arabidopsis thaliana* experiments. The photolyases that responded in Arabidopsis were UVR2 and UVR3. In both UV-B experiments, we noticed the activation of genes that belong to the nucleotide excision repair (NER) pathway, UVR7 in Arabidopsis and RAD1 in rice. The NER pathway is characterized to be responsive during UV-B damage in mammals because they do not possess photolyases. We speculate that this pathway was also activate because of the severity of the stress we submitted the plants. This effect could activated alternative pathways to help repairing the damage imposed. In the MMS treatment the genes upregulated were UVR3, PHO and SNM. It was already described that the photolyases are also involved in the damage generated by alkylating agents (Mielecki and Grzesiuk, 2014).

Using the UV-B as the main source of light in an *in vivo* experiment, we observed that the E2F family responded upregulating OsE2Fa/b3 and E2Fc1. Similarly, some members of

the E2F family also presented gene regulation in response to MMS treatment of rice plantlets. The gene OsE2Fc1 was modulate in both treatments, UV and MMS, while OsE2Fa/b2 respond specifically to the MMS treatment. In same way, AtE2Fb and AtE2Fc of Arabidopsis responded to bleomycin and UV-B exposures. The expression of a specific gene during a genotoxic stress was seen in mammalian cells in which the E2F1 responded when genotoxic stress was applied (Lin et al., 2001). This activation of E2F1 in mammalian cells was regulated by ATM and ATR genes, which are also responsive to DNA damage. How the genotoxic stress regulates the E2F in plants was still not answered.

The gene that responds in both experiments corresponds to OsE2Fc1 in rice. In Arabidopsis AtE2Fc, which is the repressor, also responded differentially to UV-B and bleomycin exposure. Interesting, The AtE2Fc was negatively regulated in the cell cycle control process (Berckmans et al., 2011). As previously reported the rice OsE2Fc1 and Arabidopsis AtE2Fc correspond both to repressors. As showed in the literature for other processes, the repressor E2F can control the activator E2F expression demonstrating that the self-regulation of this family of genes is important for the cellular processes they control. (Berckmans et al., 2011; de Jager et al., 2009).

The other genes of rice that responded to the genotoxic stress were OsE2Fa/b3 (in the UV-B experiment) and OsE2Fa/b2 (for MMS treatment), which are both activators E2Fs according to our previous work (Rauber et al., 2016). In *Arabidopsis thaliana*, AtE2Fb, an activator E2F, responded to both UV-B and MMS treatments. Differently from rice that possess three activator E2Fs, Arabidopsis possess just two. It was already demonstrated that AtE2Fa and AtE2Fb have different functions during the control of cell cycle (Magyar et al., 2005; Sozzani et al., 2006). Our data also pointed out that both activators differ in the expression pattern and that possibly the E2Fb is one of the gene that controls all the responses to the genotoxic stress. In rice, OsE2Fa/b3 responds to UV-B stress meanwhile the OsE2Fa/b2 responds to MMS treatment. We could not confirm an orthologue relationship between AtE2Fa and OsE2Fa/b1 (genes that were not responsive to genotoxic stress) or AtE2Fb and OsE2Fa/b2 or OsE2Fa/b3 (genes that responds to the genotoxic stresses). Even a more deeper study on the evolutionary relationship between E2Fs did not show this relation (Rauber et al., 2016). At this point, we could just speculate that possibly OsE2Fa/b1 and OsE2Fa/b3 maintained the same general function responding to DNA damage, but along the evolutionary time each of them possibly acquired a specific response to each type of genotoxic stress.

The DEL genes were also upregulated in response to both genotoxic stresses in both plants showing that an additional negative control in the E2F pathway is active, besides of the regulation imposed by the AtE2Fc. As already showed in the literature, the atypical E2Fs, E2F7 and E2F8, regulates the E2F1 response during DNA damage stresses in humans (Zalmas et

al., 2008). The same maybe occurring in our experiments, where the DEL could be regulating the E2Fs, downregulating them, and possibly blocking the advance of the cell cycle. This is supported by the negative regulation of cell cycle genes in both, rice and Arabidopsis plants exposed to genotoxic stress. The E2F and DEL proteins controls the cell cycle with synergistic response of the entire family of proteins and, as showed here, this is also seen in the response to genotoxic stresses (Lammens et al., 2009).

During the stresses tested in our experiments, the genes involved in apoptosis were upregulated at specific times. The involvement of E2F proteins in the regulation of apoptosis during DNA damage was shown in human cell lines model where E2F1 regulated apoptosis genes when exposed to genotoxic stresses (Pediconi et al., 2003). We conclude that the regulation of both processes by E2F was also maintained in plant species.

Our analysis on the array expression data also indicated that even in roots the E2F genes can modulate their expression during the exposure to UV-B. The response was not as higher as in the shoot, but a differential expression can be observed. The current literature shows that the damage imposed by UV-B could also impact roots even they are not directly exposed to the stress (Yokawa et al., 2015). The regulation of genes in roots during UV-B exposure was also described in the literature indicating that even without direct exposure the roots maintain the ability to respond to this stress (Leasure et al., 2011).

The E2F gene family is present in almost all eukaryotic organisms. The involvement of E2F family in the cell cycle control from metazoan to plantae was very well established. Here we showed that their involvement in genotoxic stress regulating DNA repair was also kept, in plants, like in mammals which is reported in the literature. The DNA repair is an essential process to the surviving of the organism as they prevent the accumulation of deleterious mutations and promote the genome stability (Gill et al., 2015). The regulation of E2F and DNA repair genes is observed in plants, as showed here, and in mammals, as described in the literature (Carcagno et al., 2012; E et al., 2011). The E2F/DEL proteins helps to regulate the repair of DNA damage and in the same time makes the link with cell cycle. When the DNA damage is present, the E2F family blocks the cell cycle, downregulating genes responsible for the progression of the cycle. In the same time helps to promote and activate genes responsible for the repair of the DNA. In some cases, they can even activate the apoptosis pathway.

Conclusion

The results described here lead us to propose a model of action for E2F proteins in response to the genotoxic stress (Figure 4). The repressor E2F/DP or DEL genes are upregulated so their proteins can bind in the promoter of the genes that controls the cell cycle progression, repressing them and arresting the cell division. At the same time, one specific

activator E2F is upregulated and bonds to the promoter of DNA repair responsive genes, activating them and the mechanism of DNA repair, responsible for correcting the damage produced by the genotoxic stress. This prevents the cell to duplicate in the presence of damaged DNA. This mechanism is maintained in the two models plants, rice and Arabidopsis, indicating that this response could be general for plants.

