

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**A FAMÍLIA GÊNICA DO FATOR TRANSCRICIONAL E2F E
AS RESPOSTAS AO DANO DE DNA EM PLANTAS**

PORTO ALEGRE - RS

2009

RAFAEL RAUBER

Orientadora: Márcia Margis-Pinheiro

Co-orientadora: MSc Andréia Caverzan

**A FAMÍLIA GÊNICA DO FATOR TRANSCRICIONAL E2F E AS RESPOSTAS
AO DANO DE DNA EM PLANTAS**

**Trabalho apresentado como um dos
requisitos para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas –
Ênfase Molecular, Celular e Funcional
Banca examinadora: Dra. Andréia Carina
Turchetto Zolet e Dra. Milena Schenkel
Homrich.**

PORTO ALEGRE – RS

2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao CNPq por fornecer o suporte financeiro ao projeto e a minha bolsa de iniciação científica.

A Professora Doutora Márcia Márgis-Pinheiro por me orientar neste trabalho, pelos puxões de orelha quando precisei e os elogios quando menos esperava além de me aturar por mais de 3 anos.

A minha co-orientadora a Mestre e doutoranda Andréia Caverzan por me ajudar a tornar este trabalho realidade e também, é claro, as nossas horas de conversa pipetando.

Ao grande amigo e pesquisador Júlio César de Lima que me apresentou ao fantástico mundo da biologia molecular.

A Todos os meus colegas de laboratório, em especial os guris, por tornarem o ambiente de trabalho muito divertido e produtivo.

As Doutoradas Andréia Zolet e Milena Homrich por aceitarem ser banca deste trabalho e as quais espero não fazer chorar por muito tempo.

Ao meu pai Francisco e minha Mãe Teresa por me darem todo o suporte, principalmente financeiro e emocional, para que pudesse correr atrás de meu sonho que em parte está neste papel.

Ao meu irmão Renan, que apesar de ser o eterno gordinho e tampinha, me deu apoio quando eu precisava e quando me viu no chão: pisou, como todo bom irmão, além é claro de muitas músicas no domingo à noite pra me animar.

Ao meu colega Marc que apesar de ser gringo divide as despesas de um apartamento muito barulhento comigo e sei que após a citação de seu nome terei que pagá-lo "5 pila".

A minha colega Luisa por conviver no mesmo apartamento que é referência e diversão para os vizinhos.

E um agradecimento mais do que especial a minha namorada Sheila que, apesar da distância, sempre me aturou, me suportou e me apoiou além de fornecer o combustível para manter a chama dos meus sonhos acesa, o seu amor.

A todos o meu MUITO OBRIGADO.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E ANEXOS	1
LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMO	4
1 INTRODUÇÃO	5
1.1 O ARROZ.....	5
1.2 O ESTRESSE POR LUZ ULTRA VIOLETA.....	6
1.3 A FAMÍLIA GÊNICA E2F.....	7
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	11
3.2 MATERIAL VEGETAL.....	11
3.3 ESTRESSE POR LUZ UV.....	11
3.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	12
3.5 SÍNTESE DE cDNA A PARTIR DE RNA TOTAL.....	12
3.6 DESENHO DE PRIMERS.....	13
3.7 ANÁLISE POR PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA (qRT-PCR).....	13
4 RESULTADOS	15
4.1 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES DA FAMÍLIA E2F DE ARROZ.....	15
4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES E2F DE ARROZ E DE GENES ENVOLVIDOS NOS MECANISMOS DE REPARO DO DNA.....	17
5 DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	28
ANEXO 1	29
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

Lista de Figuras, Tabelas e Anexos

Figura 1 Caracterização dos motivos conservados dos E2F típicos, proteínas DP e E2F atípicos.	9
Figura 2. Extração de RNA total da parte aérea de plantas de arroz sob tratamento de luz UV.....	13
Figura 3. Análise filogenética dos genes E2F.....	16
Figura 4. Primeiro Domínio de Ligação ao DNA (DBD) presente nos E2F típicos e nos E2F atípicos – DEL.....	16
Figura 5. Segundo domínio de ligação ao DNA (DBD2) presente apenas nos E2F atípicos.....	17
Figura 6. Domínio de dimerização presente apenas nos E2F típicos.....	17
Figura 7. Análises por qRT-PCR do nível de expressão de dois genes envolvidos com a via de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos em resposta ao estresse com luz UV-B.....	19
Figura 8. Análises por qRT-PCR do nível de expressão de um gene envolvido na via de reparo de DNA por excisão de bases em resposta ao estresse com luz UV-B.....	20
Figura 9. Análises por qRT-PCR do nível de expressão dos membros típicos da família de fatores transcricionais de E2F: E2Fm04611 e E2Fm05530, em resposta ao estresse com luz UV-B.....	22
Figura 10. Análises por qRT-PCR do nível de expressão dos membros típicos da família de fatores transcricionais de E2F: E2Fm08489 e E2Fm08436, em resposta ao estresse com luz UV-B.....	23

Figura 11. Análises por qRT-PCR do nível de expressão de um membro atípicos da família de fatores transcricionais E2F e uma proteína DP em resposta ao estresse com luz UV-B.....24

TABELA 1. Aumento da expressão relativa dos genes em função do tempo após o estresse..... 18

ANEXO 1. Códigos de acesso dos genes identificados e *primers* utilizados para estudo de expressão.29

Lista de Abreviaturas

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CDK - kinases dependentes de ciclina

cDNA - DNA complementar

CDS - *Coding sequences*

DBD - *DNA Binding Domain*

DEL - E2F atípicos

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

dNTP - desoxirribonucleotídeos

DP - *Dimerization Partner*

DSB - *Double Strand Break*

EF - *Elongation Factor*

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

EST - *Expressed Sequence Tag*

FAO - *Food and Agriculture Organization*

FDH - Formaldeído-Desidrogenase

Mb – *Mega pares de bases*

MEGA - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro

PCD - *Programmed Cell Death*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PIP - proteína intrínseca da membrana plasmática

qRT-PCR: *quantitative Real Time - PCR*

RB - Proteína de retinoblastoma

RNA: Ácido Ribonucléico

TIGR: *The Institute of Genomic Research*

Ubi 1: Gene da ubiquitina 1 de milho

UV - Luz Ultra Violeta

UV-A - Luz Ultra Violeta Faixa A

UV-B - Luz Ultra Violeta Faixa B

RESUMO

As plantas, ao longo de sua existência, passaram por um processo evolutivo que, devido a sua falta de locomoção e sua dependência da luz solar para a fotossíntese, foi diferente para este grupo de organismos. Como consequência, as plantas possuem atualmente, mecanismos de defesa bem desenvolvidos contra diversos estresses, alguns dos quais afetam direta ou indiretamente o DNA. Entre os de efeito direto pode-se citar a radiação ultra violeta que pode atuar gerando, por exemplo, dímeros de pirimidina; os estresses que atuam indiretamente produzem Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) que são igualmente genotóxicas. Em resposta aos estresses genotóxicos são ativadas diversas rotas bioquímicas complexas que ainda não estão bem descritas, tanto em nível fisiológico e bioquímico, quanto em nível genético e molecular. Dados recentes estabeleceram uma ligação entre a resposta à quebra na fita dupla (*Double Strand Break* – DSB) e a ativação de genes alvos de E2F. Em mamíferos, os fatores de transcrição E2F têm sido muito estudados. Esta família gênica apresenta similaridades entre plantas e mamíferos, tanto em nível estrutural quanto funcional. A família gênica do E2F possui membros que desempenham funções diversas tais como a progressão do ciclo celular, diferenciação e apoptose. Neste trabalho foram identificados, em arroz, diversos genes pertencentes a esta família. Foram encontrados quatro genes representantes da classe dos E2F típicos e mais dois genes representantes dos E2F atípicos (E2F/DEL), além disso, foram identificados três genes correspondentes a genes que codificam a proteína DP, uma proteína que dimeriza com os E2F típicos, além de uma sequência de proteína do Retinoblastoma que faz parte da rota de controle de expressão da família. Além disso, foi analisado o padrão de expressão gênica da família de E2F em arroz em resposta à radiação com luz UV-B em comparação com plantas controle não-tratadas. Os resultados indicaram que todos os genes da família E2F apresentaram expressão aumentada em resposta a este tipo de estresse genotóxico, e que esta expressão está correlacionada com a indução de genes de reparo nas plantas tratadas.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ARROZ

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais importantes do mundo, sendo cultivado e consumido em todos os continentes. Devido a sua ampla produção e área de cultivo, essa cultura contribui de maneira considerável tanto no aspecto econômico quanto no aspecto social. Segundo dados do FAO (*Food and Agriculture Organization*), o arroz, em 2008, teve produção mundial de aproximadamente 690 milhões de toneladas, sendo que esse número apresentou um decréscimo, em 2009, de 1,8% chegando a 668 milhões de toneladas. Quanto a área mundial cultivada, aproximadamente 160 milhões de hectares são ocupados para o seu plantio. A EMBRAPA, em 2007, cita que cerca de 75% da produção em 2005 foi oriunda de arroz irrigado.

Este cereal é a cultura alimentar de maior importância na maioria dos países em desenvolvimento, sendo ele o alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas possuindo um excelente balanço nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína *per capita* necessária a dieta humana. Estima-se que até 2050 a demanda pelo cereal deverá dobrar (EMBRAPA 2009). A média estimada de consumo anual de arroz em 2007-2008 foi de 57,1 kg por pessoa (FAO, 2007).

