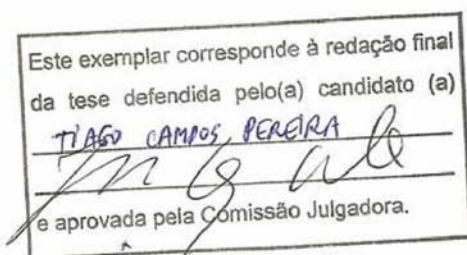




Tiago Campos Pereira

"Estudo de possíveis aplicações médicas
da Interferência por RNA"



Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular na área de Genética Animal e
Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes

Co-Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Campinas, julho de 2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

P414e	Pereira, Tiago Campos Estudo de possíveis aplicações médicas da interferência por RNA / Tiago Campos Pereira. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005. Orientadora: Iscia Lopes-Cendes. Co-orientador: Ivan de Godoy Maia. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. RNAi. 2. siRNA. 3. Silenciamento gênico. 4. PTGS. 5. RNA interferência. I. Iscia Lopes-Cendes. II. Ivan de Godoy Maia. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IVI. Título. (rcdet/ib)
--------------	--

Título em inglês: RNA interference: studies on possible medical applications.

Palavras-chave em inglês: RNAi, siRNA, RNA silencing, PTGS, RNA interference.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutorado.

Banca examinadora: Iscia Lopes-Cendes, José Andrés Yunes, Kleber Gomes Franchini, Rogério Márgis, Valdo José Dias da Silva.

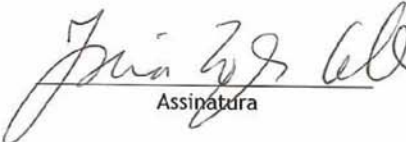
Data da defesa: 08/07/2005.

Campinas, 08 de julho de 2005.

Banca Examinadora

Membros

Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes (Orientadora)
Dpto de Genética Médica, FCM, Unicamp, Campinas, SP

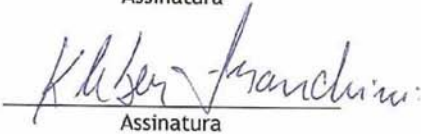


Assinatura

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
Dpto de Genética, IB, Unicamp, Campinas, SP

Assinatura

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini
Dpto de Clínica Médica, FCM, Unicamp, Campinas, SP



Assinatura

Prof. Dr. Rogério Márgis
Dpto de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS



Assinatura

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
Dpto de Fisiologia, FMTM, Uberaba, MG



Assinatura

Profa. Dra. Maitê Vaslin
Dpto de Virologia, Instituto de Microbiologia, UFRJ
Rio de Janeiro, RJ

Assinatura

Prof. Dr. José Andrés Yunes
Centro Boldrini & Programa PG-GBM, Unicamp, Campinas, SP



Assinatura

1. ÍNDICE

	página
Apresentação da tese.....	014
Capítulo 01 - Revisão bibliográfica.....	016
Capítulo 02 - Débora - Plataforma para desenho de moléculas de siRNA.....	051
Capítulo 03 - Programa <i>strand analysis</i> , versão <i>alfa</i>	075
Capítulo 04 - Programa <i>strand analysis</i> , versão <i>beta</i>	093
Capítulo 05 - Small interfering RNAs (siRNAs) reduce worm burden in <i>Schistosoma mansoni</i> -infected mice.....	125
Capítulo 06 - RNAi de <i>mecp2</i> <i>in vivo</i> não leva a movimentos estereotipados.....	148
Capítulo 07 - The post-transcriptional gene silencing pathway in <i>Eucalyptus</i>	161
Capítulo 08 - Produção Acadêmico-científica.....	181
Adendum.....	188

2. Lista de símbolos, siglas e abreviaturas

Símbolos

b: base

C: citosina

°C: graus celsius

Δ : diferença

ΔG : diferença de energia livre

g: grama

G: guanina

G: energia livre

GC: guanina e citosina

K: quilo

L: litro

μ : micro

H: hora

N: qualquer nucleotídeo

S: segundo

Abreviaturas e siglas

^{7m}Gppp: sete-metil-guanosina trifosfato - proteção do mRNA na porção 5'

ADAR (adenosine deaminases that act on dsRNAs): adenosina deaminase que age em dsRNAs

AMP (adenosine monophosphate): monofosfato de adenosina

BDNF (brain derived neurotrophic factor): fator neurotrófico derivado do cérebro

CAP: sete-metil-guanosina trifosfato - proteção do mRNA na porção 5'

CBAB: Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia

CDS (coding sequence): seqüência codificadora

CNS (central nervous system): sistema nervoso central

CpG (cytosine phosphate guanosine): citosina (seguida em uma mesma fita) de uma guanosina

cRNA (complementar RNA): RNA complementar

DCL (dicer-like): proteínas relacionadas à dicer

DNMT: DNA metiltransferase

dsRNA (double-stranded RNA): RNA dupla fita

ECA (=ACE) : enzima conversora de angiotensina

eri (enhanced RNA interference): mutante com resposta intensificada para RNAi

EST (expressed sequence tags): fragmentos de seqüências expressas

FAK (focal adhesion kinase): quinase de adesão focal

FOREST : Brazilian Eucalyptus Genome Sequence Project: projeto brasileiro de sequenciamento do genoma do eucalipto.

GFP (green fluorescent protein): proteína verde fluorescente

GMP (guanosine monophosphate): monofosfato de guanosina

HC-Pro: helper-component proteinase

HCV: Hepatitis c virus

Hg: mercúrio

HGPRTase: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

HIV: Human immunodeficiency virus

IMP (inosine monophosphate) : monofosfato de inosina

IVT (*in vitro* transcription): transcrição in vitro

Kb (kilobase): quilobase

Kcal: (kilocalorie) quilocaloria

LNA: locked nucleic acid (tecnologia referente à modificação de nucleotídeos)

MAP (mean arterial pressure): pressão arterial média

ME: movimentos estereotipados (observados na síndrome de Rett)

MeCP2 (methyl CpG binding protein 2): proteína de ligação a ilhas CpG metiladas

MHV (murine hepatitis vírus): vírus da hepatite murina

Min. : minutos

miRNAs: microRNAs

mm: milímetro

MUSD (Meiotic silencing by unpaired DNA): silenciamento meiótico induzido por DNA não pareado

ng: nanograma

nm: nanômetro

nmol: nanomoles

nt: nucleotídeo

ORF (open reading frame): fase aberta de leitura

Pág. : página

PAZ domain: domínio PIWI, Argonauta, Zwille

pb: par de base

PBS (phosphate buffer saline): tampão fosfato salino

PCR (polymerase chain reaction) : reação em cadeia da polimerase

PKR: proteína quinase R

PTGS (posttranscriptional gene silencing): silenciamento gênico pós-transcricional

PVX (potato virus x): vírus x da batata

PVY (potato virus y): vírus y da batata

RDE (RNAi defective): gene que quando mutado torna o organismo defeitivo em

RdRP (RNA-dependent RNA polymerase): RNA polimerase dependente de RNA

rgs-CaM (regulator of gene silencing - calmodulin-related): regulador do silenciamento gênico similar à calmodulina

RIP (Rep~~e~~at-induced point mutation): mutação de ponto induzida por repetição

RISC (RNA-induced silencing complex): complexo de silenciamento induzido por RNA

RITS (RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing): (complexo) de silenciamento gênico transcricional induzido por RNA.

RNAi (RNA interference): interferência por RNA

RT (reverse transcriptase): transcrição reversa

RT (room temperature): temperatura ambiente

RT-PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction) : transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SHR (*s*pon~~t~~aneously *h*ypertensive *r*ats) : ratos espontâneamente hipertensos

shRNA (short hairpin RNA): pequeno grampo de RNA

siRNA (small interfering RNAs): RNA pequenos de interferência

SR: síndrome de Rett

ssRNA (single stranded RNA): RNA fita simples

STAT (signal transducer and activator of transcription): transdutor de sinal e ativador da transcrição

TCID (tissue culture infectious doses) : doses infecciosas de cultura de tecido

TGS(transcriptional gene silencing): silenciamento gênico transcricional

Tm (temperature of melting): temperatura de fusão

UTR (untranslated region): região não traduzida

XMP (xanthine monophosphate): monofosfato de xantina

Agradecimentos

A Deus

por me conceder vida
por me dar a chance de estudar a vida
por me fazer feliz nesta vida
e por me conceder a vida eterna.

À minha família

meus pais, sempre presentes em cada momento dessa longa caminhada, pelo suporte incondicional em todos os campos da minha vida. À minhas irmãs Débora e Patrícia, meus cunhados Valdir e Tarciso e sobrinhos Ester e Israel por completarem minha vida.

Aos amigos do RNAi

Patrícia Aline, pela sua imensa disposição em me ajudar em todos os momentos,
Vínicius D. B. Pascoal, pela sua amizade, versatilidade e capacidade,
Mariana pelas inúmeras ajudas nos RT-PCRs da vida e por sua alegria inata,
Danyella Dogini pela amizade e auxílio no laboratório (“Quem é que ta falando aí ??”)
Mariângela Grippo pela ajuda nos estudos com proteínas e células
Giovana pelos cuidados com o laboratório

Aos amigos de laboratório (Genética Molecular, CBMEG e outros):

Cláudia, Daniela 96D, Daniela, Fábio Rossi, Daniela Stancato, Rafael Queiroz, Anderson, Lucila, Marilza, Mário Paniago, Sylvia, Thais, Natália Verza, Márcio (mal mal), Marcos Brandalise, Rodrigo Secolin, Caroline Clemente, Eloise entre tantos outros...

Aos meus irmãos na fé

Felipe e Bianca (noivos!!), Gustavos (Gush), Gersinho (Godzilla) e Carol (amiga, casados!!), Geovana, Giovanna, Natália (Tata girl), Gabriela, Ana Cláudia, Marcelo, Frederico (ei, Fred), Débora (fia), Miriam, Pr. Veimar (amigo de graça), Pr. Edílson, Iara, Beatriz, Pr. Gerson, Juçara, Pr. Cláudio e Dalma, Marcos (-covisk), Pr. Maurilo, Rita, Estevão, Thomaz, Eduardo (Du), Rodrigo (Digão - El matador), Jogracias, Ivan (my English teacher), Virgínia, Risia, Edinho, Júnior, Daniel Leite (Mané), Daniel de Ipatinga, Brenda, Hugo (-zmento), Bruno (with lasers), Fabrício (José), Esdras (neemias), Poliano e Vanessa (casados!!), Alessandro e Érika, Luciana e Fábio, Assenir, Akira, Teresa. Celso, Cris, Patrícia Sakakura, comissão de louvor e tantos outros...

Aos revisores desta tese, membros da pré-banca

Prof. Dr. Gonçalo Guimarães Pereira, Dpto de Genética, Unicamp, SP
Prof. Dr. Murilo Zerbini, Dpto de Fitopatologia, UFV, MG
Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Smões, Dpto de Genética, FMRP USP, SP

Aos inúmeros colaboradores diretos e indiretos

À FAPESP

Por conceder a bolsa de estudos de doutorado por todo o período de trabalho (processo número 02/ 01828-8).

o passado que é presente...

Ao Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia,

“Fio”, gostaria dizer que gosto muito de você! Você me ajudou demais em todos esses anos.....!!! Com toda sua paciência, tranquilidade, capacidade soube me conduzir de forma segura neste caminho. Tenho ótimas lembranças do tempo que trabalhamos juntos e de suas célebres frases:

“Ciência é um eterno recomeçar...”

“C’est la vie...”

“Bicho, não inventa.....se concentra.”

“A vida é uma ladeira!”

“Cara, não tem erro. É só seguir direitinho o caminho que dá tudo certo...”

“Qualquer coisa é só me ligar!”

Seguindo seus conselhos cheguei até aqui e tenha certeza que não estaria aqui sem sua ajuda, tutela e orientação. Todo o conhecimento de biologia molecular que tenho veio de ti. Quando alguém me pergunta: “Onde você aprendeu a fazer isto?” eu respondo: “Vide - Maia IG, 1998-presente”.

Você e a adorável Jaqueline conquistaram um amigo para sempre.

“Em todo tempo ama o amigo, e na angústia se faz o irmão.”

Provérbios, 17:17

o presente ambíguo...

À Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes,

A senhora foi um presente de Deus para mim, e disso não tenho dúvidas. A forma como nos entendemos e trabalhamos prova-me claramente que nossas vidas se encontraram para eu ter chance de crescer sob sua supervisão – isso é Obra divina.

Surpreendo-me diante de sua brilhante carreira sendo ainda tão jovem. A tranquilidade com que o a senhora lida com os problemas do dia-a-dia fazem-me repensar sobre a o processo de coordenação de um laboratório. Nunca a vi com raiva (mesmo tendo motivos para isso), nunca a vi desesperada (mesmo estando sem tempo), nunca vi tão gentil (mesmo tendo tantas coisas com que se preocupar). De uma de suas frases:

“Do whatever you want, the way you want, as soon as you do it!”

surgiu esse trabalho. Espero ter acertado a mão nos ingredientes. Tenho grande estima pela senhora senhora, o Lucas e o Prof. Fernando.

“Eu plantei, apolo regou; mas o crescimento veio de Deus.”

I Coríntios, 3:6

Assunto: Doutorado
Data: Mon, 24 Sep 2001 17:01:59 -0300
De: Thiago Ipatinga <ipatinga@unicamp.br>
Para: icendes@unicamp.br

Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes,

Meu nome é Tiago e sou aluno de mestrado em genética molecular no CBMEG. Terminei meu projeto em Março de 2002 e gostaria de realizar meu doutorado em genética médica. Gostaria de saber se poderíamos marcar um horário para conversarmos sobre suas linhas de pesquisa e possibilidade de realizar doutorado.

Atenciosamente,

Tiago

o próximo futuro...

Ao Dr. Alan Tunnacliffe,

Eu ainda não conheço pessoalmente Dr. Alan Tunnacliffe, mas a julgar pelos inúmeros e-mails trocados ele me parece ser uma pessoa muito ágil, inteligente, sensata e pronto a ajudar. Em especial gostaria de agradecê-lo pela maneira que me aceitou em seu laboratório, pela confiança em mim depositada, mesmo não me conhecendo. Espero retribuir tudo isso em uma interação científica com muitos frutos.

“Agrada-te do Senhor, e ele satisfará os desejos do teu coração.”

Salmos, 37:4

Assunto: postdoctoral position

De: "tiago campos pereira" <ipatinga@unicamp.br>

Data: Ter, Maio 3, 2005 2:26 pm

Para: a.tunnacliffe@biotech.cam.ac.uk

Prioridade: Normal

[Versão para Impressão](#)

Opções: [Ver cabeçalho completo](#) | [Ver Versão para Impressão](#)

Dr. Tunnacliffe,

I am a Brazilian Ph.D student and I am writing to you to known about postdoctoral positions in your laboratory. My major experience has been on RNA interference, since my undergraduate studies to my Ph.D thesis (in conclusion).

I am quite interested in your research on anhydrobiosis of metazoans. It seemed to me a quite interesting possibility to silence LEA proteins using RNAi for further analysis.

I would like to know if I could send you my documents for your evaluation.

best regards,

Tiago Campos Pereira

APRESENTAÇÃO DA TESE

1. APRESENTAÇÃO

Esta tese tem como objetivo apresentar e discutir sobre algumas das possíveis aplicações médicas da Interferência por RNA (RNAi).

O capítulo 1 destina-se a uma revisão bibliográfica da técnica ao longo destes seus sete anos de existência. No capítulo 2, 3 e 4 apresentamos uma plataforma e programas (da mesma) desenvolvidos durante este projeto e utilizados no desenho de todas as moléculas aqui descritas (siRNAs).

No capítulo cinco relatamos a primeira utilização de siRNAs no tratamento da esquistossomose *in vivo*. No capítulo seis investigamos a participação do gene *mecp2* em diferentes tecidos no desencadeamento de um fenótipo clássico associado a mutações neste gene.

No sétimo capítulo apresentamos um estudo de *data mining* sobre os genes envolvidos nos mecanismos de silenciamento gênico (PTGS/ RNAi/ co-supressão) no banco de dados do *Eucalyptus*. Apesar de ser um estudo no reino vegetal, ele foi incluído nesta tese pois aborda de maneira sistemática esta via, apresenta sua abundância relativa e pode trazer aplicações da técnica em outras áreas além da médica. As produções científico-acadêmicas produzidas ao longo do doutorado foram compiladas no capítulo oito. Por fim, um adendum apresenta em forma detalhada procedimentos especiais deste projeto.

Diante de um tema tão atual e amplo sinto a sensação de *dever incompleto*. A revisão apresentada a seguir não pôde contemplar em detalhes todos os aspectos envolvidos à RNAi pois exigiriam uma compilação extremamente longa, fugindo da realidade (e objetivo específico) desta tese. Os textos a seguir reúnem os trabalhos realizados ao longo dos trinta e dois meses (até então) deste projeto de doutorado financiado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo número 02/01828-8)**. Todo este trabalho conta com total colaboração direta de **Patrícia Aline Ribeiro** e **Vinícius D. B. Pascoal** (alunos da Dra. Iscia Lopes-Cendes).

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Histórico

A interferência por RNA (RNAi) foi desenvolvida em 1998 por *Andrew Fire*, *SiQun Xu*, *Mary K. Montgomery*, *Steven A. Kostas*, *Samuel E. Driver* e *Craig C. Mello* que chegaram a essa descoberta seguindo uma série de dados, resultados e publicações que apontavam para uma hipótese interessante sobre a ação de moléculas de RNA dupla fita (dsRNAs) na célula: *promover silenciamento gênico*.

Provavelmente as primeiras observações referentes às implicações biológicas de dsRNAs foram derivadas da natureza, séculos (ou até milênios atrás). Entre elas, a identificação de variedades de arroz com pouco conteúdo de proteínas (gluteínas - Surridge, 2003) e a surpreendente ação do vírus PVY sobre o vírus PVX (supressão do silenciamento gênico; Ross, 1950). É possível ainda que algumas doenças genéticas relatadas há muito tempo sejam mediadas pela ação de dsRNAs.

O histórico mais recente aponta para 1983 como *talvez* a primeira demonstração molecular que um dsRNA seria capaz de levar ao silenciamento gênico (Schmidt *et al.*, 1983; Schmidt, 2004). Artigo esse infelizmente ignorado por muito tempo.

Em 1990 um grupo de pesquisadores pretendendo produzir petúnias com uma cor púrpura mais intensa inseriu cópias adicionais do gene *chalcone synthase*, envolvido na produção de pigmentos de antocianina. O que observaram porém foi o paradoxal desenvolvimento de algumas flores variegadas ou totalmente brancas (figura 1). Este fenômeno foi denominado “*co-supressão*” e foi descrito por dois grupos distintos (van der Krol *et al.*, 1990; Napoli *et al.*, 1990).

Resultados semelhantes foram observados em 1992 ao se inserir em *Neurospora crassa* cópias adicionais do gene *al-1*, essencial na biosíntese de carotenóides, na tentativa de produzir colônias com uma cor laranja mais intensa. Como anteriormente, um terço das colônias ficaram brancas. O fenômeno observado foi denominado “*quelling*” (repressão - Romano e Macino, 1992).



Figura 1. Fenótipo associado à co-supressão. Em destaque, petúnia transgênica com elevado número de cópias do gene *chalcone synthase*. A ocorrência de co-supressão gerou o padrão de cor variegado (Gura, 2000).

Em 1995, Sue Guo e colaboradores apresentaram um trabalho analisando o gene *par-1* de *C. elegans* utilizando a técnica de *RNA antisense*. Relataram um detalhe intrigante em seus experimentos: tanto o RNA antisense como senso (controle) levaram ao silenciamento do gene em estudo (Guo e Kemphues, 1995).

Por volta de 1996 já havia a hipótese que dsRNAs levassem de alguma forma ao silenciamento gênico nas petúnias e fungos, idéia essa que soava como *nonsense* pois era difícil imaginar um mecanismo claro pelo qual isso pudesse acontecer. Contudo Fire e colaboradores acreditaram nessa hipótese e imaginaram que os experimentos de Guo eram paradoxais exatamente devido a uma contaminação das moléculas de RNA senso com antisense, gerando dsRNAs que levaram ao silenciamento gênico.

Em 1997 o grupo de Fire testou a hipótese no verme *C. elegans* e a comprovou. Diante de tão grandes aplicações o depósito da patente adiou a publicação, que pode ser vista na edição de 19 de fevereiro de 1998 da revista científica *Nature* (figura 2). A comunidade científica lia então um artigo que iria revolucionar a biologia molecular como o PCR havia feito 13 anos antes (Saiki *et al.*, 1985).

letters to nature

and 10 mM Na_2HPO_4 . FV solution also contained 0.2 NaF and 0.1 Na_2VO_4 . Rarely, irreversible current rundown still occurred with FVPP. The total Na^+ concentration of all cytoplasmic solutions was adjusted to 30 mM with NaOH, and pH was adjusted to 7.0 with N-methylglucamine (NMG) or HCl. PIP_2 liposomes (20–200 nm) were prepared by sonicating 1 mM PIP_2 (Boehringer Mannheim) in distilled water. Reconstituted monoclonal PIP_2 antibody (Perspective Biosystems, Framingham, MA) was diluted 40-fold into experimental solution. Current–voltage relations of all currents reversed at E_K and showed characteristic rectification, mostly owing to the presence of Na^+ in FVPP and possibly also residual polyamines. Current records presented (measured at 30 °C, –30 mV holding potential) are digitized strip-chart recordings. Purified bovine brain $\text{G}\beta\gamma^{22}$ was diluted just before application such that the final detergent (CHAPS) concentration was 5 μM . Detergent-containing solution was washed away thoroughly before application of PIP_2 , because application of phospholipid vesicles in the presence of detergent usually reversed the effects of $\text{G}\beta\gamma$; presumably, $\text{G}\beta\gamma$ can be extracted from membranes by detergent plus phospholipids.

Molecular biology. R188Q mutation was constructed by insertion of the mutant oligonucleotides between the *BsmI* and *BglII* sites of pSPORT-ROMK1 (ref. 11). A polymerase chain reaction (PCR) fragment (amino acids 180–391) from pSPORT-ROMK1 R188Q mutant was subcloned into pGEX-2T vector (Pharmacia) for expression of R188Q mutant protein of GST–RKC. The construction, expression and purification of GST–IKC (amino acids 182–428 of IRK1), GST–GKC (180–462 of GIRK1), GST–IKN (1–86 of IRK1) have been described^{21,22}.

In vitro PIP_2 binding assay. ^3H - PIP_2 in chloroform-methanol (1:1) (American Radiolabeled Chemicals; 0.4 $\mu\text{Ci nmol}^{-1}$ specific activity) was dried under N_2 and sonicated in 100 μl phosphate buffered saline (PBS) to form pure ^3H - PIP_2 liposomes. Purified GST fusion protein (100 nM) was incubated with ^3H - PIP_2 (0.2–1 μM) and precipitated by glutathione 4B-Sepharose beads. After 1 wash with PBS, the precipitates were dissolved in SDS gel loading buffer and counted in a beta-scintillation counter using a window for ^3H . The bound ^3H radioactivity was typically in the range ~2–8% of the total added. For co-immunoprecipitation, 25% PIP_2 or PIP in 75% phosphatidylcholine (PC) background (30 μg PIP_2 or PIP (Boehringer Mannheim) and 90 μg phosphatidylcholine (Sigma)), both in chloroform, were dried down together and sonicated in 300 μl PBS to form mixed liposome. GST fusion proteins were first incubated with 25% PIP_2 or PIP liposome (100 μM) and PIP_2 antibodies (1:100 dilution) for 2 h and with protein A-Sepharose for a further 30 min. After one wash with PBS, the immunoprecipitates were separated by 10% SDS–PAGE, probed with specific antibodies^{21,22}, and visualized by ECL (Amersham). Each experiment was performed at least twice with similar results. The relative amount of immunoreactivity in each lane was quantified by serial dilutions of sample²¹.

Received 6 June; accepted 13 October 1997.

- McNicholas, C. M., Wang, W., Ho, K., Hebert, S. C. & Giebisch, G. Regulation of ROMK1 K⁺ channel activity involves phosphorylation processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8077–8081 (1994).
- Fakler, B., Brandle, U., Glowatzki, E., Zenner, H.-P. & Ruppersberg, I. P. Kir2.1 inward rectifier K⁺ channels are regulated independently by protein kinases and ATP hydrolysis. *Neuron* **13**, 1413–1420 (1994).
- Kubo, Y., Reuveny, E., Slesinger, P. A., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* **364**, 802–806 (1993).
- Dascal, N. et al. Atrial G-protein-activated K⁺ channel: expression cloning and molecular properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10235–10239 (1993).
- Krapivinsky, G. et al. The G-protein-gated atrial K⁺ channel $\text{I}_{\text{K}_{\text{ACH}}}$ is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁺-channel proteins. *Nature* **374**, 135–141 (1995).
- Lesage, F. et al. Molecular properties of neuronal G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **270**, 28660–28667 (1995).
- Furukawa, T., Yamane, T., Terai, T., Katayama, Y. & Hiraoaka, M. Functional linkage of the cardiac ATP-sensitive K⁺ channel to actin cytoskeleton. *Pflügers Arch.* **431**, 504–512 (1996).
- Hilgemann, D. W. & Ball, R. Regulation of cardiac Na^+ , Ca^{2+} exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP_2 . *Science* **273**, 956–959 (1996).
- Fukami, K. et al. Antibody to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibits oncogene-induced mitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9057–9061 (1988).
- Kubo, Y., Baldwin, T. J., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**, 127–133 (1993).
- Ho, K. et al. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* **362**, 31–38 (1993).
- Sui, J. L., Chan, K. W. & Logothetis, D. E. Na^+ activation of the muscarinic K⁺ channel by a G-protein-independent mechanism. *J. Gen. Physiol.* **109**, 381–390 (1996).
- Chan, K. W. et al. A recombinant inwardly rectifying potassium channel coupled to GTP-binding proteins. *J. Gen. Physiol.* **107**, 381–397 (1996).
- Zhang, X., Jefferson, A. B., Ananthakrishnan, V. & Maierus, P. W. The protein deficient in Lowe syndrome is a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 5-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4853–4856 (1995).

- Fukami, K., Endo, T., Imamura, M. & Takenawa, T. α -Actinin and vinculin are PIP_2 -binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **269**, 1518–1522 (1994).
- Fan, Z. & Makielski, J. C. Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J. Biol. Chem.* **272**, 5388–5395 (1997).
- Schacht, J. Inhibition by neomycin of polyphosphoinositide turnover in subcellular fractions of guinea-pig cerebral cortex *in vitro*. *J. Neurochem.* **27**, 1119–1124 (1976).
- Kim, J., Mosior, M., Chung, L. A., Wu, H. & McLaughlin, S. Binding of peptides with basic residues to membrane containing acidic phospholipids. *Biophys. J.* **60**, 135–148 (1991).
- Harlan, J. E., Yoon, H. S., Hajduk, P. J. & Fesik, S. W. Structural characterization of the interaction between a pleckstrin homology domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* **34**, 9859–9864 (1995).
- Reuveny, E. et al. Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* **370**, 143–146 (1994).
- Huang, C.-L., Slesinger, P. A., Casey, P. J., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Evidence that direct binding of $\text{G}_{\beta\gamma}$ to the GIRK1 protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron* **15**, 1133–1143 (1995).
- Huang, C.-L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Binding of $\text{G}_{\beta\gamma}$ to multiple regions of G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels. *FEBS Lett.* **405**, 291–298 (1997).
- Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K. & Clapham, D. E. $\text{G}\beta\gamma$ binds directly to the G-protein-gated K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* **270**, 29059–29062 (1995).
- Janmey, P. A. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 169–191 (1994).
- Penniston, J. T. Plasma membrane Ca^{2+} -pumping ATPases. *Annu. NY Acad. Sci.* **402**, 291–303 (1982).
- Pitcher, J. A., Touhara, K., Payne, E. S. & Lefkowitz, R. J. Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the β -adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with $\text{G}\beta\gamma$ and lipid. *J. Biol. Chem.* **270**, 11707–11710 (1995).
- Tagliabue, M., Wible, P. A., Capasso, R. & Brown, A. M. Specification of the pore properties by the carboxyl terminus of inwardly rectifying K⁺ channels. *Science* **264**, 844–847 (1994).
- Clapham, D. E. & Neer, E. J. New roles for G protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signaling. *Nature* **365**, 403–406 (1993).
- Casey, P. J., Graziano, M. P. & Gilman, A. G. G protein $\beta\gamma$ subunits from bovine brain and retina: equivalent catalytic support of ADP-ribosylation of a subunit by pertussis toxin but differential interactions with G_{α} . *Biochemistry* **28**, 611–616 (1989).