Figures

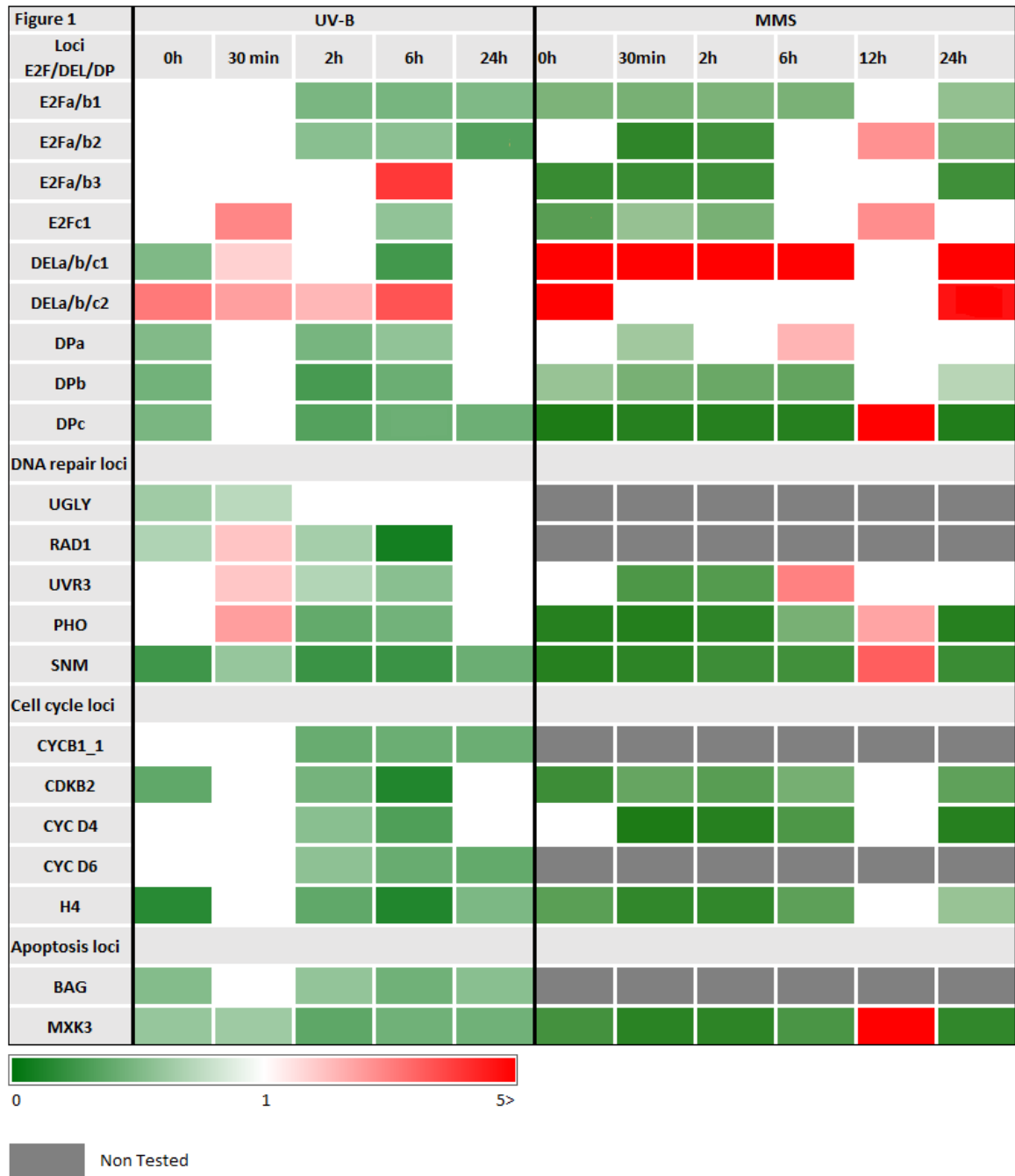


Figure 1 *In vivo* experiments with plantlets of rice exposed to UV-B and MMS. The scale shows the comparison between treated and non-treated samples. The number below to the scale shows the fold changes between treated and non-treated plantlets based on the RTqPCR reactions presented in the Supplementary table 1 and 2. The gray boxes show the genes that were not analyzed. All the experiments have at least three separated biologic samples with three technical replicates each.

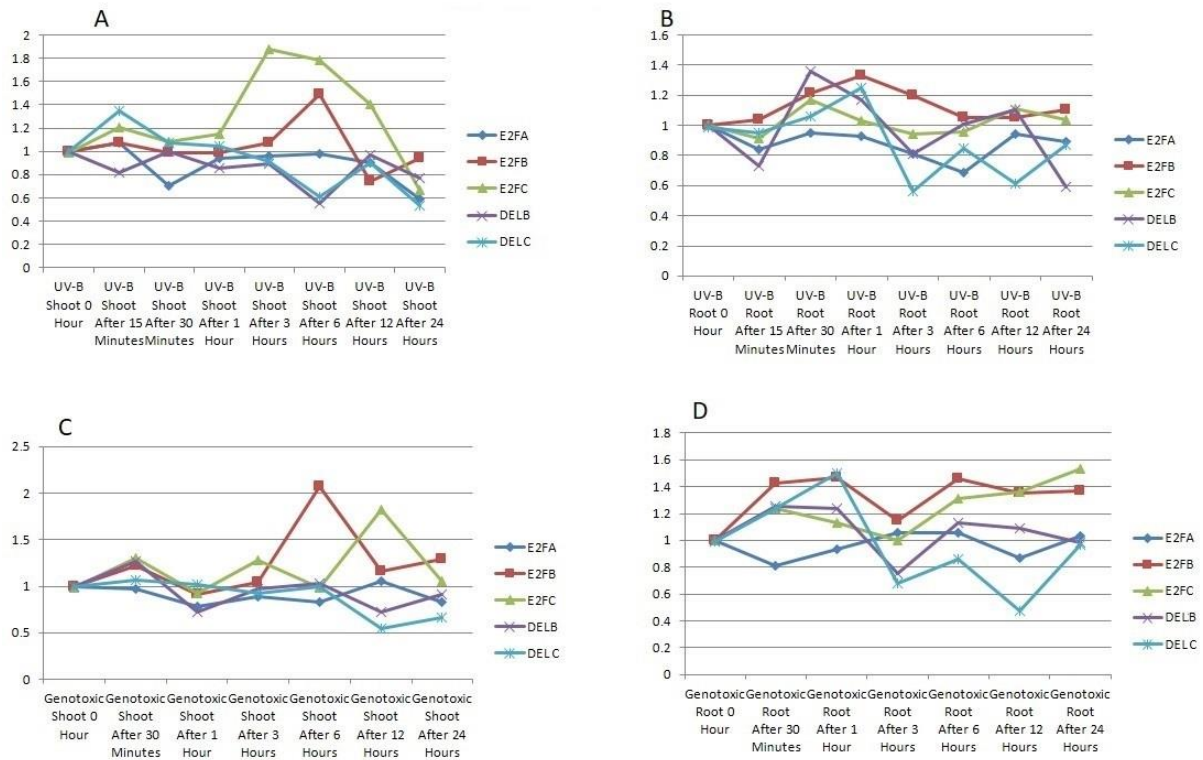


Figure 2 Expression of the E2F/DEL genes in *Arabidopsis thaliana* arrays. The data is available at Arabidopsis eFP browser. The gene expression was calculated comparing the expression in treated samples X control samples. All measurements were taken in duplicate.