Por ser uma cultura extremamente versátil, que tem facilidade de adaptação a diferentes condições de solo e clima, o arroz é considerado a espécie que apresenta um dos maiores potenciais de combate a fome no mundo. O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais de arroz, com cerca de 11 milhões de toneladas para um consumo de 11,7 milhões de toneladas (EMBRAPA 2007).

Na agricultura, a produtividade é afetada pelas condições ambientais adversas que podem provocar grandes perdas. Portanto, o aumento da produtividade na agricultura e a segurança alimentar global está diretamente relacionada com os estresses ambientais enfrentados pelas culturas (DHALIWHAL & ARORA, 1999).

O arroz (*Oryza sativa*) é considerado a planta modelo de estudos entre as monocotiledôneas, assim como *Arabidopsis* é considerada a planta modelo para as dicotiledôneas. É um organismo diplóide com 24 cromossomos e com genoma de 390 megabases (Mb), o menor entre os cereais. A sintonia do genoma de arroz com o de outros cereais como milho e trigo, o progresso nos protocolos de transformação mediada por *Agrobacterium*, a disponibilidade de etiquetas de genes expressos ou ESTs (do inglês, “*Expressed Sequence Tags*”) e de mapas moleculares saturados, fazem do arroz um organismo modelo para estudos fisiológicos, genéticos e de evolução dentre as plantas, principalmente em relação às monocotiledôneas (GALE & DEVOS, 1998; SHIMAMOTO & KYOZUKA, 2002). Tendo em vista que o arroz é uma espécie modelo para estudos de genômica nas gramíneas, fica evidente que o estudo do seu genoma terá um grande impacto na agricultura do século 21.

1.2 O ESTRESSE POR LUZ ULTRA VIOLETA

As plantas estão sob constante efeito de fatores endógenos e exógenos que afetam a integridade do DNA. Em resposta, são ativadas complexas redes de sinalização visando bloquear o efeito provocado por esses estressores. Devido ao seu caráter sésbil e a dependência da luz solar para a fotossíntese, as plantas estão freqüentemente expostas a diversos agentes que danificam o DNA (genotoxinas).

Um agente fortemente genotóxico é a luz Ultra Violeta (UV). Essas ondas de comprimento entre 220 e 400 nm são emitidas pela luz solar. Entre as subdivisões da luz ultravioleta se encontra a luz UV-B com comprimento de onda entre 280 e 320 nm, sendo ela o componente mais energético da luz solar que chega à superfície terrestre. Este comprimento de onda interage com o DNA modificando suas bases ou provocando sua interação bloqueando, assim, os processos no qual o DNA está envolvido (MPOLOKA, 2008).

Quase toda a radiação UV-C danosa e maior parte da radiação UV-B é filtrada pela camada de ozônio. O aumento dos índices de UV-B atingindo a superfície terrestre se deve à destruição acelerada do escudo de ozônio

estratosférico devido à poluição do ar por compostos criados pelo ser humano (MPOLOKA, 2008).

Análises genéticas e bioquímicas recentes têm permitido um avanço no entendimento da percepção e da sinalização deste tipo de estresse. Entretanto, os componentes 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 de como a sinalização das respostas ao dano no DNA evoluiu nas plantas.

1.3 A FAMÍLIA GÊNICA E2F

Em mamíferos, a família gênica que codifica os fatores de transcrição E2F tem sido extensivamente estudada. Esta família possui membros que desempenham funções diversas tais como a progressão do ciclo celular, transição G1/S, segregação e condensação do cromossomo, replicação do DNA e reparo, além de diferenciação e apoptose. Os genes da família do fator transcricional E2F apresentam similaridades entre plantas e mamíferos, tanto em nível estrutural quanto funcional (como fortes reguladores do ciclo celular)(RAMÍREZ-PARRA *et al*, 1999). No contexto das respostas ao dano de DNA, dados recentes estabeleceram uma ligação entre a resposta à quebra na fita dupla (*double strand break* – DSB) e a ativação de genes alvos de E2F, mas o envolvimento de E2F em morte celular programada (*programmed cell death* – PCD) em plantas não é conhecido (BLAIS & DYNLACHT, 2004; INZE, 2005).

A família gênica de fatores de transcrição E2F é composta por dois tipos de proteínas: os E2F típicos e os atípicos. Todos os genes possuem estruturas bem caracterizadas para a planta modelo *Arabidopsis thaliana* (MARICONTI *et al*, 2002). Para os E2F típicos os domínios bem descritos são: um domínio de ligação ao DNA responsável pela interação da proteína com os 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*” que é necessária para interação proteína-proteína que

confere especificidade à resposta transcricional, um domínio de transativação e um domínio de ligação à proteína do Retinoblastoma (RB). As proteínas referentes aos E2F atípicos, também descritos como proteínas DEL (E2F/DEL) possuem uma organização diferente, com apenas dois domínios de ligação ao DNA descritos (LAMMENS *et al*, 2009) (figura 1).

As proteínas DP (Dimerization Partner) também possuem um domínio de ligação ao DNA e um domínio de heterodimerização, o que condiz com o possível mecanismo de atuação deste complexo protéico (figura 1). Segundo este modelo, as proteínas de E2F típicos interagem e formam heterodímeros com a proteína DP, formando assim uma proteína com dois domínios de ligação ao DNA. Esta ligação ao DNA promove a ativação da transcrição. Por outro lado, os E2F/DEL teriam um efeito antagônico uma vez que possuem os dois domínios de ligação ao DNA e não possuem os domínios responsáveis pela ativação da transcrição. Como estas proteínas ocupam a mesma sequência a qual se liga o heterodímero E2F-DP bloqueiam assim o efeito desse complexo produzindo um efeito repressor por competição pela sequência consenso de ligação destes fatores de transcrição. (LAMMENS *et al*, 2009). Este motivo de ligação é bem descrito e bem conservado entre plantas e outros animais, inclusive o ser humano. A sequência consenso é: (TTTCCCGC) (JAGER *et al*, 2001).

Além disso, ainda existe outra rota de regulação da transcrição pelas proteínas da família E2F. Esta via é controlada pela proteína de retinoblastoma (RB). Experimentos *in vitro* demonstraram alta afinidade entre a proteína RB e o complexo E2F/DP. Em animais, a proteína RB se liga ao heterodímero E2F/DP em um local correspondente ao domínio de transativação C-terminal. Esta ligação faz com que se promova a inibição do complexo com consequente inibição da transcrição. Para o desligamento da proteína RB do complexo E2F/DP a proteína RB deve ser fosforilada por diversas kinases dependentes de ciclinas (CDK), fazendo com que esta perca sua afinidade pelo complexo e o torne livre para ativar a transcrição dos genes alvo. Este sistema foi encontrado na maioria dos eucariotos, inclusive em plantas superiores, sugerindo que este mecanismo seja conservado (SHEN, 2002).

Esta família gênica possui nove membros em *Arabidopsis thaliana* sendo três E2F típicos, três E2F atípicos e duas proteínas DP (MARICONTI *et al*, 2002).

Até o momento para o *Nicotiana tabacum* foi descrito apenas um membro da família E2F sendo descrito como ntE2F (SEKINE *et al*, 1999) e para trigo foi descrito um E2F sendo nominado TmE2F além de uma proteína DP (RAMÍREZ-PARRA *et al*, 1999 – RAMÍREZ-PARRA & GUTIERREZ, 2000). Para mamíferos já foram caracterizados oito membros da família gênica E2F sendo seis E2F típicos e dois E2F atípicos além de duas proteínas DP (DYSON, 1999 – ZALMAS *et al* 2008)