Acknowledgements. We thank E. Phan for technical assistance; I. Bezprozvanny, C. Dessauer, D. Logothetis, C.-C. Lu, Q. Moe, S. Mizumoto and H. Yin for discussions and advice; L. Jan for GIRK1 and ROMK1 antibodies; C. Dessauer and A. Gilman for $\text{G}_{\alpha\text{q}}$; P. Casey for $\text{G}\beta\gamma$; and R. Alpern for support and encouragement. This work was supported by grants from the NKF of Texas (C.L.H.) and from the AHA and NIH (D.W.H.).

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.L.H. (e-mail: chuanl@mednet.swmed.edu).

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*

Andrew Fire*, SiQun Xu*, Mary K. Montgomery†, Steven A. Kostas††, Samuel E. Driver‡ & Craig C. Mello‡

* Carnegie Institution of Washington, Department of Embryology, 115 West University Parkway, Baltimore, Maryland 21210, USA

† Biology Graduate Program, Johns Hopkins University, 3400 North Charles Street, Baltimore, Maryland 21218, USA

‡ Program in Molecular Medicine, Department of Cell Biology, University of Massachusetts Cancer Center, Two Biotech Suite 213, 373 Plantation Street, Worcester, Massachusetts 01605, USA

Experimental introduction of RNA into cells can be used in certain biological systems to interfere with the function of an endogenous gene^{1,2}. Such effects have been proposed to result from a simple antisense mechanism that depends on hybridization between the injected RNA and endogenous messenger RNA transcripts. RNA interference has been used in the nematode *Caenorhabditis elegans* to manipulate gene expression^{3,4}. Here we investigate the requirements for structure and delivery of the interfering RNA. To our surprise, we found that double-stranded RNA was substantially more effective at producing interference than was either strand individually. After injection into adult animals, purified single strands had at most a modest effect, whereas double-stranded mixtures caused potent and specific interference. The effects of this interference were evident in both the injected animals and their progeny. Only a few molecules of injected double-stranded RNA were required per affected cell, arguing against stoichiometric interference with endogenous

Figura 2. O primeiro marco. Artigo de Andrew Fire e colaboradores descrevendo a RNAi.

1.2 A interferência por RNA

O conceito

A expressão “*Interferência por RNA*” (RNAi) foi aplicada inicialmente ao processo no qual dsRNAs injetados no verme *C. elegans* promoviam o silenciamento de RNAs mensageiros, permitindo a identificação da função gênica (Fire *et al.*, 1998). Este processo é extremamente conservado, excluindo-se apenas os procariotos (bactérias e arqueobactérias) e alguns eucariotos (*S. cerevisiae*).

Conceitualmente a RNAi é uma *técnica* que aproveita-se de um mecanismo biológico pré-existente no organismo: a via de *silenciamento gênico pós-transcricional* (PTGS). Este último é um sistema de defesa que atua identificando e degradando moléculas de RNA estranhas ao transcriptoma de uma célula sadia. Uma dessas moléculas é o dsRNA, naturalmente gerada na replicação viral ou mobilização de elementos transponíveis, sendo reconhecidas como sinal de perigo ou alerta. Esses dsRNAs levam à destruição de RNAs fita simples (ssRNAs) que sejam similares em sequência. Podemos interpretar assim o PTGS como *um sistema imune do transcriptoma* e a RNAi, quando aplicada a estudos de genética reversa, como uma *doença auto-imune induzida*.

A regulação gênica mediada por microRNAs (miRNAs), cujo mecanismo molecular apresenta sobreposição com o PTGS, é *interpretada nesta tese* como um fenômeno à parte. De fato mais estudos são necessários para esclarecer *quão sobrepostos* são estes mecanismos, possibilitando assim uma melhor interpretação do papel biológico de ambos.

O processo

Uma série de artigos tem descrito genes envolvidos na via de silenciamento gênico. Alguns deles são compartilhados com a via de microRNAs, outros foram demonstrados apenas para miRNAs até o momento. O rascunho da via de silenciamento gênico descrito a seguir é baseado na compilação dos dados gerados a partir destes estudos. Não necessariamente este esboço da via exista como *um todo* em algum organismo, uma vez que alguns genes podem ser *taxon-específicos*.

Uma endoribonuclease do tipo III citoplasmática denominada *Dicer* (DCL; Bernstein *et al.*, 2001) cliva dsRNAs identificadas em pequenos duplexes de 21~25 nucleotídeos denominados RNA pequenos de interferência (siRNAs - *small interfering RNAs*; Hamilton e Baulcombe, 1999; figura 4). Esses últimos apresentam uma estrutura molecular muito bem definida: um grupo fosfato na extremidade 5' e dois nucleotídeos *overhang* na extremidade 3' OH. Os siRNAs são capturados por R2D2, uma proteína com afinidade por duplexes de RNA e que fica acoplada à *dicer*. R2D2 apresenta um papel crucial: ela age como um *sensor da estabilidade termodinâmica das extremidades* do siRNA (Tomari, *et al.*, 2004). Desta forma, R2D2 posiciona-se e liga-se ao oligo do duplex cuja extremidade 5' é mais estável, sendo este denominado *passageiro*. Em sequência, uma proteína com atividade de RNA helicase (*Dicer* ou alguma outra proteína específica - Dalmay *et al.*, 2001) abre o duplex e o outro oligo - com extremidade 5' menos estável, denominado *guia* - é *preferencialmente* transferido para Slicer (uma endoribonuclease), permitindo assim a ação do *complexo de silenciamento induzido por RNA* (RISC; Hammond *et al.*, 2000). A

formação deste complexo é ATP-dependente (Nykänen *et al.*, 2001) e procede através de uma série de subcomplexos intermediários (Pham *et al.*, 2004).

RISC, localizado em sítios de decaimento de RNA denominados *corpos citoplasmáticos* (*cytoplasmic bodies*; Sen e Blau, 2005), é composto por várias proteínas de função desconhecida (**gemin 3**, **gemin 4**, **VIG** e **dFXR**; Hutvagner and Zamore, 2002; Caudy *et al.*, 2002) e por algumas nucleases como **Slicer** (ou argonauta 2), a endonuclease responsável pela clivagem do RNA alvo (vide adendum: *encontrando Slicer*; Hammond *et al.*, 2001; Parker *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004; Rand *et al.*, 2004), **Dicer** (Pham *et al.*, 2004); provavelmente por **Wex**, uma proteína similar à 3'-5' RNase D (Glazov *et al.*, 2003) e por **Tudor-SN**, uma proteína homóloga a uma nuclease de *Staphylococcus/Micrococcus* (Caudy *et al.*, 2003). Esta última componente liga-se e realiza a clivagem de moléculas de dsRNAs hiper-editadas pelo sistema ADAR (Scadden, 2005).

A atividade de RISC é direcionada pelo *oligo guia* nela presente até encontrar no transcriptoma um RNA totalmente complementar. Ao contrário do que se imaginava, evidências recentes providas de estudos cinéticos de RISC e de miRNAs apontam para uma *contribuição diferencial* - talvez exclusiva - da região 5' (sete primeiros nucleotídeos) do oligo guia para a especificidade de slicer (Haley e Zamore, 2004; Lim *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005).

A procura pelo sítio de clivagem dentro do RNA alvo por RISC parece não ser do tipo varredura 5'– 3' como o sistema de identificação de sítios de iniciação de tradução pelos ribossomos. Dados apontam para um mecanismo do tipo *encontro controlado por difusão*

(*diffusion-controlled encounter*) entre RISC e o sítio de clivagem (Brown *et al.*, 2005). Há evidências que a acessibilidade ao sítio é regulada pela estrutura secundária do RNA alvo, influenciando diretamente a eficiência da clivagem por RISC (Brown *et al.*, 2005).

Uma vez identificado, Slicer realiza a clivagem magnésio-dependente (Schwarz *et al.*, 2004) do RNA alvo entre os nucleotídeos pareados nas bases 10 e 11 do oligo guia (Elbashir *et al.*, 2001a), gerando grupos 3'-hidroxila e 5'-fosfato (Martinez and Tuschl, 2004). O oligo guia permanece intacto e permite que RISC silencie no mínimo mais outros nove RNAs antes de deixar o complexo (Hutvagner e Zamore, 2002).

Os dois produtos gerados na clivagem são denominados: **fragmento 5'** (que contém o CAP – sete-metil-guanosina trifosfato; ^{7m}Gppp) e o **fragmento 3'** (que contém a cauda poli-A). O primeiro é degradado pelo exossomo (proteínas Ski2p, Ski3p, and Ski8p; Orban e Izaurralde, 2005) e/ou uma exoribonuclease com atividade 3'-5' (Wex, Glazov *et al.*, 2003) ao passo que o segundo é processado por uma exoribonuclease com atividade 5'-3' (AtXRN4 ; Souret *et al.*, 2004). Isto significa dizer que o RNA clivado não é decapeado nem deadenilado. Esse processo garante que os dois fragmentos não sejam traduzidos, o que poderia gerar proteínas truncadas e possivelmente citotóxicas.

A adição de uma cauda de poliuridina na extremidade 3' do fragmento 5' após a clivagem de mRNA por microRNAs (Shen e Goodman, 2004) é possivelmente realizado por RDE-3 (uma nucleotidiltransferase; Chen *et al.*, 2005) e parece favorecer a subsequente ação de Wex ou exossomo.

Em *C. elegans* o silenciamento é auto-sustentável. Esta característica se deve à ação de uma *RNA polimerase dependente de RNA* (RdRP; Dalmay *et al.*, 2000; Lipardi *et al.*, 2001)

que gera um RNA complementar (cRNA) usando como molde RNAs sem a estrutura CAP (Gazzani *et al.*, 2004). A ausência deste elemento (CAP) evidencia que tal RNA seja aberrante, a partir do qual são gerados novos dsRNAs que mantêm o processo (auto-sustentabilidade). Neste mesmo organismo, a introdução local de dsRNAs leva a um silenciamento sistêmico mediado por uma proteína transmembrânica denominada Sid-1 (Winston *et al.*, 2002; Feinberg e Hunter, 2003), sendo que este efeito é ainda transmitido para a primeira geração em um processo dependente das proteínas argonauta e Rde-4 (para *RNA interference defective 4*; Grishok *et al.*, 2000). Em contraposição, o processo de silenciamento em mamíferos é temporário (alguns dias) devido provavelmente à ausência desta via de amplificação somada à existência de homólogos de uma siRNase: eri-1 (para *Enhanced RNAi*, Kennedy *et al.*, 2004).

Em uma posição desconhecida na via, a proteína SGS3 (para *suppressor of gene silencing*) rica em domínios *coiled-coil* é necessária para o silenciamento em plantas (Mourrain *et al.*, 2000).

É importante ressaltar que Dicer não reconhece bem dsRNAs cuja estrutura secundária esteja comprometida, isto é, com maus pareamentos (*mismatches*). Desta forma, RNAi é antagonizada pelo sistema ADAR (*adenosine deaminases that act on dsRNAs*), que converte adenosinas em inosinas gerando maus pareamentos em dsRNAs (Scadden e Smith, 2001; Tonkin e Bass, 2003). Contudo, considerando que Tudor-SN age sobre tais moléculas, evidencia-se um efeito recíproco entre ambas vias (RNAi e ADAR) que é mais complexo que o antagonismo mútuo (Scadden, 2005).

Outros antagonistas da via são: 5'-azacitidina, *dihydroxypropyladenine* (Kovarik *et al.*, 2000), baixas temperaturas (Szittyá *et al.*, 2003; Kameda *et al.*, 2004), o produto gênico de

RRF3 (Simmer *et al.*, 2002), supressores endógenos como rgs-CaM (Anandalakshmi *et al.*, 2000) e virais tais como HC-Pro e p19 (Mallory *et al.*, 2001; Vargason *et al.*, 2003). O cádmio em concentrações não tóxicas por sua vez impede a sinalização sistêmica do silenciamento, tornando-o limitado à célula (Ueki e Citovsky, 2001),

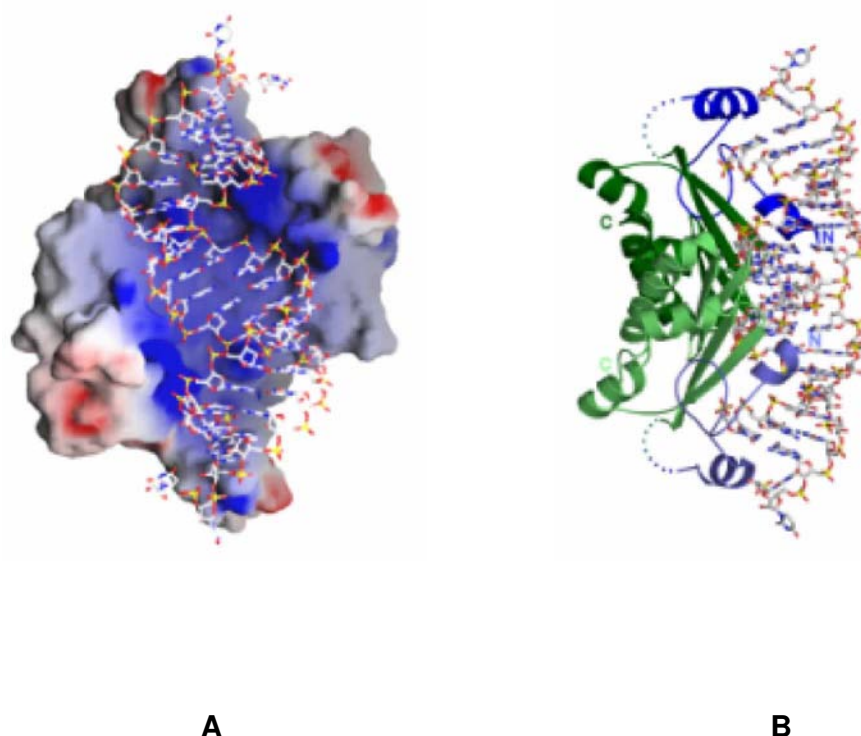


Figura 3. Supressor viral de PTGS. A proteína p19 (estrutura do cristal 3a) do *Carnation Italian ringspot virus* age como um supressor do silenciamento gênico pós-transcricional devido à sua capacidade de *seqüestrar* siRNAs (seqüência no meio do cristal, e à direita em 3B), interrompendo a via. Este mecanismo é utilizado por vírus como contra-ataque ao PTGS (Vargason *et al.*, 2003).

Eventos nucleares

Demonstrou-se recentemente que os siRNAs levam não apenas ao silenciamento gênico *pós-transcricional* (clivagem de RNAs), mas também ao silenciamento gênico *transcricional* (TGS; Kawasaki e Taira, 2004; Morris *et al.*, 2004). Tal fenômeno já havia sido descrito em plantas, mas nunca demonstrado em células de mamíferos. Em um estudo utilizando siRNAs direcionados contra ilhas CpG de uma determinada sequência promotora observou-se a metilação do DNA genômico correspondente, efeito mediado pelas *DNA metiltransferases* Dnmt1 e Dnmt3B (Kawasaki e Taira, 2004).

De fato sabe-se que a co-supressão - fenômeno intimamente relacionado à RNAi - apresenta eventos nucleares em plantas. Entre eles: a metilação de DNA genômico cognato ao dsRNA desencadeador através da proteína Met1 (Morel *et al.*, 2000) e o remodelamento da cromatina através da proteína Ddm1 (Jeddeloh *et al.*, 1998). Uma DNA helicase também é necessária (em fungos) para o silenciamento (Cogoni e Macino, 1999).

Outro aspecto apenas recentemente descoberto é a relação de siRNAs na formação da heterocromatina em conjunto com o complexo RITS (RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing; Motamedi *et al.* 2004; Noma *et al.* 2004; Verdel *et al.*, 2005; Sugiyama *et al.*, 2005).

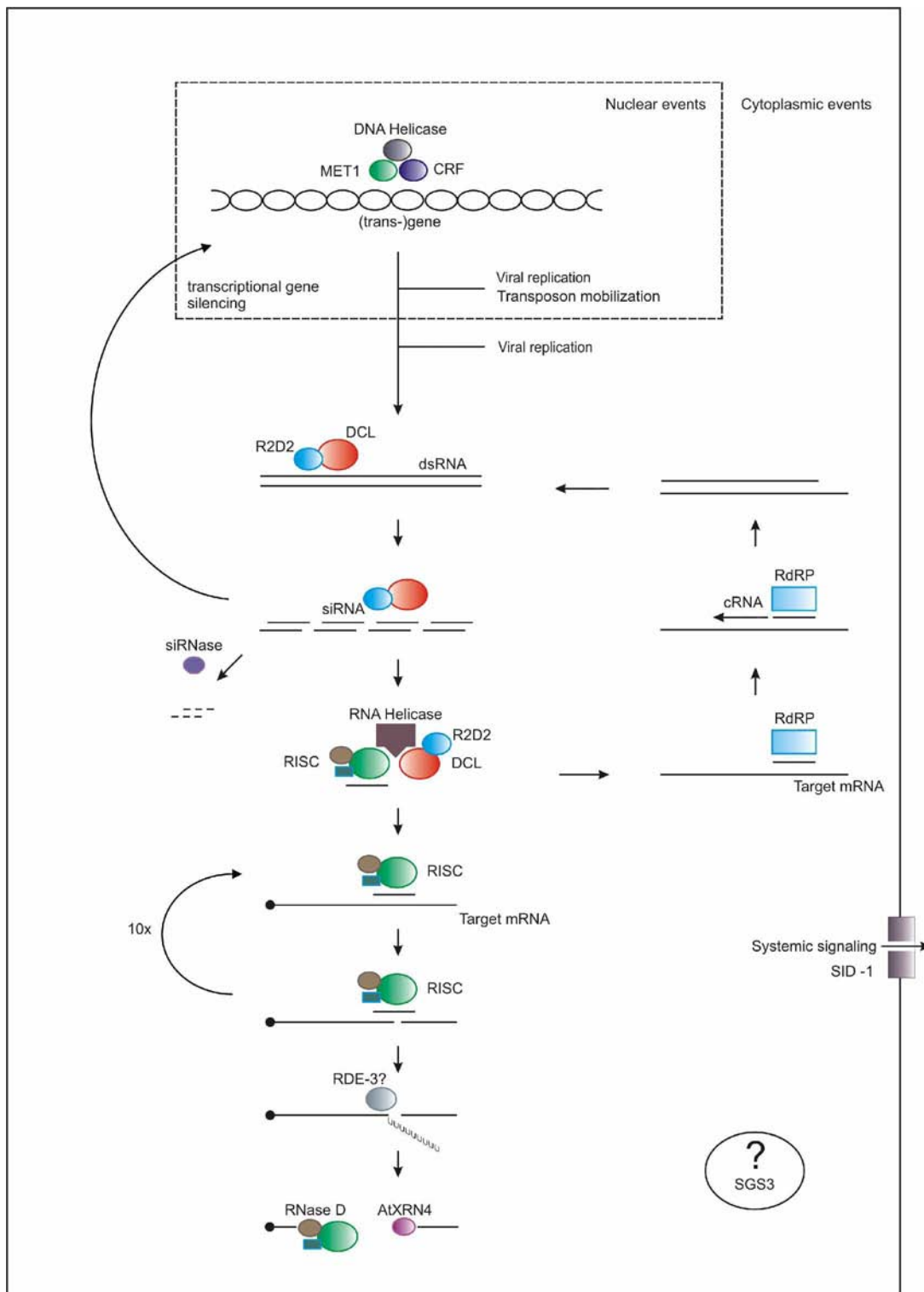


Figura 4. A via de silenciamento gênico pós-transcricional - representação dentro de uma célula. CRF (=Ddm1): *chromatin remodeling factor*. Note que o processamento do fragmento 5' pode ser feito por RNaseD ou pelo exossomo.

1.3 Terapêutica baseada em RNAi

A RNAi é uma técnica extremamente promissora cujas aplicações abrangem (entre outros), a genética reversa (e genômica funcional), terapia gênica, desenvolvimento de animais modelo, estudos do comportamento, validação de alvos para novas drogas e o combate a patógenos.

Sua aplicação médica foi contemplada desde sua descoberta, contudo a introdução de dsRNAs maiores que trinta pares de base (pb) em células de mamíferos ativa a via da *proteína kinase R* (PKR), levando à uma resposta interferon e morte celular. Isso foi por muito tempo um bloqueio à aplicação da técnica em mamíferos uma vez que os dsRNAs usualmente utilizados eram de 300 a 800 pb. O uso de células sem atividade de PKR, tais como linhagens tumorais ou embrionárias permitiram os primeiros ensaios em mamíferos (Svoboda *et al.*, 2000; Billy *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001).

Todavia, o número de tais linhagens é limitado e uma ampla aplicação da técnica exigia um avanço metodológico. Em maio de 2001, *Thomas Tuschl* e colaboradores demonstraram pela primeira vez que RNAi poderia ser desencadeada por siRNAs - os intermediários da via compostos por duplexes de RNA de apenas 21 nucleotídeos (nt) – em células de mamíferos sem induzir a resposta interferon (Elbashir *et al.*, 2001b). Essa descoberta, o segundo marco na área de RNAi, levou a uma grande revolução, tornando a técnica viável em mamíferos (figura 5).

Deu-se então início a inúmeros trabalhos visando, entre outros, o combate a vírus em cultura celular, entre eles: HIV (Jacque *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2002 ; Novina *et al.*, 2002;

Qin *et al.*, 2003), HCV (Kapadia *et al.*, 2003; Randall *et al.*, 2003) e poliovirus (Gitlin *et al.*, 2002). Estudos avaliando o combate a prions também foram desenvolvidos (Daude, *et al.*, 2003; Tilly *et al.*, 2003).

Os ótimos resultados obtidos *in vitro* encorajaram a realização de estudos *in vivo*. O terceiro marco na área ocorreu apenas quatorze meses após o artigo de Elbashir e colaboradores: em julho de 2002 foi publicada a utilização de RNAi em camundongos adultos, os primeiros ensaios *in vivo* em mamíferos através da *transfecção hidrodinâmica* (figura 6; McCaffrey *et al.*, 2002). Este trabalho possibilitou um conjunto de estudos *in vivo* no combate a vírus (Tompkins *et al.*, 2004; Uprichard *et al.*, 2005), parasitas (Mohammed *et al.*, 2003), desenvolvimento de animais modelo para doenças genéticas (Kunath *et al.*, 2003; Fedoriw *et al.*, 2004), estudos do comportamento (Thakker *et al.*, 2004), avaliação de terapias para doenças genéticas (Xia *et al.*, 2004) e câncer (Brummelkamp *et al.*, 2002). Essa revolução levou a revista *Science* a considerar a RNAi - junto aos miRNAs - como a grande descoberta em 2002.

Dois anos depois já entrávamos na quarta fase da RNAi: testes clínicos em humanos em julho de 2004 (figura 7; Check, 2004 a,b e c) trazendo grande esperança para a cura de inúmeras doenças.

O mais recente avanço reside na área de desenvolvimento de estratégias de *delivery* de siRNA. O grupo da empresa *Alnylam* conjugou moléculas de colesterol à siRNAs elevando sua biodisponibilidade *in vivo*, trazendo assim para mais próximo uma terapêutica em humanos (Soutschek *et al.*, 2004).

letters to nature

ogy), respectively. Staining specificity was controlled by single staining, as well as by using secondary antibodies in the absence of the primary stain.

Generation of target cells

Target cells displaying a membrane-integral version of either wild-type HEL or a mutant¹⁰ exhibiting reduced affinity for HyHEL10 ((R⁵, D¹⁰, G¹⁰², N¹⁰³) designated HEL*) were generated by transfecting mouse J558L plasmacytoma cells with constructs analogous to those used¹⁰ for expression of soluble HEL/HEL*, except that 14 Ser/Gly codons, the H2K^b transmembrane region, and a 23-codon cytoplasmic domain were inserted immediately upstream of the termination codon by polymerase chain reaction. For mHEL-GFP, we included the EGFP coding domain in the Ser/Gly linker. Abundance of surface HEL was monitored by flow cytometry and radiolabelled-antibody binding using HyHEL5 and D1.3 HEL-specific monoclonal antibodies, for which the mutant HELs used in this work show unaltered affinities¹⁰.

Interaction assays

For B-cell/target interaction assays, splenic B cells from 3-83 or MD4 transgenic mice^{26,29} carrying (IgM + IgD) BCRs specific for HEL or H2K^b/H2K^d were freshly purified on Lympholyte and incubated with a twofold excess of target cells in RPMI, 50 mM HEPES pH 7.4, for the appropriate time at 37 °C before being applied to polylysine-coated slides. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS or methanol and permeabilized with PBS/0.1% Triton X-100 before immunofluorescence. We acquired confocal images using a Nikon E800 microscope attached to BioRad Radiance Plus scanning system equipped with 488-nm and 543-nm lasers, as well as differential interference contrast for transmitted light. GFP fluorescence in living cells in real time was visualized using a Radiance 2000 and Nikon E800 inverted microscope. Images were processed using BioRad LaserSharp 10.24 or 2000 software to provide single plane images, confocal projections or slicing.

Antigen presentation

Presentation of HEL epitopes to T-cell hybridomas 2G7 (specific for I-E^b[HEL¹⁻¹⁶]) and IES (specific for I-E^b[HEL¹⁰⁰⁻¹¹⁶]) by transfectants of the LK35.2 B-cell hybridoma expressing an HEL-specific IgM BCR was monitored as described¹⁰.

Received 12 December 2000; accepted 30 March 2001.

1. Lanzavecchia, A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* **314**, 537–539 (1985).
2. Klaus, G. G., Humphrey, J. H., Kunkl, A. & Dongworth, D. W. The follicular dendritic cell: its role in antigen presentation in the generation of immunological memory. *Immunol. Rev.* **53**, 3–28 (1980).
3. Tese, J. G., Kosco, M. H., Burton, G. F. & Szakal, A. K. Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol. Rev.* **117**, 185–211 (1990).
4. Kosco-Vibilo, M. H., Gray, D., Scheidegger, D. & Julius, M. Follicular dendritic cells help resting B cells to become effective antigen-presenting cells: induction of B7/BB1 and upregulation of major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* **178**, 2055–2066 (1993).
5. Schamel, W. W. & Beth, M. Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunol.* **13**, 5–14 (2000).
6. Taylor, R. B., Duffus, W. P. H., Raff, M. C. & de Petris, S. Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. *Nature* **233**, 225–227 (1971).
7. Schneider, G. F. & Unanue, E. R. Clipping and the lymphocyte: models for membrane reorganization. *J. Immunol.* **119**, 1549–1551 (1977).
8. Cheng, P. C., Dykstra, M. L., Mitchell, R. N. & Pierce, S. K. A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J. Exp. Med.* **190**, 1540–1560 (1999).
9. Weintraub, B. C. et al. Entry of B cell receptor into signaling domains is inhibited in tolerant B cells. *J. Exp. Med.* **191**, 1443–1448 (2000).
10. Batista, E. D. & Neuberger, M. S. Affinity dependence of the B cell response to antigens: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate. *Immunol.* **8**, 751–759 (1998).
11. Nemaze, D. & Burki, K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* **337**, 562–566 (1989).
12. Hartley, S. B. et al. Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* **333**, 765–769 (1991).
13. Dustin, M. L. et al. Low affinity interaction of human and rat T cell adhesion molecule CD2 with its ligands allows adhering membranes to achieve high physiological affinity. *J. Biol. Chem.* **272**, 30889–30898 (1997).
14. Lang, J. et al. B cells are exquisitely sensitive to central tolerance and receptor editing by ultralow affinity membrane-bound antigens. *J. Exp. Med.* **184**, 1685–1697 (1996).
15. Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E. & Lanzavecchia, A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* **375**, 148–151 (1995).
16. Morke, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Scialy, N. & Kupfer, A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82–86 (1998).
17. Wulfigg, C. & Davis, M. M. A receptor-cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* **282**, 2266–2269 (1998).
18. Grabowski, A. et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221–227 (1999).
19. Leupin, O., Zaru, R., Lanché, T., Müller, S. & Valitutti, S. Exclusion of CD45 from the T-cell receptor signaling area in antigen-stimulated T lymphocytes. *Curr. Biol.* **10**, 277–280 (2000).
20. Cagan, R. L., Kramer, H., Hart, A. C. & Zipursky, S. L. The bridge of senescent and senescent interaction: internalization of a transmembrane ligand. *Cell* **69**, 395–399 (1992).
21. Huang, J. F. et al. TCR-mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science* **286**, 952–954 (1999).
22. Hwang, I. et al. T cells can use either T cell receptor or CD28 receptors to absorb and internalize cell surface molecules derived from antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* **191**, 1137–1148 (2000).
23. Batista, E. D. & Neuberger, M. S. B cells extract and present immobilized antigen: implications for affinity discrimination. *EMBO J.* **19**, 513–520 (2000).
24. Casten, L. A., Lakey, E. K., Jelschick, M. L., Margolish, E. & Pierce, S. K. Anti-immunoglobulin

augments the B-cell antigen-presentation function independently of internalization of receptor-antigen complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **82**, 5890–5894 (1985).