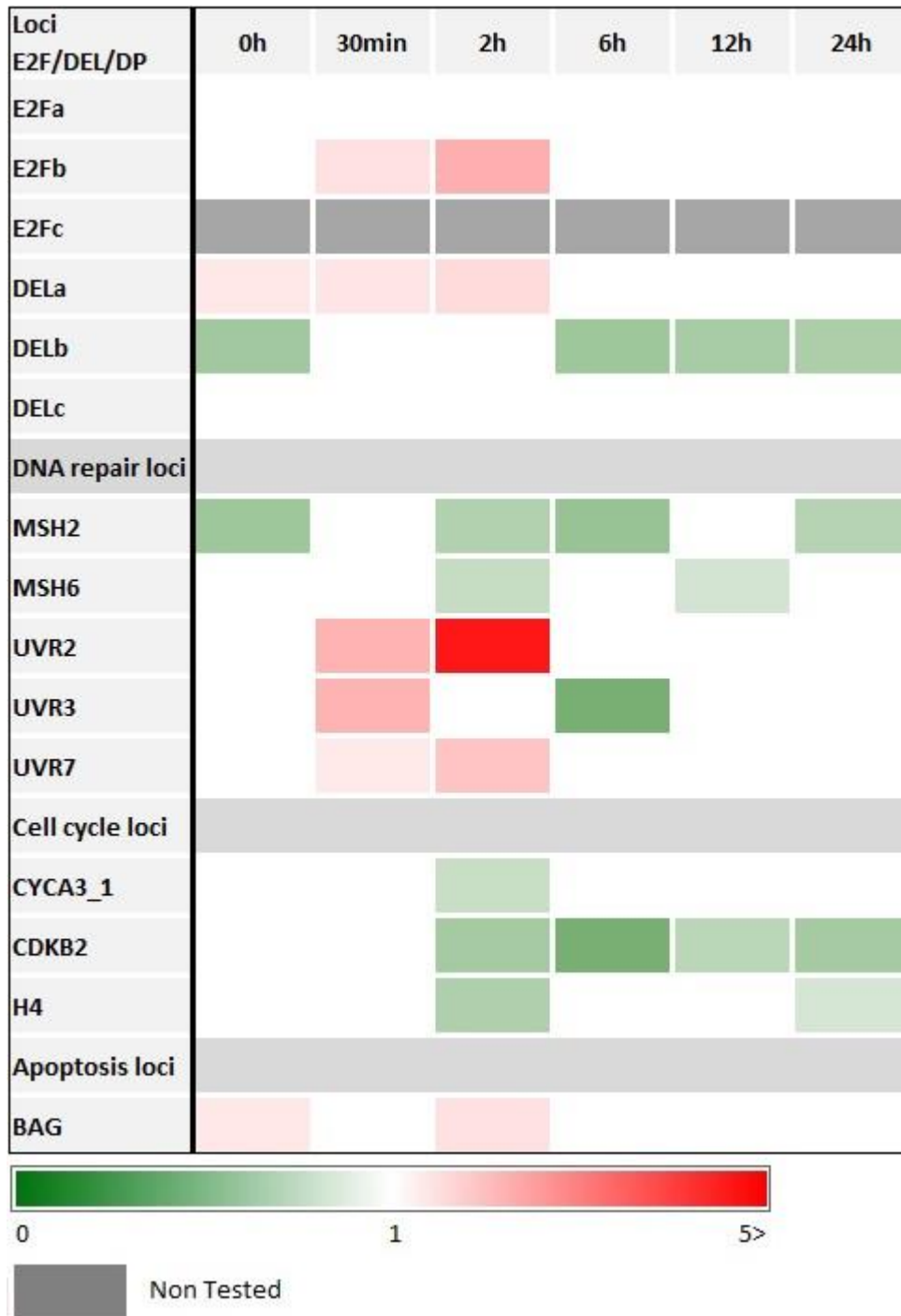


Figure 3 *In vivo* experiments performed using plantlets of arabidopsis exposed to UV-B. The scale shows the comparison between treated and non-treated samples. The number below to the scale shows the fold changes between treated and non-treated plantlets based on the RTqPCR reactions presented in the Supplementary table 3. The gray boxes shows the genes that was not analyzed. All the experiments have at least three separated biologic samples with three technical replicates each

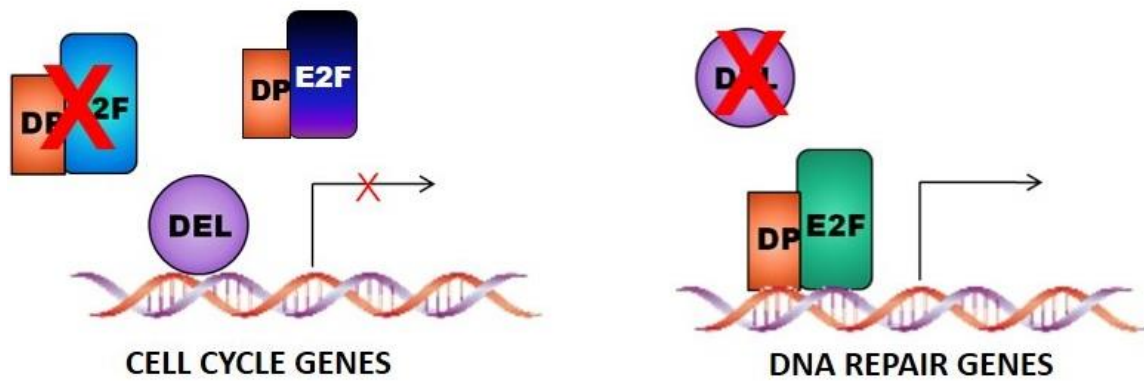


Figure 4 Model of action of the E2F/DEL genes during a genotoxic stress. The light blue E2F is the activator E2F downregulated in the experiments that possibly controls the cell cycle progression. The dark blue E2F is the repressor E2F and the green E2F is the specific activator E2F that is upregulated in the experiments.

Supplementary figures

Rice Loci E2F/DEL/DP	UV-B				
	0h	30 min	2h	6h	24h
E2Fa/b1	1(0.15)	1(0.16)	0.48(0.09)**	0.47(0.09)**	0.5(0.17)*
E2Fa/b2	0.97(0.15)	0.84(0.13)	0.54(0.11)**	0.55(0.14)*	0.33(0.12)**
E2Fa/b3	0.88(0.12)	1.31(0.19)	1.4(0.32)	4.13(0.65)**	1.57(0.43)
E2Fc1	1.32(0.26)	2.91(0.4)**	1(0.2)	0.57(0.14)*	1.27(0.33)
DELa/b/c1	0.5(0.08)**	1.73(0.25)*	1.11(0.33)	0.26(0.07)**	0.78(0.32)
DELa/b/c2	3.11(0.66)*	2.52(0.55)*	2.13(0.44)*	3.7(0.63)**	1.56(0.43)
DPa	0.51(0.06)**	1.2(0.25)	0.47(0.1)**	0.57(0.14)*	1.33(0.44)
DPb	0.45(0.06)**	1.05(0.18)	0.28(0.05)**	0.42(0.06)**	1.21(0.32)
DPc	0.48(0.08)**	0.95(0.17)	0.33(0.08)**	0.42(0.1)**	0.43(0.19)**
DNA repair loci					
UGLY	0.63(0.08)**	0.73(0.09)*	0.98(0.18)	1.08(0.18)	0.69(0.18)
RAD1	0.69(0.09)*	1.93(0.29)*	0.65(0.12)*	0.08(0.01)**	1.35(0.48)
UVR3	1.34(0.17)	2.53(0.44)**	0.39(0.12)**	0.45(0.13)**	0.83(0.31)
PHO	1.33(0.17)	1.90(0.3)*	0.7(0.12)*	0.64(0.09)**	0.78(0.25)
SNM	0.25(0.03)**	0.59(0.1)**	0.23(0.06)**	0.23(0.04)**	0.42(0.16)**
Cell cycle loci					
CYCB1_1	0.96(0.17)	0.84(0.13)	0.41(0.08)**	0.42(0.13)**	0.42(0.18)**
CDKB2	0.38(0.06)**	1.39(0.22)	0.46(0.09)**	0.13(0.03)**	0.68(0.28)
CYC D4	0.78(0.15)	0.97(0.15)	0.54(0.11)**	0.31(0.08)**	0.8(0.35)
CYC D6	0.98(0.18)	1.02(0.13)	0.56(0.11)**	0.41(0.14)**	0.39(0.17)*
H4	0.16(0.02)**	0.84(0.11)	0.38(0.07)**	0.13(0.02)**	0.49(0.16)**
Apoptosis loci					
BAG	0.52(0.08)**	1.61(0.26)	0.58(0.13)**	0.44(0.12)**	0.54(0.22)*
MXK3	0.59(0.08)**	0.62(0.08)**	0.37(0.06)**	0.44(0.07)**	0.44(0.13)**

Supplementary figure 1: Expression data from the rice UV-B experiment. The numbers are expressed relative to the control. In parenthesis the standard error from the samples. *p<0.05 **p<0.01

Rice	MMS					
Loci E2F/DEL/DP	0h	30min	2h	6h	12h	24h
E2Fa/b1	0.43(0.09)**	0.41 (0.1)**	0.43(0.11)**	0.42 (0.1)**	5.28(2.25)	0.53(0.08)**
E2Fa/b2	1.38(0.47)	0.09(0.01)**	0.17(0.07)**	0.56(0.13)	2.73(0.71)*	0.43(0.07)**
E2Fa/b3	0.13(0.03)**	0.13(0.02)**	0.16(0.04)**	1.18(0.31)	2.86(1.35)	0.16(0.02)**
E2Fc1	0.27(0.06)**	0.64(0.12)*	0.41(0.07)**	1.18(0.3)	2.3(0.4)*	1.23(0.25)
DELa/b/c1	26.04(9.60)*	34.77(6.01)**	6.24(1.77)*	14.5(3.89)**	15.69(9.36)	17.21(2.78)**
DELa/b/c2	8.62(3.1)*	0.77(0.15)	1.12(0.27)	0.96(0.27)	4.02(2.43)	4.72(1.08)*
DPa	1.69(0.66)	0.59(0.08)**	0.89(0.24)	2.19(0.53)*	2.28(0.94)	1.07(0.117)
DPb	0.55(0.11)**	0.41(0.06)**	0.35(0.08)**	0.42(0.11)**	1.65(0.58)	0.59(0.09)**
DPc	0.01(0.01)**	0.05(0.01)**	0.05(0.01)**	0.05(0.02)**	9.43(2.5)*	0.03(0.01)*
DNA repair loci						
UGLY	nt	nt	nt	nt	nt	nt
RAD1	nt	nt	nt	nt	nt	nt
UVR3	0.16(0.04)*	0.22(0.03)**	0.25(0.04)**	2.98(.073)*	0.65(0.17)	1.35(0.21)
PHO	0.05(0.01)**	0.04(0.14)**	0.09(0.01)**	0.41(0.09)**	2.43(0.34)*	0.05(0.01)**
SNM	0.05(0.01)**	0.08(0.01)**	0.15(0.02)**	0.17(0.04)**	3.54(0.64)*	0.14(0.02)**
Cell cycle loci						
CYCB1_1	nt	nt	nt	nt	nt	nt
CDKB2	0.16(0.04)**	0.33(0.07)**	0.27(0.09)**	0.4(0.11)*	2.03(0.55)	0.3(0.05)**
CYC D4	1.07(0.53)	0.01(0.01)**	0.05(0.02)**	0.22(0.11)**	2.28(0.62)	0.05(0.01)**
CYC D6	nt	nt	nt	nt	nt	nt
H4	0.28(0.07)**	0.1(0.02)**	0.1(0.03)**	0.29(0.06)**	1.9(0.58)	0.55(0.08)**
Apoptosis loci						
BAG	nt	nt	nt	nt	nt	nt
MXK3	0.18(0.04)**	0.07(0.01)**	0.08(0.09)**	0.21(0.05)**	11.15(3.01)**	0.1(0.02)**