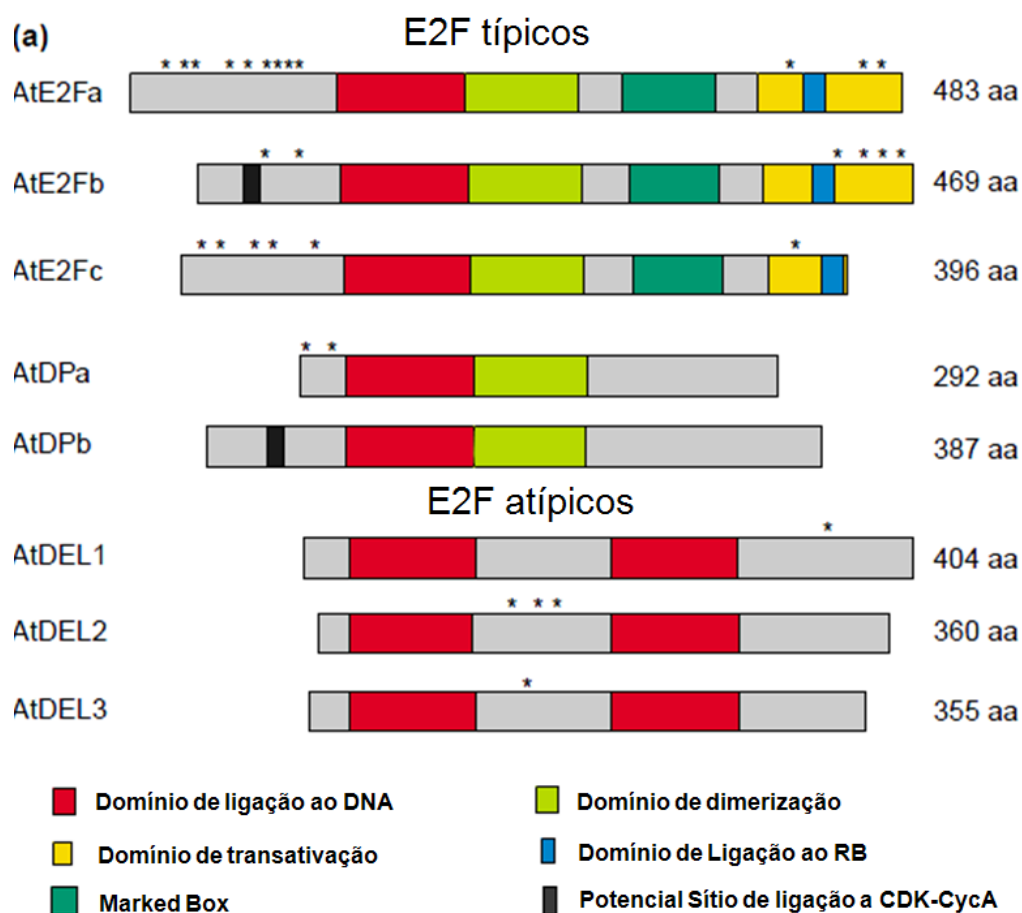


Figura 1 Caracterização dos motivos conservados dos E2F típicos, proteínas DP e E2F atípicos. Domínios caracterizados para *Arabidopsis thaliana*. Figura modificada de SHEN (2005).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar a estrutura e a expressão dos genes da família E2F em arroz em resposta a um estresse genotóxico visando entender as relações entre estes fatores de transcrição e as respostas ao dano de DNA em plantas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar genes que codificam fatores de transcrição da família E2F no genoma do arroz através de análises *in silico*.
- 2) Confirmar a identidade desses genes através de análises filogenéticas incluindo genes desta família presentes em *A thaliana*
- 3) Caracterizar o padrão de expressão dos genes da família E2F em folhas de arroz em resposta ao tratamento com radiação UV.
- 4) Relacionar o padrão de expressão dos genes E2F e os genes de reparo ao dano do DNA em arroz em função do tratamento com UV.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANÁLISES *IN SILICO*

A busca dos genes pertencentes a família gênica E2F foi realizada utilizando o bancos de dados TIGR (*The Institute of Genomic Research*) que contém o genoma completo do arroz assim como ESTs (*expressed sequence tag*).

Utilizando-se da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) foram obtidas as sequências presentes no genoma do arroz utilizando como “query” as sequências dos membros desta família gênica descritas para *Arabidopsis thaliana* (MARICONTI *et al*, 2002). Para confirmação da existência das prováveis seqüências de E2F encontradas utilizamos o banco de dados GRAMENE, além do banco de dados PHYTOZOME.

Para alinhar e confirmar a identidade dos novos genes E2F identificados em arroz foi utilizado o programa MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)(TAMURA *et al*, 2008). As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências da família de E2F de *A. thaliana* com o objetivo de confirmar a presença dos domínios existentes nessas proteínas. Além disso, foram construídas árvores filogenéticas utilizando o método de Neighbour-Joining também disponível no programa MEGA 4.0. Nas árvores produzidas foram utilizadas as codificadoras dos genes utilizando-se dos aminoácidos preditos pelo programa. Esta árvores foram construídas utilizando-se 1000 replicatas.

3.2 MATERIAL VEGETAL

40 Plantas de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare) foram usadas neste estudo. As plantas foram crescidas em casa de vegetação à temperatura de 28°C e foto-período de 16/8h em potes permanentemente submersos em bandejas com água.

3.3 ESTRESSE POR LUZ UV-B

As plantas de arroz foram submetidas à radiação com luz Ultravioleta B (UV-B) conforme descrito a seguir. 20 Plantas não-tratadas foram mantidas nas mesmas condições das 20 plantas estressadas a temperatura (28°C) e fotoperíodo (16/8 horas de claro/escuro), porém sem a presença de luz UV. Foram realizadas duas aplicações de 4 horas de estresse com luz UV-B com intervalo de 20 horas entre os tratamentos. Após o segundo estresse, foi coletada a parte aérea de duas plantas e estas formaram uma amostra correspondente a uma das 4 replicatas biológicas que foram utilizadas para cada tempo de coleta. Estes tempos de coleta foram: 0 hora (logo após o segundo estresse), 30 minutos, 2 horas, 6 horas e 24 horas após o segundo tratamento. As amostras de tecido vegetal (parte aérea) foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer -80°C até o momento da extração.

3.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

A extração do RNA total foi realizada com o reagente TRIZOL (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. A figura 2 é representativa do perfil de RNA que foi obtido utilizando esse reagente.

3.5 SÍNTESE DE CDNA A PARTIR DE RNA TOTAL

A síntese de cDNA a partir de RNA total foi realizada utilizando-se a enzima M-MLV *Reverse Transcriptase* (Promega) seguindo-se as recomendações do fabricante, com as seguintes adaptações: em um volume final de 20 µL, foi utilizado uma quantidade inicial de 2 µL de RNA total de arroz (1µg de RNA total), 1 µL do oligonucleotídeo poli-T (1 µg/µL), 1µL de desoxirribonucleotídeos (dNTP) a 10 mM, 8 µL de água Milliq ultra-pura. Visando desnaturar o RNA, a solução foi incubada à 65°C por 5 minutos e imediatamente incubada em gelo por mais 5 minutos. A seguir, 4 µL de tampão 2,5X (*First Strand Buffer 2,5X*), 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de H₂O, 1 µL de M-MLV *Reverse Transcriptase* (200 U/µL) foram adicionados à solução. A reação foi mantida a 37°C por 2 horas e em seguida incubada a 70°C por 15 minutos. A qualidade dos cDNAs foi verificada por PCR usando *primers* para os genes constitutivos FDH e/ou PiP.

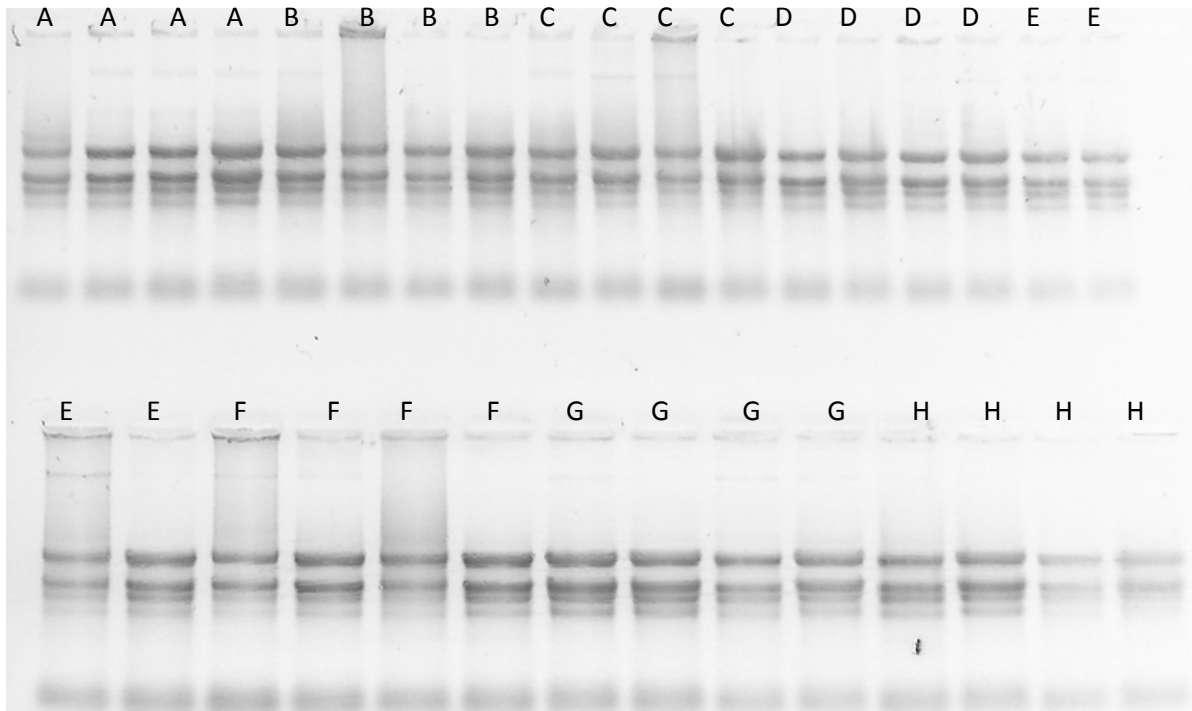


Figura 2. Extração de RNA total da parte aérea de plantas de arroz sob tratamento de luz UV: Imagem de eletroforese em gel de agarose a 1% mostrando a presença do RNA total nas plantas utilizadas por tratamento. Cada letra corresponde a um conjunto de quadruplicatas biológicas seguindo os tempos de coleta: **A** controle 0h. **B** estressadas 0h. **C** controle 30 min. **D** estressadas 30 min. **E** controle 2 h. **F** estressadas 2h. **G** controle 6 h. **H** estressadas 6h.

3.6 DESENHO DE PRIMERS

As seqüências CDS obtidas e confirmadas de E2F foram utilizadas para a construção de oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) para cada membro da família gênica usando a ferramenta *primer3* (ROZEN & SKALETSKY, 2000). Os *primers* foram desenhados para produzir fragmentos de 180 a 250 pb para as análises de PCR em tempo real. A temperatura de fusão de todos os iniciadores foi ajustada para 60 °C.