25. Siemasko, K., Eiskelder, R. J., Williamson, E., Kabak, S. & Clark, M. R. Signals from the B lymphocyte antigen receptor regulate MHC class II containing late endosomes. *J. Immunol.* **160**, 5203–5208 (1998).
26. Serre, K. et al. Efficient presentation of multivalent antigens targeted to various cell surface molecules of dendritic cells and surface Ig of antigen-specific B cells. *J. Immunol.* **161**, 6059–6067 (1998).
27. Grzes, S. M., Lowe, A. D., Farrington, J. & Karn, J. Translocation of growth factor-dependent myeloid stem cells with retroviral vectors carrying c-myc. *Oncogene* **7**, 751–751 (1989).
28. Rauschl, D. M. et al. Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature* **354**, 308–311 (1991).
29. Goodnow, C. C. et al. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **334**, 678–682 (1988).
30. Ahvild, V. R., Khanikchi, A. A., Williams, G. T., Adorini, L. & Neuberger, M. S. Acceleration of intracellular targeting of antigen by the B-cell antigen receptor: importance depends on the nature of the antigen-antibody interaction. *EMBO J.* **16**, 3553–3562 (1997).

Supplementary information is available on Nature's World-Wide Web site (<http://www.nature.com>) or as paper copy from the London editorial office of Nature.

Acknowledgements

We thank B. Amos and S. Reichelt for help and advice with confocal microscopy, and S. Munro for helpful discussions. We are indebted to those who provided antibodies, transgenic mice and cell lines. F.D.B. and D.L. were supported by the Arthritis Research Campaign and Studienstiftung des deutschen Volkes, respectively.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.D.B. (e-mail: fdb@nrc-lmb.cam.ac.uk) or M.S.N. (e-mail: msn@nrc-lmb.cam.ac.uk).

Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells

Sayda M. Elbashir*, Jens Harborth†, Winfried Lendeckel*, Abdulrah Yalcin†, Klaus Weber† & Thomas Tuschli*

* Department of Cellular Biochemistry, and † Department of Biochemistry and Cell Biology, Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry, Am Fassberg 11, D-37077 Göttingen, Germany

RNA interference (RNAi) is the process of sequence-specific, post-transcriptional gene silencing in animals and plants, initiated by double-stranded RNA (dsRNA) that is homologous in sequence to the silenced gene^{1–4}. The mediators of sequence-specific messenger RNA degradation are 21- and 22-nucleotide small interfering RNAs (siRNAs) generated by ribonuclease III cleavage from longer dsRNAs^{5–9}. Here we show that 21-nucleotide siRNA duplexes specifically suppress expression of endogenous and heterologous genes in different mammalian cell lines, including human embryonic kidney (293) and HeLa cells. Therefore, 21-nucleotide siRNA duplexes provide a new tool for studying gene function in mammalian cells and may eventually be used as gene-specific therapeutics.

Uptake of dsRNA by insect cell lines has previously been shown to 'knock-down' the expression of specific proteins, owing to sequence-specific, dsRNA-mediated mRNA degradation^{6,10–12}. However, it has not been possible to detect potent and specific RNA interference in commonly used mammalian cell culture systems, including 293 (human embryonic kidney), NIH/3T3 (mouse fibroblast), BHK-21 (Syrian baby hamster kidney), and CHO-K1 (Chinese hamster ovary) cells, applying dsRNA that varies in size between 38 and 1,662 base pairs (bp)^{10,12}. This apparent lack of RNAi in mammalian cell culture was unexpected, because RNAi exists in mouse oocytes and early embryos^{13,14}, and because RNAi-related, transgene-mediated co-suppression was also observed in cultured Rat-1 fibroblasts¹⁵. But it is known that dsRNA in the cytoplasm of mammalian cells can trigger profound physiological

Figura 5. O segundo marco. Artigo de Elbashir e colaboradores descrevendo a RNAi em células de mamíferos através de siRNAs.

brief communications

Table 1 Nodal cilia features in different vertebrate classes

	Onset of <i>Lrd</i> mRNA expression	Appearance of nodal cilia	Earliest conserved asymmetric gene expression
Mouse	Gastrula, 7.5 d.p.f.	Gastrula, 7.5 d.p.f.	Nodal, 8.25 d.p.f., 3–5 somites
Chick	Gastrula, HH4 –	Gastrula, HH4 –	Nodal, HH7, 0–2 somites
Xenopus	Stage-11 gastrula	Stage-14 neurula	<i>Xnr-1</i> (Nodal), stage-17 neurula
Zebrafish	80% epiboly gastrula	Four somites	Cyclops (Nodal), 20 somites

*Asymmetric gene expression of *Sonic hedgehog* at the node occurs at HH4 (pretranslating before Nodal expression, but seems to be unique to the chick embryo). d.p.f., days post-fertilization.

localization of *Lrd* expression and formation of nodal cilia. The earliest known asymmetric expression patterns that are common to all vertebrates likewise exhibit considerable variability in their time of onset among different vertebrate classes^{1,2}. In all instances, however, these conserved asymmetries are preceded by the onset of *Lrd* expression and by the appearance of nodal cilia (Table 1), indicating that nodal cilia may be responsible for initiating L–R asymmetric gene expression and for establishing the final body plan in all vertebrates.

Jeffrey J. Essner*, Kyle J. Vogan†, Molly K. Wagner*, Clifford J. Tabin†, H. Joseph Yost*, Martina Brueckner‡

*Center for Children, Huntsman Cancer Institute and Department of Oncological Sciences, University

of Utah, Salt Lake City, Utah 84112-5550, USA
e-mail: joseph.yost@hci.utah.edu

†Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA

‡Department of Pediatrics and Cardiology, Boyer Center for Molecular Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06520, USA

1. Capdevila, J. et al. *Cell* **101**, 9–21 (2000).
2. Wright, C. V. E. *Dev. Cell* **1**, 179–186 (2001).
3. Nomura, S. et al. *Cell* **95**, 829–837 (1998).
4. Okada, Y. et al. *Mol. Cell* **4**, 439–468 (1999).
5. Supp, D. M. et al. *Nature* **389**, 963–966 (1996).
6. Supp, D. M. et al. *Development* **126**, 5495–5504 (1999).
7. Olbrich, H. et al. *Nature Genet.* **30**, 143–144 (2002).
8. Munoz, J. *Anal. Embryol.* **203**, 481–490 (2001).
9. Cooper, M. S. & D'Aurico, L. A. *Dev. Biol.* **180**, 184–198 (1996).

Supplementary information accompanies this communication on Nature's website.

Competing financial interests: declared none.

Gene expression

RNA interference in adult mice

RNA interference is an evolutionarily conserved surveillance mechanism that responds to double-stranded RNA by sequence-specific silencing of homologous genes. Here we show that transgene expression can be suppressed in adult mice by synthetic small interfering RNAs and by small-hairpin RNAs transcribed *in vivo*

from DNA templates. We also show the therapeutic potential of this technique by demonstrating effective targeting of a sequence from hepatitis C virus by RNA interference *in vivo*.

Small interfering RNAs (siRNAs) mimic intermediates in the RNA-interference (RNAi) pathway and can silence genes in somatic cells without activating non-specific suppression by double-stranded RNA-dependent protein kinase¹. To investigate whether siRNAs also inhibit gene expression *in vivo*, we used a modification

of hydrodynamic transfection methods^{2–4} to deliver naked siRNAs to the livers of adult mice. Either an siRNA derived from firefly luciferase or an unrelated siRNA was co-injected with a luciferase-expression plasmid (for construct description and sequences, see supplementary information). We monitored luciferase expression in living animals using quantitative whole-body imaging⁵ (Fig. 1a, c), and found that it was dependent on reporter-plasmid dose (results not shown).

In each experiment, serum measurements of a co-injected human α -1 antitrypsin (hAAT) plasmid⁶ served to normalize transfection efficiency and to monitor non-specific translational inhibition. Average serum concentrations of hAAT after 74 h were similar in all groups.

Our results indicate that there was specific, siRNA-mediated inhibition of luciferase expression in adult mice ($P < 0.0115$) and that unrelated siRNAs had no effect ($P < 0.864$; Fig. 1a, b). In 11 independent experiments, luciferase siRNAs reduced luciferase expression (as judged by emitted light) by an average of 81% ($\pm 2.2\%$). These findings indicate that RNAi can downregulate gene expression in adult mice.

As RNAi degrades respiratory syncytial virus RNAs in culture⁷, we investigated whether RNAi could be directed against a human pathogenic RNA expressed in a mouse, namely that of hepatitis C virus (HCV). (Infection by HCV, an RNA virus that infects 1 in 40 people worldwide, is the most common reason for liver transplantation in the United States and Europe.) We fused the NS5B region (non-structural protein 5B, viral-polymerase-encoding region) of this virus with luciferase RNA and monitored RNAi by co-transfection *in vivo*. An

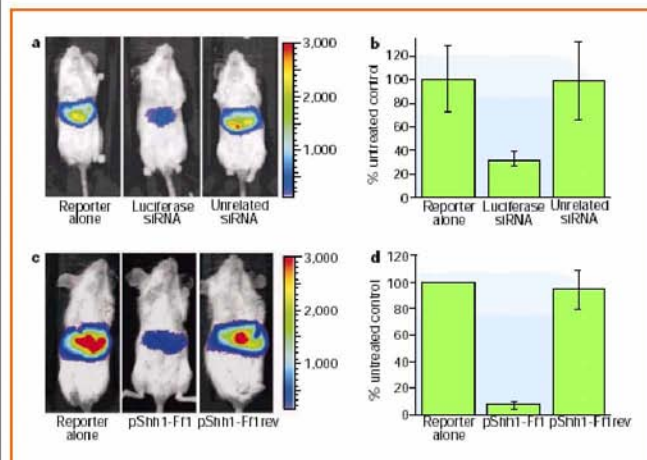


Figure 1 RNA interference in adult mice. **a**, Representative images of light emitted from mice co-transfected with the luciferase plasmid pGL3-control and either no siRNA, luciferase siRNA or unrelated siRNA. A pseudocolour image representing intensity of emitted light (red, most intense; blue, least intense) superimposed on a greyscale reference image (for orientation) shows that RNAi functions in adult mice. Annealed 21-nucleotide siRNAs (40 μ g; Dharmacon) were co-injected into the livers of mice with 2 μ g pGL3-control DNA (Promega) and 800 units of RNasin (Promega) in 1.8 ml PBS buffer in 5–7 s. After 72 h, mice were anaesthetized and given 3 mg luciferin intraperitoneally 15 min before imaging. **b**, siRNA results (six mice per group) from a representative experiment. Mice receiving luciferase siRNA emitted significantly less light than reporter-alone controls (one-way ANOVA with post hoc Fisher's test). Results for reporter alone and unrelated siRNA were statistically similar. **c**, pSh1-F1, but not pSh1-F1 rev (see text), reduced luciferase expression in mice relative to the reporter-alone control. pSh1-F1 or pSh1-F1 rev (10 μ g) were co-injected with 2 μ g pGL3-control in 1.8 ml PBS buffer. **d**, Average values of three independent siRNA experiments ($n = 5$). Average values for the reporter-alone group are designated as 100% in each of the three experiments. Animals were treated according to the US National Institutes of Health's guidelines for animal care and the guidelines of Stanford University.

Figura 6. O terceiro *marco* Artigo de McCaffrey e colaboradores descrevendo a primeira demonstração de RNAi *in vivo* através da transfecção hidrodinâmica em camundongos adultos.

Experts challenge claims for space tourism

Helen Pearson, Mojave

The sun was fierce and expectations were sky high when SpaceShipOne took flight over the windswept Mojave desert early on Monday morning. The rocket has become the first privately funded, manned spaceship to skim the edge of space. But experts say its creators may have to go back to the drawing board if they want a craft capable of ferrying passengers into orbit.

Enthusiasts claim that an era of affordable, commercial space travel will be ushered in by the \$20-million spacecraft, which was designed by aerospace engineer Burt Rutan and his company Scaled Composites, and backed by Microsoft co-founder Paul Allen. The launch is also Rutan's stepping stone towards the Ansari X prize, a \$10-million

jackpot for the first privately financed rocket to send three passengers, or an equivalent weight, up to a height of 100 kilometres twice within a fortnight.

Although aerospace engineers have applauded Rutan's feat, they say there are still numerous technological and financial hurdles to be overcome. "It's a wonderful achievement — but whether it leads to long term space tourism is really questionable," says Jerry Grey, director for aerospace policy at the American Institute of Aeronautics and Astronautics in New York. "It is insignificant in the overall scheme of space flight," says space-history expert Roger Launius of the National Air and Space Museum in Washington DC.

On 21 June, SpaceShipOne piggy-backed

on a carrier aeroplane to about 15 kilometres. Once released, it fired its custom-built hybrid engine, powered by a solid mix of synthetic rubber and nitrous oxide, or laughing gas, to reach 100 kilometres. This fuel cocktail is less flammable than the Space Shuttle's mix of liquid oxygen and liquid hydrogen, making for a safer, though less punchy, blast.

The craft re-entered the atmosphere by flipping up the back part of its wings into a high-drag configuration that is designed to ensure it sinks slowly without generating too much heat. This is different from conventional rockets, which use a computerized system to keep them at the right angle during descent. Ninety minutes after take off, pilot Mike Melvill landed safely back on Earth.

Still, not everything went as planned. The rocket crested at about 100.1 kilometres, but Rutan hoped to reach nearly 110 kilometres. It strayed over 30 kilometres off course when it re-entered the atmosphere. And the ship also touched down with a dent in its tail.

To reach continuous orbit some 300–400 kilometres above Earth will take top speeds that are eight times as fast as that of SpaceShipOne and an exponential leap in efficiency and energy, experts say.

Rutan would not confirm whether he plans to build orbital craft. But some of the other 26 X-prize contenders, and a few companies outside the competition, are already testing prototype spaceships with orbital flight in mind. SpaceX in El Segundo, California, for example, is scheduled to put a \$30-million US Department of Defense satellite into orbit on a prototype vertical-take-off rocket later this year.



Down to Earth: SpaceShipOne reached the runway safely, but it failed to stick to its planned course.

RNA therapy beckons as firms prepare for clinical trials

Erika Check, Washington

Biotechnology companies are edging closer towards taking a promising gene-silencing technique called RNA interference (RNAi) into clinical trials.

The technique can be used to inhibit viruses in animals, such as hepatitis in mice. But it has not yet been tested in people, although companies are consolidating their intellectual property positions and filling their bank accounts in the hope of launching clinical trials, possibly this year.

RNAi relies on a natural mechanism in which animal cells target and destroy foreign genetic material (see *Nature* 425, 10–12; 2003). Injecting small pieces of RNA into a cell seems to trigger the destruction of any pieces of RNA matching the injected sequence. This creates the enticing prospect of 'knocking down' expression of RNA in viruses such as HIV or

hepatitis, as well as correcting neurological problems or muscle disease.

One firm pioneering the approach was founded by biologist and Nobel laureate Philip Sharp of the Massachusetts Institute of Technology. His company, Alnylam Pharmaceuticals, based in Massachusetts, went public in May, raising \$30 million.

Alnylam merged last year with Ribopharma, a company based in Kulmbach, Germany, which owns a European patent on RNAi. It is working in diseases such as macular degeneration (progressive vision loss) and aims to test an RNAi technology in AIDS patients with the condition next year.

Benitec, a firm based in Queensland, Australia, has emerged as Alnylam's main rival. Last year, the US Patent and Trademark Office granted Benitec a patent that seems to

cover a large range of clinical applications of RNAi. And the firm has just acquired the company Avocel, founded by Stanford geneticist Mark Kay. Co-founder Sara Cunningham says the company hopes to be listed on the US NASDAQ stock exchange by the end of the year.

Benitec also plans to fund a clinical trial for geneticist John Rossi at the City of Hope in Duarte, California. Earlier this month, Rossi said he hoped to begin as early as this July. His trial will aim to treat children infected with HIV. The children's bone-marrow stem cells will be removed and treated with an RNAi molecule. The cells will then be implanted back into the children. It is hoped that the treated cells will resist HIV infection better than untreated cells. This could be the first RNAi clinical trial to be submitted to the US Food and Drug Administration.

Figura 7. O quarto marco. Surgem as primeiras propostas de protocolos de RNAi em humanos - em julho de 2004.

1.5 Próximos desafios

Uma aplicação praticamente não abordada pela terapêutica baseada em RNAi é o tratamento de bacterioses. Isso ocorre porque as bactérias não expõem seu ácido nucléico ao hospedeiro* - como os vírus - nem apresentam a via de RNAi, dificultando o combate direto.

Há um (único) artigo no qual um grupo de pesquisadores russos relata o silenciamento de genes em bactérias utilizando moléculas de RNA dupla-fita *paralelas* (Churikov *et al.*, 2000). De fato, há trabalhos abordando de forma indireta essa classe de patógenos. Entre eles há um relato utilizando dsRNA para combater os tumores causados pela agrobactéria *in planta*. Os alvos do silenciamento neste caso foram os oncogenes do patógeno integrados ao genoma do hospedeiro (Escobar *et al.*, 2001). Alternativamente, o silenciamento de genes do hospedeiro essenciais para a multiplicação de bactérias de replicação intracelular, tais como a *Legionella pneumophila*, tem sido outra estratégia (Wieland *et al.*, 2005). O silenciamento de genes *up-regulated* por infecção bacteriana e associados ao surgimento do quadro clínico pode também emergir como uma outra estratégia (Rupp *et al.*, 2005).

Uma segunda aplicação ainda não abordada pela RNAi é sua utilização no ambiente, como o combate e/ou prevenção da maré vermelha (causada por algas ou protozoários) e tratamento de esgoto.

Alguns outros pontos desafiadores que têm sido alvos intensos de pesquisa e investimento são: i) desenvolvimento de programas para desenho de siRNAs (Chalk *et al.*, 2004; Amarzguioui e Prydz, 2004), ii) modificação da estrutura molecular de siRNAs visando estabilidade (Jepsen e Wengel, 2004; Elmen *et al.*, 2005), iii) desenvolvimento de

abordagens de entrega e direcionamento *in vivo* (Soutschek *et al.*, 2004) e iv) e de modelos matemáticos que permitam um melhor entendimento do processo de silenciamento (Bergstrom *et al.*, 2003).

* há exceções como a agrobactéria.

1.6 O futuro da interferência

A RNAi tem se tornado uma ferramenta básica em biologia molecular. É crescente o número de laboratórios utilizando-a. Sua aplicação terapêutica não é definitivamente certa, pois muitas outras estratégias que se apresentaram promissoras em seu início falharam por não resistirem ao *teste do tempo*.

Caso se mantenha, o avanço na área de silenciamento gênico permite-nos hipotetizar remédios a base de siRNAs nas farmácias em 2015 - ou bem antes. Terapias, anestésias (Ganju e Hall, 2004; Dorn *et al.*, 2004), espermicidas, anticaspas, drogas e inúmeras aplicações inesperadas do silenciamento deverão ser reais em um futuro próximo.

De fato, alguns produtos e tratamentos baseados em RNAi entrarão em breve no mercado como o café descafeinado (Ogita *et al.*, 2003), tratamento para redução de pelos (www.sirna.com) e o impressionante *gato hipo-alérgico* que a empresa Allerca (<http://www.allerca.com/>) oferecerá a partir de 2007 por US\$ 3.500,00.

Um vencedor é praticamente certo: a equipe de *Andrew Fire*, para quem um prêmio Nobel já tem sido cogitado há muito tempo. Se a RNAi passar pelo *teste do tempo*, teremos outro vencedor: *a saúde pública*.

2. Adendum

2.1 encontrando slicer

Tão importante quanto identificar uma nova via é dissecá-la bioquimicamente. E isso começou a ser feito para o PTGS no final da última década com a identificação dos primeiros membros da via (Cogoni e Macino, 1997).

O elemento *central* desta via era inexoravelmente uma RNase já apelidada de Slicer mesmo antes de ser clonada. Em 2000 o complexo RISC foi descrito, e obviamente Slicer seria um de seus constituintes. Mas qual deles? Em 2001 a primeira nuclease foi clonada - Dicer (Bernstein *et al.*, 2001), mas suas características não correspondiam à da Slicer. Dois anos depois uma segunda nuclease foi encontrada, agora claramente constituindo RISC: era a Tudor SN, cuja dissecação bioquímica também a excluía como candidata à Slicer.

O rascunho de virtualmente toda a via ao final de seis anos levantou a dúvida: onde está Slicer? Nenhuma das proteínas identificadas (além de Dicer e TudorSN) apresentava domínios conservados de nuclease. Como o elemento mais importante da via permanecia ainda não identificado?

Entre as mais abundantes proteínas da via – em número de transcritos - estavam os membros da família argonauta (Pereira, 2002) cujo domínio característico PAZ (PIWI, Argonauta, Zwille) tinha função desconhecida. Alguns grupos começaram a se dedicar a estas proteínas. A determinação da estrutura do domínio PAZ sugeria que ele apresentava afinidade por moléculas de siRNA (Song *et al.*, 2003; Lingel *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003),

o que foi comprovado por cristalografia (Lingel *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2004). Considerando adicionalmente que *argonauta 2* era um dos elementos mais bem definidos de RISC, postulou-se que ela poderia estar diretamente envolvida na transferência oligo guia de Dicer para Slicer.

Estudos de cristalografia da proteína argonauta de *Pyrococcus furiosus* trouxeram repentinamente à tona algo surpreendente: o domínio PIWI, que não tinha semelhança a nenhum outro domínio conhecido em termos de sequência primária, apresentava um domínio *criptico de RNase H* revelado por comparação de estruturas terciárias (Song, *et al.*, 2004). Mutações neste domínio levaram à perda da atividade de *slicing* (Liu *et al.*, 2004).

Uma série de grupos chegou à mesma descoberta no mesmo momento em várias partes do mundo mas com estratégias distintas: estrutura de cristal da proteína *argonauta* de *Archaeoglobus fulgidus* (Parker *et al.*, 2004), ensaios bioquímicos dos membros da família argonauta (Meister, *et al.*, 2004), e de RISC (Rand, *et al.*, 2004). Esse conjunto de evidências demonstrou ao final de 2004 que argonauta 2 é Slicer; ironicamente seu homólogo fora o segundo membro da via a ser clonado (*qde-2*; Cogoni e Macino, 1997).

Curiosamente, as proteínas usadas para cristalização são oriundas de arqueobactérias (*Pyrococcus furiosus* e *Archaeoglobus fulgidus*), grupo que não apresenta a via de PTGS. Por que elas teriam essas proteínas e domínios?

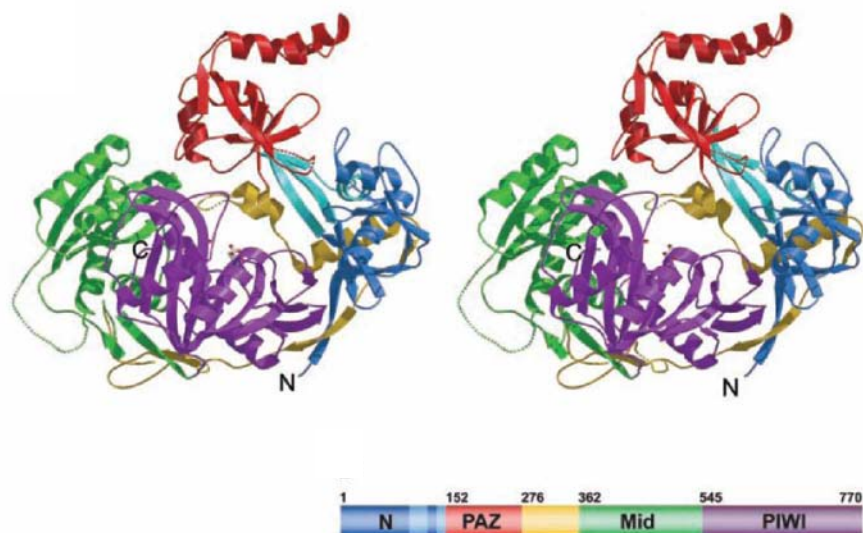


Figura 8. Estrutura de slicer (argonauta 2). Os domínios e suas posições podem ser vistos de acordo com o legenda multicolor (adaptado de Song *et al.*, 2004).

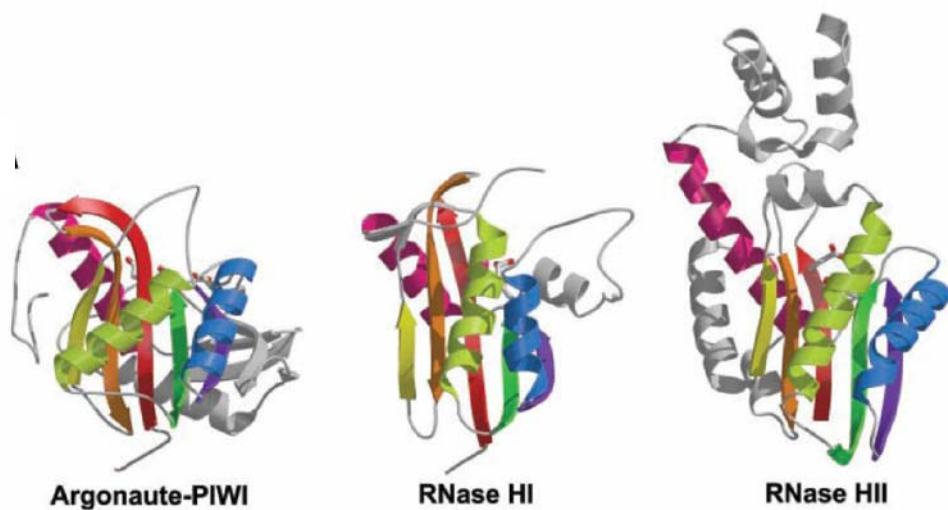


Figura 9. Piwi é um domínio de RNase H. A semelhança do domínio PIWI de argonauta 2 com domínios de RNase H é revelada através das análises de estrutura terciária (adaptado de Song *et al.*, 2004).