Supplementary figure 2: Expression data from the rice MMS experiment. The numbers are expressed relative to the control. In parenthesis the standard error from the samples. *p<0.05 **p<0.01

Loci E2F/DEL/DP	0h	30min	2h	6h	12h	24h
E2Fa	0.88(0.03)	1.41(0.18)	1.33(0.14)	0.8(0.11)	0.87(0.07)	0.93(0.09)
E2Fb	0.93(0.06)	1.48(0.08)**	2.26(0.08)**	1.06(0.17)	0.83(0.15)	0.96(0.04)
E2Fc	NT	NT	NT	NT	NT	NT
DELa	1.37(0.04)**	1.42(0.14)*	1.56(0.08)*	0.58(0.09)	0.74(0.1)	0.77(0.1)
DELb	0.59(0.06)*	0.88(0.09)	1.49(0.18)	0.58(0.07)*	0.62(0.07)*	0.64(0.06)**
DELc	0.96(0.03)	0.98(0.05)	0.91(0.07)	1.23(0.14)	1.36(0.08)	1.08(0.07)
DNA repair loci						
MSH2	0.58(0.08)**	0.89(0.06)	0.66(0.05)**	0.55(0.07)*	0.85(0.08)	0.68(0.07)**
MSH6	0.84(0.08)	1.02(0.05)	0.75(0.07)*	0.65(0.09)	0.81(0.05)*	0.85(0.08)
UVR2	0.93(0.08)	2.19(0.4)*	4.64(0.36)**	0.7(0.12)	0.92(0.1)	0.82(0.4)
UVR3	0.93(0.09)	2.19(0.3)**	1.18(0.11)	0.41(0.06)**	0.79(0.08)	0.74(0.15)
UVR7	0.83(0.09)	1.35(0.1)*	1.94(0.27)*	1.53(0.31)	1.12(0.09)	1.05(0.05)
Cell cycle loci						
CYCA3_1	1.14(0.06)	1.08(0.08)	0.76(0.06)**	0.95(0.11)	0.96(0.07)	0.91(0.08)
CDKB2	1.14(0.05)	1.22(0.09)	0.61(0.04)**	0.41(0.08)*	0.7(0.1)*	0.61(0.09)*
H4	0.85(0.06)	0.99(0.07)	0.65(0.04)**	0.9(0.06)	1.09(0.09)	0.82(0.03)**
Apoptosis loci						
BAG	1.37(0.05)**	1.24(0.09)	1.48(0.11)*	1.04(0.12)	1(0.05)	1.17(0.04)

Supplementary figure 3: Expression data from the arabidopsis UV-B experiment. The numbers are expressed relative to the control. In parenthesis the standard error from the samples. *p<0.05 **p<0.01

References

- Ballaré, C. L., M. M. Caldwell, S. D. Flint, S. A. Robinson, and J. F. Bornman, 2011, Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms, and interactions with climate change: *Photochem Photobiol Sci*, v. 10, p. 226-41.
- Berckmans, B., T. Lammens, H. Van Den Daele, Z. Magyar, L. Bögre, and L. De Veylder, 2011, Light-dependent regulation of DEL1 is determined by the antagonistic action of E2Fb and E2Fc: *Plant Physiol*, v. 157, p. 1440-51.
- Blais, A., and B. D. Dynlacht, 2004, Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control: *Curr Opin Genet Dev*, v. 14, p. 527-32.
- Carcagno, A. L., L. E. Giono, M. C. Marazita, D. S. Castillo, N. Pregi, and E. T. Cánepa, 2012, E2F1 induces p19INK4d, a protein involved in the DNA damage response, following UV irradiation: *Mol Cell Biochem*, v. 366, p. 123-9.
- Carnevale, J., O. Palander, L. A. Seifried, and F. A. Dick, 2012, DNA damage signals through differentially modified E2F1 molecules to induce apoptosis: *Mol Cell Biol*, v. 32, p. 900-12.
- de Jager, S. M., S. Scofield, R. P. Huntley, A. S. Robinson, B. G. den Boer, and J. A. Murray, 2009, Dissecting regulatory pathways of G1/S control in Arabidopsis: common and distinct targets of CYCD3;1, E2Fa and E2Fc: *Plant Mol Biol*, v. 71, p. 345-65.
- E, X., M. T. Pickering, M. Debatis, J. Castillo, A. Lagadinos, S. Wang, S. Lu, and T. F. Kowalik, 2011, An E2F1-mediated DNA damage response contributes to the replication of human cytomegalovirus: *PLoS Pathog*, v. 7, p. e1001342.
- Finn, R. D., A. Bateman, J. Clements, P. Coghill, R. Y. Eberhardt, S. R. Eddy, A. Heger, K. Hetherington, L. Holm, J. Mistry, E. L. Sonnhammer, J. Tate, and M. Punta, 2014, Pfam: the protein families database: *Nucleic Acids Res*, v. 42, p. D222-30.
- Gill, S. S., N. A. Anjum, R. Gill, M. Jha, and N. Tuteja, 2015, DNA damage and repair in plants under ultraviolet and ionizing radiations: *ScientificWorldJournal*, v. 2015, p. 250158.
- Guo, J., J. Song, F. Wang, and X. S. Zhang, 2007, Genome-wide identification and expression analysis of rice cell cycle genes: *Plant Mol Biol*, v. 64, p. 349-60.
- Harbour, J. W., and D. C. Dean, 2000, The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms: *Genes Dev*, v. 14, p. 2393-409.
- Inze, D., 2005, Green light for the cell cycle: *EMBO J*, v. 24, p. 657-62.
- Kilian, J., D. Whitehead, J. Horak, D. Wanke, S. Weinl, O. Batistic, C. D'Angelo, E. Bornberg-Bauer, J. Kudla, and K. Harter, 2007, The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses: *Plant J*, v. 50, p. 347-63.
- Kosugi, S., and Y. Ohashi, 2002, E2Ls, E2F-like repressors of Arabidopsis that bind to E2F sites in a monomeric form: *J Biol Chem*, v. 277, p. 16553-8.
- La, H., J. Li, Z. Ji, Y. Cheng, X. Li, S. Jiang, P. N. Venkatesh, and S. Ramachandran, 2006, Genome-wide analysis of cyclin family in rice (*Oryza Sativa L.*): *Mol Genet Genomics*, v. 275, p. 374-86.
- Lammens, T., J. Li, G. Leone, and L. De Veylder, 2009, Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family: *Trends Cell Biol*, v. 19, p. 111-8.
- Lario, L. D., E. Ramirez-Parra, C. Gutierrez, P. Casati, and C. P. Spampinato, 2011, Regulation of plant MSH2 and MSH6 genes in the UV-B-induced DNA damage response: *J Exp Bot*, v. 62, p. 2925-37.
- Lario, L. D., E. Ramirez-Parra, C. Gutierrez, C. P. Spampinato, and P. Casati, 2013, ANTI-SILENCING FUNCTION1 proteins are involved in ultraviolet-induced DNA damage repair and are cell cycle regulated by E2F transcription factors in Arabidopsis: *Plant Physiol*, v. 162, p. 1164-77.
- Leasure, C. D., H. Y. Tong, X. W. Hou, A. Shelton, M. Minton, R. Esquerra, S. Roje, H. Hellmann, and Z. H. He, 2011, root uv-b sensitive mutants are suppressed by specific mutations in ASPARTATE AMINOTRANSFERASE2 and by exogenous vitamin B6: *Mol Plant*, v. 4, p. 759-70.