3.7. ANÁLISE POR PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA (qRT-PCR)

A determinação da expressão relativa de cada um dos genes da família E2F foi realizada pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

As reações de qRT-PCR foram realizadas em aparelho Step One Plus (Applied Biosystem). As condições de reação seguiram os seguintes parâmetros: uma etapa de desnaturação inicial de 5 min a 94 °C, seguida por 35 ciclos de 10 s a 94 °C, 15 s a 60 °C, e 15 s a 72 °C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas por 2 min a 40 °C para reanelamento e então aquecidas de 55 até 99 °C com uma taxa de incremento de 0.2 °C/s para aquisição de dados e obtenção da curva de desnaturação. As reações foram feitas em um volume final de 20 µl contendo 10 µl do produto da transcrição reversa (diluída 100 vezes em tampão Tris-EDTA), 2 µl de tampão PCR 10x (Invitrogen), 1.2 µl de MgCl₂ 50 mM, 0.4 µl de dNTPs 5 mM, 0.4 µl de cada par de iniciadores específicos 10 µM, 3.95 µl de água ultra pura, 2.0 µl de SYBR green (1:100,000, Molecular Probes), e 0.05 µl de Platinum Taq DNA polimerase (5 U/µl, Invitrogen). Pares de *primers* que amplificam genes constitutivos como o fator de alongação (eF; código de acesso no GenBank AJ252135); Ubiquitina (Ubi; código de acesso no GenBank AK103230) formaldeído-desidrogenase (FDH; código de acesso no GenBank U77637.1) foram usados como controle interno para normalizar a quantidade de mRNA presente em cada amostra. Todos os resultados foram expressos através de quantificação relativa a um conjunto desses genes constitutivos, utilizando-se a metodologia $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrita por LIVAK & SCHMITTGEN (2001). Os experimentos foram realizados em quadruplicatas técnicas.

4 RESULTADOS

4.1: IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES DA FAMÍLIA E2F DE ARROZ

As buscas no genoma do arroz permitiram a identificação de seis genes que codificam fatores de transcrição da família E2F, sendo quatro destes correspondentes a E2F típicos e dois correspondentes a E2F/DEL (E2F atípicos), além de três genes que possivelmente codificam proteínas DP. Além disso, um gene que codifica a proteína RB foi também identificado. Nas análises seguintes foi utilizado o número de acesso da CDS (coding sequences) presente no genebank. As informações a respeito das sequências se encontram no ANEXO 1.

Para confirmar a identidade dos genes identificados, foram realizadas análises filogenéticas utilizando dez seqüências correspondentes a genes que codificam fatores de transcrição da família E2F da planta *A. thaliana*, uma seqüência correspondente ao único gene da família E2F descrita em trigo, além dos genes encontrados nos bancos de dados de arroz, somando assim um total de vinte e duas seqüências. Todas as seqüências utilizadas eram CDS. A árvore que está descrita na figura 3 foi gerada pelo método de distância Neighbour-Joining utilizando 1000 replicatas.

Os resultados mostram que os genes de arroz agruparam com os membros da família de E2F formando quatro grupos bem definidos (bootstrap de 100). O primeiro grupo foi das proteínas E2F típicas, o segundo de proteínas E2F atípicas, um grupo de proteínas DP e outro com proteínas Rb. Além disso, utilizando a ferramenta de alinhamento do próprio programa, foi verificado uma similaridade muito grande entre os aminoácidos do primeiro domínio de ligação ao DNA presente nas proteínas E2F típicas e atípicas (figura 4). Também foi verificada a similaridade de aminoácidos entre o segundo domínio de ligação ao DNA apenas presente em E2F atípicos (figura 5) e a semelhança entre o domínio de dimerização presente apenas em E2F típicos (figura 6).

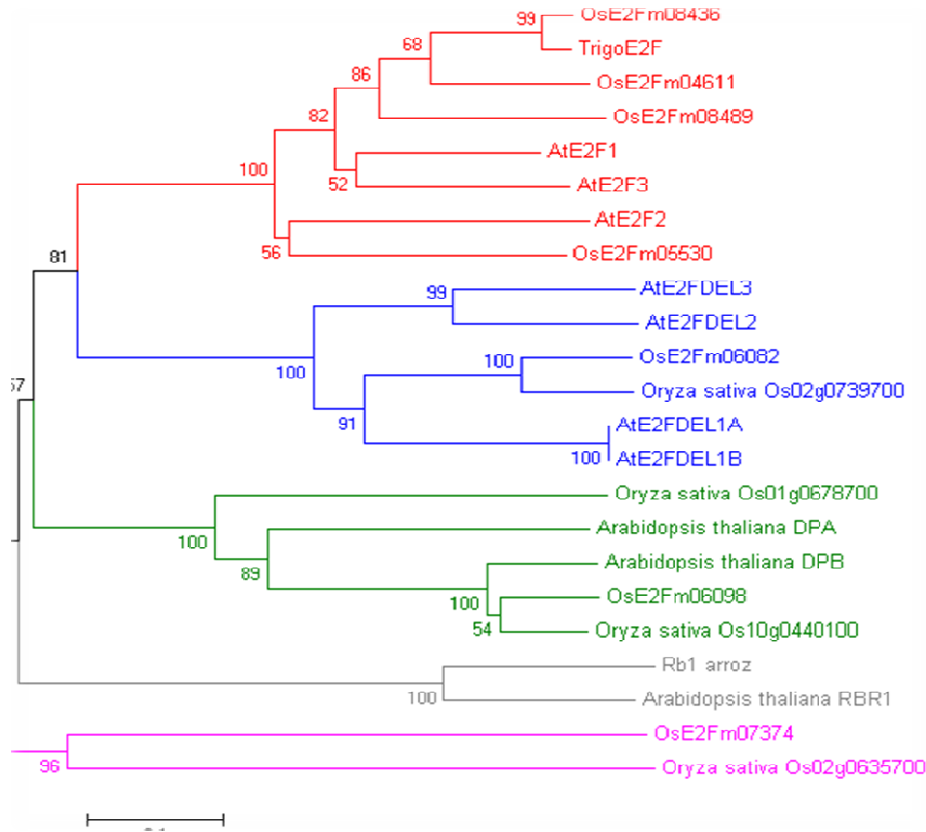


Figura 3. Cladograma gerado utilizando genes E2F. A árvore filogenética foi construída utilizando o método de distância Neighbour-Joining disponível no programa MEGA 4.0. Foram utilizadas as sequências de *A. thaliana*, trigo e arroz. Em vermelho E2F típicos, em azul E2F atípicos, em verde proteínas DP, em cinza proteínas RB e em rosa proteínas fosforiladas E2F *like*.

AtE2F1	C	V	D	S	L	G	L	L	K	F	I	L	I	A	E	N	G	I	L	D	L	K	A	A	D	L	E	V	K	R	F	I	Y	D	I	V	L	E	G	I	G	L	I	P	K	L	K	R	I	L	K	G				
AtE2F2	C	V	D	S	L	G	L	L	K	F	V	L	I	E	A	E	N	G	L	D	L	V	C	A	V	V	L	E	V	K	R	F	I	Y	D	I	V	L	E	G	I	G	L	I	P	K	L	K	R	I	L	K	G			
AtE2F3	C	V	D	S	L	G	L	L	K	F	V	L	I	K	A	E	N	G	L	D	L	V	C	A	V	V	L	E	V	K	R	F	I	Y	D	I	V	L	E	G	I	G	L	I	P	K	L	K	R	I	L	K	G			
OsE2Fm08436 / E2F	C	V	D	S	L	G	L	L	K	F	I	L	L	A	A	E	N	G	I	L	D	L	K	A	A	D	L	E	V	K	R	F	I	Y	D	I	V	L	E	G	I	G	L	I	P	K	L	K	R	I	L	K	G			
OsE2Fm08489 / E2F	C	V	D	S	L	G	L	L	K	F	I	L	L	A	A	E	N	G	I	L	D	L	D	A	A	K	I	L	D	V	K	R	F	I	Y	D	I	V	L	E	G	I	G	L	I	P	K	L	K	R	I	L	K	G		
OsE2Fm04611 / E2F	C	V	D	S	L	G	L	L	K	F	L	L	L	G	A	E	N	G	I	V	D	L	K	A	A	E	L	E	V	K	R	F	I	Y	D	I	V	L	E	G	I	G	L	I	P	K	L	K	R	I	L	K	G			
OsE2Fm05530 / E2F	C	V	D	S	L	G	L	L	K	F	I	L	L	E	G	A	E	N	G	L	D	L	K	A	A	E	L	E	V	K	R	F	I	Y	D	I	V	L	E	G	V	D	L	I	E	K	L	K	R	I	L	K	G			
OsE2Fm06082 / DEL	S	R	K	K	L	G	L	L	S	F	V	A	L	D	R	E	D	V	E	S	V	G	L	D	D	A	A	R	L	G	V	E	R	R	F	I	Y	D	I	V	L	E	I	G	M	L	V	R	A	A	R	I	G			
Oryza sativa Os02g0739700 / DEL	S	R	K	K	L	G	L	L	S	F	V	A	L	D	R	E	D	V	E	S	I	G	L	D	D	A	A	R	L	G	V	E	R	R	F	I	Y	D	I	V	L	E	V	G	I	L	V	R	A	A	R	I	G			
AtE2FDEL3	S	R	K	K	L	G	V	L	V	S	F	L	L	L	D	V	D	V	E	L	I	G	L	D	D	A	A	G	L	G	V	E	R	R	F	I	Y	D	V	V	I	L	E	I	G	I	V	A	R	G	K	R	I	L	K	G
AtE2FDEL1A	S	R	K	K	L	G	L	L	S	F	L	A	L	L	R	E	G	I	E	M	V	G	L	D	D	A	A	R	L	G	V	E	R	R	F	I	Y	D	I	V	L	E	V	G	V	L	R	E	A	K	R	I	L	K	G	
AtE2FDEL1B	S	R	K	K	L	G	L	L	S	F	L	A	L	L	R	E	G	I	E	M	V	G	L	D	D	A	A	R	L	G	V	E	R	R	F	I	Y	D	I	V	L	E	V	G	V	L	R	E	A	K	R	I	L	K	G	
AtE2FDEL2	S	R	K	K	L	G	V	L	V	A	F	L	L	L	D	V	D	V	E	L	F	G	L	D	D	A	A	R	L	G	V	E	R	R	F	I	Y	D	V	V	I	L	E	I	G	L	V	A	R	G	K	R	I	L	K	G