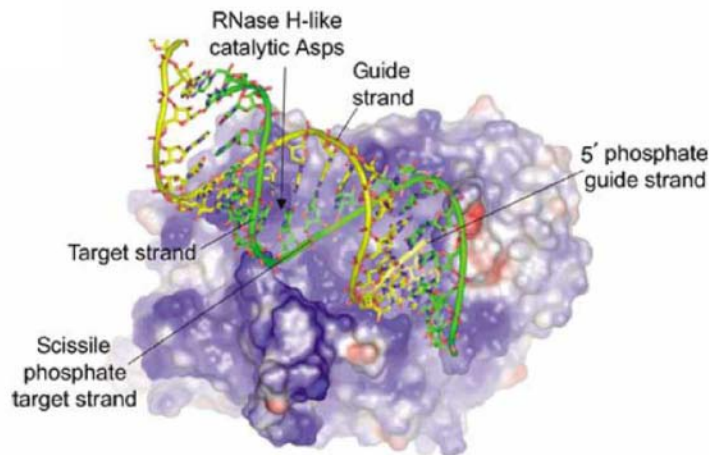


Figura 10. Slicer associada ao oligo guia (guide strand) e RNA alvo (target strand). A determinação da estrutura revela um sulco em slicer que permite a captura do RNA alvo para sua posterior clivagem (adaptado de Parker *et al.*, 2004).

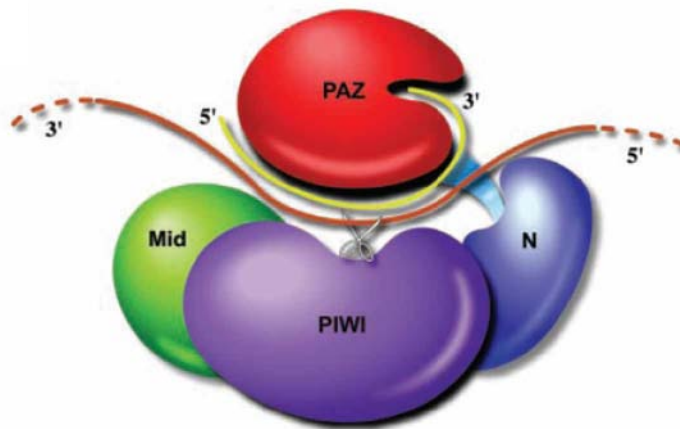


Figura 11. Modelo de participação domínios de slicer na clivagem do RNA alvo. O domínio PAZ realizaria a retenção do oligo guia através de sua porção 3' ao passo que o domínio Piwi (em conjunção com o restante) formaria o sulco para entrada do RNA alvo e sua clivagem (adaptado de Parker *et al.*, 2004).

2.2 Ser ou não ser específico?

Uma das grandes dúvidas que giram em torno da RNAi é sua *especificidade*. Uma sequência de 21 nt é única entre em 4 trilhões, suficientemente exclusivo para os genomas (e consequentemente transcriptomas) conhecidos. Contudo não se sabe se todos os 21 nt contribuem igualmente para a especificidade. Alguns artigos apontam que esta característica é dirigida por uma identidade mínima de 11 nt sequenciais (≈ 1 em 4 milhões; Jackson *et al.*, 2003), outros apontam para a necessidade de apenas 7 nucleotídeos (≈ 1 em 16 mil; Haley e Zamore, 2004; Lim *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005) tornando o sistema potencialmente não específico. Este último modelo levaria à existência de 183.105 alvos no genoma humano para cada siRNA.

Outro argumento contra a alta especificidade é oriundo de estudos com microRNAs, cuja inibição da tradução é realizada permitindo pareamentos imperfeitos. Isso levanta a hipótese de siRNAs inibirem a tradução de *off-targets* (alvos imperfeitos).

A especificidade parece ser o *calcanhar-de-aquiles* da RNAi. Mas há muitos aspectos a serem considerados. A aplicação em genética reversa exige de fato total especificidade: silenciamento de outros genes poderiam levar a uma conclusão errada da função gênica. Contudo, a aplicação terapêutica contra vírus não parece ameaçada pelo *fantasma da inespecificidade*. Isso porque as seqüências virais são muito diferentes das de seus hospedeiros. Análises no programa blast (www.ncbi.nlm.nih.gov) geralmente apresentam baixíssima ou nenhuma similaridade entre as seqüências de um vírus e seu hospedeiro.

Outro aspecto muito importante é o que nosso laboratório em particular chama de “*fator de diluição*”. Esse elemento foi hipotetizado com base nos desenhos siRNAs *versus*

dsRNAs para um mesmo alvo. Um siRNA tende inexoravelmente a ser mais específico que dsRNA porque este último irá gerar vários siRNAs. Se um dsRNA de 2100 pb for hipoteticamente *diced* (picotado) em 100 siRNAs e apenas um deles apresentar um *off-target*, o que pode acontecer? O efeito maior do silenciamento se dará sobre o alvo principal (99%) dos siRNAs. Isso se consideramos um processamento perfeito, gerando um siRNA de 21 nt exato para o *off-target*. As chances disto acontecer são de 1 em 21. Assim sendo, em um exemplo simples, os efeitos de *off-targeting* neste caso são de apenas $1/100 \times 1/21$ isto é 0,0476 %. Considerando a estabilidade termodinâmica do siRNA isso pode cair para zero (vide capítulo 3 - *Strand Analysis* 1.0).

O *calcanhar-de-aquiles* pode ser superado inesperadamente caso se desenvolva uma estratégia que torne os siRNAs totalmente gene-específicos, seja por modificação de sua estrutura molecular ou por outros meios. Na terapêutica, é possível ainda que o “*fator de diluição*” diminua eventuais problemas, ou que, mesmo havendo um real *off-targeting*, os custos (efeitos colaterais) dos siRNAs valham o benefício: a *cura*.

3. Bibliografia

- Amarzguioui M, Prydz H. (2004). An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochem Biophys Res Commun.* 316(4):1050-8.
- Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, Herr JM Jr, Mau C, Mallory A, Pruss G, Bowman L, Vance VB. (2000). A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* 290:142-4.
- Bergstrom CT, McKittrick E, Antia R. (2003). Mathematical models of RNA silencing: unidirectional amplification limits accidental self-directed reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(20):11511-6.
- Bernstein, E, Caudy, AA, Hammond, SM and Hannon, GJ. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
- Billy E, Brondani V, Zhang H, Muller U, Filipowicz W. (2001) Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(25):14428-33.
- Brown KM, Chu CY, Rana TM. (2005). Target accessibility dictates the potency of human RISC. *Nat Struct Mol Biol.* 2005 [Epub ahead of print]
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. (2002). Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell.* 2(3):243-7.
- Caudy, AA, Ketting, RF, Hammond, SM, Denli, AM, Bathorn, AM, Tops, BB, Silva, JM, Myers MM, Hannon GJ and Plasterk, RH (2003). A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* 425:411-4.
- Caudy, AA, Myers, M, Hannon, GJ and Hammond, SM (2002). Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev.* 16:2491-6.
- Chalk AM, Wahlestedt C, Sonnhhammer EL. (2004). Improved and automated prediction of effective siRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 319(1):264-74.
- Check E. (2004a). RNA therapy beckons as firms prepare for clinical trials. *Nature* 429:792.
- Check E. (2004b). Firm sets sights on gene silencing to protect vision. *Nature* 430:819.
- Check E. (2004c). Hopes rise for RNA therapy as mouse study hits target. *Nature* 432:136.
- Chen, C.G., Smard, M.J., Tabara, H., Brownell, D.R., McCollough, J.A.M., Mello, C.C. (2005). A Member of the Polymerase B Nucleotidyltransferase Superfamily Is Required for RNA Interference in *C. elegans*.
- Churikov NA, Chistiakova LG, Zavi'gel'skii GB, Manukhov IV. (2000). [RNA interference in Escherichia coli cells: the expression of molecules that are complementary to the lon gene mRNA in parallel orientation] *Genetika.* 36(1):23-7. **em russo**

- Cogoni C, Macino G. (1997). Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(19):10233-8.
- Cogoni C, Macino G. (1999). Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science* 286:2342-4.
- Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*. 2000 101(5):543-53.
- Dalmay, T, Horsefield, R, Braunstein, TH and Baulcombe, DC (2001). SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J*. 20: 2069-2078.
- Daude, N., M. Marella, and J. Chabry, (2003). Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs. *J Cell Sci*. 116(Pt 13):2775-9.
- Dorn G, Patel S, Wotherspoon G, Hemmings-Mieszczak M, Barclay J, Natt FJ, Martin P, Bevan S, Fox A, Ganju P, Wishart W, Hall J. (2004). siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic Acids Res*. 32(5):e49.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. (2001a). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*. 15(2):188-200.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. (2001b). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411:494-8.
- Elmen J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, Wahren B, Liang Z, Orum H, Koch T, Wahlestedt C. (2005). Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res*. 33(1):439-47.
- Escobar, M.A., E.L. Civerolo, K.R. Summerfelt, and A.M. Dandekar, (2001). RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:13437-42.
- Fedoriw AM, Stein P, Svoboda P, Schultz RM, Bartolomei MS. (2004). Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in H19 gene imprinting. *Science* 303(5655):238-40.
- Feinberg EH, Hunter CP. (2003). Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*. 301(5639):1545-7.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391(6669):806-11.
- Ganju P, Hall J. (2004). Potential applications of siRNA for pain therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 4(4):531-42.
- Gazzani S, Lawrenson T, Woodward C, Headon D, Sablowski R. (2004). A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science* 306:1046-8.

- Gitlin L, Karelsky S, Andino R. (2002) Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*. 418(6896):430-4.
- Glazov, E, Phillips, K, Budziszewski, G., Meins, FJr., and Levin, JZ (2003). A gene encoding an RNase D exonuclease-like protein is required for post-transcriptional silencing in Arabidopsis. *Plant J*. 35:342-349.
- Grishok A, Tabara H, Mello CC. (2000). Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science*. 287(5462):2494-7.
- Guo S, Kemphues KJ. (1995). *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/ Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*. 1995 May 19;81(4):611-20.
- Haley B, Zamore PD. (2004). Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol*. 11(7):599-606.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 286(5441):950-2.
- Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293(5532):1146-50.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.
- Hutvagner, G. and Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297:2056-60.
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*. 21(6):635-7.
- Jacque, J.M., K. Triques and M. Stevenson, 2002 Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*. 418:435-8.
- Jeddeloh JA, Bender J, Richards EJ. (1998). The DNA methylation locus DDM1 is required for maintenance of gene silencing in Arabidopsis. *Genes Dev*. 12(11):1714-25.
- Jepsen JS, Wengel J. (2004). LNA-antisense rivals siRNA for gene silencing. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 7(2):188-94.
- Kameda T, Ikegami K, Liu Y, Terada K, Sugiyama T. (2004). A hypothermic-temperature-sensitive gene silencing by the mammalian RNAi. *Biochem Biophys Res Commun*. 315(3):599-602.
- Kapadia, S.B., A. Brideau-Andersen and F.V. Chisari, 2003 Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:2014-8.
- Kawasaki H, Taira K. (2004) Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* 431:211-7.
- Kennedy, S, Wang, D, and Ruvkun, G. (2004). A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 427:645-9.

- Kovarik A, Van Houdt H, Holy A, Depicker A. (2000). Drug-induced hypomethylation of a posttranscriptionally silenced transgene locus of tobacco leads to partial release of silencing. *FEBS Lett.* 467(1):47-51.
- Kunath T, Gish G, Lickert H, Jones N, Pawson T, Rossant J. (2003). Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotechnol.* 21(5):559-61.
- Lee, N.S., T. Dohjima, G. Bauer, H. Li, M.J. Li *et al.*, 2002 Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol.* 20:500-5.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 120(1):15-20.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* [Epub ahead of print]
- Lingel A, Smon B, Izaurralde E, Sattler M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature.* 426(6965):465-9.
- Lingel A, Smon B, Izaurralde E, Sattler M. (2004). Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat Struct Mol Biol.* 11(6):576-7.
- Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. (2001). RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell.* 107(3):297-307.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305:1437-41.
- Ma JB, Ye K, Patel DJ. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature.* 429(6989):318-22.
- Mallory AC, Ely L, Smith TH, Marathe R, Anandalakshmi R, Fagard M, Vaucheret H, Pruss G, Bowman L, Vance VB. (2001). HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell.* 13:571-83.
- Martinez J, Tuschl T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* 18(9):975-80. Epub 2004 Apr 22.
- McCaffrey, A.P., L. Meuse, T.T. Pham, D.S. Conklin, G.J. Hannon *et al.*, 2002 RNA interference in adult mice. *Nature.* 418:38-9.
- Meister, G, Landthaler, M, Patkaniowska, A, Dorsett, Y, Teng, G. and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15:185-97.

- Mohammed A, Dasaradhi PV, Bhatnagar RK, Chauhan VS, Malhotra P. (2003). In vivo gene silencing in *Plasmodium berghei*--a mouse malaria model. *Biochem Biophys Res Commun.* 309(3):506-11.
- Morel JB, Mourrain P, Beclin C, Vaucheret H. (2000). DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 10(24):1591-4.
- Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. (2004) Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 305:1289-92.
- Motamedi MR, Verdel A, Colmenares SU, Gerber SA, Gygi SP, Moazed D. (2004). Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs. *Cell.* 119(6):789-802.
- Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Joudette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo TA, Vaucheret H. (2000) *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell.* 101(5):533-42.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell.* 1990 2(4):279-289
- Noma K, Sugiyama T, Cam H, Verdel A, Zofall M, Jia S, Moazed D, Grewal SI. (2004). RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nat Genet.* 36(11):1174-80.
- Novina, C.D., M.F. Murray, D.M. Dykxhoorn, P.J. Beresford, J. Riess *et al.*, 2002 siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med.* 8:681-6.
- Nykanen A, Haley B, Zamore PD. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell.* 2001 107(3):309-21.
- Ogita S, Uefuji H, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H. (2003). Producing decaffeinated coffee plants. *Nature.* 423(6942):823.
- Orban TI, Izaurralde E. (2005). Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA.* 2005 Feb 9; [Epub ahead of print]
- Parker, JS, Roe, SM and Barford, D. (2004). Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J.* 23:4727-37.
- Pereira, TC. (2002). Estudo da atividade de supressão da proteína HC-Pro e análise do perfil de expressão de PTGS em cana-de-açúcar. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Pham JW, Pellino JL, Lee YS, Carthew RW, Sontheimer EJ. (2004). A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell.* 117:83-94.

- Qin, X.F., D.S. An, I.S. Chen, D. Baltimore, 2003 Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:183-8.
- Rand, TA, Ginalski, K, Grishin, N. and Wang, X. (2004). Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:14385-9.
- Randall, G., A. Grakoui and C.M. Rice, 2003 Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:235-40.
- Romano N, Macino G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol.* 1992 6(22):3343-53.
- Ross AF. (1950). Local lesion formation and virus production following simultaneous inoculation with potato virus-X and virus-Y. *Phytopathology* 40: (1) 24.
- Rupp J, Hellwig-Burgel T, Wobbe V, Seitzer U, Brandt E, Maass M. (2005). Chlamydia pneumoniae infection promotes a proliferative phenotype in the vasculature through Egr-1 activation in vitro and in vivo . *Proc Natl Acad Sci U S A.* [Epub ahead of print]
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4.
- Scadden AD. (2005). The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nat Struct Mol Biol.*
- Scadden AD, Smith CW. 2001. RNAi is antagonized by A->I hyper-editing. *EMBO Rep.* 2:1107-11.
- Schmidt, F. R.; Davis, N. D.; Diener, U. L.; Lemke, P. A. (1983). Cycloheximide induction of aflatoxin synthesis in a nontoxigenic strain of *Aspergillus flavus*. *Bio/Technology* 1(9), 794-5.
- Schmidt, F.R. (2004). RNA interference detected 20 years ago? *Nat Biotechnol* 22(3):267-8.
- Schwarz DS, Tomari Y, Zamore PD. (2004). The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. *Curr Biol.* 14(9):787-91.
- Shen B, Goodman HM. (2004). Uridine addition after microRNA-directed cleavage. *Science* 306:997.
- Sen GL, Blau HM. (2005). Argonaute 2/ RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol.*
- Simmer F, Tijsterman M, Parrish S, Koushika SP, Nonet ML, Fire A, Ahringer J, Plasterk RH. (2002). Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes *C. elegans* hypersensitive to RNAi. *Curr Biol.* 12(15):1317-9.
- Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, Hannon GJ, Joshua-Tor L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol.* 10(12):1026-32.

- Song, JJ, Smith, SK, Hannon, GJ and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305:1434-7.
- Souret, FF, Kastenmayer, JP and Green, PJ (2004). AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell*. 15:173-83.
- Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliensky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. 432(7014):173-8.
- Sugiyama T, Cam H, Verdel A, Moazed D, Grewal SI. (2005). RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(1):152-7.
- Surridge, C. (2003). RNA interference: Cereal adultery. *Nature*. 423(6938):390.
- Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz RM. (2000). Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development*. 127:4147-56.
- Szittyá G, Silhavy D, Molnar A, Havelda Z, Lovas A, Lakatos L, Banfalvi Z, Burgyan J. (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J*. 22(3):633-40.
- Thakker DR, Natt F, Husken D, Maier R, Muller M, van der Putten H, Hoyer D, Cryan JF. (2004). Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain by using nonviral RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(49):17270-5.
- Tilly, G., J. Chapuis, D. Vilette, H. Laude and J.L. Vilotte, (2003). Efficient and specific down-regulation of prion protein expression by RNAi. *Biochem Biophys Res Commun*. 305:548-51.
- Tomari, Y, Matranga, C, Haley, B, Martinez, N, and Zamore, PD. (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306:1377-80.
- Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM, Epstein SL. (2004). Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(23):8682-6.
- Tonkin LA, Bass BL. (2003). Mutations in RNAi rescue aberrant chemotaxis of ADAR mutants. *Science* 302:1725.
- Ueki S, Citovsky V. (2001). Inhibition of systemic onset of post-transcriptional gene silencing by non-toxic concentrations of cadmium. *Plant J*. 28(3):283-91.
- Uprichard SL, Boyd B, Althage A, Chisari FV. (2005). Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(3):773-8.
- van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*. 1990 2(4):291-9.

- Vargason JM, Szittyá G, Burgyan J, Tanaka Hall TM. (2003). Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell*. 115:799-811.
- Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SI, Moazed D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*. 303(5658):672-6.
- Wieland H, Ullrich S, Lang F, Neumeister B. (2005). Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* depends on host cell amino acid transporter SLC1A5. *Mol Microbiol*. 55(5):1528-37.
- Winston WM, Molodowitch C, Hunter CP. (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*. 295(5564):2456-9.
- Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ, Martins IH, Orr HT, Paulson HL, Yang L, Kotin RM, Davidson BL. (2004). RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med*. 10(8):816-20.
- Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou MM. (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*. 426(6965):468-74.
- Yang S, Tutton S, Pierce E, Yoon K. (2001) Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. (22):7807-16.

CAPÍTULO 2

DÉBORA:

Plataforma para desenho de siRNAs

1. Introdução

A RNAi é conhecida como uma ferramenta de *knock-down* gênico, isto é, permite elevado grau de inativação dos alvos (90 a 99% em estudos *in vitro*), mas não total, como observado em ferramentas de *knock-out*.

A utilização sistemática de siRNAs revelou que algumas moléculas direcionadas para diferentes alvos de um mesmo RNA são mais eficientes que outras (Holen *et al.*, 2002). Esses dados sugeriram a existência de parâmetros que determinariam a eficiência de *knock-down* de um siRNA, entre eles: i) posição no RNA alvo ii) conteúdo de GC e estrutura secundária do siRNA (Reynolds *et al.*, 2004) e iii) estabilidade termodinâmica das extremidades (Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.* 2003).

Vários grupos e empresas começaram então a desenvolver programas capazes de identificar siRNAs funcionais a partir de um RNA alvo (Yamada e Morishita 2004; Yuan *et al.*, 2004; Naito *et al.*, 2004; Chalk *et al.*, 2004; Amarzguioui e Prydz, 2004; Levenkova *et al.*, 2004; Yiu *et al.*, 2005).

Contudo, ao início deste projeto de tese não havia algoritmos para desenho de siRNAs, sendo a única referência o protocolo de *Thomas Tuschl* e colaboradores (Elbashir *et al.*, 2001).

Este capítulo apresenta a plataforma denominada *Débora*, criada e aperfeiçoada durante o decorrer deste projeto de doutorado, assim como sua validação. Ela tem sido utilizada em nosso laboratório para desenho de inúmeras moléculas em projetos próprios e em colaborações.

2. A plataforma

A plataforma (roteiro simplificado) se baseia em alguns parâmetros já descritos na literatura e outros identificados durante este projeto. Todos eles são aplicados aos oligos *guia* e *passageiro*, como apresentado na ordem:

2.1 localização no RNA alvo

O alvo (21-mer) deve estar localizado na região codificante, excluindo os 100 primeiros nucleotídeos após o *start codon* e os 100 últimos nucleotídeos antes do *stop codon*. Isso devido à possibilidade dessas regiões (de 100 nt) estarem complexadas a proteínas regulatórias da tradução, dificultando o acesso do siRNA. 5' e 3' *untranslated regions* (UTR) geralmente não são consideradas devido à mesma questão. Contudo os microRNAs - que atuam de uma forma muito similar aos siRNAs - têm como alvo a 3' UTR e alguns estudos de RNAi relatam a identificação de bons alvos nessas regiões.

2.2 polimorfismos

Várias seqüências do gene (alvo) são compiladas e alinhadas - usando por exemplo o programa *Clustal X* - excluindo-se regiões com presença de polimorfismos. O sequenciamento deve ser feito caso não haja potenciais seqüências de 21-mer sem polimorfismos.

2.3 formato das moléculas

A maioria dos siRNAs utilizados neste projeto são produzidos por transcrição *in vitro*. Este procedimento exige que o primeiro nucleotídeo seja uma guanina e o décimo nono seja uma citosina (forma molecular 5' GN₁₇CN₂ 3'). Para shRNAs o formato deve ser 5' GN₂₀ 3'. Uma transcrição *in vitro* mais intensa é esperada para moléculas com o formato G₂N₁₆CN₂. Oligos obtidos comercialmente podem ser adquiridos em qualquer formato (N₂₁). A procura por tais sequências é conduzida no programa *Gene Runner*.

2.4 atividade do oligo guia

Preferência pelos maiores valores de energia livre (ΔG) gerados pelos programas *Strand Analysis* versão 1.0 ou 2.0 (vide capítulos 3 e 4).

2.5 estrutura secundária dos oligos

Evita-se siRNAs que apresentem estruturas secundárias (*hairpins*, *duplexes* ou *internal loops*) cuja T_m seja maior que 0°C. Essa análise é conduzida no programa *Gene Runner*, subprograma *oligo*, sempre trabalhando com o formato *RNA* da sequência.

2.6 conteúdo de GC

Preferência por conteúdos de GC entre 30% e 55% - o que reduz a ocorrência de estruturas secundárias.

2.7 extremidades 3' overhang

Vários estudos observaram que dinucleotídeos de timina nas extremidades 3' atribuem maior estabilidade ao siRNA.

2.8 especificidade

A busca por identidade é realizada através do programa BLAST *Search for Short, Nearly Exact Matches* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), usando sempre o oligo antisenso do siRNA (que será a molécula funcional) contra o banco EST (seqüências expressas) do organismo em questão. A identidade (em termos de nucleotídeos contínuos) máxima permitida entre o oligo antisenso e um alvo inespecífico é de 15 nt.

2.9 outros

Parâmetros identificados neste projeto, cuja propriedade intelectual é mantida através de contrato de segredo industrial (vide adendum).

3. Validação da plataforma

siRNAs contra os seguintes genes foram desenhados e utilizados para validar experimentalmente a plataforma:

- MeCP2 de camundongo (accession number AF158181)
- focal adhesion kinase de rato (FAK; accession number AF020777)
- alpha beta crystalline (Cryab) de camundongo (accession number NM_009964)
- HGPRTase de *S. mansoni* (accession number X07883)
- Vírus da Hepatite murina (MHV; accession number AF201929)
- enzima conversora de angiotensina de rato (ECA; accession number AF201332)
- signal transducer and activator of transcription 5 a/b de rato (STAT 5a/b; accession number NM_017064)

Os resultados para MeCP2 e HGPRTase podem ser vistos nos capítulos seis e sete respectivamente. Os dados de FAK e Cryab e Stat 5a/b não estão mostrados (projetos de colaboração). A seguir os resultados parciais de MHV (in vitro), e ECA em ratos e, Stat 5a/b (in vitro) cujas informações adicionais estão no adendo.

3.1 - Silenciamento in vitro de Stat 5 a/b

Projeto de colaboração com Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero e Daniel da Cunha
(Dpto de Fisiologia, Unicamp).
em andamento

No intuito de perscrutar a sinalização intracelular mediada por um membro da família dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT), utilizamos a plataforma para desenhar um siRNA contra o gene Stat 5 a/b.

Células isoladas de ilhotas pancreáticas foram tratadas com siRNA (figura 1) complexado a lipossomos (Lipofectamine 2000, Invitrogen), de acordo com o fabricante. Vinte e quatro horas depois elas foram coletadas, o RNA extraído e submetido a RT-PCR para confirmação do silenciamento. O gene RPS-29 foi usado como controle interno.

A utilização deste único siRNA permitiu o silenciamento de aproximadamente 85% dos transcritos correspondentes (figura 2), sendo possível ainda uma redução mais intensa elevando-se a massa de duplex utilizada.

Nome: Stat5a/b-s

Sequencia: 5' GACCCAAGAGUACUUCAUCAU 3'

Nome: Stat5a/b-as

Sequencia: 5' GAUGAAGUACUCUUGGGUCUG 3'

```
241 tgggtgcagga gctgcagaag aaggcagaac accaggtggg ggaagatggc tttgtgctga
301 agatcaagct ggggcactat gccacgcagc tccagaacac gtacgaccgc tgtcccatgg
361 agctggttcg ctgtatccgt cacattctgt acaatgaaca gaggtgggtc cgagaagcca
421 acaattgtag ctccctgct ggtgtcctgg ttgacgccat gtcccagaag caccttcaga
481 tcaaccaaac gtttgaggag ctgcgcctga tcacacagga cacggagagc gagctgaaga
541 agctgcagca gacccaagag tacttcatca tccagtacca ggagagcctg cggatccaag
601 ctcagtttgg ccagctggcc cagctgaacc cccaggagcg catgagcagg gagacagccc
661 tccagcagaa gcaagtgtcc ctggagacct ggctgcagcg agaggcacag acactgcagc
721 agtaccgcgt ggagctgggt gaaaagcacc agaagaccct gcagttgttg aggaagcagc
781 agaccatcat cctggacgac gagctgatcc agtggaagcg ggggcagcag ctggccggga
```

Figura 1. siRNAs desenhados para stat 5 a/b. Sequência parcial do mRNA de STAT5a (3611 nt), destacando (em sombreado) o alvo para silenciamento.