- Lee, J., A. Das, M. Yamaguchi, J. Hashimoto, N. Tsutsumi, H. Uchimiya, and M. Umeda, 2003, Cell cycle function of a rice B2-type cyclin interacting with a B-type cyclin-dependent kinase: *Plant J*, v. 34, p. 417-25.
- Lidon, F. C., and J. C. Ramalho, 2011, Impact of UV-B irradiation on photosynthetic performance and chloroplast membrane components in *Oryza sativa* L: *J Photochem Photobiol B*, v. 104, p. 457-66.
- Lin, W. C., F. T. Lin, and J. R. Nevins, 2001, Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation: *Genes Dev*, v. 15, p. 1833-44.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen, 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method: *Methods*, v. 25, p. 402-8.
- Magyar, Z., L. De Veylder, A. Atanassova, L. Bakó, D. Inzé, and L. Bögre, 2005, The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division: *Plant Cell*, v. 17, p. 2527-41.
- Manova, V., and D. Gruszka, 2015, DNA damage and repair in plants - from models to crops: *Front Plant Sci*, v. 6, p. 885.
- Mariconti, L., B. Pellegrini, R. Cantoni, R. Stevens, C. Bergounioux, R. Cella, and D. Albani, 2002, The E2F family of transcription factors from Arabidopsis thaliana. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants: *J Biol Chem*, v. 277, p. 9911-9.
- McKenzie, R. L., P. J. Aucamp, A. F. Bais, L. O. Bjorn, M. Ilyas, and S. Madronich, 2011, Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation: *Photochem Photobiol Sci*, v. 10, p. 182-98.
- Mielecki, D., and E. Grzesiuk, 2014, Ada response - a strategy for repair of alkylated DNA in bacteria: *FEMS Microbiol Lett*, v. 355, p. 1-11.
- Mpoloka, S. W., 2008, Effects of prolonged UV-B exposure in plants: *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 4874-4883.
- Parihar, P., S. Singh, R. Singh, V. P. Singh, and S. M. Prasad, 2015, Changing scenario in plant UV-B research: UV-B from a generic stressor to a specific regulator: *J Photochem Photobiol B*, v. 153, p. 334-43.
- Pediconi, N., A. Ianari, A. Costanzo, L. Belloni, R. Gallo, L. Cimino, A. Porcellini, I. Screpanti, C. Balsano, E. Alesse, A. Gulino, and M. Levrero, 2003, Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage: *Nat Cell Biol*, v. 5, p. 552-8.
- Ramirez-Parra, E., Q. Xie, M. B. Boniotti, and C. Gutierrez, 1999, The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators: *Nucleic Acids Res*, v. 27, p. 3527-33.
- Rauber, R., C. Cabreira, L. B. de Freitas, A. C. Turchetto-Zolet, and M. Margis-Pinheiro, 2016, The evolutionary history of the E2F and DEL genes in Viridiplantae: *Mol Phylogenet Evol*, v. 99, p. 225-34.
- Reichheld, J. P., C. Gigot, and N. Chaubet-Gigot, 1998, Multilevel regulation of histone gene expression during the cell cycle in tobacco cells: *Nucleic Acids Res*, v. 26, p. 3255-62.
- Rosa, S., V. Ntoukakis, N. Ohmido, A. Pendle, R. Abranches, and P. Shaw, 2014, Cell differentiation and development in Arabidopsis are associated with changes in histone dynamics at the single-cell level: *Plant Cell*, v. 26, p. 4821-33.
- Rozen, S., and H. Skaletsky, 2000, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers: *Methods Mol Biol*, v. 132, p. 365-86.
- Sakamoto, A. N., V. T. Lan, V. Puripunyanich, Y. Hase, Y. Yokota, N. Shikazono, M. Nakagawa, I. Narumi, and A. Tanaka, 2009, A UVB-hypersensitive mutant in Arabidopsis thaliana is defective in the DNA damage response: *Plant J*, v. 60, p. 509-17.
- Sozzani, R., C. Maggio, S. Varotto, S. Canova, C. Bergounioux, D. Albani, and R. Cella, 2006, Interplay between Arabidopsis activating factors E2Fb and E2Fa in cell cycle progression and development: *Plant Physiol*, v. 140, p. 1355-66.
- Takahashi, I., S. Kojima, N. Sakaguchi, C. Umeda-Hara, and M. Umeda, 2010, Two Arabidopsis cyclin A3s possess G1 cyclin-like features: *Plant Cell Rep*, v. 29, p. 307-15.

- Tsantoulis, P. K., and V. G. Gorgoulis, 2005, Involvement of E2F transcription factor family in cancer: *Eur J Cancer*, v. 41, p. 2403-14.
- Tuteja, N., P. Ahmad, B. B. Panda, and R. Tuteja, 2009, Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases: *Mutat Res*, v. 681, p. 134-49.
- van den Heuvel, S., and N. J. Dyson, 2008, Conserved functions of the pRB and E2F families: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 9, p. 713-24.
- Yokawa, K., T. Kagenishi, and F. Baluška, 2015, UV-B Induced Generation of Reactive Oxygen Species Promotes Formation of BFA-Induced Compartments in Cells of Arabidopsis Root Apices: *Front Plant Sci*, v. 6, p. 1162.
- Zalmas, L. P., X. Zhao, A. L. Graham, R. Fisher, C. Reilly, A. S. Coutts, and N. B. La Thangue, 2008, DNA-damage response control of E2F7 and E2F8: *EMBO Rep*, v. 9, p. 252-9.

6.1 WEB References

- Phytozome v 9.1 <<http://www.phytozome.net/>> (last access – 31-10-2014)
- Genedoc program v. 2.0 <<https://www.psc.edu/index.php/user-resources/software/genedoc>> (last access – 28-10-2015)
- Arabidopsis eFP Browser <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Abiotic_Stress> (last access – 28-10-2015)
- Plaza <<http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>> (last access – 28-10-2015)

Capítulo IV

– Discussão –

A família gênica E2F codifica fatores transcricionais presentes em grande parte dos organismos eucarióticos e são responsáveis por controlar o ciclo celular, uma importante função relacionada com a sobrevivência dos indivíduos (Harashima et al., 2013). Essa família possui membros capazes de permitir o avanço ou bloqueio do ciclo celular, controlando assim a taxa de crescimento celular. Além disso, eles também têm a capacidade de regular a morte celular programada. Essas duas funções juntas podem definir como o organismo cresce e se desenvolve.

Visto que essa família gênica possui tamanha importância funcional, sua história evolutiva tem grande relevância, pois ela está presente em organismos bastante diversos. Os caminhos evolutivos seguidos por essas famílias em fungos, animais e plantas podem ser completamente diferentes, visto que estes organismos possuem capacidades, necessidades e modos de vida distintos. Em metazoários o estudo de Cao et al, em 2010, mostrou alguns dados interessantes a respeito da evolução dos E2F. Inicialmente, através de buscas por bancos de dados. Os autores demonstraram a presença de E2Fs em metazoários, plantas, algas e organismos unicelulares. Esses estudos focaram majoritariamente em metazoários, tendo como um dos principais resultados a descrição da separação das proteínas E2F em ativadoras e repressoras como tendo ocorrido antes da divergência entre placozoa e bilateria. Além disso, foi demonstrado que as proteínas E2F repressoras podem ser as mais relacionadas com o ancestral proteico de E2F do que as ativadoras (Cao et al., 2010). Em plantas já foi descrita a existência de proteínas E2F ativadoras e repressoras. Isto nos abriu a questão de como ou quando essas proteínas ativadoras e repressoras teriam surgido ao longo da evolução das plantas visto que o surgimento em metazoários foi caracterizado como acontecendo durante a evolução do grupo e não antes da separação entre animais e plantas. Outro ponto que nos levou a estudar a evolução de uma família de controladores de ciclo celular é que a forma como os metazoários e as plantas crescem são completamente diferentes, além de que as plantas possuem a capacidade de gerar organismos poliploides férteis (Cui et al., 2006). Esta poliploidização poderia levar a um possível aumento da quantidade de genes responsáveis pelo controle do ciclo celular.

Um dos primeiros resultados de nosso estudo descrito no capítulo II foi a presença de diversas duplicações extras que não foram relatadas em metazoários. O número máximo de proteínas DEL encontradas até hoje em metazoários foi duas e

em plantas foram encontradas até quatro parálogos em uma mesma espécie sendo que a maioria das plantas possui três cópias. As proteínas DP também possuem um número menor de cópias em metazoários comparados com plantas. Em metazoa a média de cópias é de duas proteínas DP sendo que em plantas ocorre média de três proteínas podendo chegar até a cinco em algumas espécies (*Sorghum bicolor*). Como já é sabido essa capacidade de lidar com duplicações é comum em plantas visto que algumas possuem genomas poliploides (Cui et al., 2006). Apesar disso ser visto em proteínas DEL e DP, as nossas análises não revelaram um aumento no número de proteínas E2F em plantas, como DEL e DP. Em humanos as proteínas E2F são em seis, enquanto o número máximo de sequências E2F em uma única espécie foi 7 em *Linum usitatissimum*.