Figura 4. Primeiro Domínio de Ligação ao DNA (DBD) presente nos E2F típicos e nos E2F atípicos – DEL. Sequências de aminoácidos predita pelo programa MEGA utilizando-se o domínio completo. Domínio presente em *A. thaliana* caracterizado por MARICONTI *et al*, 2002). E2F típicos circundados em vermelho. E2F/DEL circundadas em verde

TABELA 1. Aumento da expressão relativa dos genes em função do tempo após o estresse. Os números indicam quantas vezes o nível de expressão está aumentado em relação ao nível detectado nas plantas controle, não estressadas

Loci E2F / DEL	0	30 min	2h	6h	24h
E2Fm04611	4X	3X	15X	131X	2X
E2Fm05530	5X	11X	10X	17X	2X
E2Fm08436	3X	3X	6X	13X	1X
E2Fm08489	3X	2X	9X	11X	1X
E2Fm06082 - DEL	2X	5X	14X	7X	1X
E2Fm06098 - DP	2X	4X	7X	15X	1X
Loci Genes reparo					
UGLY	2X	2X	14X	38X	1X
RAD1	2X	6X	9X	3X	1X
UVR3	5X	7X	5X	9X	1X

As figuras 7 e 8 mostram os padrões de expressão dos genes de reparo em resposta ao tratamento com radiação UV-B. Os resultados obtidos mostram que os genes envolvidos na rota de reparo ao DNA possuem expressão diferenciada. O gene UV3 possui a expressão relativa aproximadamente 5 vezes maior imediatamente após o término do tratamento (tempo zero), tendo o seu maior aumento, 9 vezes, 6 horas após e voltando aos patamares iniciais no tempo 24h. Semelhante a esse padrão está o demonstrado pelo gene da Uracil DNA glycosilase, onde já no tempo zero a expressão está o dobro da situação controle, tendo seu pico máximo, aproximadamente 38 vezes maior, no tempo 6 horas e voltando ao nível basal em 24 h. O gene RAD-1 teve um padrão um pouco diferente, mas ainda assim com a quantidade dobrada de mRNA no tempo zero, com um pico em 2 horas de aproximadamente 9 vezes maior, também voltando ao nível do controle em 24 horas.

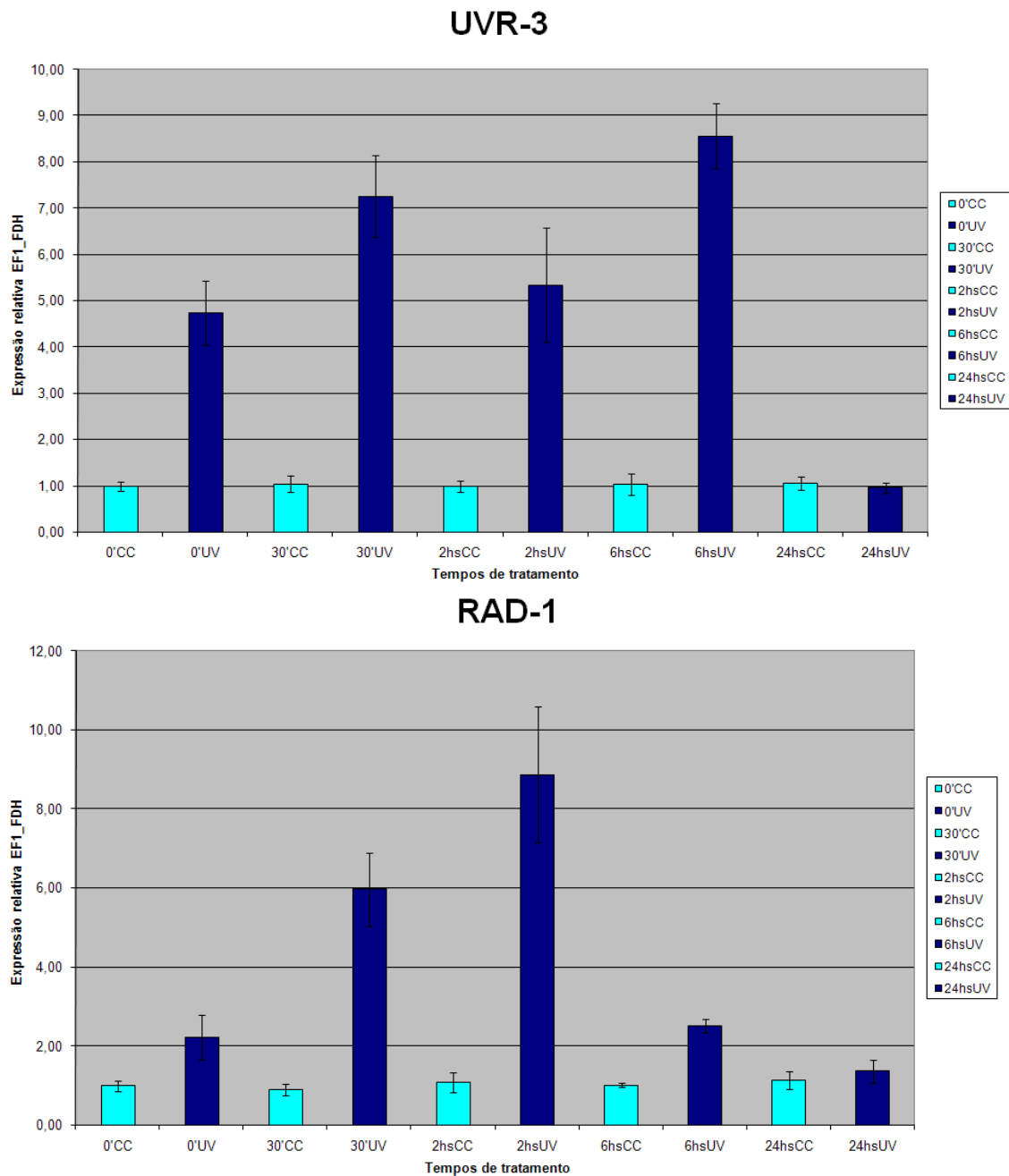


Figura 7. Análises por qRT-PCR do nível de expressão de dois genes envolvidos com a via de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos em resposta ao estresse com luz UV-B. As análises foram realizadas em plantas submetidas a luz ultravioleta por dois períodos de 4 horas com intervalo de 20 horas e coletadas em 0h, 30 minutos, 2, 6 e 24 horas após o estresse. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *fdh* e *ef*

Uracil DNA Glycosilase (UGLY)

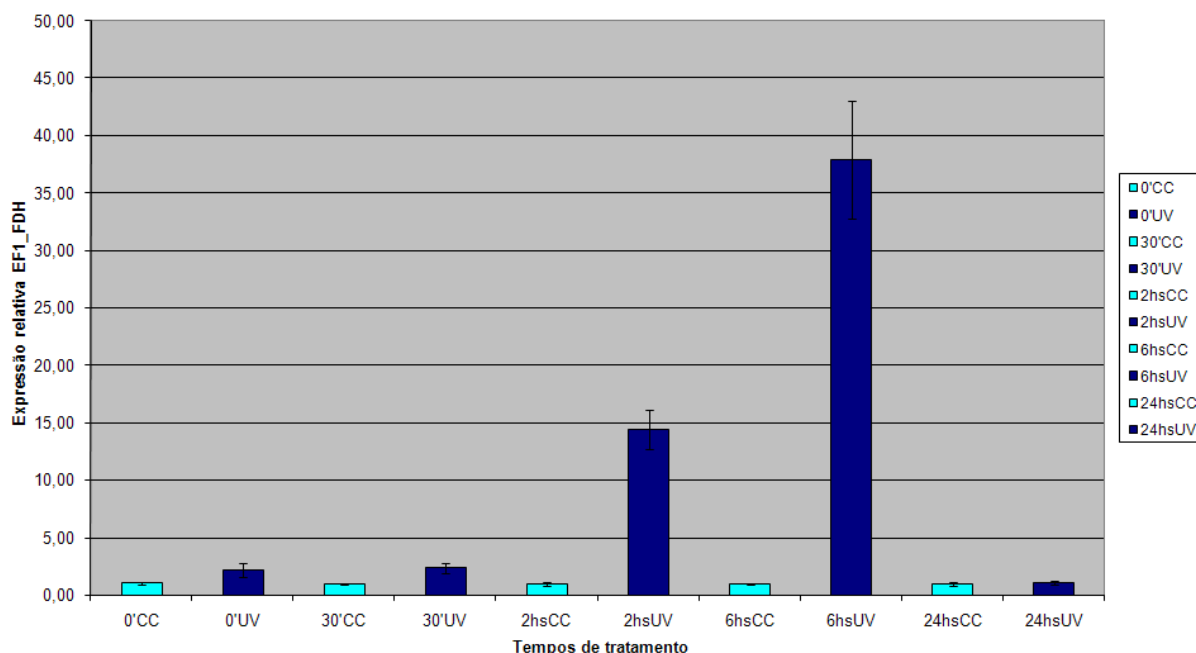


Figura 8. Análises por qRT-PCR do nível de expressão de um gene envolvido na via de reparo de DNA por excisão de bases em resposta ao estresse com luz UV-B. As análises foram realizadas em plantas submetidas a luz ultravioleta por dois períodos de 4 horas com intervalo de 20 horas e coletadas em 0h, 30 minutos, 2, 6 e 24 horas após o estresse. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *fdh* e *ef*.