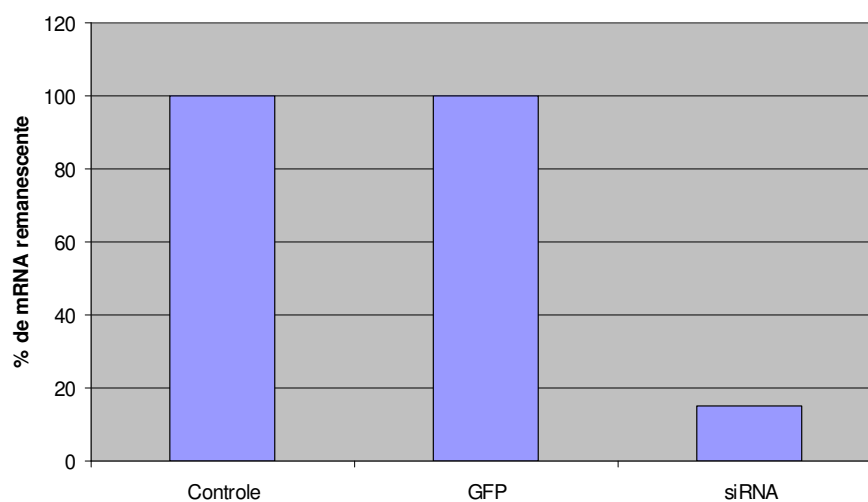
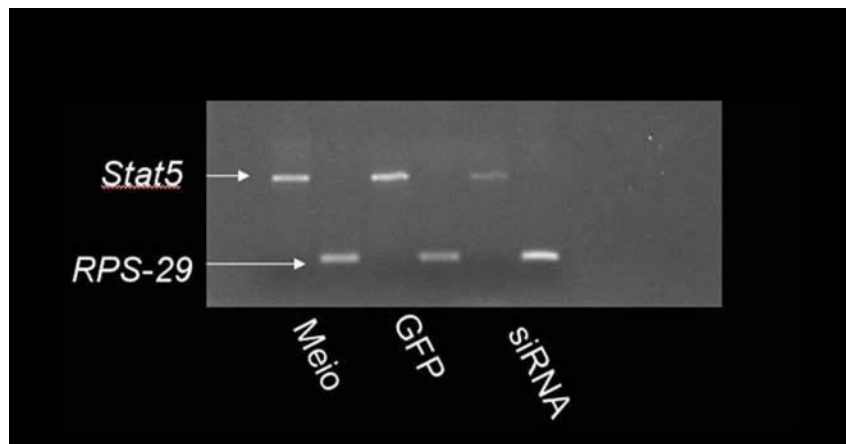


Figura 2. RT-PCR semi-quantitativo demonstrando silenciamento de Stat 5 a/b. Após a normalização com base na rps-29, nota-se um silenciamento de aproximadamente 85% de transcritos para stat 5a/b.

3.2 Combate ao vírus da hepatite murina (MHV) através do silenciamento de proteína N

Projeto de colaboração com Mariângela Grippo, aluna de doutorado da Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes e Dr. Rovilson Gilioli (Lab. De qualidade Animal - CEMIB, Unicamp)
em andamento

Introdução

O vírus da hepatite murina (MHV), pertencente ao grupo dos Coronavírus, é o patógeno mais frequentemente identificado em camundongos utilizados como modelo experimental. Várias estirpes têm sido isoladas, diferenciando na sua patogenicidade e antigenicidade (Barthold *et al.*, 1984; Taguchi *et al.*, 1982, Gilioli *et al.*, 1996).

Os Coronavírus são vírus grandes, com 80 a 160 nm de diâmetro (figura 3), envelopados, possuem um RNA de fita simples polaridade positiva e o maior genoma de todos os vírus de RNA, com aproximadamente 30 kilobases.

O ciclo de replicação dos coronavírus (Fig. 4) obedece a alguns passos resumidamente descritos abaixo.

1. O RNA viral (fita simples positiva) é imediatamente traduzido pela maquinaria da célula hospedeira. Apenas o primeiro gene, Orf 1ab (replicase) é traduzido na proteína RdRP (RNA-dependent RNA polymerase)
2. A RdRP sintetiza a fita negativa de RNA (-) que é usada para gerar fitas molde positivas (+) e um conjunto de RNAs mensageiros (RNAm) subgenômicos.
3. O primeiro gene do RNA mensageiro é traduzido em proteína, até a última proteína, que é a proteína N (proteína do nucleocapsídeo)
4. O RNA genômico (+) não é traduzido, ao invés disso é empacotado em virions e servem como material genético para a geração de outras partículas virais

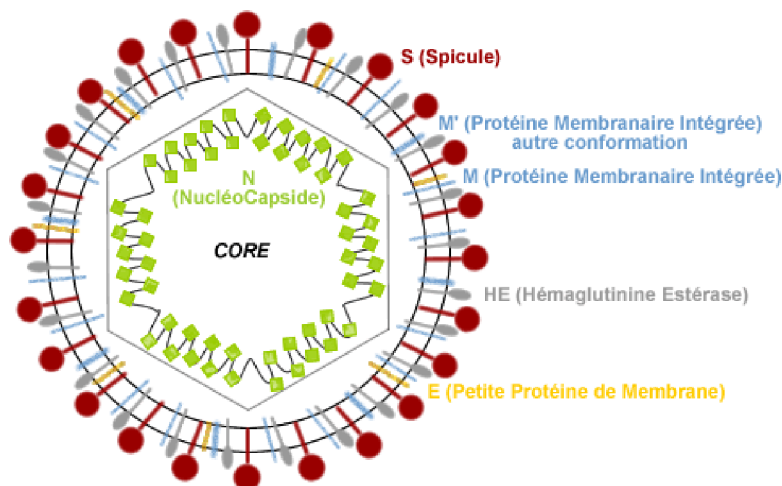


Figura 3. Morfologia da partícula viral de um Coronavírus. Notar a localização de suas principais proteínas.

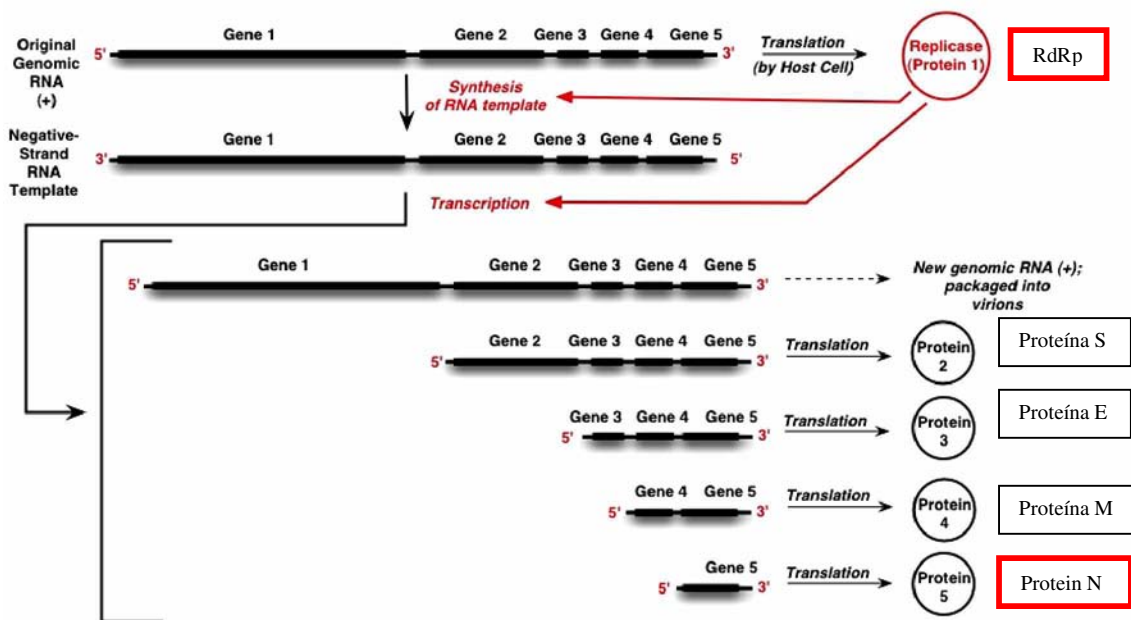


Figura 4. Genoma e replicação do MHV. Diagrama simplificado do genoma do Coronavírus, mostrando que os 5 genes conservam-se em todos os coronavírus (replicase 1ab, espícula(S), membrana (E), integral da membrana (M) e do nucleocapsídeo(N). (Adaptado de Fields, 2001).

Cada partícula viral é constituída por quatro proteínas estruturais além do RNA, conforme observado na figura 3.

A proteína estrutural S, localizada na membrana viral, é responsável pela formação das espículas e pela ligação da partícula viral à célula hospedeira, apresentando um importante papel na fusão do envelope viral com a membrana celular. As proteínas M e E são importantes na formação e no brotamento das partículas virais.

Revestindo todo o RNA viral encontra-se a proteína N, fundamental para a formação do nucleocapsídeo e estando diretamente envolvida na regulação da síntese de RNA.

Muitos Coronavírus, incluindo algumas estirpes do MHV, apresentam ainda uma outra glicoproteína em seu envelope – a proteína HE (Hemaglutinina-esterase), responsável pela aglutinação e adsorção do vírus a hemácias de diferentes espécies animais.

Este projeto visa avaliar RNAi como ferramenta de combate a viroses em sistemas *in vitro*. A disponibilidade de amostras do MHV, sua fácil manipulação, seus efeitos citopáticos claros (formação de sincícios e lesão do tapete celular; figura 1 A e B) em um curto período de tempo (24 horas) e sua letalidade em camundongos o tornam um ótimo modelo de estudos de RNAi no combate *in vitro* e *in vivo*.

Materiais e Métodos

Desenho do siRNA

Um alvo na posição 910 da região codificante do gene para a proteína N (accession number no GeneBank : AF201929) foi desenhado seguindo o algoritmo Débora (figura 5).

```

1 atgtcttttg ttcttgggca agaaaatgcc ggtagcagaa gtcctctctg aaaccgcgct
61 ggtaatggca tcctcaagaa gaccacttgg gctgaccaa cgcagcgtgg aaatagaggg
121 agaaggaacc atcccaagca gactgcaact actcagccca atgccgggag tgtgggtccc
181 cttactctt ggttttcggg catcacccag tttcaaaagg gaaaggagtt ccagtttgca
241 caagacaggg gactgcctat tgccagtggg atccccgctt cagagcaaaa gggatattgg
301 tatagacaca accgacgttc ttttaaaaca cctgatggcc agcacaagca gctactgccc
361 agatgggtatt tttactatct tggaaacagg ccccatgctg gcgcagagta tggcgacgat
421 atcgaaggag ttgtctgggt cgcaagccaa caggccgaca ctaagaccac tgcgatgtt
481 gttgaaaggg acccaagcag tcatgaggct attcctacta ggtttgcgcc cggcacggt
541 ttgcctcagg gctttttatg agaaggctcg ggaaggctcg cacctgctag tcgatctggt
601 tcgcggtcac aatcccgtgg gccaaataat cgcgctagaa gcagttccaa ccagcgccag
661 cctgcctctg ctgtaaaacc tgacatggcc gaagaaattg ctgctcttgt tttggctaag
721 cttggtaaa atgccggcca gcccaagcag gtaactaagc aaagcgccaa agaagtcagg
781 cagaaaattt taactaagcc tcgtcaaaag aggactccaa acaagcagtg cccagtcag
841 cagtgttttg ggaagagagg ccctaatacag aactttggag gctctgaaat gttaaaactt
901 ggaactagt atccgcagtt ccccattctt gcagagttgg ctccaacacc tagtgccttc
961 ttctttggat ctaaaattaga attggtcaaa aagaactctg gtggtgctga tgaaccacc
1021 aaagatgtt atgaattgca gtattcaggt gcaattagat ttgatagtac tctaccggt
1081 tttagagact tcatgaaagt gttgactgag aatttgaatg cctaccagga ccaagctggt
1141 agttagatc tagtgagccc aaagcctcca agaagaggtc gtagacaggg tcaagaaaag
1201 aaagatgaag tagataatgt aagcgttgca aagcccaaaa gcttggtgca gcgaaatgta
1261 agtagagaat taacccccga ggatcgtagc ctgctggctc agatcctaga cgtggcggt
1321 gtgccagatg ggttggaaga tgactcta atgtgtaa

```

Figura 5. Sequência codificante do gene para proteína N. Em negrito/ fundo cinza: alvo para RNAi.

Características do siRNA-N910

Posição na sequência (AF201929 - CDS)	910
Molécula	siRNA
Fórmula molecular	$\text{GN}_{17}\text{CN}_2$
% GC (oligo antisenso)	57,1 %
3' TT	na fita senso
Atividade do oligo guia	sim
polimorfismos	não apresenta
estrutura antisenso/ senso	Ok
BLAST	ok

siRNA-N910

senso: 5' GATCCGC AGTTCCCC ATTCTT 3'
 antisenso: 3' CACTA GGC GTCAAGGGGTAAG 5'

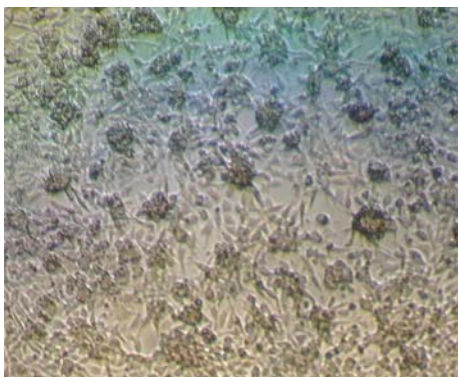
Síntese do siRNA: o siRNA foi produzidos em laboratório por transcrição *in vitro* (vide adendum pág 168; Donze e Picard, 2002; Yu *et al.*, 2002).

Transfecção: Células da linhagem L909, susceptíveis ao vírus MHV-3 foram cultivadas em MEM- Eagle, suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de penicilina. As células foram contadas em uma densidade próxima de 1×10^4 células por well e cultivadas em placas de 24 wells a 37°C com 5% CO₂, por 24 horas até a confluência de 60%. Neste momento elas foram transfectadas com 20 picomoles (≈ 270 ng) de siRNA complexo a lipossomos (Lipofectamine Reagent, Invitrogen). Vinte e quatro horas depois as células são infectadas com o MHV (1 TCID 50). Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Como controles negativos utilizamos células tratadas com um siRNA irrelevante e células não infectadas.

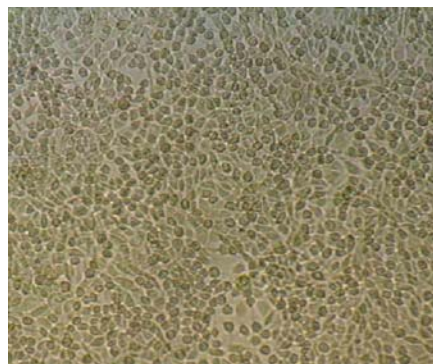
Confirmação do efeito do siRNA na replicação viral: vinte e quatro horas após a infecção com MHV realizou-se uma avaliação do efeito por microscopia ótica (figura 1, análise da formação de sincícios e lise do tapete celular) .

Resultados e Discussão

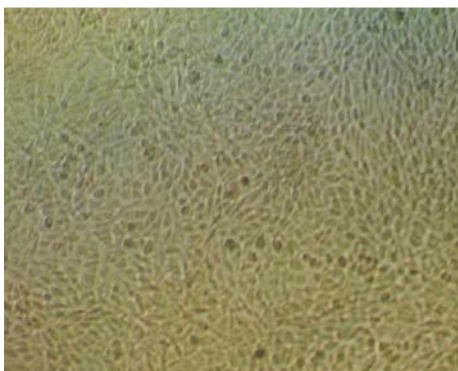
Os resultados demonstraram um claro efeito protetor (figura 6 A,B, C e D).



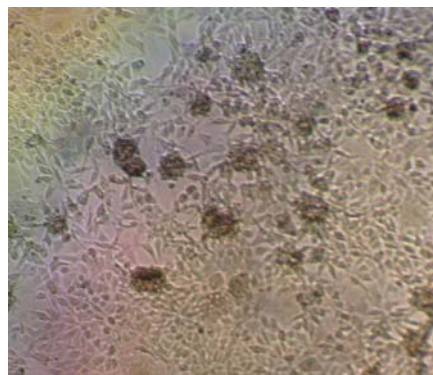
A) Célula infectada com MHV.
Note os sincícios (pontos escuros e arredondados) e a lise do tapete celular.



B) Célula não infectada



C) Célula transfectada com
siRNA 910 (nucleocapsídeo)



D) Célula transfectada com
siRNA irrelevante

Figura 6. Testes de combate ao MHV por siRNAs. Os resultados demonstram um claro e eficiente combate ao vírus.

Os dados apresentam um eficiente controle de MHV mesmo utilizando alvos da fase final de replicação. Ensaio para confirmação molecular do silenciamento (RT-PCR e western) estão em andamento.

3.3 - Silenciamento da enzima conversora de angiotensina (ECA) em ratos geneticamente hipertensos

Projeto de colaboração com Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
(Dpto de Fisiologia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro - Uberaba, MG).
em andamento

Introdução

A hipertensão arterial sistêmica é um dos fatores de risco mais importantes para doenças cardiovasculares e atinge aproximadamente vinte por cento da população mundial. Ela é considerada uma doença complexa, isto é, com componentes ambientais e genéticos (Pereira e Krieger, 2001).

Alguns dos fatores ambientais são: dieta inadequada, consumo elevado de álcool ou de sal, sedentarismo e estresse. Entre os elementos genéticos estão os componentes do sistema *renina-angiotensina-aldosterona* (figura 7).

Neste sistema, o fígado produz o angiotensinogênio, que é processado na corrente sanguínea pela renina em angiotensina I. Em sequência, *enzima conversora de angiotensina* (ECA), localizada nas células da superfície dos vasos sanguíneos converte angiotensina I em angiotensina II. Esta última estimula a glândula adrenal a produzir aldosterona, que ordena a retenção de sal no rim, elevando assim a pressão sanguínea.

Dúzias de drogas anti-hipertensivas (diuréticos, bloqueadores de canais de cálcio, beta-bloqueadores, inibidores de ECA e bloqueadores do receptor da angiotensina II) reduziram em mais de 50% a ocorrência de derrames e ataques cardíacos nos Estados Unidos. Contudo elas podem gerar efeitos colaterais como fadiga, vertigem, insônia, impotência, constipação e dor de cabeça. Adicionalmente, o número de pacientes com

terapia ineficaz é ainda elevado. Tudo isso leva à necessidade do desenvolvimento de drogas com reduzidos ou sem efeitos colaterais e de ação mais prolongada.

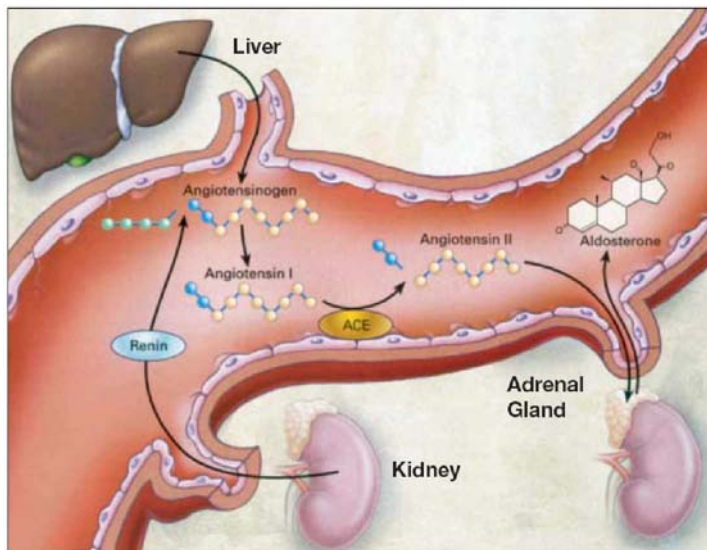


Figura 7. Sistema renina-angiotensina-aldosterona (ilustração de *Breakthroughs in Bioscience* - FASEB).

A existência de componentes genéticos na hipertensão arterial nos levou hipotetizar o desenvolvimento de um tratamento baseado na RNAi, visando o silenciamento de ECA e a consequente quebra do sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Em um teste piloto usamos como modelo uma linhagem de ratos SHR (*spontaneously hypertensive rats*), derivada do Wistar e isolada por *inbreeding* (Okamoto e Aoki, 1963). Estes animais nascem normotensos (pressão média arterial - MAP - 140 mm Hg) e apresentam hipertensão espontânea (MAP 180 mm Hg) entre a 7ª e a 15ª semanas, atingindo um platô entre a 20ª e 28ª semanas, não havendo influência sexual nesse desenvolvimento. O sistema renina angiotensina desempenha um importante papel na patogênese desta hipertensão.

Materiais e Métodos

Identificação do alvo

Uma sequência alvo contra o gene ECA de ratos foi desenhada de acordo com o algoritmo *Débora*, na região codificante (figura 8; número de acesso no GenBank: AF201332).

Características

posição na sequência (AF201332)	2024
molécula	siRNA
fórmula molecular	G ₂ N ₁₉ (transcrição <i>in vitro</i> intensificada)
% GC (oligo antisenso)	42,9 %
3' TT	apenas no oligo antisenso
Atividade do oligo guia	Ok
polimorfismos	não apresenta
estrutura antisenso/ senso	Ok
Especificidade (blast)	Ok

siRNA 2024:

senso: 5' GGTGTTGTGGAACGAATACGC 3'
antisenso: 3' TTCCACAACACCTTGCTT ATG 5'

Figura 8. Sequência do mRNA do gene ECA. Em itálico/negrito: 5' UTR e 3' UTR. Em fundo cinza: região escolhida para RNAi.

```

1  cgccgcaccg cgccgcaccg gccatggggg ccgcgtccg ccagcggggg cggtggccgt
61 tgtcaccgcc gctcttgatg ctgtcgctgc tgctgctgct gctgctgccg ccgtcgcccg
121 ccccggcgct tgaccctgga ttgcagccgg gcaacttttc cgcgacgag gcaggggccc
181 agctcttcgc tgacagctat aactcgagtg ccgaggtggt gatgttccag agcaccgcag
241 ccagctgggc gcacgacacc aacatcacgg aggagaatgc gcggctccag gaggaagcgg
301 ccctgatcaa ccaggagttt gcagaggtct ggggcaagaa ggccaaggag ctgtatgagt
361 ccatctggca gaacttcact gaccaaagc tgccaaggat catcggtacc gtacagaccc
421 taggacctgc caacctgccc ctgaccacg ggctgcagta caactctctg ctaagcaaca
481 tgagcagaat ctactccacc ggcaaggtct gcttccccaa caagactgcc acctgctggt
541 ccctggaccc agagctcacc aacatcctgg cttccctcacg aaactatgcc aaggtgctgt
601 ttgcctggga aggctggcat gatgctgtgg gtatcccact gaggccctc tatcaggact
661 ttactgcccc cagtaatgaa gcctacagac aagatggctt ctcagacaca ggagccctact
721 ggcgctcctg gtatgagtc ccctcctttg aagagagttt ggagcatctc taccaccaag
781 tcgagccctc ctacctgaac ctccatgcct ttgtccgtcg cgactgcac cgccgctatg
841 gggacaaata catcaatctc agaggtccta ttcccgtca tctgctggga gacatgtggg
901 ccgagagctg ggagaaacatt tacgacatgg tagtgctttt cccgacaaaa cccaacctcg
961 atgtcaccag tacaatggta cagaagggct ggaatgccac gcacatgttc cggtcgcag
1021 aggaattctt tacctcgctg gggctctccc ccatgcctcc agagttcttg gcggagtcga
1081 tgctggagaa accagctgat ggacgggagg tggtgtgcca tgccctctgcg tgggacttct
1141 acaacaggaa ggacttcagg attaagcagt gcacgcgggt cacgatggac cagctgtcca
1201 cagtacacca cgagatgggc cacgtgcagt actatctcca gtacaaggac ctgcacgtct
1261 ctctcgctcg aggtgccaac cctggcttcc acgaggccat cggggatgta ctcgctctct
1321 ctgtctctac cccagcacat ctgcacaaaa ttggcctgct agaccgtgtt gccaatgaca
1381 tagaaagtga catcaattac ttgctaaga tgcccttaga gaaaattgcc ttcttgcctt
1441 ttggttacct ggtggaccag tgccgctggg gggtcttcag tggaagctac ccacctctc
1501 gtacaaacta cgactggtgg tatcttcgaa ccaagtatca ggggatctgc ccaccagttg
1561 ctcggaatga aacctatctt gacgtggggg ccaagtcca catcccaagc gtgacaccat
1621 acatcaggta ctttgtgagt ttcgtgctac agttccagtt ccatcaagcg ctgtgcaagg
1681 aggcaggcca ccagggtcca ctacaccagt gtgacatcta ccagtccacc aaggcagggg
1741 ccaagctcca acaggtgctg caggctggct gctccaggcc ctggcaggag gtgctgaagg
1801 acctggtggg ttcagatcgc ctggatgcca gtgcgcta ggagtacttc caaccagtaa
1861 gccagtggct gcaggagcag aatcagcgga atggcgaggt octaggtggg ccggagtatc
1921 agtggcgtcc accgttacca gacaactatc cagagggaat tgacctagag actgatgaag
1981 ccaaggctaa caggttcgtg gaggagtatg accggacagc caaggtgttg tggaacgaat
2041 acgcagaggc caactggcat tataaaccca acattaccat agagggcagc aagatcctgc
2101 ttcagaaaaa caaggaagtg tccaaccata ccttgaata tgccacctgg gccaaagacat
2161 ttgagctgag caacttcagc aactctacca tcaagcggat cataaagaag gttcagaacg
2221 tggaaccggc agtgctgcct cccaacgagt tagaagagta caaccagatc ctgctagaca
2281 tggaacgcac ttacagtgtg gccaatgttt gctacacaaa tggaacttgt ctgtcaactgg
2341 agcctgatct gacaaatata atggccacgt cccgaaaata cgaagaattg ctttgggtgt
2401 ggaagagctg gcgagacaag gtggggagag ccatccttcc ctttttccca aagtaoigtgg
2461 acttctccaa caagatcgcc aagctcaacg gctactctga tgcaagggat tcctggagat
2521 ctcatatgag gtccgtagac ttggagcaag acctggaaaa actataccag gagctgcagc
2581 cgctctacct gaacctgcat gcctatgtgc gccgctccct gcaccgccat tatgggtctg
2641 agtacatcaa cctggatggg ccattcctg ccacactgct agggaaacatg tgggcacaga
2701 cttggtccaa catctatgac ttggtggcac ccttcccttc cgccccag atagatgcca
2761 cggaaggccat gataaagcag ggatggacac ccagaaggat atttaaggaa gctgacaatt
2821 tttttacctc cttggggctg ttacctgtgc ccctgagtt ctggaacaa tcaatgttag
2881 agaagccaac cgatgggagg gaggtggtgt gccatgcctc agcctgggag ttctacaacg
2941 gcaaggactt caggatcaag caatgtacct ctgtgaacat ggaggaattg gtgatagccc
3001 accacgaaat gggccacatc cagtatttca tgcaagtaca agacttgcc gtgacctttc
3061 gggagggcgc caaccccggt tttcatgagg ctattggaga tgttttggct ctgtctgtgt
3121 ctacacccaa gcatctacac agtctcaacc tgctcagcag tgagggcagt ggctacgagc
3181 atgacatcaa ctttctaag aagatggccc ttgacaagat cgccctcatc cccttcagct
3241 acctcattga ccagtggcgc tggagggtct ttgacggaag catcaccaag gagaactaca
3301 accaggagtg gtggagtctc agactgaagt accagggtct ctgccctcca gtgcctagat
3361 cccaagggtga ctttgaccca gggtccaagt tccaogttcc tgcaaatgtg ccatacatca
3421 ggtactttat cagcttcac atccagttcc agttccacga ggcactatgt cgcgacgccg
3481 ggcacaccgg ccccctgtac aagtgtgata tctaccaatc caaggaaagca gggaagctgc
3541 tgccagatgc ctatgaattg ggctacagta agcagtgccc agaagcccatg aagataatca
3601 caggccaacc taacatgtca gcctctgcca ttatgaatta cttcaagcca ctgactgaat
3661 ggctcgctac agagaacagg agacatggag agacactggg ctggccggag tacacctgga
3721 caccaaacac ggctcgctca gaaggctccc tcccagagtc cagtcgcgtc aaactcctgg
3781 gtatgtacct ggaaccacag caggcccgtg tgggccagtg ggtgctgctc ttcctaggcg
3841 tcgcccgtct ggtggccacc gtgggtctcg cccaccgact ctacaacatc cataaccatc
3901 acagcctccg ccggccccc cgtgggcccc agtttgggtc cgaggtggag ctcagacact
3961 cctgaggtga ccctgccgtc aaggccaaca gaggagtgtc ccaaaaaaa aaaa

```

Síntese do siRNA: o siRNA foi produzidos em laboratório por transcrição *in vitro* (vide adendum pág 168; Donze e Picard, 2002; Yu *et al.*, 2002).

Animais: foram utilizados doze ratos SHR entre 16^a - 20^a semana de hipertensão, com uma massa média de 325 gramas. Eles foram separados em três grupos: i) três animais injetados apenas com tampão (PBS); ii) dois animais injetados com siRNA contra GFP e iii) sete animais injetados com siRNA contra ECA.