Através de buscas de sequências gênicas em diferentes bancos de dados e análises bayesianas robustas, conforme descrito em detalhes no capítulo II desta tese, construímos árvores filogenéticas e elucidamos os caminhos evolutivos desses genes, em especial em plantas. Essas análises revelaram que o surgimento do ancestral de E2F e DEL aconteceu antes da separação entre animais e plantas e que os fungos acabaram perdendo essa família gênica (Figura 2, capítulo II). A análise filogenética ainda mostrou que as proteínas DEL divergiram antes da separação entre animais e plantas mas em um ponto posterior ao surgimento dos E2F, visto que as proteínas DEL não foram encontradas em organismos unicelulares mais basais. Em fungos foram encontradas proteínas E2F porém não foram encontrados membros dos DEL resultado de uma possível perda gênica. Os únicos fungos que exibiram a presença desta família gênica, E2Fs e DPs, são parasitas intracelulares obrigatórios. Já foi especulado na literatura que a perda de repressores do ciclo celular poderia permitir que estes organismos possam infectar e se proliferar mais rapidamente em seus hospedeiros (Cuomo et al., 2012). Isto corrobora com os nossos dados que indicam a perda das proteínas DEL e a existência de apenas uma proteína E2F em fungos. Entretanto, nossas análises não permitiram relacionar as proteínas E2F de fungos como ativadores ou repressores do ciclo celular. O controle fino do ciclo celular é importante para organismos multicelulares visto que um crescimento desordenado pode resultar em anomalias celulares, porém para fungos uma perda da repressão do ciclo celular parece ser vantajoso devido ao seu modo de vida (Cuomo et al., 2012).

Duas outras análises envolvendo exclusivamente sequências de E2F e DEL de plantas e algas foram realizadas. Essas análises permitiram avaliar os caminhos evolutivos específicos destes subgrupos proteicos em plantas. Durante a evolução das proteínas E2F, ocorreram diversas divisões. A primeira delas foi a divisão entre E2F ativadores e repressores. Estes dois subtipos de E2F surgiram em metazoários, conforme já havia sido descrito por Cao (2010), antes da divisão entre placozoa e bilateria. Com os resultados da filogenia agregando sequências de metazoários e plantas dois grupos foram formados, os E2F de metazoários e os E2F de plantas. Dentro de cada grupo, dois subgrupos foram formados, um de ativadores e outro de repressores, sugerindo que o surgimento de E2F ativadores e repressores aconteceu em dois momentos ao longo da história evolutiva de E2F, um antes da divisão entre placozoa e bilateria em metazoários e outro após o surgimento do grupo das embriófitas. Após o surgimento de ativadores e repressores, os dois ainda se duplicaram mais uma vez após o surgimento entre monocotiledôneas e eudicotiledôneas. As proteínas DEL também seguiram o mesmo caminho, se duplicando duas vezes depois do surgimento das embriófitas, porém isso não foi relacionado com nenhuma característica específica portanto essa divisão ainda pode ser explorada em trabalhos futuros de caracterização funcional das proteínas DEL.

As proteínas DEL fazem parte da família de proteínas E2F porém possuem uma estrutura proteica diferente, possuindo dois domínios de ligação ao DNA enquanto os E2F e DP possuem apenas um (Lammens et al., 2009). Quando um E2F está dimerizado com a proteína DP a estrutura final deste complexo também possui dois domínios de ligação ao DNA. Ambos, o complexo E2F/DP e as proteínas DEL, se ligam em uma mesma sequência consenso na região promotora do gene a ser regulado gerando assim uma competição pelo sítio (Vandepoele et al., 2005). Uma análise filogenética envolvendo esses domínios mostrou que um dos domínios de ligação ao DNA (DBD) das proteínas DEL é mais semelhante ao DBD de E2F indicando que este domínio pode ser mais semelhante a proteína ancestral, enquanto o segundo DBD teve uma divergência maior. Este fato, em conjunto com os dados de coletas de sequências que mostraram que os organismos mais basais não possuem proteínas DEL e a comparação de aminoácidos indicam que as proteínas DEL devem ter surgido de uma possível duplicação da proteína E2F ancestral. As diferentes forças evolutivas que atuaram sobre estes dois domínios de ligação ao DNA permitiram uma

evolução independente do segundo DBD. A inclusão dos DBD das proteínas DP na análise demonstraram que estes são os que mais se diferenciaram. Este resultado indica que as proteínas DP devem ter surgido de uma duplicação de uma proteína ancestral comum a família. Entretanto, com esses dados, não foi possível determinar se esta proteína ancestral é mais relacionada às proteínas DP ou às proteínas E2F. Análises mais robustas utilizando a predição de proteínas ancestrais poderiam responder de maneira definitiva a esta pergunta.

As proteínas da família gênica E2F participam no controle de diversos processos celulares, como por exemplo o avanço do ciclo celular, a entrada em endociclo, a apoptose e replicação (Carnevale et al., 2012; de Jager et al., 2001; E et al., 2011). As análises evolutivas descritas no capítulo II desta tese aponta para uma divergência funcional dessas proteínas, divergência essa que ainda não foi sistematicamente explorada. Em mamíferos o envolvimento de E2F nas respostas aos estresses genotóxicos foi caracterizado em alguns trabalhos, sendo que o principal envolvimento relatado foi com o E2F1 de humanos (Lin et al., 2001; Pediconi et al., 2003). Este E2F específico pode ser controlado por duas proteínas DEL, nomeadas em humanos como E2F7 e E2F8 (Zalmas et al., 2008). Apesar de ser caracterizado em humanos pouco foi publicado a respeito do envolvimento destes fatores transcricionais na resposta ao dano de DNA em plantas.

Para avaliar o envolvimento dos membros da família E2F nas respostas ao dano genotóxico foram realizados experimentos com duas diferentes fontes de dano de DNA em duas plantas modelos, o arroz e a *Arabidopsis thaliana*. Outros dados foram obtidos utilizando bancos públicos de acesso a experimentos de microarranjo disponíveis para *Arabidopsis* no site eFP browser (disponível em <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Os danos genotóxicos aos quais as plantas foram expostas são luz UV-B e Metil-metano sulfonato. Com relação às análises *in silico* dos experimentos de microarranjo, os estressores acessados foram bleomicina e luz UV-B. As medidas de expressão gênica mostraram que a família gênica E2F responde ao dano aumentando a expressão de alguns membros de sua família especificamente. Esta mesma resposta foi encontrada na literatura para os genes de animais, sendo específica a um gene, E2F1, em todos os tipos de dano testados. Em plantas duas respostas diferentes foram observadas, conforme o modelo estudado. Para *Arabidopsis* o gene E2Fb responde ao estresse, independente do

estressor testado, já em arroz, MMS induz uma resposta específica do gene E2Fa/b2 e para luz UV-B o gene que respondeu foi E2Fa/b3. Todos estes genes destacados aqui, animais e plantas, são genes considerados ativadores da expressão (Sozzani et al., 2006). Além deles também foi observado o aumento de expressão dos genes E2F repressores (de Jager et al., 2009). As análises filogenéticas (Capítulos II e III) foram fundamentais para a caracterização de ativadores e repressores, o que nos permitiu entender o efeito potencial das respostas observadas nesses experimentos utilizando estressores genotóxicos. Além dos genes E2F típicos, os genes codificadores de DEL e DP também responderam ao dano aumentando sua expressão.

Além de analisar a expressão dos genes E2F, foi também analisada a expressão de genes sabidamente envolvidos em diferentes mecanismos de reparo ao DNA. Majoritariamente os genes que responderam foram genes com função de fotoliase além de genes envolvidos com mecanismos de reparo por excisão de nucleotídeos. Ambos os mecanismos são relatados como efetivos para a eliminação de dímeros de pirimidina, no caso dos danos gerados por luz UV-B, e para a remoção dos tipos de lesões geradas por um agente alquilante, o MMS (Gill et al., 2015; Mielecki e Grzesiuk, 2014). Esta resposta positiva relatando aumento da expressão desses genes mostra que as rotas de reparo foram ativadas, porém não foi possível estabelecer uma ligação direta entre o aumento de E2F e o aumento destes genes nos tempos coletados. Assim, os dados obtidos indicam que alguns membros da família E2F têm participação nas respostas a estresses genotóxicos, porém é possível que os genes ativados para o reparo não sejam ativados diretamente pelos E2F, visto que os tempos de ativação dos E2F e dos genes de reparo divergiram.