As figuras 9, 10 e 11 mostram os padrões de expressão da família gênica dos E2F em arroz. As análises do padrão de expressão desses genes indicaram um aumento na expressão dos genes de E2F nos diferentes tempos de tratamento com a luz UV-B. Os genes de E2F típicos tiveram um padrão semelhante de resposta. O gene denominado E2Fm08489, um E2F típico, teve um aumento de aproximadamente três vezes já no tempo zero, com pico de expressão em 6 horas com um valor aproximadamente 11 vezes maior em relação à situação controle. Essa expressão é reduzida nas plantas tratadas 24 horas após o tratamento com níveis um pouco menores que a situação controle. O gene E2Fm08436 seguiu o mesmo padrão tendo sua expressão aumentada em 3 vezes no tempo zero, com máximo de expressão em 6 horas com valor de até 13 vezes mais alto, e expressão pouco abaixo do controle em 24 horas. O gene

E2Fm04611 foi o gene que mais respondeu, tendo já no tempo zero um valor de 4 vezes maior que o controle, tendo seu pico de expressão em 6 horas com aproximadamente 131 vezes mais mRNA presente, voltando a patamares quase normais em 24 horas. E ainda o gene E2Fm05530 com um aumento de 5 vezes no tempo zero, pico em 6 horas com uma expressão 17 vezes maior, e quantidade parecida a situação controle em 24 h.

O gene correspondente a proteína DP, E2Fm06098, apresentou o mesmo padrão de resposta que os genes de E2F típicos descritos acima, com um aumento no tempo zero, máximo de expressão, de 15 vezes em relação ao controle, em 6 horas após o tratamento. No tempo de 24 horas após o estresse, a expressão volta a níveis semelhante ao das plantas controle.

Em contraponto, o gene correspondente a E2F atípico, E2Fm06082, teve sua expressão dobrada no tempo zero, com máximo de resposta em 2 horas onde apresentou um aumento relativo de aproximadamente 14 vezes, e retorno a níveis iguais ao controle em 24 horas.

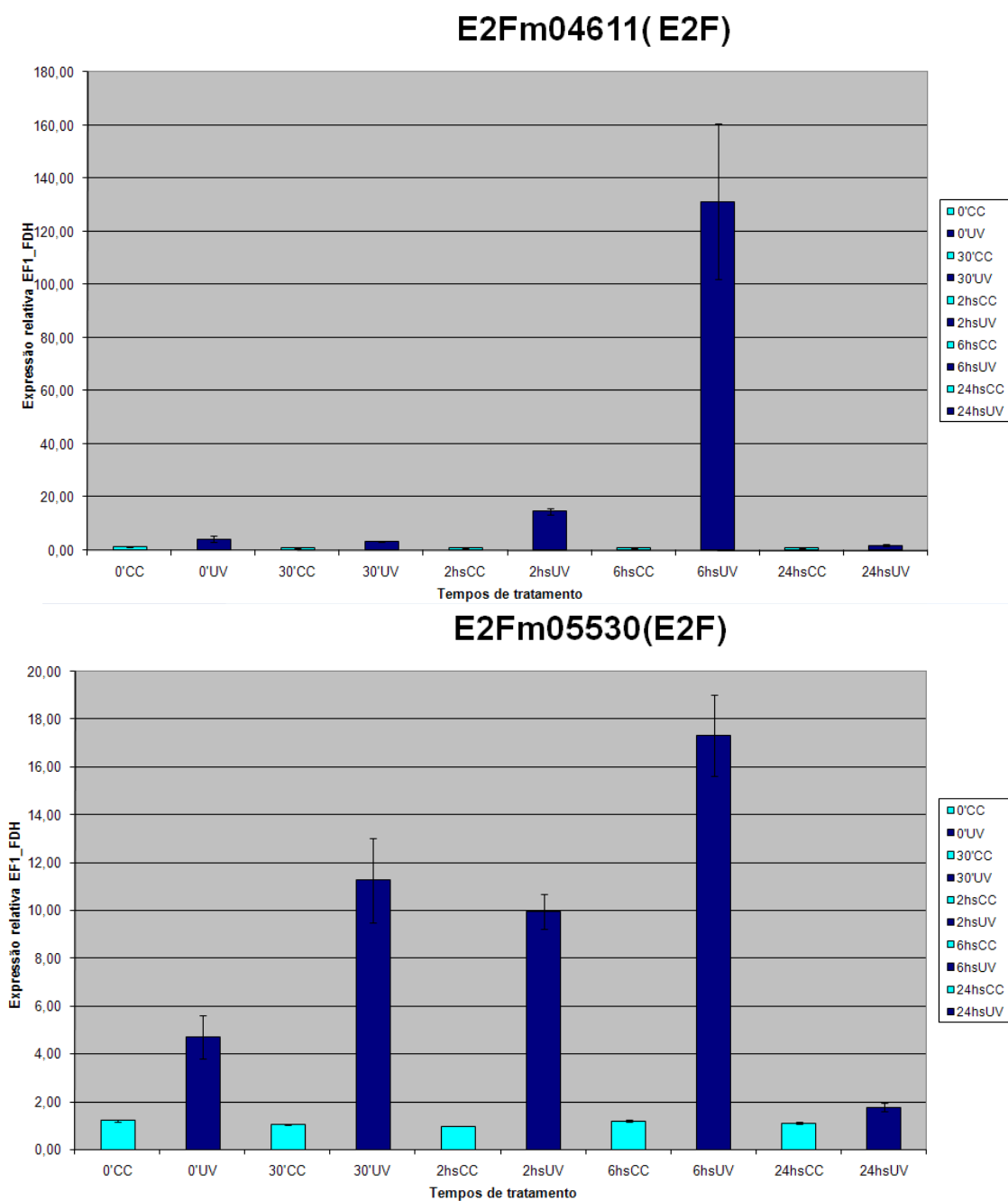


Figura 9. Análises por qRT-PCR do nível de expressão dos membros típicos da família de fatores transcricionais de E2F: E2Fm04611 e E2Fm05530, em resposta ao estresse com luz UV-B. As análises foram realizadas em plantas submetidas a luz ultravioleta por dois períodos de 4 horas com intervalo de 20 horas e coletadas em 0h, 30 minutos, 2, 6 e 24 horas após o estresse. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *fdh* e *ef*.