Injeção: a massa de siRNA contra ECA inoculada foi de 150 µg/kg (aproximadamente 45-50 µg por animal), através de uma injeção endovenosa (jugular) rápida de veículo (PBS, 1 mL/animal).

Confirmação do efeito do siRNA: análises moleculares (RT-PCR e western), bioquímicos (atividade de ECA) e fisiológicos (pressão média arterial, figura 2) serão usados como parâmetros para confirmar o efeito antihipertensivo dos duplexes RNA.

Resultados e discussão

A análise fisiológica demonstrou uma redução de aproximadamente 20% na MAP três dias após a injeção - um pouco antes de o experimento ser interrompido (figuras 9 e 10). Essa diminuição (aproximadamente 35 mm Hg) converte os camundongos hipertensos em normotensos, agindo em um período de tempo (no mínimo 24 horas) muito maior que os anti-hipertensivos usuais (captopril, 8 horas). Os dois grupos controles (tampão e tampão+siRNA contra GFP) foram agrupados na figura 2.

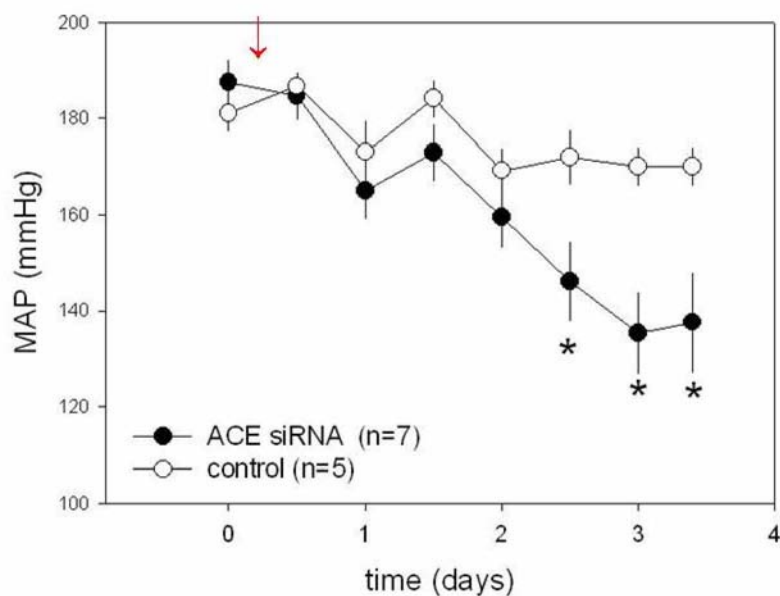


Figura 9. Experimento 1. Time course da pressão arterial média (MAP) em ratos hipertensos espontâneos (SHR) tratados com siRNA (ACE siRNA) ou controle. A seta indica o momento da injeção. $p < 0,05$ versus o controle. Massa injetada = 150 ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

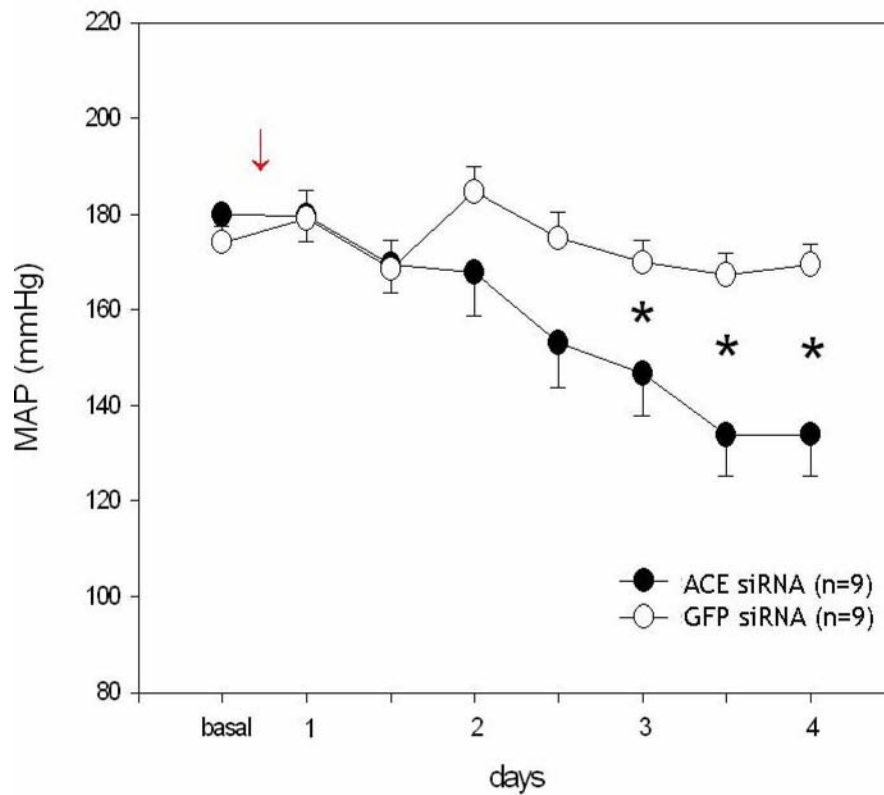


Figura 10. Experimento 2. Time course da pressão arterial média (MAP) em ratos hipertensos espontâneos (SHR) tratados com siRNA (ACE siRNA) ou controle (GFP). A seta indica o momento da injeção. $p < 0,05$ versus o controle. Massa injetada = 200 ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Ensaio adicionais estão em andamento para determinar o tempo de ação dos siRNAs na redução da MAP assim como para confirmar o silenciamento em termos moleculares.

4. Discussão

A plataforma Débora foi desenvolvida ao longo do projeto de doutorado, incorporando as mais recentes e relevantes parâmetros determinantes da eficiência de um siRNA (incluindo os programas Strand Analysis – capítulo 3 e 4).

Sua validação pôde ser demonstrada em seis sistemas diferentes até o momento, sendo dois *in vitro* (combate ao MHV e stat 5 a/b) e quatro *in vivo* (MeCP2, HGPRTase, FAK e ECA).

5.3 - proteção intelectual da plataforma *Débora*: parâmetro 2.9

Há basicamente duas formas de se proteger uma propriedade intelectual (PI): *patente* ou *segredo industrial*. O depósito de patentes de processos (como no caso da plataforma *Débora*) é algo comum, porém pode gerar um efeito inverso: perda do domínio exclusivo do mesmo. Isso porque o depósito da patente ocorre em um banco público, sendo nele descrito os *detalhes* de sua criação.

O desenvolvimento de novos processos baseados em informações neste banco público, contendo porém modificações *significativas* e *não óbvias* podem gerar novas patentes para outrem. Considerando esse risco potencial - no caso especial de processos onde pequenas alterações são simples de serem desenvolvidas – os autores de *Débora* em comum acordo decidiram proteger a produção pelas leis de um *Segredo Industrial*.

Essa modalidade de proteção à PI não é amplamente difundida. Isto porque, entre outros motivos, ela só pode ser aplicada à PIs cujos mecanismos intrínsecos não sejam *evidentes*, como por exemplo, a fórmula química da Coca-cola, a mais notória PI protegida por esse mecanismo. Um novo modelo de tênis ou motor de geladeira não podem ser protegidos como segredo industrial porque a descrição, visualização e compreensão de seus mecanismos internos e externos são evidentes.

Esta forma de proteção se baseia na restrição de informações *específicas* e *essenciais* sobre a PI (*em nosso caso o parâmetro 2.9*), a qual é mantida única e exclusivamente por seus autores que oficializam o compromisso de sigilo por meio de um contrato oficial registrado em cartório. Desta forma, a PI é protegida por total responsabilidade dos autores.

6. Bibliografia

- Amarzguioui M, Prydz H. (2004). An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochem Biophys Res Commun.* 316(4):1050-8.
- Barthold SW, Smith AL. (1984). Mouse hepatitis virus strain--related patterns of tissue tropism in suckling mice. *Arch Virol.* 81(1-2):103-12.
- Chalk AM, Wahlestedt C, Sonnhhammer EL. (2004). Improved and automated prediction of effective siRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 319(1):264-74.
- Fields, Virology. (2001). Volume 1 (Fourth Edition) Ed. Knipe, D. M. And Howley, P. M. New York: Lippincott Williams & Wilkins.
- Gilioli R, Sakurada JK, Andrade LA, Kraft V, Meyer B, Rangel HA. (1996). Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. *Lab Anim Sci.* 46(5):582-4.
- Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H. (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* 30(8):1757-66.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 115(2):209-16.
- Levenkova N, Gu Q, Rux JJ. (2004). Gene specific siRNA selector. *Bioinformatics.* 20(3):430-2.
- Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K, Morishita S, Saigo K. (2004). siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue):W124-9.
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jap Circ J* 27: 282-93, 1963.
- Pereira, AC e Krieger, JE. (2001). Biologia e genética molecular aplicadas ao diagnóstico e tratamento da hipertensão Novos paradigmas, antigos problemas. *Rev Bras Hipertens* 8: 105-13.
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol.* 22(3):326-30.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 115(2):199-208.
- Taguchi F, Makino S, Fujiwara K. (1982). Antigenic differentiation of mouse hepatitis viruses by neutralization test. *Microbiol Immunol.* 26(8):741-5.
- Yamada T, Morishita S. (2004). Accelerated off-target search algorithm for siRNA. *Bioinformatics.* [Epub ahead of print]
- Yiu SM, Wong PW, Lam TW, Mui YC, Kung HF, Lin M, Cheung YT. (2005). Filtering of ineffective siRNAs and improved siRNA design tool. *Bioinformatics.* 21(2):144-51.
- Yuan B, Latek R, Hossbach M, Tuschl T, Lewitter F. (2004). siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue):W130-4.

CAPÍTULO 3

Strand Analysis (versão alfa)

programa para análise de siRNAs

Criação e Desenvolvimento

Rodrigo Secolin¹
Vinícius D'Ávila Bitencourt Pascoal²
Tiago Campos Pereira²
Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia³
Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes^{1,2}

1 - Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas - Campinas, SP - 13084-971.

2 - Grupo de Interferência por RNA, Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP - 13084-971.

3 - Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu - SP - Brasil - 18618-000.

1. Introdução

A utilização sistemática de siRNAs revelou que algumas moléculas direcionadas para diferentes alvos de um mesmo RNA são mais eficientes que outras (Holen *et al.*, 2002). A identificação de siRNAs funcionais exige assim a realização de testes iniciais *in vitro*, demandando tempo e recursos.

Uma alternativa para isso é o uso de programas para análise da funcionalidade de siRNAs. Estudos em microRNAs e siRNAs levaram à descoberta de um parâmetro - talvez o mais importante - determinante da eficiência de um siRNA: *a diferença de estabilidade termodinâmica de suas extremidades* (Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.* 2003). Esta característica é definida pelos *quatro primeiros pares de base* de cada extremidade.

Dentro da célula, os siRNAs são capturados por R2D2, uma proteína que fica acoplada à *dicer* (DCL) e que possui afinidade por duplexes de RNA. R2D2 apresenta um papel crucial: age como um *sensor de estabilidade termodinâmica* identificando a terminação *mais estável*, sendo que uma RNA helicase iniciará o processo de abertura do siRNA pela extremidade oposta. A fita cuja extremidade 5' está na terminação menos estável é preferencialmente transferida para RISC (figura 1).

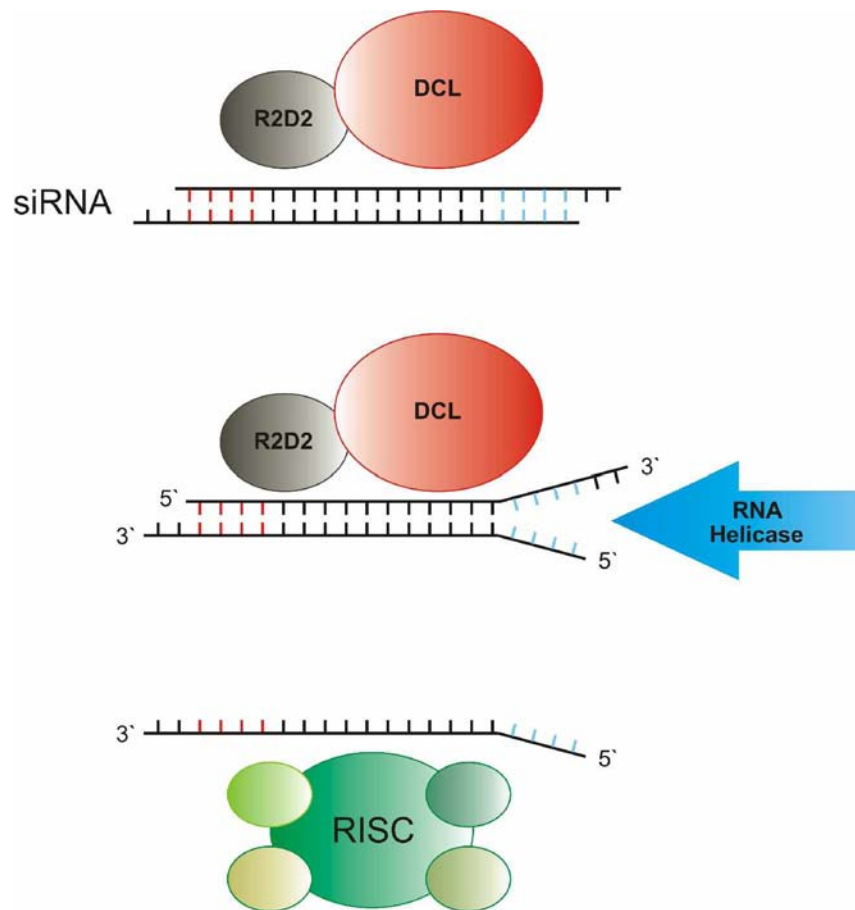


Figura 1. Papel da estabilidade interna na transferência preferencial das fitas para RISC. R2D2 posiciona-se na extremidade termodinamicamente mais estável do siRNA (quatro pares de base em vermelho). Uma RNA helicase inicia a abertura do duplex pela extremidade oposta (menos estável - quatro pares de base em azul). A fita cuja extremidade 5' é menos estável é transferida para RISC. Note que os quatro primeiros nucleotídeos na extremidade 5' da fita inferior correspondem aos nucleotídeos 16-19 da fita superior - estratégia usada no algoritmo a ser apresentado.

Uma reduzida (ou nula) eficiência de silenciamento sucederá caso a fita *senso* seja transferida para o RISC. Assim, a caracterização da estabilidade termodinâmica das extremidades passa a ser um procedimento indispensável no processo de escolha de uma alvo para RNAi. Este passo exige tempo e atenção, tornando-se extremamente demorado e sujeito a falhas quando aplicado a um número grande de seqüências-alvo ($n > 20$). O desenvolvimento de um programa capaz de caracterizar automaticamente a estabilidade termodinâmica de alvos pré-selecionados (seqüências de 21-mer) no RNA em estudo representaria um avanço no processo de desenho de siRNAs.

Em especial, vetores baseados em promotores de RNA polimerase III (como U6 e H1) não permitem a clonagem de sequencias com quatro timinas (e consequentemente quatro adeninas no caso de *short hairpin RNAs*, *shRNAs*) pois os reconhecem como sinal de terminação.

A primeira versão deste programa, denominado *strand analysis - versão alfa* é capaz de:

- determinar de maneira rápida se um siRNAs é *funcional* (extremidade 5' do oligo antisenso menos estável) ou *não-funcional* (extremidade 5' do oligo senso menos estável).
- apontar a existência de quatro timinas (4Ts) ou quatro adeninas (4As) nos alvos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Algoritmo

O programa foi escrito na linguagem *Pascal*, é executado em DOS – *Disk-based operating system* - e visa calcular a diferença (Δ) de energia livre (G; -kcal/mol) das sequências compostas pelos 4 primeiros pares de base (e não nucleotídeos) das extremidades dos duplexes. Quanto mais negativo for o valor de G para uma determinada sequência, mais estável ela é. Os valores de G são calculados por *dinucleotídeos*, segundo a tabela abaixo (Khvorova *et al.* 2003):

Valores de <u>G</u> usados para calcular estabilidade interna de duplexes de RNA (-kcal/mol).				
	2º nucleotídeo (5'-3')			
1º nucleotídeo (5'-3')	A	C	G	U
A	1,1	2,4	1,9	1,1
C	2,2	3,3	2,2	1,9
G	2,7	3,8	3,3	2,4
U	1,4	2,6	2,2	1,1

Considerando o seguinte siRNA:

fita senso 5' GCAUGACCCUGAGCAGCUAUU 3'

fita antisenso 3' GCCGUACUGGGACUCGUCGAU 5'

Os quatro primeiros nucleotídeos da sequência **senso**

5' GCAUGACCCUGAGCAGCUAUU 3' têm o seguinte valor de energia livre:

1º dinucleotídeo GC: -3,8 kcal/mol

2º dinucleotídeo CA: -2,2 kcal/mol

3º dinucleotídeo AU: -1,1 kcal/mol

4º dinucleotídeo UG: -2,2 kcal/mol

$$\Sigma_G (\text{somatória dos quatro dinucleotídeos}) = -9,3 \text{ kcal/mol.}$$

Os quatro primeiros nucleotídeos da sequência **antisense**

5' UAGCUGCUCAGGGUCAUGCCG 3' têm o seguinte valor de energia livre:

1º dinucleotídeo UA: -1,4 kcal/mol

2º dinucleotídeo AG: -1,9 kcal/mol

3º dinucleotídeo GC: -3,8 kcal/mol

4º dinucleotídeo CU: -1,9 kcal/mol

$$\Sigma_G (\text{somatória dos quatro dinucleotídeos}) = -9,0 \text{ kcal/mol.}$$

Como a extremidade 5' do antisense é menos estável (maior valor de Σ_G), a molécula é *funcional*.

O cálculo de ΔG de siRNAs pelo programa ocorre como demonstrado a seguir:

- Entrar com uma sequência senso de 21-mer (5'-3') do RNA alvo.
- Calcular a somatória dos valores de G dos quatro primeiros dinucleotídeos na porção 5' do oligo senso ($\sum_{Gs}$).
- Calcular a somatória dos valores de G dos quatro primeiros dinucleotídeos na porção 5' do oligo antisenso ($\sum_{Gas}$).*
- Valor final da diferença energia livre da molécula (ΔG) é :

$$\Delta G = \sum_{Gas} - \sum_{Gs}$$

Um siRNA funcional apresenta a porção 5' da fita antisenso menos estável, ou seja:

$$\sum_{Gas} > \sum_{Gs}$$

Assim, considerando valores *negativos* para $\sum_G$, temos:

$\Delta G \leq 0 \rightarrow$ fita senso preferencialmente transferida, isto é,

NON-FUNCTIONAL STRAND

$\Delta G > 0 \rightarrow$ fita antisenso preferencialmente transferida, isto é,

FUNCTIONAL STRAND

Adicionalmente, o algoritmo identifica a existência de repetições de 4As ou 4Ts nas sequências, informando na resposta que tais alvos não são adequados para uso em vetores baseados em promotores H1/U6.

* Essa sequência corresponde aos nts complementares aos nts 16 a 19 do oligo senso.

2.2 Simulação

A sequência codificante (CDS) utilizada para teste do programa foi da RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) ORF1B; 8202 nucleotídeos (número de acesso no genbank: AF201929) do Murine hepatitis virus, strain 2. Sequências alvo pré-selecionadas no formato GN₁₇CN₂ (adequadas para transcrição *in vitro*) foram procuradas no programa *gene runner* e submetidas à análise.

3. Resultados

Depósito da sequência de RdRP no programa *gene runner*. Procura por sequências no formato GN₁₇CN₂ - 300 alvos encontrados (em azul – visualização parcial da sequencia).

Gene Runner - [c:\generun\work\nuc4.seq *]

File Edit View Analysis Tables Graph Options Window Help

5' 11 21 31 41 51 61 71 81 91

1 GTATTCTGT GTAGGCACAG GCTCCAGTT TCACTCAAAA GACAGCACT TTTTAACGG GTTCGGGGTA CAAGGTGAAA TGCCCGCTTT GTACCCGTGT

101 CCAGTGGCTT GGACACTGAT GTTCAATTAA GGGCATTTCG TATTGTAAAT GCTAATCGAG CTGGCATTGG TTTGTATTAT AAAGTGAATT GTTCCCGTTT

201 TCAGCGCGCA GATGAAGATG GCACACAGTT GGATAAGTTT TTTGTTATTA AAAGAACCAG TTTAGAAGTG TATAATAAGG AGAAGGAATG CTATGAGTTG

301 ACAAAGAAAT GTGGTGTGTT GGCCTGAACAC GAATTCCTCA CATTGATGT TGAGGGAAGT CGTGATCCAC ACATGTACG CAAAGATCTT TCAGAGTATA

401 CTATGTTAGA CCTTGTCTAT GCATTGCGGG ATTTGATCGG CAATGATTGT TCACCTCTCA AGGAATTTCT CTTTACTTAT GCTGAGTGTG ATGAGTCTTA

501 CTTTCAGAGG AAGGACTGGT ATGATTTTGT TGAGAATTCCT GATATAATTA ATGTGTACAA AAAGCTTGGG CCTATTITTA ATAGGGCCTT GCTTACACCT

601 GCTAAGTTTG CGGACACATT AGTGAGGCGA CGCCTAGTAG GTGTTTTAAC ACCTGATTAAT CAAGATTGTG ATGGTCAATG GATGACTTIT GGAATTITTG

701 GTTTCAGAGG AAGGACTGGT ATGATTTTGT TGAGAATTCCT GATATAATTA ATGTGTACAA AAAGCTTGGG CCTATTITTA ATAGGGCCTT GCTTACACCT

801 TATTATGGGT ACTTATAGGG AGTTTGAAGT TGTTCAGTAT GATTTTACTG ATTTCAAGTT AGAGCTCTTT AATAGTATT TTAAGTATTG GAGTATGACC

901 TATCACCAGG GCTCTGTGTA TCACCTCGGT CCGGATCAGT CACAAATTTG TGAAGTATTA GTTCTAACA TACCAGTTAC CATACTGAAA CCTCTAAAC

1001 GGCCTCTTGT TAGGCAAAATC TTTGTAGATG GTGTGCTTTT CGTTGCTCCG ATTGGCTACC ATTATATAAG AATTAGGTGT GTTATGAATA TGGATCTGGA

1101 TACACATCGT TACCGCTTGT CTCTTAAGAG CTTGCTTTTG TATGCAGCAG ATCCTGCCCT TCATGTGGCG TCTGCTAGTG CACTGCTTGA TTTGCGCACA

1201 TGCTGTTTGA GCGTAGCAGC TATTACAGGT GCGGTAAATG TTCAACAGT CAACCTGGGA AATTTTAACT AGGATTITTA TGAATTITTA TTAGTAAGAG

1301 GCGCTGTTAA AGAAGGGAGC TCCGTGTATT TGAAGCACTT CTTCTTTACG CAGGATGGTA ATGCTGCTAT TACTGATTAT AATTATTACA AGTATATCT

1401 CCCCACTATG GTGGATATTA AGCAGTTGTT GTTGTCTCTA GAAGTTGTTA ATAGTATTTT TGAGATCTAT GATGCTGGGT GTATACCCCG AACACAGGTC

1501 ATTGTTAATA ATTAATGATA GAGCGCTGGC TATCCATTTA ATAAATTTGG AAAGGCCAGA CTCATTATG AGGCATTATC ATTTGAGGAA CAGGATGAAG

1601 TTTATGCGTA CACTAAGCGC AACGTCCTGC CAACATTAACT TCAATGATTA GAATTTATAC CTTATTATGC TAAGATAGG GCTCGACTGC TTGCTGGTGT

1701 TTCCATTCTT AGTACTATGA CTGGCAGAA GTTTCTCTCA AAGTGTTTAA AGAGTATAGC AGCTACTCGT GGTGTTCTTG TAGTTATAGG CACCACGAAA

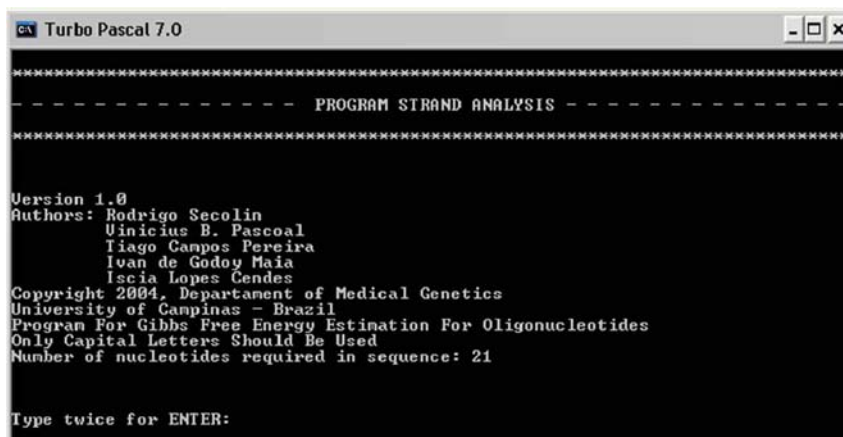
1801 TTTTATGGCG GTTGGGACGA TATGTTACGC CGCCTTATTA AAGATGTTGA TAGTCTGTGA CTTATGGGTT GGGACTATCC TAAATGTGAT CGTGTCTATG

8167 8202 DNA LIN DS NO LOCUS Ins 8167-8187 = 21 42.9% GC

Exemplo 1 - $\Delta G > 0$

Alvo: 5' GGCACAGGCTCCCAGTTTCAG 3'

Posição na sequência: nucleotídeos 14 – 24



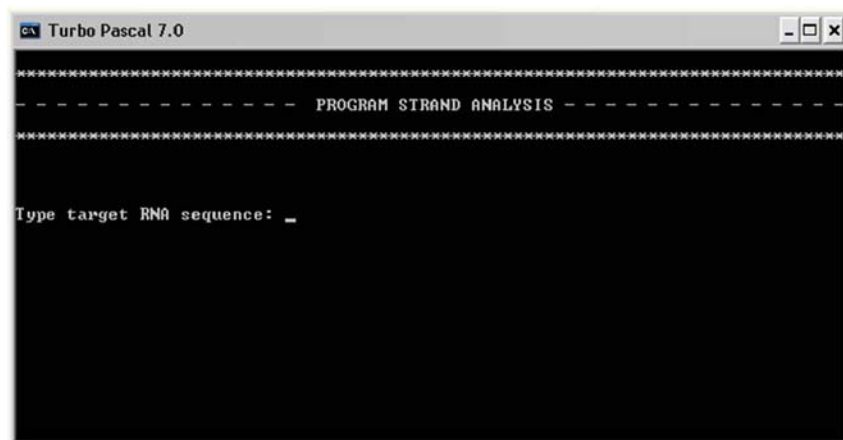
```
Turbo Pascal 7.0

----- PROGRAM STRAND ANALYSIS -----

Version 1.0
Authors: Rodrigo Secolin
        Vinicius B. Pascoal
        Tiago Campos Pereira
        Ivan de Godoy Maia
        Iscia Lopes Cendes
Copyright 2004, Department of Medical Genetics
University of Campinas - Brazil
Program For Gibbs Free Energy Estimation For Oligonucleotides
Only Capital Letters Should Be Used
Number of nucleotides required in sequence: 21

Type twice for ENTER:
```

Figura 1. Página inicial de *Strand Analysis*.



```
Turbo Pascal 7.0

----- PROGRAM STRAND ANALYSIS -----

Type target RNA sequence: _
```

Figura 2. Entrada dos dados.

```
Turbo Pascal 7.0
----- PROGRAM STRAND ANALYSIS -----
Type target RNA sequence: GGCACAGGCTCCAGITTACAG
```

Figura 3. Seqüência para análise.

```
Turbo Pascal 7.0
----- PROGRAM STRAND ANALYSIS -----
Results...
Target RNA sequence:      :GGCACAGGCTCCAGITTACAG
Sense Strand              :GGCACAGGCCUCCAGUUUCAG
Antisense Strand          :CCGUUCCGAGGGUCAAGUC
Value of Gibbs free energy: 4.40 Kcal/mol    => ACTIVE Functional Strand
Press twice ENTER to another calculus or N to scape: _
```

Figura 4. Saída dos resultados.