Os genes relacionados com apoptose também foram analisados e se mostraram possivelmente regulados pela família gênica E2F. Este fato já foi relatado na literatura, onde o controle de expressão mediada por E2F levou a alterações na expressão de genes envolvidos com a apoptose (Lin et al., 2001; Pediconi et al., 2003). Vários genes envolvidos com o ciclo celular também foram analisados visando avaliar uma das funções mais caracterizadas para a família E2F. Durante todos os experimentos nenhum gene envolvido com o ciclo celular teve a quantidade de seu mRNA aumentada, sendo que na maioria dos tempos ocorreu uma forte repressão de todos estes genes. Este dado correlaciona com a repressão de alguns genes E2F.

O conjunto desses resultados nos levou a propor um modelo (Figura 4, capítulo III) de ação dos genes E2F durante o dano ao DNA. Alguns membros da família gênica, como os E2F ativadores, tiveram um aumento na sua expressão sendo relacionados direta ou indiretamente com o aumento da expressão de genes envolvidos no reparo e possivelmente na apoptose. No caso dos genes que estão envolvidos com a apoptose e cuja expressão foi induzida, pode indicar que o tratamento aplicado resultou em um estresse, capaz de ativar a morte celular programada devido a severidade. Os repressores da rota, tais como E2F repressores e proteínas DEL, estão ativados possivelmente para reprimir as outras funções dessa família gênica, como o avanço do ciclo celular, bloqueando diretamente os genes ou regulando os próprios membros da família, conforme já foi descrito em mamíferos (Lammens et al., 2009). Os outros E2F ativadores estavam reprimidos ao longo de todos experimentos o que corrobora com a hipótese de autoregulação da família. Como resultado da ação desse conjunto de genes da família E2F, o organismo para de dividir as suas células, ativa os mecanismos de reparo, para voltar a se dividir após correção do defeito, ou os mecanismos de apoptose levem as células lesadas para a morte.

Demonstramos nesta tese que a evolução da família de fatores transcricionais E2F das plantas segue um padrão um pouco distinto do seguido pelos metazoários, mostrando algumas duplicações extras ao longo da história evolutiva. Além disso nosso estudo evolutivo mostrou que em plantas um segundo ponto de surgimento das proteínas E2F ativadores e repressoras, sendo caracterizado como surgindo durante a linhagem das embriófitas. As proteínas DEL, em nossas análises, surgiram de um ancestral comum mais semelhante a E2F e isto pode ter acontecido por uma duplicação da região codificadora da proteína, levando as proteínas DEL a terem uma estrutura de dois domínios protéicos. Já as proteínas DP podem ter surgido concomitante as proteínas E2F sendo que não conseguimos decifrar qual das duas é a mais antiga. Já para as análises funcionais mostramos que a família dos E2F está envolvida nas respostas ao dano de DNA em plantas. As respostas foram específicas para cada modelo utilizado e, em arroz, proteínas específicas responderam para cada agente estressor diferente. O modelo proposto mostra que as proteínas E2F controlariam o ciclo celular, a apoptose e o reparo ao DNA simultaneamente, freando o ciclo celular, ativando as rotas de reparo e, caso necessário, ativando as rotas de

apoptose. Cada proteína da família E2F possui uma resposta específica que ajuda a controlar esse panorama geral e a todos os genes necessários para essas tarefas.

Apesar dos esforços algumas perguntas ainda permanecem não respondidas. A resposta ao dano de DNA será defeituosa na ausência dessas proteínas E2F ativadoras? Como as plantas nocautes para esses genes responderiam ao longo de um estresse genotóxico? Outras funções da planta seriam afetadas? Recentemente obtivemos plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes *knockout* para o gene E2F ativador (E2Fb), o qual teve sua expressão aumentada em resposta a todos os estresses mostrados no capítulo III. Estes mutantes, em conjunto com outros mutantes para genes da família E2F, serão submetidos a estresses genotóxicos e posteriormente a diferentes testes de sensibilidade ao dano para tentar responder as questões abertas. Além disso perfis de expressão podem ser avaliados a fim de verificar as possíveis respostas da família gênica frente a falta de uma proteína específica e possivelmente a autoregulação da própria família gênica.

– Referências bibliográficas –

- Calzone, L., A. Gelay, A. Zinovyev, F. Radvanyi, and E. Barillot, 2008, A comprehensive modular map of molecular interactions in RB/E2F pathway: *Mol Syst Biol*, v. 4, p. 173.
- Cao, L. H., B. Peng, L. Yao, X. M. Zhang, K. A. Sun, X. M. Yang, and L. Yu, 2010, The ancient function of RB-E2F Pathway: insights from its evolutionary history: *Biology Direct*, v. 5, p. 21.
- Carcagno, A. L., L. E. Giono, M. C. Marazita, D. S. Castillo, N. Pregi, and E. T. Cánepa, 2012, E2F1 induces p19INK4d, a protein involved in the DNA damage response, following UV irradiation: *Mol Cell Biochem*, v. 366, p. 123-9.
- Carnevale, J., O. Palander, L. A. Seifried, and F. A. Dick, 2012, DNA damage signals through differentially modified E2F1 molecules to induce apoptosis: *Mol Cell Biol*, v. 32, p. 900-12.
- Cayirlioglu, P., P. C. Bonnette, M. R. Dickson, and R. J. Duronio, 2001, Drosophila E2f2 promotes the conversion from genomic DNA replication to gene amplification in ovarian follicle cells: *Development*, v. 128, p. 5085-98.
- Chittenden, T., D. M. Livingston, and J. A. DeCaprio, 1993, Cell cycle analysis of E2F in primary human T cells reveals novel E2F complexes and biochemically distinct forms of free E2F: *Mol Cell Biol*, v. 13, p. 3975-83.
- Cui, L., P. K. Wall, J. H. Leebens-Mack, B. G. Lindsay, D. E. Soltis, J. J. Doyle, P. S. Soltis, J. E. Carlson, K. Arumuganathan, A. Barakat, V. A. Albert, H. Ma, and C. W. dePamphilis, 2006, Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants: *Genome Res*, v. 16, p. 738-49.
- Cuomo, C. A., C. A. Desjardins, M. A. Bakowski, J. Goldberg, A. T. Ma, J. J. Becnel, E. S. Didier, L. Fan, D. I. Heiman, J. Z. Levin, S. Young, Q. Zeng, and E. R. Troemel, 2012, Microsporidian genome analysis reveals evolutionary strategies for obligate intracellular growth: *Genome Res*, v. 22, p. 2478-88.
- de Jager, S. M., M. Menges, U. M. Bauer, and J. A. Murra, 2001, Arabidopsis E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene AtCDC6 and is a member of a multigene family with differential activities: *Plant Mol Biol*, v. 47, p. 555-68.
- de Jager, S. M., S. Scofield, R. P. Huntley, A. S. Robinson, B. G. den Boer, and J. A. Murray, 2009, Dissecting regulatory pathways of G1/S control in Arabidopsis: common and distinct targets of CYCD3;1, E2Fa and E2Fc: *Plant Mol Biol*, v. 71, p. 345-65.
- De Veylder, L., T. Beeckman, G. T. Beemster, J. de Almeida Engler, S. Ormenese, S. Maes, M. Naudts, E. Van Der Schueren, A. Jacqmard, G. Engler, and D. Inzé, 2002, Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor: *EMBO J*, v. 21, p. 1360-8.
- del Pozo, J. C., M. B. Boniotti, and C. Gutierrez, 2002, Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light: *Plant Cell*, v. 14, p. 3057-71.
- del Pozo, J. C., S. Diaz-Trivino, N. Cisneros, and C. Gutierrez, 2006, The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCFSKP2A pathway in Arabidopsis: *Plant Cell*, v. 18, p. 2224-35.
- Dimova, D. K., and N. J. Dyson, 2005, The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces: *Oncogene*, v. 24, p. 2810-26.
- Dynlacht, B. D., A. Brook, M. Dembski, L. Yenush, and N. Dyson, 1994, DNA-binding and trans-activation properties of Drosophila E2F and DP proteins: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, p. 6359-63.