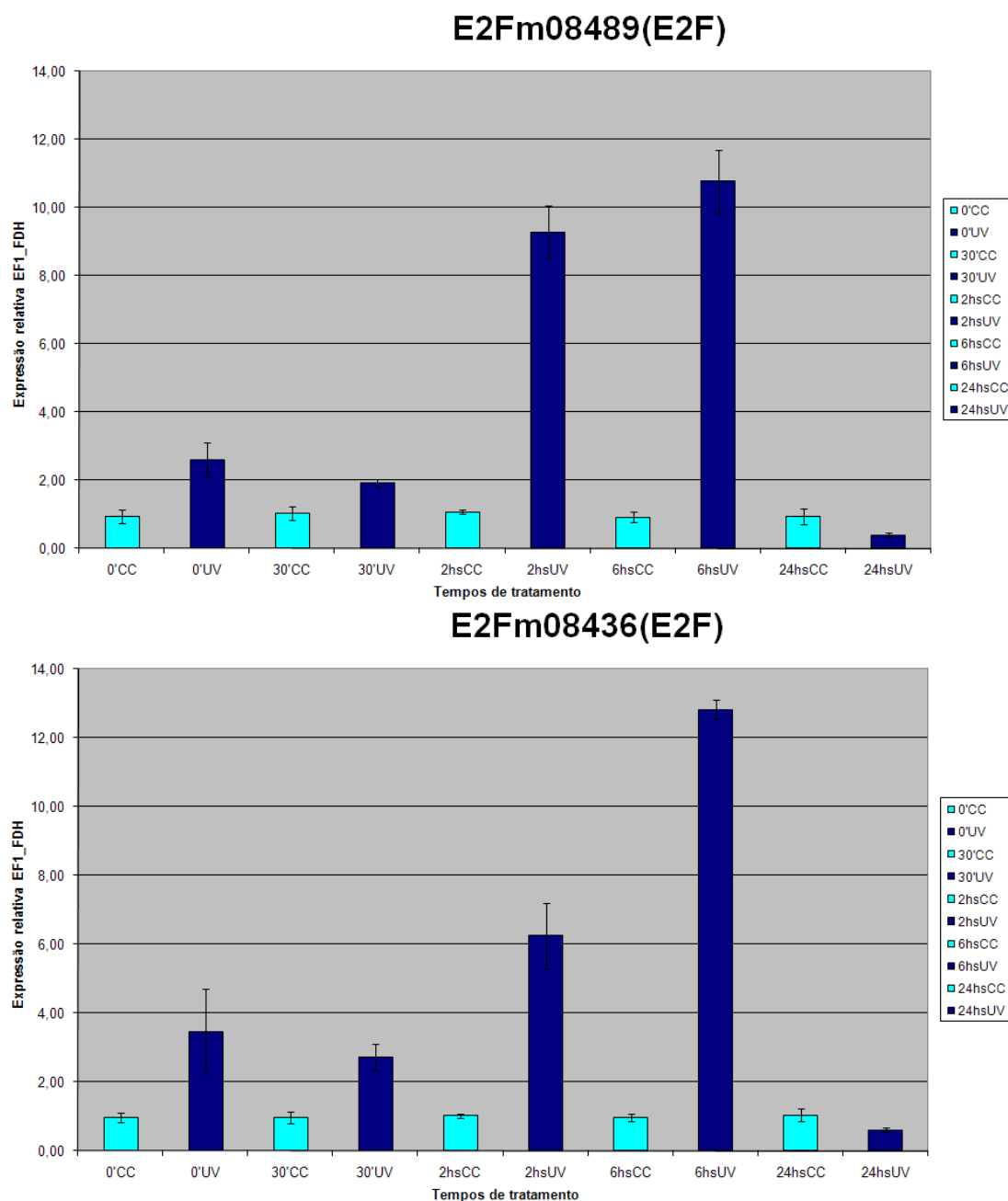


Figura 10. Análises por qRT-PCR do nível de expressão dos membros típicos da família de fatores transcricionais de E2F: E2Fm08489 e E2Fm08436, em resposta ao estresse com luz UV-B. As análises foram realizadas em plantas submetidas a luz ultravioleta por dois períodos de 4 horas com intervalo de 20 horas e coletadas em 0h, 30 minutos, 2, 6 e 24 horas após o estresse. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *fdh* e *ef*.

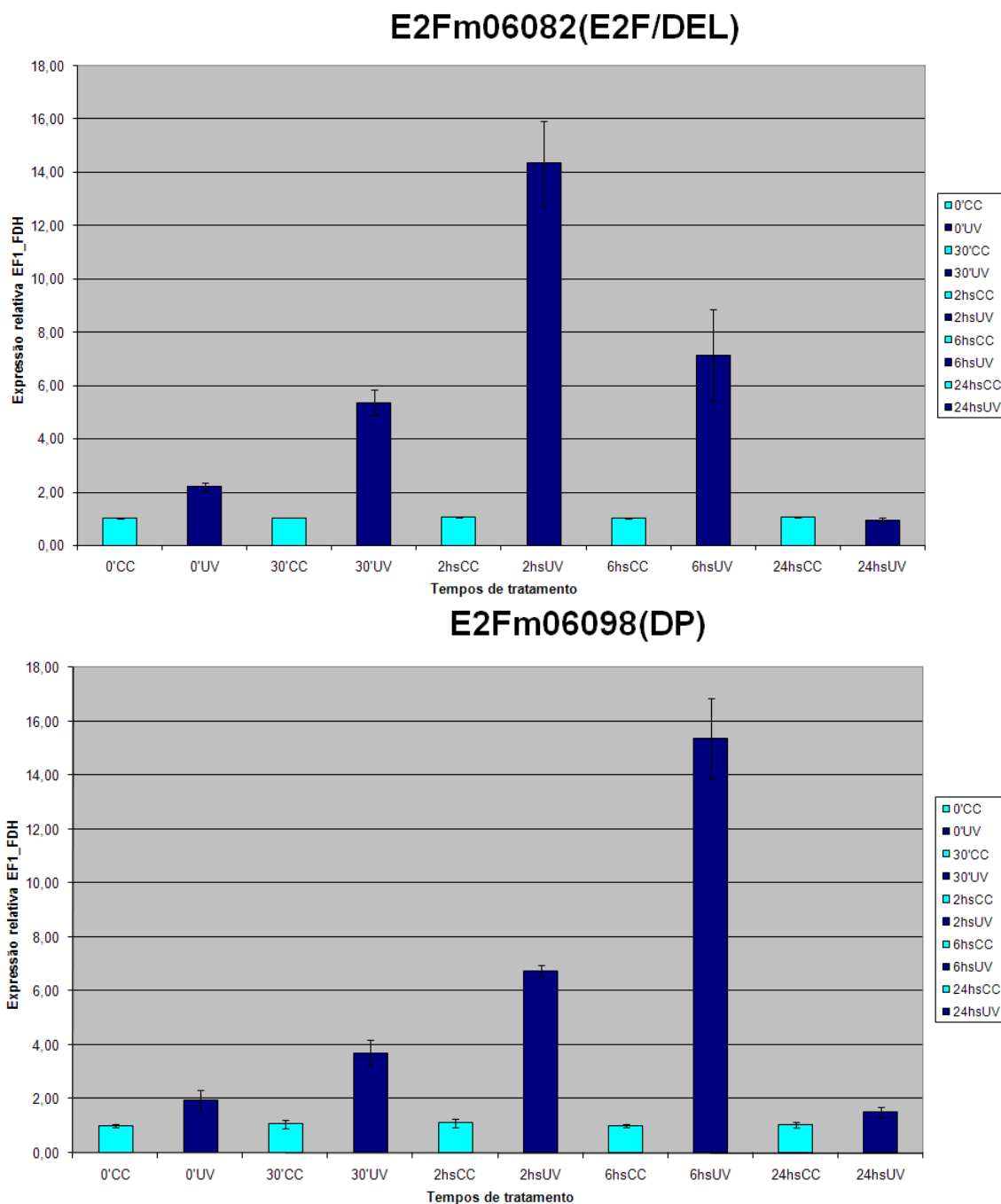


Figura 11. Análises por qRT-PCR do nível de expressão de um membro atípicos da família de fatores transcricionais E2F e uma proteína DP em resposta ao estresse com luz UV-B. As análises foram realizadas em plantas submetidas a luz ultravioleta por dois períodos de 4 horas com intervalo de 20 horas e coletadas em 0h, 30 minutos, 2, 6 e 24 horas após o estresse. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *fdh* e *ef*.

5 DISCUSSÃO

Os genes que codificam os fatores de transcrição E2F foram caracterizados em diversos organismos tais como *Drosophila melanogaster* (DYNLACHT *et al*, 1994), *Xenopus levis* (PHILPOTI & FRIEND, 1994), *Gallus gallus* (PASTEAU *et al*, 1995) *Homo sapiens* (CHITTENDEN, 1993), *Nicotiana tabacum* (SEKINE *et al*, 1999), *Triticum monococcum* (RAMÍREZ-PARRA *et al*, 1999) e *Arabidopsis thaliana* (MARICONTI *et al*, 2002). No entanto, para arroz não existia nada descrito referente a esses genes. No presente trabalho, foi confirmada a presença de diversos genes dessa família no genoma do arroz. Além disso, esses genes foram caracterizados quanto a estrutura das proteínas codificadas e quanto ao padrão de expressão em resposta a um estresse genotóxico.

O tratamento das plantas com radiação UV-B foi eficiente como estresse genotóxico, tendo em vista a indução dos mecanismos de reparo, observado pelo aumento de expressão dos genes envolvidos em rotas de reparo ao dano de DNA. O dano ao DNA envolvido com luz ultravioleta já está bem estabelecido, visto que a luz UV é não-ionizante porém possui energia suficiente para interagir com as bases nitrogenadas gerando diversos tipos de defeitos na fita do DNA, entre eles quebra de fita dupla e formação de dímeros de pirimidina (MPOLOKA, 2008).

As análises realizadas revelaram um possível envolvimento dos fatores de transcrição E2F nas vias de sinalização de reparo ao dano de DNA, uma vez que esses genes são induzidos de maneira coordenada com os genes de reparo. No entanto, ainda não é possível descartar que essa expressão em resposta à radiação UV não seja reflexo de outros processos que possam estar ocorrendo como consequência do estresse, tais como indução de divisão celular, ou mesmo morte celular programada. No experimento descrito neste trabalho o estresse aplicado foi fracionado em duas exposições de 4 horas, separadas por um período de 20 horas. Sabe-se que os fatores de transcrição E2F em *A. thaliana* controlam fortemente o avanço do ciclo celular (MARICONTI *et al*, 2002). Portanto, em 20 horas (tempo dado para resposta inicial da planta após quatro horas de estresse) é possível que uma morte celular e posterior avanço do ciclo

possa ter ocorrido. Assim, outro experimento está sendo conduzido no qual o estresse será aplicado em uma única dose. Com uma única dose o estresse genotóxico deverá continuar sendo eficaz. O tempo de aplicação do estresse será de apenas 4 horas, assim espera-se que a resposta relacionada ao controle do ciclo celular não seja evidenciado, pois a resposta ao dano de DNA deve ser anterior à retomada da divisão celular.

Entre os genes da família dos fatores de transcrição E2F podem-se distinguir duas classes: os E2Fs típicos e os E2Fs atípicos (LAMMENS *et al*, 2009). Essa classificação é baseada na estrutura das proteínas codificadas por esses genes. Em nosso experimento utilizamos todos os membros da classe dos E2Fs típicos e um exemplar dos atípicos. Todos os genes testados foram responsivos ao estresse produzido pela exposição à luz UV-B. No entanto, o perfil de expressão variou entre as duas classes, com genes apresentando máximos de expressão em tempos diferentes. Os E2F típicos e DP apresentaram o máximo de expressão no tempo de 6 horas. Essa expressão simultânea de E2Fs típicos e DP corrobora com dados da literatura que indica uma possível interação entre essas duas proteínas para que exerçam a função de ativadores de expressão (SHEN, 2002). Dois dos genes da rota de reparo também tiveram máximo de expressão após 6 horas do final do tratamento, são eles Uracil DNA glicosilase e UVR-3. Uma das hipóteses possíveis para esses dados é que os fatores transcricionais típicos dimerizados com a proteína DP sejam promotores da expressão desses genes.