Exemplo 2 - $\Delta G = 0$

Alvo: 5' GTTGAGGGAAGTCGTGTACCA 3'

Posição na seqüência: nucleotídeos 349 – 369

```

Turbo Pascal 7.0
*****
----- PROGRAM STRAND ANALYSIS -----
*****

Type target RNA sequence: GTTGAGGGAAGTCGTGTACCA_

```

```

Turbo Pascal 7.0
*****
----- PROGRAM STRAND ANALYSIS -----
*****
Results...
Target RNA sequence:      :GTTGAGGGAAGTCGTGTACCA
Sense Strand              :GUUGAGGGAAGUCGUGUACCA
Antisense Strand          :CAACUCCCUUCAGCACAUGGU
-----
Value of Gibbs free energy: 0.00 Kcal/mol    => NON-ACTIVE Functional Strand
-----
Press twice ENTER to another calculus or N to scape: _

```

Figura 5. Análise de molécula sem transferência preferencial de fitas ($\Delta G = 0$).

Exemplo 3 - $\Delta G < 0$

Alvo: 5' GCATTGCGGCATTTTCGATCGC 3'

Posição na seqüência: nucleotídeos 421 - 441

```
Turbo Pascal 7.0
----- PROGRAM STRAND ANALYSIS -----
Type target RNA sequence: GCATTGCGGCATTTCGATCGC
```

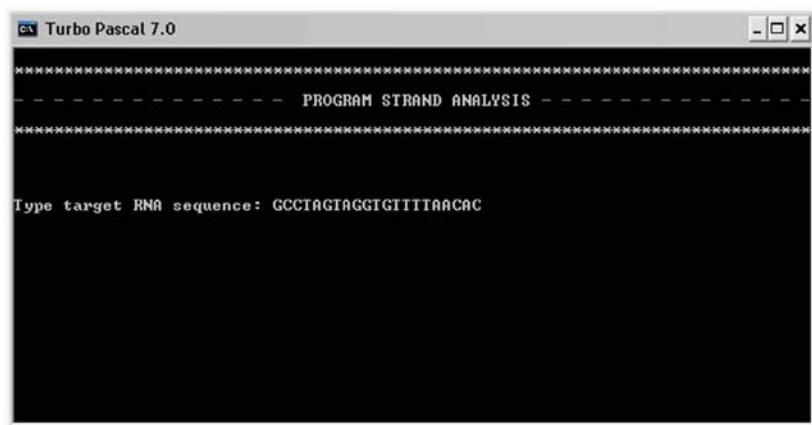
```
Turbo Pascal 7.0
----- PROGRAM STRAND ANALYSIS -----
Results...
Target RNA sequence:      :GCATTGCGGCATTTCGATCGC
Sense Strand              :GCAUUGCGGCAUUUCGAUCGC
Antisense Strand          :CGUACGCCGUAAGCUAGCG
-----
Value of Gibbs free energy: -0.40 Kcal/mol    => NON-ACTIVE Functional Strand
-----
Press twice ENTER to another calculus or N to scape: _
```

Figura 6. Análise de molécula com transferência preferencial da fita senso ($\Delta G < 0$).

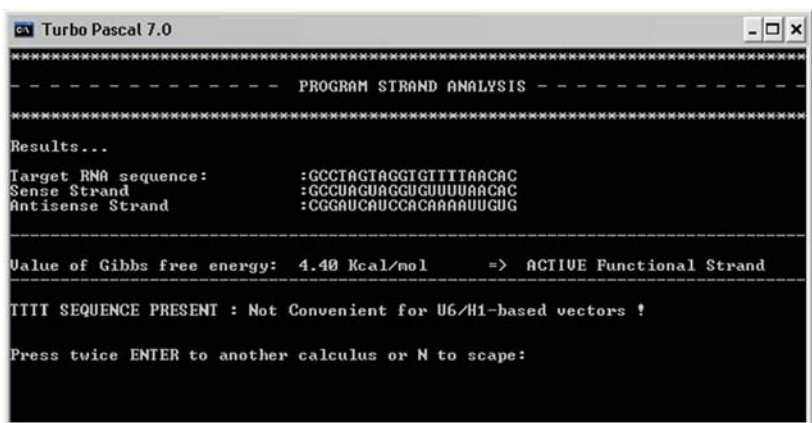
Exemplo 4 - Identificação de quatro timinas

Alvo: 5' GCCTAGTAGGTGTTTTAACAC 3'

Posição na sequência: nucleotídeos 632 – 652



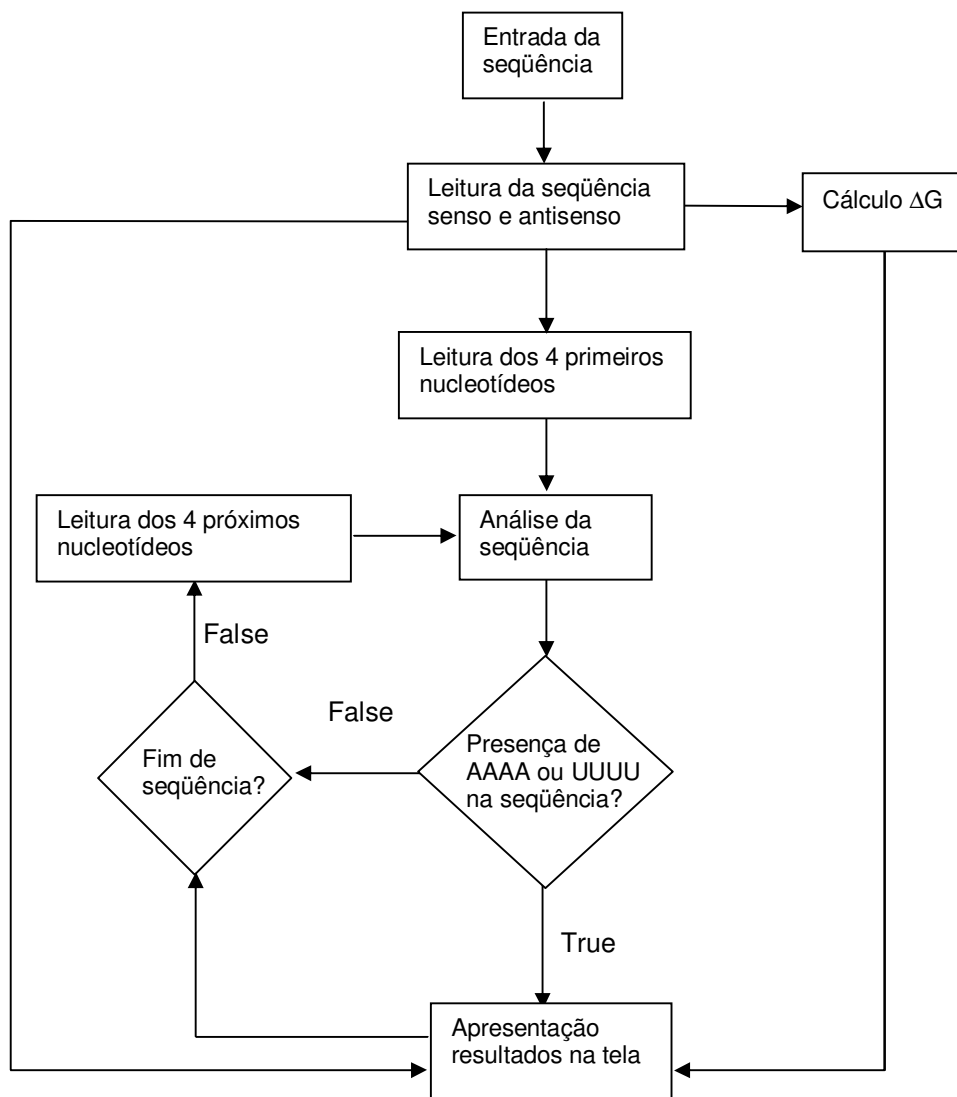
```
Turbo Pascal 7.0
----- PROGRAM STRAND ANALYSIS -----
Type target RNA sequence: GCCTAGTAGGTGTTTTAACAC
```



```
Turbo Pascal 7.0
----- PROGRAM STRAND ANALYSIS -----
Results...
Target RNA sequence:      :GCCTAGTAGGTGTTTTAACAC
Sense Strand              :GCCUAGUAGGUGUUUUUAAACAC
Antisense Strand          :CGGAUCAUCCACAAAUUGUG
-----
Value of Gibbs free energy: 4.40 Kcal/mol    => ACTIVE Functional Strand
-----
TTTT SEQUENCE PRESENT : Not Convenient for U6/H1-based vectors !
Press twice ENTER to another calculus or N to scape:
```

Figura 7. Análise de molécula com quatrimeto de timina.

Fluxograma do programa *Strands analysis* - versão alfa:



4. Discussão

A identificação da fita do siRNA preferencialmente transferida para RISC é um passo essencial para a aplicação de RNAi. Esta escolha é definida pelas características de energia livre (G) das extremidades pareadas do duplex, sendo que o *oligo guia* (transferido para RISC) é aquele cuja porção 5' é menos estável.

A determinação de ΔG é conceitualmente um procedimento que exige atenção e tempo. Ao se analisar seqüências longas (acima de 300 pb ou cujo número de alvos potenciais seja acima de 20) ele torna-se extremamente demorado e sujeito à falhas.

O desenvolvimento de um programa capaz de analisar individualmente cada alvo potencial (seqüência de 21-mer) no RNA desejado representa um avanço no processo de desenho de siRNAs. A versão alfa deste programa, denominado *strand analysis* é capaz de identificar de maneira simples siRNAs com ΔG positivos (siRNAs funcionais) ΔG nulos (nenhuma das duas fitas é *preferencialmente* transferida); ΔG negativos (siRNAs não-funcionais).

A identificação de 4A ou 4T, mesmo em fitas termodinamicamente funcionais, evita o desenho incorreto de shRNAs utilizados em vetores baseados nos promotores U6/H1.

A identificação de siRNAs funcionais assegura a inativação gênica, e os valores de ΔG apontam para um *potencial gradiente de inativação*. siRNAs com maiores valores de ΔG transferem de uma maneira mais tendenciosa o oligo antisense para RISC, potencializando a taxa de inativação gênica. Tal gradiente poderia ser utilizado em

experimentos que objetivam não exatamente a máxima inativação gênica, mas parte dela como ensaios de haplo-insuficiência – redução de 50% da atividade gênica.

5. Bibliografia

Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H. (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* 30(8):1757-66.

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 115(2):209-16.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 115(2):199-208.

CAPÍTULO 4

Strand Analysis (*versão beta*)

programa para análise de siRNAs

Criação e Desenvolvimento

Rodrigo Secolin¹
Vinícius D'Ávila Bitencourt Pascoal²
Tiago Campos Pereira²
Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia³
Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes²

1 - Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas - Campinas, SP - 13084-971.

2 - Grupo de Interferência por RNA, Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP - 13084-971.

3 - Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu - SP - Brasil - 18618-000.

1. Introdução

O uso de programas para análise da estabilidade termodinâmica de siRNAs é considerado hoje um passo essencial na identificação de moléculas funcionais. Um desses programas é o *strand analysis – versão alfa*.

Esta primeira versão é capaz de avaliar siRNAs individualmente, apresentando seus valores de ΔG . Ao se analisar porém moléculas extremamente longas (>1000 pb) o procedimento perde eficiência mesmo com uso de programas como *strand analysis – versão alfa*. Torna-se necessário para esses casos um programa capaz de analisar toda a sequência (*varredura*) de uma maneira sistemática. Neste sentido, a identificação dos maiores e menores valores ΔG existentes em uma determinada sequência pode ser executada. Considerando que ΔG s maiores representam alta tendência do oligo antisenso ser incorporado a RISC, e ΔG s menores representam alta tendência do oligo senso ser incorporado a RISC, um gradiente de valores pode ser gerado, alcançando maiores e menores eficiências de silenciamento. Estes dados podem ser úteis em estudos de haploinsuficiência.

A identificação de ΔG s em posições específicas do transcrito alvo (5', central e 3') também são informações interessantes. Quanto mais próxima da porção 5' a clivagem por slicer ocorrer, menor será o **fragmento 5'**, mais rapidamente ele será processado e menos produtos potencialmente citotóxicos serão gerados. Mesmo sendo o **fragmento 3'** maior, a não existência do sinal de entrada para o ribossomo reduz os riscos de citotoxicidade. Em

contraposição, as regiões 5' UTR podem ser ricas em proteínas regulatórias, o que dificultaria o acesso do siRNA.

As regiões centrais são interessantes por não serem ricas em tais proteínas; ao passo que as regiões 3' podem ser úteis devido à sua hiper-variabilidade, tornando o siRNA gene-específico.

Não obstante, a discriminação por posição revela-se uma ferramenta muito interessante ao se trabalhar com famílias gênicas ou proteínas com domínios conservados: a exclusão de tais seqüências pode ser realizada de maneira simples.

2. Materiais e Métodos

2.1 Algoritmo

O programa foi escrito na linguagem *Delphi*, é executado em *Windows* e visa calcular a diferença (Δ) de energia livre (G; -kcal/mol) das sequências compostas pelos 4 primeiros pares de base das extremidades dos duplexes – análise idêntica à versão 1.0

Opções gerais:

- *Oligo analysis*: análise de sequências de 23-mer (5' - 3'), na qual os 21 nt iniciais irão compor a fita antisenso e os 21 nt finais a fita senso.

- *Sequence analysis*: análise de sequências inteiras de RNA (acima de 23-mer), realizando o cálculo de ΔG para sequências de 21-mer, de forma contínua até o final da sequência, deslocando-se um nucleotídeo por vez.

2.2 Parâmetros de “Oligo analysis”

Entrada dos dados:

Digitar a sequência alvo (5'-3') mínima de 23-mer

Resultados:

RNA sense: sequência de 21-mer (5'-3') do oligo senso

RNA antisense: sequência de 21-mer (5'-3') do oligo antisenso

Value: valor em kcal/mol de ΔG

$\Delta G > 0 \rightarrow$ ACTIVE Funcional Strand

$\Delta G \leq 0 \rightarrow$ NON-ACTIVE Funcional Strand

Informações adicionais:

AAAA sequence present - not convenient for H1/ U6 based vectors !

TTTT sequence present - not convenient for H1/ U6 based vectors !

Indicam a existência de quadripletos de adenosina ou timina na sequência, o que torna não funcional para promotores de RNA polimerase III – H1 ou U6.

2.3 Parâmetros de “Sequence analysis”

Entrada:

Arquivo *.txt* cuja linha inicial segue o formato:

> nome do arquivo

e as linhas abaixo contêm a sequência do RNA (sem números) tal como a seguir:

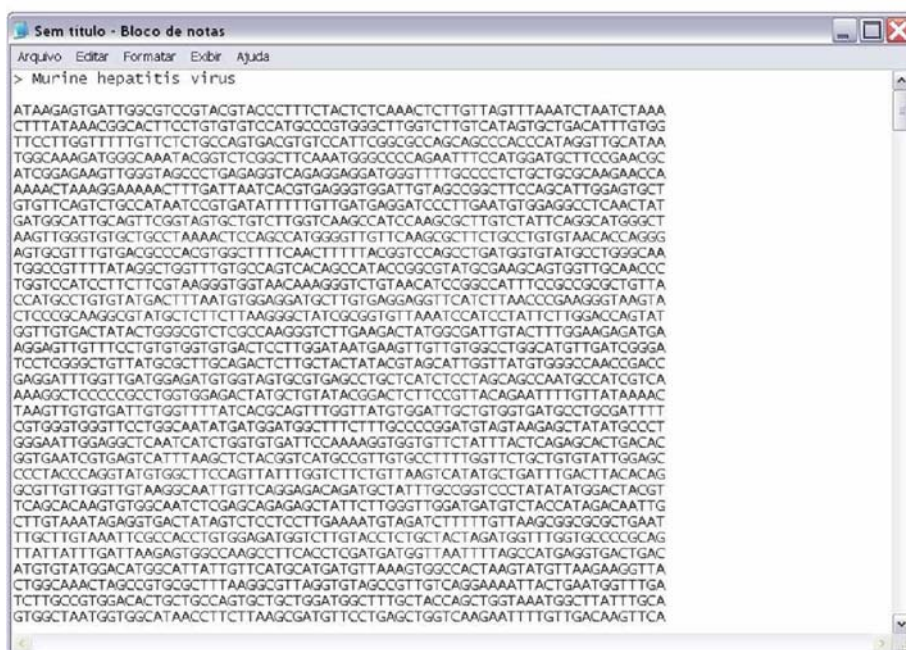


Figura 1. Formato do arquivo de entrada de dados para o programa *Sequence Analysis*.

Opções:

Quanto à ΔG (escolher no mínimo uma opção):

Show all strands (apresentar todas as fitas: $\Delta G > 0$ e $\Delta G \leq 0$).

Show active functional strands (apresentar apenas as fitas funcionais : $\Delta G > 0$).

Show non-active functional strands (apresentar apenas as fitas não funcionais : $\Delta G \leq 0$).

Quanto à ordem da resposta (escolher no mínimo uma opção):

By position: dispõe as respostas por ordem crescente de posição na sequência.

By Gibbs free energy value: dispõe as respostas por ordem decrescente de ΔG .

Resultados:

Arquivos de resposta são gerados automaticamente na mesma pasta (diretório) de origem do *arquivo de entrada*. Devido ao tamanho considerável que alguns arquivos podem chegar – megabytes – eles são gerados no formato *.doc* (Microsoft Word).

2.2 Simulação

A sequência utilizada para simulação do programa foi o genoma completo do Murine hepatitis virus, strain 2, 31276 pares de base (número de acesso no genbank: AF201929). Para o oligo analysis, apenas uma sequência representativa foi avaliada ao passo que para o sequence analysis, o genoma completo foi analisado - seqüências de 21-mer formato N_{21} .

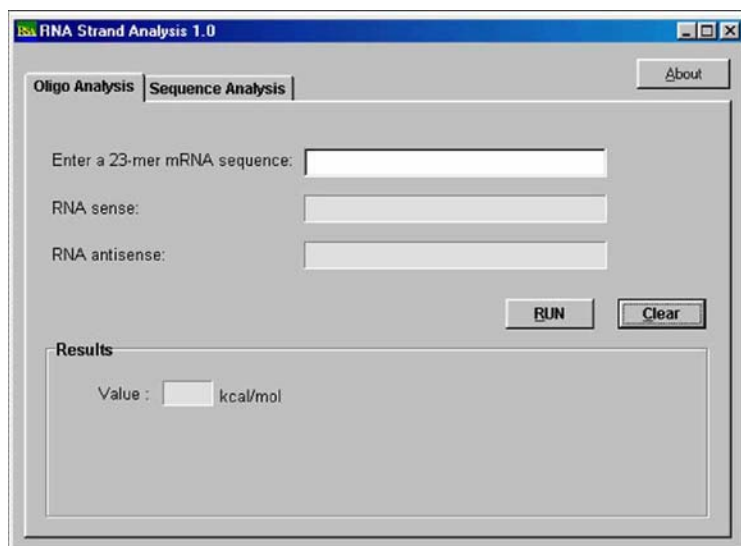
3. Resultados

Oligo analysis

Análise 1

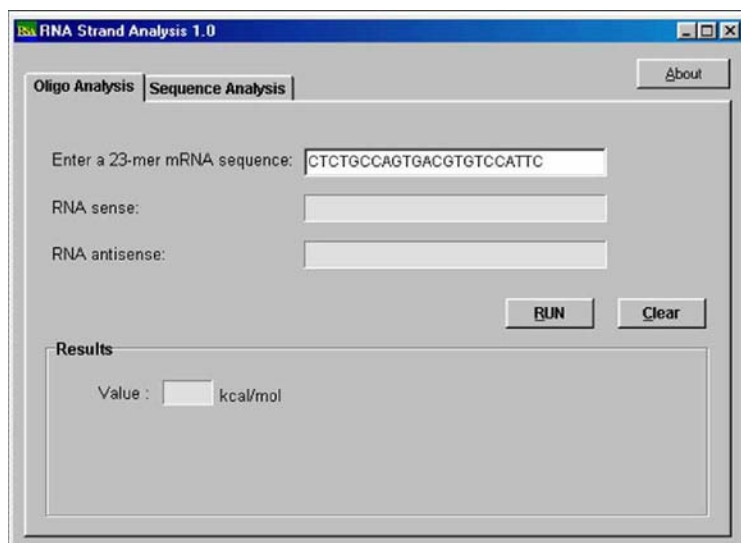
Alvo: 5' CTCTGCCAGTGACGTGTCCATTC 3'

Posição na sequência: nucleotídeos 159 – 179



The screenshot shows the 'RNA Strand Analysis 1.0' window. It has two tabs: 'Oligo Analysis' (selected) and 'Sequence Analysis'. An 'About' button is in the top right. The main area contains three input fields: 'Enter a 23-mer mRNA sequence:', 'RNA sense:', and 'RNA antisense:'. Below these are 'RUN' and 'Clear' buttons. A 'Results' section at the bottom has a 'Value : ' label and a text box for 'kcal/mol'.

Figura 2. Página inicial de *Oligo analysis*.



This screenshot shows the same software interface as Figure 2, but with the sequence 'CTCTGCCAGTGACGTGTCCATTC' entered into the 'Enter a 23-mer mRNA sequence:' field. The 'RNA sense:' and 'RNA antisense:' fields remain empty. The 'RUN' and 'Clear' buttons and the 'Results' section are still visible at the bottom.

Figura 3. Entrada dos dados.

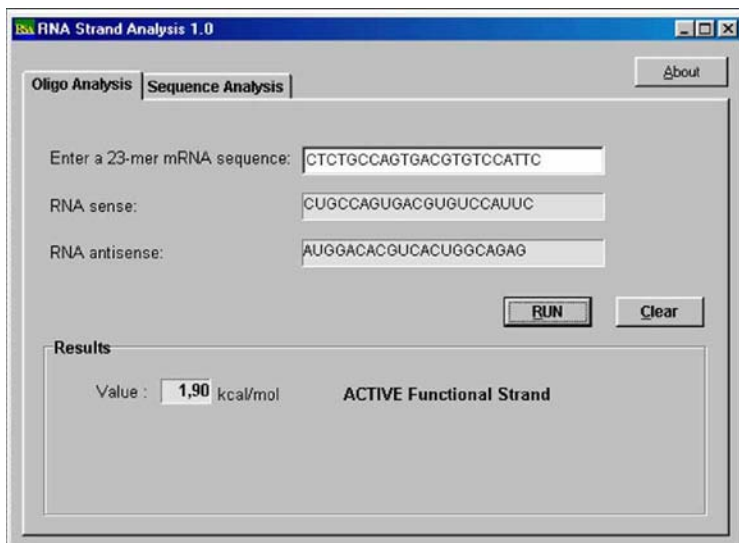


Figura 4. Resultados - saída dos dados.

Sequence analysis

Análise do genoma de MHV - opções escolhidas:

Análise 1. Show active functional strands / By position

Análise 2. Show active functional strands / By Gibbs free energy value

Análise 3. Show non-active functional strands / By position

Análise 4. Show non-active functional strands / By Gibbs free energy value

Análise 5. Show all strands / By position

Análise 1. Show active functional strands / By position

Número de seqüências:

Tamanho do arquivo: 4368 kb

Número de páginas do arquivo: 2561

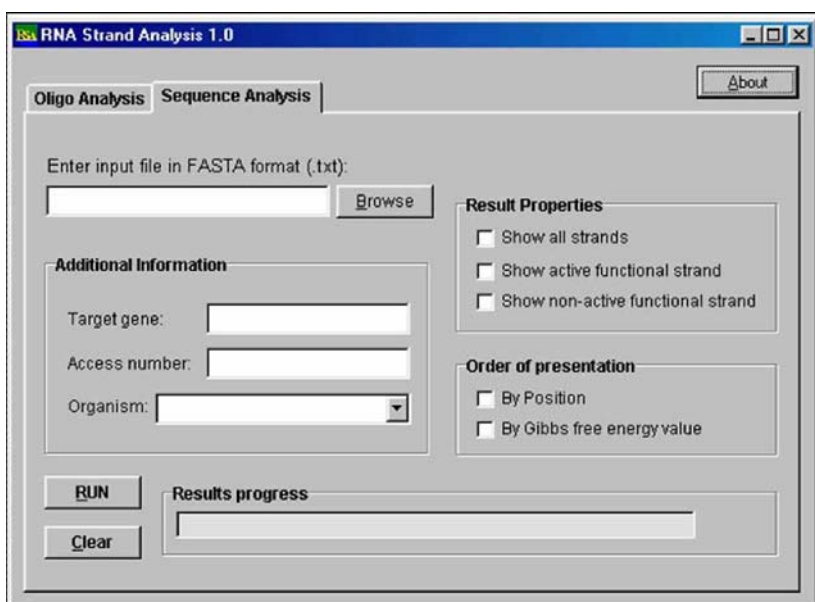


Figura 5. Página inicial de *Sequence analysis*.

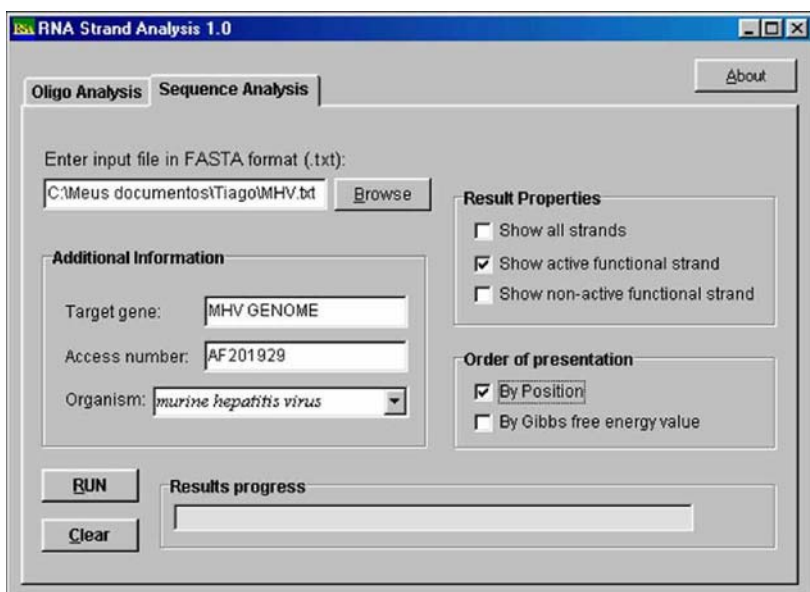


Figura 6. Entrada dos dados e escolha de opções.