- E, X., M. T. Pickering, M. Debatis, J. Castillo, A. Lagadinos, S. Wang, S. Lu, and T. F. Kowalik, 2011, An E2F1-mediated DNA damage response contributes to the replication of human cytomegalovirus: *PLoS Pathog*, v. 7, p. e1001342.
- Gill, S. S., N. A. Anjum, R. Gill, M. Jha, and N. Tuteja, 2015, DNA damage and repair in plants under ultraviolet and ionizing radiations: *ScientificWorldJournal*, v. 2015, p. 250158.
- Guo, J., J. Song, F. Wang, and X. S. Zhang, 2007, Genome-wide identification and expression analysis of rice cell cycle genes: *Plant Mol Biol*, v. 64, p. 349-60.
- Harashima, H., N. Dissmeyer, and A. Schnittger, 2013, Cell cycle control across the eukaryotic kingdom: *Trends in Cell Biology*, v. 23, p. 345-356.
- Kandasamy, M. K., E. C. McKinney, R. B. Deal, A. P. Smith, and R. B. Meagher, 2009, Arabidopsis actin-related protein ARP5 in multicellular development and DNA repair: *Dev Biol*, v. 335, p. 22-32.
- Kosugi, S., and Y. Ohashi, 2002a, E2F sites that can interact with E2F proteins cloned from rice are required for meristematic tissue-specific expression of rice and tobacco proliferating cell nuclear antigen promoters: *Plant J*, v. 29, p. 45-59.
- Kosugi, S., and Y. Ohashi, 2002b, E2Fs, E2F-like repressors of Arabidopsis that bind to E2F sites in a monomeric form: *J Biol Chem*, v. 277, p. 16553-8.
- Kosugi, S., and Y. Ohashi, 2002c, Interaction of the Arabidopsis E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation: *Plant Physiol*, v. 128, p. 833-43.
- Kovesdi, I., R. Reichel, and J. R. Nevins, 1986, Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation: *Cell*, v. 45, p. 219-28.
- Kovesdi, I., R. Reichel, and J. R. Nevins, 1987, Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84, p. 2180-4.
- Kuefner, M. A., M. Brand, C. Engert, S. A. Schwab, and M. Uder, 2015, Radiation Induced DNA Double-Strand Breaks in Radiology: *Rofo*, v. 187, p. 872-8.
- Lammens, T., V. Boudolf, L. Kheibarshekan, L. P. Zalmas, T. Gaamouche, S. Maes, M. Vanstraelen, E. Kondorosj, N. B. La Thangue, W. Govaerts, D. Inzé, and L. De Veylder, 2008, Atypical E2F activity restrains APC/CCCS52A2 function obligatory for endocycle onset: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, p. 14721-6.
- Lammens, T., J. Li, G. Leone, and L. De Veylder, 2009, Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family: *Trends Cell Biol*, v. 19, p. 111-8.
- Lario, L. D., E. Ramirez-Parra, C. Gutierrez, P. Casati, and C. P. Spampinato, 2011, Regulation of plant MSH2 and MSH6 genes in the UV-B-induced DNA damage response: *J Exp Bot*, v. 62, p. 2925-37.
- Lidon, F. C., and J. C. Ramalho, 2011, Impact of UV-B irradiation on photosynthetic performance and chloroplast membrane components in *Oryza sativa* L: *J Photochem Photobiol B*, v. 104, p. 457-66.
- Lin, W. C., F. T. Lin, and J. R. Nevins, 2001, Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation: *Genes Dev*, v. 15, p. 1833-44.
- Magyar, Z., L. De Veylder, A. Atanassova, L. Bakó, D. Inzé, and L. Bögre, 2005, The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division: *Plant Cell*, v. 17, p. 2527-41.
- Mariconti, L., B. Pellegrini, R. Cantoni, R. Stevens, C. Bergounioux, R. Cella, and D. Albani, 2002, The E2F family of transcription factors from Arabidopsis thaliana. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants: *J Biol Chem*, v. 277, p. 9911-9.
- McKenzie, R. L., P. J. Aucamp, A. F. Bais, L. O. Bjorn, M. Ilyas, and S. Madronich, 2011, Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation: *Photochem Photobiol Sci*, v. 10, p. 182-98.

- Mielecki, D., and E. Grzesiuk, 2014, Ada response - a strategy for repair of alkylated DNA in bacteria: FEMS Microbiol Lett, v. 355, p. 1-11.
- Mpoloka, S. W., 2008, Effects of prolonged UV-B exposure in plants: African Journal of Biotechnology, v. 7, p. 4874-4883.
- Nikitaki, Z., I. V. Mavragani, D. A. Laskaratou, V. Gika, V. P. Moskvina, K. Theofilatos, K. Vougas, R. D. Stewart, and A. G. Georgakilas, 2016, Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: A new 'old' paradigm of how the bystanders and distant can become the players: Semin Cancer Biol, v. 37-38, p. 77-95.
- Pasteau, S., L. Loiseau, L. Arnaud, A. Trembleau, and G. Brun, 1995, Isolation and characterization of a chicken homolog of the E2F-1 transcription factor: Oncogene, v. 11, p. 1475-86.
- Pediconi, N., A. Ianari, A. Costanzo, L. Belloni, R. Gallo, L. Cimino, A. Porcellini, I. Screpanti, C. Balsano, E. Alesse, A. Gulino, and M. Levrero, 2003, Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage: Nat Cell Biol, v. 5, p. 552-8.
- Philpott, A., and S. H. Friend, 1994, E2F and its developmental regulation in *Xenopus laevis*: Mol Cell Biol, v. 14, p. 5000-9.
- Polo, S. E., and S. P. Jackson, 2011, Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications: Genes Dev, v. 25, p. 409-33.
- Pérez, D. J., M. L. Menone, E. L. Camadro, and V. J. Moreno, 2008, Genotoxicity evaluation of the insecticide endosulfan in the wetland macrophyte *Bidens laevis* L: Environ Pollut, v. 153, p. 695-8.
- Ramirez-Parra, E., C. Fründt, and C. Gutierrez, 2003, A genome-wide identification of E2F-regulated genes in *Arabidopsis*: Plant J, v. 33, p. 801-11.
- Ramírez-Parra, E., Q. Xie, M. B. Boniotti, and C. Gutierrez, 1999, The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators: Nucleic Acids Res, v. 27, p. 3527-33.
- Rank, J., 2003, The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay: ekologija, v. nr. 1, p. 5.
- Sakamoto, A. N., V. T. Lan, V. Puripunyanich, Y. Hase, Y. Yokota, N. Shikazono, M. Nakagawa, I. Narumi, and A. Tanaka, 2009, A UVB-hypersensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* is defective in the DNA damage response: Plant J, v. 60, p. 509-17.
- Sekine, M., M. Ito, K. Uemukai, Y. Maeda, H. Nakagami, and A. Shinmyo, 1999, Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants: FEBS Lett, v. 460, p. 117-22.
- Shen, W. H., 2002, The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control: Trends Plant Sci, v. 7, p. 505-11.
- Sozzani, R., C. Maggio, S. Varotto, S. Canova, C. Bergounioux, D. Albani, and R. Cella, 2006, Interplay between *Arabidopsis* activating factors E2Fb and E2Fa in cell cycle progression and development: Plant Physiol, v. 140, p. 1355-66.
- Tian, J., and J. Yu, 2009, Changes in ultrastructure and responses of antioxidant systems of algae (*Dunaliella salina*) during acclimation to enhanced ultraviolet-B radiation: J Photochem Photobiol B, v. 97, p. 152-60.
- Tuteja, N., P. Ahmad, B. B. Panda, and R. Tuteja, 2009, Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases: Mutat Res, v. 681, p. 134-49.
- Vandepoele, K., K. Vlieghe, K. Florquin, L. Hennig, G. T. Beemster, W. Gruissem, Y. Van de Peer, D. Inzé, and L. De Veylder, 2005, Genome-wide identification of potential plant E2F target genes: Plant Physiol, v. 139, p. 316-28.
- Vlieghe, K., V. Boudolf, G. T. Beemster, S. Maes, Z. Magyar, A. Atanassova, J. de Almeida Engler, R. De Groot, D. Inzé, and L. De Veylder, 2005, The DP-E2F-like gene DEL1 controls the endocycle in *Arabidopsis thaliana*: Curr Biol, v. 15, p. 59-63.

Zalmas, L. P., X. Zhao, A. L. Graham, R. Fisher, C. Reilly, A. S. Coutts, and N. B. La Thangue, 2008, DNA-damage response control of E2F7 and E2F8: *EMBO Rep*, v. 9, p. 252-9.