Por outro lado, o gene avaliado como atípico possui pico de expressão em duas horas. Esses dados podem indicar que, uma vez que a família gênica E2F compete por um mesmo sítio de ligação ao gene (MARICONTI *et al*, 2002), poderia ser necessário uma diminuição na expressão de E2F atípicos para que os E2F típicos possam atuar como ativadores assim levando seus genes a um nível de expressão aumentado.

Dados publicados para células mamíferas também correlacionam os membros atípicos como sendo diferencialmente expressos sob condições de dano de DNA e interagindo entre eles (ZALMAS *et al*, 2008), tornando-se assim um interessante foco para nossos estudos.

Além disso, será avaliado se existe alguma relação entre a expressão da família gênica E2F e a morte celular programada (PCD) utilizando-se primers construídos com base em genes já caracterizados para este tipo de evento. Visto que em mamíferos, já existem dados correlacionando mutantes defectivos de proteínas da família gênica de E2F e um nível de PCD aumentado (PHILLIPS *et al* 1999). Porém em arroz nada foi publicado até o momento.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram identificadas no genoma de arroz quatro sequências de genes que foram caracterizadas como E2F típicos, duas sequências que codificam E2F atípicos, além de três genes codificantes de proteínas DP e e um para a proteína Rb.

Todos os genes da família E2F analisados foram responsivos ao tratamento com radiação UV-B, indicando que esses genes podem estar relacionados com a sinalização da resposta ao dano do DNA e vias de reparo do mesmo.

Espera-se montar o perfil de expressão de todos os genes identificados a fim de elucidar com maior precisão a resposta desta família e o envolvimento dos mesmos na sinalização das respostas a estresses genotóxicos.

ANEXO 1. Códigos de acesso dos genes identificados e *primers* utilizados para estudo de expressão. Dados provenientes do banco de dados TIGR (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>). Para alguns genes os *primers* não foram desenhados e são indicados como “nd”.

Loci E2F /DEL	CDS number	Genomic	Protein	PrimerF	PrimerR
<u>LOC_Os04g33950</u>	CDS 12004.m08489 / E2F	12004.t03070	12004.m08489	GGTTCGGATGACTCAGGAAC	CCACCTATGGTTGCTTTCGT
<u>LOC_Os12g06200</u>	CDS 12012.m04611 / E2F	12012.t00506	12012.m04611	GGGCGAGTACCACCAGTTC	CACTAATCCAGCAGGCAGC
<u>LOC_Os02g33430</u>	CDS 12002.m8436 / E2F	12002.t02986	12002.m08436	GGTTGGGCAATGTAGCAACT	AATGCTGACATCCCCTTCTG
<u>LOC_Os04g02140</u>	CDS 12004.m05530 / E2F	12004.t00111	12004.m05530	CCGGCTACGACTATGGCTAC	TTTTCTAGGCCGTTTGATGC
LOC_Os06g02459	CDS 12006.m06082 / E2F/DEL	12006:7583781.7589606	12006.m06082	GTACAGCCGCAAGCAGAAGT	ATCGTCAACGTGCTCGAGAG
LOC_Os02g50630	CDS 13102.m05745 / E2F/DEL	13102.t04690	13102.m05745	nd	nd
LOC_Os03g05760	CDS 12003.m06098 / DP	12003.t00447	12003.m06098	CCTCATGCAACTGTGGAAGT	CAAATCGACGGTATTCATGATC
LOC_Os10g30420	CDS 13110.m02619 DP	13110.t02375	13110.m02619	nd	nd
LOC_Os01g48700	CDS 13101.m05054 DP	13101.t04235	13101.m05054	nd	nd
Loci Genes Reparo					
LOC_Os04g57730	CDS 12004.m10658 / UGLY	12004.t05239	12004.m10658	CACGAGAGGTTGCATAGCC	GGAATTTTGATCCCCTCTGG
LOC_Os09g24220	CDS12009.m05578 / MSH6-1	12009.t02105	12009.m05578	nd	nd
LOC_Os06g04190	CDS 12006.m31828 / RAD1	12006.t00308	12006.m31828	CTCCTGTCGAGATCCGCTAC	TGTATTCCCAGCATGCTCAA
LOC_Os02g10990	CDS 12002.m06397 / UVR3	12002.t00947	12002.m06397	ATCATCTTGCACGCCACTCT	CAGGAGAGCCACATCCAGTT

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLAIS, A. & DYNLACHT, B. D. Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control, *Current Opinion in Genetics & Development*, 14:527–532, 2004.

CHITTENDEN, T. LIVINGSTON, D. M. DECAPRIO, J. A. Cell Cycle Analysis of E2F in Primary Human T Cells Reveals novel E2F Complexes and Biochemically Distinct Forms of Free E2F, *Molecular And Cellular Biology*, 13(7)3975-3983, 1993.

DHALIWHAL G.S.,. ARORA R,(1999) Stresses in agroecosystems: concepts and approaches, em: G.S. DHALIWAL, R. ARORA, (Eds.), *Environmental Stress in crop plants*, Ajay Verma Commonwealth Publishers, 1999, pp. 1-18.

DYNLACHT, B. D. BROOK, A. DEMBSKI, M. YENUSH,L. DYNLACHT, N. D. DNA-binding and trans-activation properties of Drosophila E2F and DP proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences, PNAS*, 91:6359-6363, 1994.

DYSON, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins, *Genes & Development*, 12:2245-2262, 1998.

EMBRAPA Arroz Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br> Acesso em: 15 de novembro de 2009.

FAO (Food and Agriculture Organization) Disponível em: <http://www.fao.org> Acesso em: 15 de outubro de 2009.

GALE, M. D. & DEVOS, K. M. Comparative genetics in the grasses, *Proceedings of the National Academy of Sciences, PNAS*, 95:1971-1974, 1998.

GRAMENE, Disponível em: www.gramene.org Acesso em: Abril 2009.

INZÉ, D. Green light for the cell cycle, *European Molecular Biology Organization Journal, EMBO*, 24: 657–662, 2005.

JAGER S. M. de, MENGES, M. BAUER M. MURRAY, J.A.H. 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 Molecular Biology*, 47: 555–568, 2001.

KOSUGI, S. & OHASHI, Y. 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, *The Plant Journal*, 29(1):45-59, 2002.

LAMMENS, T. LI, J. LEONE, G. VEYLDER, L. de, Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family, *Trends in Cell Biology*, 19(3):111-118, 2009.

LIVAK, K. J. SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C (T))} Method, *Methods*, 25(4):402-408, 2001.

MARICONTI, L., PELLEGRINI, B. CANTONI, R. STEVENS, R. BERGOUNIOUX, C. CELLA, R. ALBANI, The E2F Family of Transcription Factors from *Arabidopsis thaliana*: novel and conserved components of the retinoblastoma/e2f pathway in plants, *The Journal Of Biological Chemistry*, 227(12):9911-9919, 2002.

MPOLOKA, S. W. Effects of prolonged UV-B exposure in plants, *African Journal of Biotechnology*, 7:4874-4883, 2008.

PASTEAU S. LOISEAU L. ARNAUD L. TREMBLEAU A. BRUN G., Isolation and characterization of a chicken homolog of the E2F-1 transcription factor, *Oncogene*, 11(8):1475-1486, 1995.

PHILLIPS, A. C. ERNST, M. K. BATES, S. RICE, N. R. VOUSDEN, K.H. E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways, *Molecular Cell*, 4:771-781, 1999.

PHILPOTI, A. & FRIEND, S. H. E2F and Its Developmental Regulation in *Xenopus laevis*, *Molecular And Cellular Biology*, 14(7):5000-5009, 1994.

PHYTOZOME, Disponível em <http://www.phytozome.net/> Acesso em: Abril de 2009.

RAMÍREZ-PARRA, E. & GUTIERREZ, C. Characterization of wheat DP, a heterodimerization partner of the plant E2F transcription factor wich stimulates E2F-DNA binding, *Federation of European Biochemical societies, FEBS letters*, 486:73-78, 2000.

RAMÍREZ-PARRA, E. XIE, Q. BONIOTTI, M. B. GUTIERREZ, C. The cloning of plant E2F, a retinoblastoma binding protein, reveals unique and conserved features, with animal G1/S regulators, *Nucleic Acids Research*, 27(17):3527-3533, 1999.

ROZEN, S. & SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for Biologist programmers. *Methods Molecular Biology*, 132,365–386, 2000. Disponível em: <http://frodo.wi.mit.edu/> Acesso em Maio de 2009.

SEKINE, M. ITO, M. UEMUKAI, K. MAEDA, Y. NAKAGAMI, H. SHINMYO, A. Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants, *Federation of European Biochemical Societies, FEBS letters*, 460:117-122, 1999.

SHEN, W. The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control, *TRENDS in Plant Science*, 7(11):505-511, 2002.

SHIMAMOTO, K. & KYOZUKA, J. Rice as a model for comparative genomics of plants, *Annual Review of Plant Biology*, 53:399–419, 2002.

TAMURA, K. DUDLEY, I. NEI, M. KUMAS, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599, disponível em: <http://www.megasoftware.net> Realizado Download em: Abril de 2009.

TIGR The Institute of Genomic Research, Disponível em: <http://rice.plantbiology.msu.edu/> Acesso em: Abril de 2009.

ZALMAS, L. P. ZHAO, X. GRAHAM A. L. FISHER, R. REILLY, C. COUTTS, A. S. THANGUE, N. B. LA. DNA-damage response control of E2F7 and E2F8, *European Molecular Biology Organization reports, EMBO*, 9(3):252-259, 2008.