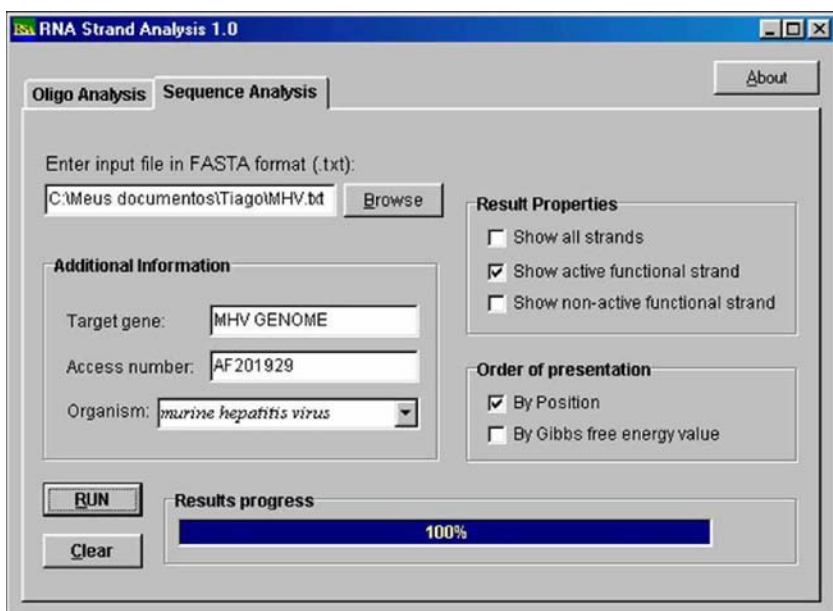
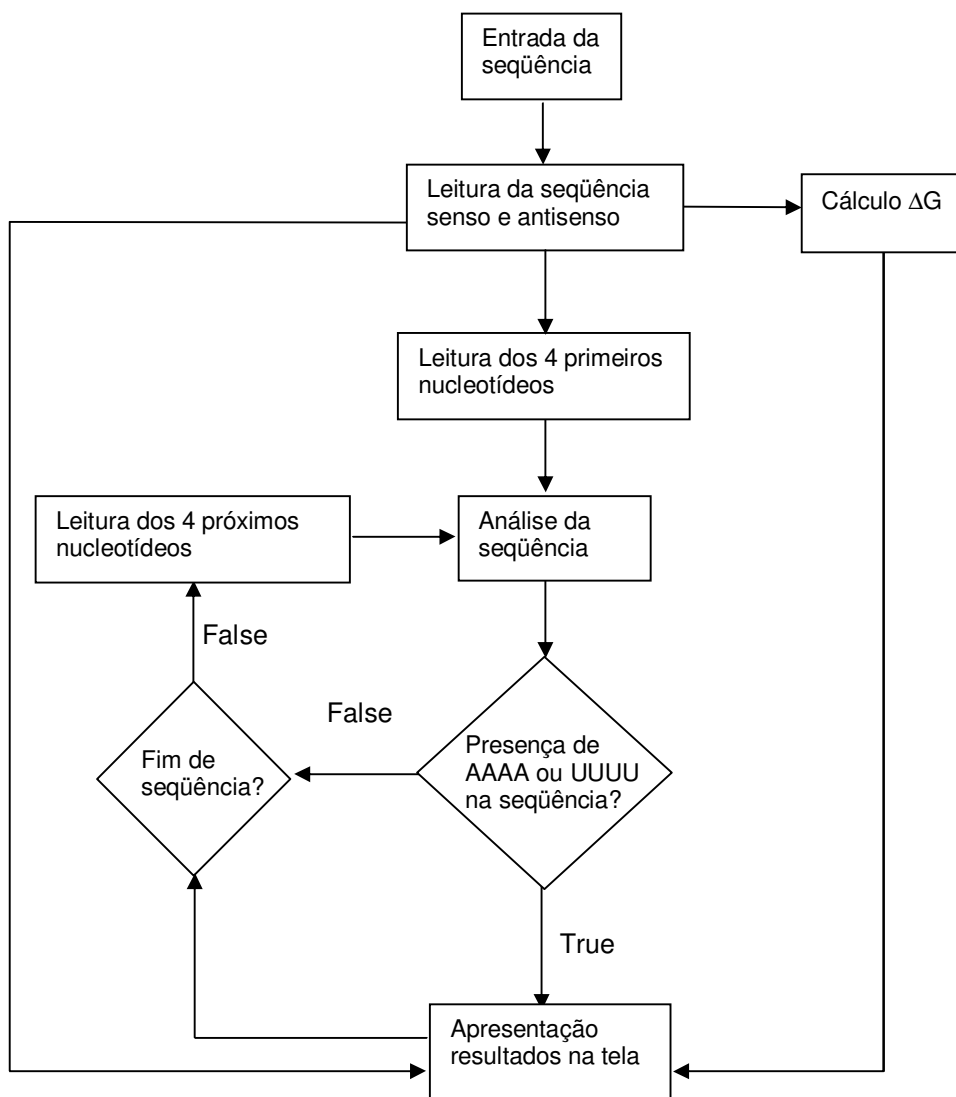


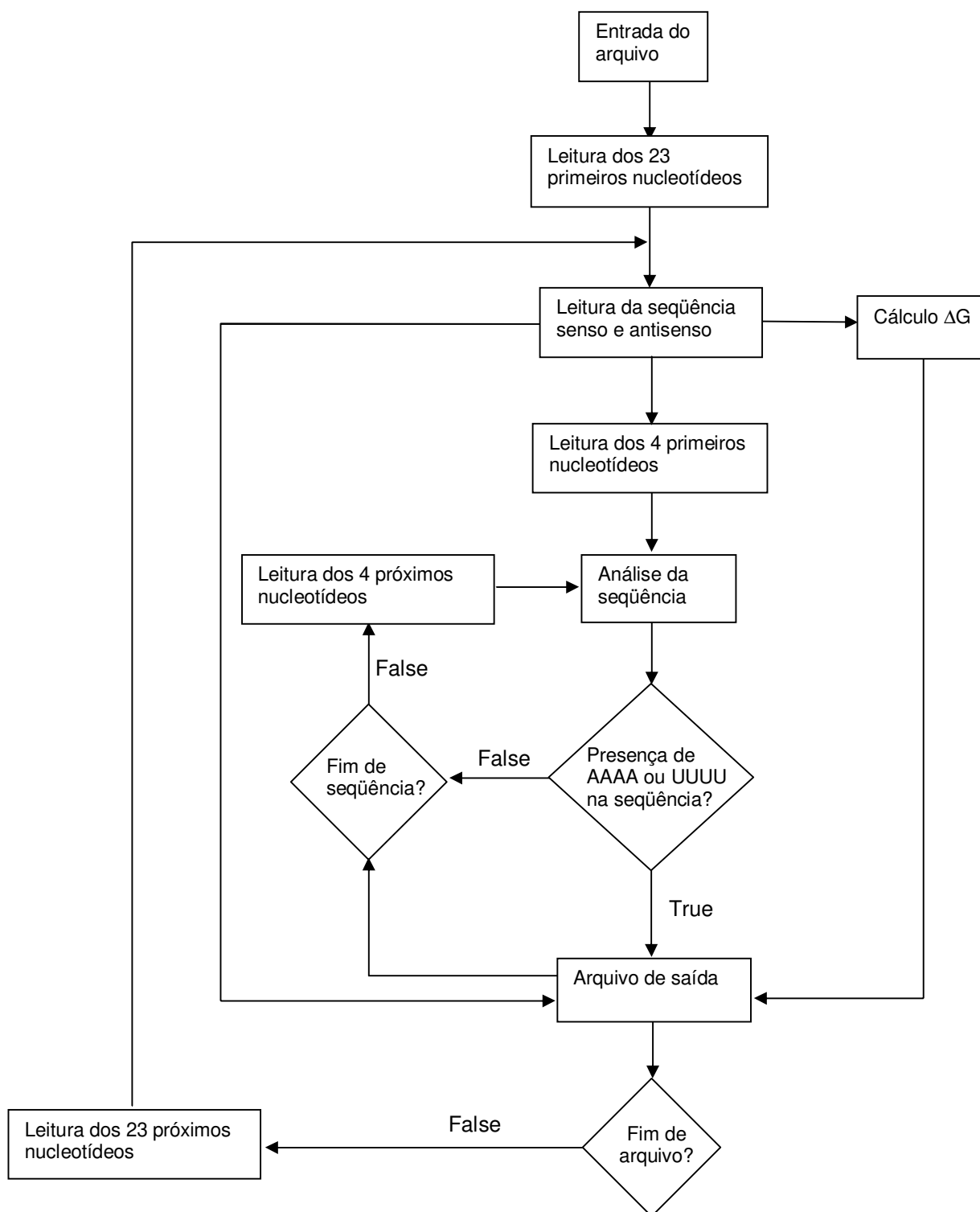
Figura 7. Conclusão da análise - "Results progress 100%".

Fluxograma do programa *Strands analysis* – versão beta:

1. *Oligo analysis*



2. Sequence analysis



RNA STRAND ANALYSIS

Version 1.0

Authors: Rodrigo Secolin, BSc
Vinicius B. Pascoal, BSc
Tiago Campos Pereira, MSc
Ivan Godoy Maia, PhD
Ischia Lopes-Cendes, PhD

Departament of Medical Genetics - University of Campinas
Department of Genetics - São Paulo State University at Botucatu
Brazil, 2005

FASTA name file: > Murine Hepatitis virus - complete genome sequence
Target gene: MHV COMPLETE GENOME SEQUENCE
Access number: AF201929
Organism: murine hepatitis virus
Sequence directions: 5'- 3'

Show active functional strands - Order by Position

POSITION: 5

mRNA sequence: GAGTGATTGGCGTCCGTACGT
RNA sense: GAGUGAUUGGCGUCCGUACGU
RNA antisense: GUACGGACGCCAAUCACUCUU

RESULTS:

Value: 0.80 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

POSITION: 6

mRNA sequence: AGTGATTGGCGTCCGTACGTA
RNA sense: AGUGAUUGGCGUCCGUACGUA
RNA antisense: CGUACGGACGCCAAUCACUCU

RESULTS:

Value: 0.80 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

POSITION: 12

mRNA sequence: TGGCGTCCGTACGTACCCCTTT
RNA sense: UGGCGUCCGUACGUACCCUUU
RNA antisense: AGGGUACGUACGGACGCCAAU

RESULTS:

Value: 0.60 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

POSITION: 13

mRNA sequence: GCGTCCGTACGTACCCTTTC
RNA sense: GCGUCCGUACGUACCCUUUC
RNA antisense: AAGGGUACGUACGGACGCCA

RESULTS:

Value: 2.10 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

POSITION: 14

mRNA sequence: GCGTCCGTACGTACCCTTTCT
RNA sense: GCGUCCGUACGUACCCUUUCU
RNA antisense: AAAGGGUACGUACGGACGCCA

RESULTS:

Value: 3.60 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

POSITION: 15

mRNA sequence: CGTCCGTACGTACCCTTTCTA
RNA sense: CGUCCGUACGUACCCUUUCUA
RNA antisense: GAAAGGGUACGUACGGACGCC

RESULTS:

Value: 3.70 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

POSITION: 16

mRNA sequence: GTCCGTACGTACCCTTTCTAC
RNA sense: GUCCGUACGUACCCUUUCUAC
RNA antisense: AGAAAGGGUACGUACGGACGC

RESULTS:

Value: 3.70 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

POSITION: 17

mRNA sequence: TCCGTACGTACCCTTTCTACT
RNA sense: UCCGUACGUACCCUUUCUACU
RNA antisense: UAGAAAGGGUACGUACGGACG

RESULTS:

Value: 3.40 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

Análise 2. Show active functional strands / By Gibbs free energy value

Número de seqüências:

Tamanho do arquivo: 4368 kb

Número de páginas do arquivo: 2561

RNA STRAND ANALYSIS

Version 1.0

Authors: Rodrigo Secolin, BSc
Vinicius B. Pascoal, BSc
Tiago Campos Pereira, MSc
Ivan Godoy Maia, PhD
Ischia Lopes-Cendes, PhD

Department of Medical Genetics - University of Campinas
Department of Genetics - São Paulo State University at Botucatu
Brazil, 2005

FASTA name file: > Murine Hepatitis virus - complete genome sequence
Target gene: MHV COMPLETE GENOME SEQUENCE
Access number: AF201929
Organism: murine hepatitis virus
Sequence directions: 5'- 3'

Show active functional strands - Order by Value

POSITION: 28680

mRNA sequence: GGGGCAGATTATTTTATAGT
RNA sense: GGGGCAGAUUAUUUUUAUAGU
RNA antisense: UAUAAAAUAAUCUGCCCCAC

RESULTS:

Value: 8.70 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

TTTT SEQUENCE PRESENT : Not Convenient for H1/U6-based vectors !

POSITION: 27181

mRNA sequence: GCGCCTTATGGTTTATATTTT
RNA sense: GCGCCUUAUGGUUUUAUUAUUU
RNA antisense: AAUAUAAACCAUAAGGCGCAU

RESULTS:

Value: 8.40 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

TTTT SEQUENCE PRESENT : Not Convenient for H1/U6-based vectors !

POSITION: 24549

mRNA sequence: GCGCCAATATTTATTTAATTT
RNA sense: GCGCCAUAUUUAUUUAUUU
RNA antisense: AUUAAAUAUAUUGGCGCUU

RESULTS:

Value: 8.40 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

POSITION: 20743

mRNA sequence: GCCGCTGGAAAGAGTTAATCT
RNA sense: GCCGCUGGAAAGAGUUAUUCU
RNA antisense: AUUAACUCUUUCCAGCGGCGA

RESULTS:

Value: 8.40 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

POSITION: 25506

mRNA sequence: TGGCCGCTGTCACATTTTATAG
RNA sense: UGGCCGCUGUCACAUUUUUAG
RNA antisense: AAAAAUGUGACAGCGGCCAUU

RESULTS:

Value: 8.20 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

TTTT SEQUENCE PRESENT : Not Convenient for H1/U6-based vectors !

POSITION: 21401

mRNA sequence: GGGGCTTACAGTCTTTTTGAT
RNA sense: GGGGCUUACAGUCUUUUUGAU
RNA antisense: CAAAAAGACUGUAAGCCCCUC

RESULTS:

Value: 8.20 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

TTTT SEQUENCE PRESENT : Not Convenient for H1/U6-based vectors !

POSITION: 5906

mRNA sequence: GGCCCAGTTTAGAACATTTGA
RNA sense: GGCCCAGUUUAGAACAUUUGA
RNA antisense: AAAUGUUCUAAACUGGGCCUU

RESULTS:

Value: 8.20 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

POSITION: 1952

mRNA sequence: GCCCCGCAGTTATTATTTGAT
RNA sense: GCCCCGCAGUUAUUUUUGAU
RNA antisense: CAAAUAAUACUGCGGGGCAC

RESULTS:

Value: 8.20 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

Análise 3. Show non-active functional strands / By position

Número de seqüências:

Tamanho do arquivo: 4610 kb

Número de páginas do arquivo: 2664

RNA STRAND ANALYSIS

Version 1.0

Authors: Rodrigo Secolin, BSc

Vinicius B. Pascoal, BSc

Tiago Campos Pereira, MSc

Ivan Godoy Maia, PhD

Iscia Lopes-Cendes, PhD

Department of Medical Genetics - University of Campinas

Department of Genetics - São Paulo State University at Botucatu

Brazil, 2005

FASTA name file: > Murine Hepatitis virus - complete genome sequence

Target gene: MHV COMPLETE GENOME SEQUENCE

Access number: AF201929

Organism: murine hepatitis virus

Sequence directions: 5'- 3'

Show non-active functional strands - Order by Position

POSITION: 1

mRNA sequence: ATAAGAGTGATTGGCGTCCGT

RNA sense: AUAAGAGUGAUUGGCGUCCGU

RNA antisense: GGACGCCAAUCACUCUUAU--

RESULTS:

Value: -5.10 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 2

mRNA sequence: TAAGAGTGATTGGCGTCCGTA

RNA sense: UAAGAGUGAUUGGCGUCCGUU

RNA antisense: CGGACGCCAAUCACUCUUAU-

RESULTS:

Value: -3.50 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 3

mRNA sequence: AAGAGTGATTGGCGTCCGTAC

RNA sense: AAGAGUGAUUGGCGUCCGUAC

RNA antisense: ACGGACGCCAAUCACUCUUAU

RESULTS:

Value: -3.00 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 4

mRNA sequence: AGAGTGATTGGCGTCCGTACG
RNA sense: AGAGUGAUUGGCGUCCGUACG
RNA antisense: UACGGACGCCAAUCACUCUA

RESULTS:

Value: -0.40 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 7

mRNA sequence: GTGATTGGCGTCCGTACGTAC
RNA sense: GUGAUUGGCGUCCGUACGUAC
RNA antisense: ACGUACGGACGCCAAUCACUC

RESULTS:

Value: 0.00 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 8

mRNA sequence: TGATTGGCGTCCGTACGTACC
RNA sense: UGAUUGGCGUCCGUACGUACC
RNA antisense: UACGUACGGACGCCAAUCACU

RESULTS:

Value: -1.30 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 9

mRNA sequence: GATTGGCGTCCGTACGTACCC
RNA sense: GAUUGGCGUCCGUACGUACCC
RNA antisense: GUACGUACGGACGCCAAUCAC

RESULTS:

Value: -1.30 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 10

mRNA sequence: ATTGGCGTCCGTACGTACCCCT
RNA sense: AUUGGCGUCCGUACGUACCCU
RNA antisense: GGUACGUACGGACGCCAAUCA

RESULTS:

Value: -1.80 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

Análise 4. Show non-active functional strands / By Gibbs free energy value

Número de seqüências:

Tamanho do arquivo: 4610 kb

Número de páginas do arquivo: 2664

RNA STRAND ANALYSIS

Version 1.0

Authors: Rodrigo Secolin, BSc
Vinicius B. Pascoal, BSc
Tiago Campos Pereira, MSc
Ivan Godoy Maia, PhD
Ischia Lopes-Cendes, PhD

Department of Medical Genetics - University of Campinas
Department of Genetics - São Paulo State University at Botucatu
Brazil, 2005

FASTA name file: > Murine Hepatitis virus - complete genome sequence
Target gene: MHV COMPLETE GENOME SEQUENCE
Access number: AF201929
Organism: murine hepatitis virus
Sequence directions: 5'- 3'

Show non-active functional strands - Order by Value

POSITION: 5949

mRNA sequence: AATTTTAAATTGGTGGGGCAC
RNA sense: AAUUUUAAAUUGGUGGGGCAC
RNA antisense: GCCCCACCAUUUAAAAUUGG

RESULTS:

Value: -9.30 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

TTTT SEQUENCE PRESENT : Not Convenient for H1/U6-based vectors !

POSITION: 21639

mRNA sequence: ATAAACTTCCCATTGGCCCAA
RNA sense: AUAACUCCCAUUGGCCCAA
RNA antisense: GGGCCAAUGGGAAGUUUAUA

RESULTS:

Value: -9.00 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 5950

mRNA sequence: ATTTTAAATTGGTGGGGCACA
RNA sense: AUUUUAAAUUGGUGGGGCACA
RNA antisense: UGCCCCACCAUUUAAAAUUG

RESULTS:

Value: -8.20 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

TTTT SEQUENCE PRESENT : Not Convenient for H1/U6-based vectors !

POSITION: 27879

mRNA sequence: AATTTATTGCACTTTCCCCGC
RNA sense: AAUUUAUUGCACUUUCCCCGC
RNA antisense: GGGGAAAGUGCAAUAAAUUGU

RESULTS:

Value: -8.20 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 21814

mRNA sequence: TAATAGATGATATGGCGGCAT
RNA sense: UAAUAGAUGAUUAGCGGCAU
RNA antisense: GCCGCCAUUAUCAUUAUUACU

RESULTS:

Value: -8.10 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 23527

mRNA sequence: TTATAATAATGTTAGCGCCTC
RNA sense: UUAUAAUAAUGUUAGCGCCUC
RNA antisense: GGCGCUAACAUUAUUAUAAAG

RESULTS:

Value: -8.10 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 30450

mRNA sequence: GTTTTGGGAAGAGAGGCCCTA
RNA sense: GUUUUGGGAAGAGAGGCCCUA
RNA antisense: GGGCCUCUCUCCCCAAAACAC

RESULTS:

Value: -8.00 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

TTTT SEQUENCE PRESENT : Not Convenient for H1/U6-based vectors !

POSITION: 207

mRNA sequence: ATAATGGCAAAGATGGGCAAA
RNA sense: AUAAUGGCAAAGAUGGGCAAA
RNA antisense: UGCCCAUCUUUGCCAUAUUGC

RESULTS:

Value: -7.90 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

Análise 5. Show all strands / By position

Número de seqüências:

Tamanho do arquivo: 8976 kb

Número de páginas do arquivo: 5223

RNA STRAND ANALYSIS

Version 1.0

Authors: Rodrigo Secolin, BSc

Vinicius B. Pascoal, BSc

Tiago Campos Pereira, MSc

Ivan Godoy Maia, PhD

Iscia Lopes-Cendes, PhD

Department of Medical Genetics - University of Campinas

Department of Genetics - São Paulo State University at Botucatu

Brazil, 2005

FASTA name file: > Murine Hepatitis virus - complete genome sequence

Target gene: MHV COMPLETE GENOME SEQUENCE

Access number: AF201929

Organism: murine hepatitis virus

Sequence directions: 5'- 3'

Show all strands - Order by Position

POSITION: 1

mRNA sequence: ATAAGAGTGATTGGCGTCCGT

RNA sense: AUAAGAGUGAUUGGCGUCCGU

RNA antisense: GGACGCCAAUCACUCUUAU--

RESULTS:

Value: -5.10 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 2

mRNA sequence: TAAGAGTGATTGGCGTCCGTA

RNA sense: UAAGAGUGAUUGGCGUCCGUU

RNA antisense: CGGACGCCAAUCACUCUUAU-

RESULTS:

Value: -3.50 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 3

mRNA sequence: AAGAGTGATTGGCGTCCGTAC

RNA sense: AAGAGUGAUUGGCGUCCGUAC

RNA antisense: ACGGACGCCAAUCACUCUUAU

RESULTS:

Value: -3.00 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 4

mRNA sequence: AGAGTGATTGGCGTCCGTACG
RNA sense: AGAGUGAUUGGCGUCCGUACG
RNA antisense: UACGGACGCCAAUCACUCUUA

RESULTS:

Value: -0.40 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 5

mRNA sequence: GAGTGATTGGCGTCCGTACGT
RNA sense: GAGUGAUUGGCGUCCGUACGU
RNA antisense: GUACGGACGCCAAUCACUCUU

RESULTS:

Value: 0.80 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

POSITION: 6

mRNA sequence: AGTGATTGGCGTCCGTACGTA
RNA sense: AGUGAUUGGCGUCCGUACGUA
RNA antisense: CGUACGGACGCCAAUCACUCU

RESULTS:

Value: 0.80 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

POSITION: 7

mRNA sequence: GTGATTGGCGTCCGTACGTAC
RNA sense: GUGAUUGGCGUCCGUACGUAC
RNA antisense: ACGUACGGACGCCAAUCACUC

RESULTS:

Value: 0.00 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 8

mRNA sequence: TGATTGGCGTCCGTACGTACC
RNA sense: UGAUUGGCGUCCGUACGUACC
RNA antisense: UACGUACGGACGCCAAUCACU

RESULTS:

Value: -1.30 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

SEQUENCIAS FINAIS (continuação de Análise 5. Show all strands / By position)

POSITION: 31238

mRNA sequence: GATCATGGCCAATTGGAAGAA
RNA sense: GAUCAUGGCCAAUUGGAAGAA
RNA antisense: CUUCCAAUUGGCCAUGAUCAA

RESULTS:

Value: -0.30 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 31239

mRNA sequence: ATCATGGCCAATTGGAAGAAT
RNA sense: AUCAUGGCCAAUUGGAAGAAU
RNA antisense: UCUUCCAAUUGGCCAUGAUCA

RESULTS:

Value: -1.20 kcal/mol => NON-ACTIVE Functional Strand

POSITION: 31240

mRNA sequence: TCATGGCCAATTGGAAGAATC
RNA sense: UCAUGGCCAAUUGGAAGAAUC
RNA antisense: UUCUCCAAUUGGCCAUGAUC

RESULTS:

Value: 1.40 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

POSITION: 31241

mRNA sequence: CATGGCCAATTGGAAGAATCA
RNA sense: CAUGGCCAAUUGGAAGAAUCA
RNA antisense: AUUCUCCAAUUGGCCAUGAU

RESULTS:

Value: 2.10 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

POSITION: 31242

mRNA sequence: ATGGCCAATTGGAAGAATCAC
RNA sense: AUGGCCAAUUGGAAGAAUCAC
RNA antisense: GAUUCUCCAAUUGGCCAUGA

RESULTS:

Value: 2.90 kcal/mol => ACTIVE Functional Strand

4. Discussão

A identificação da estabilidade das extremidades de um siRNA é considerada atualmente um passo essencial no desenho de siRNAs funcionais. O programa *Strand Analysis versão beta* representa um melhoramento de várias funções em referência à *versão alfa*. Entre elas

- linguagem mais avançada: *Delphi*
- plataforma de execução mais avançada: *Windows*
- análise de seqüências pequenas (23-mer) ou extensas (genômicas).
- entrada dos dados por *copiar e colar* direto (oligo analysis) ou carregamento (*up-loading – browsing; sequence analysis*).
- apresentação (nos resultados) das fitas senso e antiseno na orientação 5' - 3' considerando os dois nucleotídeos *overhang*.
- opção de escolha de saída de dados por ΔG ou por posição na seqüência (*sequence analysis*).
- gráfico de acompanhamento do processamento em tempo real (*Results progress - sequence analysis*).

O principal melhoramento é a capacidade de análise de toda a seqüência de uma forma sistemática, podendo-se adicionalmente visualizar os resultados dispostos por ordem de interesse (ΔG ou posição). Esses dados podem gerar novos *insights* sobre as implicações do silenciamento em seqüências virais e de transposons.

A análise do genoma de MHV (*show all strands by position*) gerou um arquivo de 8,976 megabytes com 5223 páginas. Os maiores valores ΔG foram detectados nos genes:

envelope glycoprotein (1), *spike glycoprotein precursor* (3) e *RNA-directed RNA polymerase* (4).

Uma terceira versão deste programa (gama) está em fase final de desenvolvimento, o qual permitira a análise de off-targeting da sequência-alvo escolhida diante do transcriptoma conhecido do organismo em questão.

CAPÍTULO 5

Small interfering RNAs (siRNAs) reduce worm
burden in *Schistosoma mansoni*-infected mice

artigo submetido ao
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene

LRH: CAMPOS-PEREIRA AND OTHERS
RRH: SIRNAS AGAINST A PARASITIC INFECTION

SMALL INTERFERING RNAS (SIRNAS) REDUCE
WORM BURDEN IN *SCHISTOSOMA MANSONI*-INFECTED MICE

TIAGO CAMPOS-PEREIRA, VINÍCIUS D. B. PASCOAL, IVAN G. MAIA,
LUIZ A. MAGALHÃES, ELIANA M. ZANOTTI-MAGALHÃES AND
ISCIA LOPES-CENDES

Departamento de Genética Médica, Unicamp - Campinas, São Paulo, Brasil;
Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Unesp - Botucatu, São Paulo, Brasil;
Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Unicamp - Campinas, São Paulo,
Brasil

ABSTRACT

Many studies have demonstrated the therapeutical applications of small interfering RNAs (siRNAs) in combating intracellular pathogens such as prions and viruses. In this study we evaluated their potential against a parasitic infection - schistosomiasis. siRNAs were produced against *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*, an essential gene of the parasite *Schistosoma mansoni*. Infected mice were tail vein-injected with siRNAs and the number of worms were counted six days after treatment and compared to control groups. Overall, the total number of parasites was reduced approximately 27% after treatment with siRNAs ($P = 0.0023$, Kruskal-Wallis). siRNAs were totally specific to parasite as host encoded HGPRTase mRNA was not altered, pointing to a treatment possibly without side effects. This is the first successful *in vivo* demonstration of a siRNA-based approach against schistosomiasis, one of the few for parasitic infections. The extreme low dose used evidences that this infection could be effectively treated with siRNAs.

INTRODUCTION

Schistosoma mansoni infects approximately two hundred million people worldwide, being an important parasitic disease specially in tropical countries as Brazil. Although schistosomicidal drugs and other control measures exist, the development of new strategies is of special interest. The parasite is unable to synthesize purines *de novo*; therefore, it uses precursors obtained from the host blood.¹ One enzyme of this biochemical pathway is hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRTase; EC 2.4.2.8), with a messenger RNA of 1374 nucleotides encoding a protein of 231 amino-acid residues. This enzyme is essential for the synthesis of guanosine monophosphate (GMP) from guanine and/or hypoxanthine (figure 1). If no GMP is available, no RNA is synthesized and cell death ensues. This has long pointed to HGPRTase as a potential drug target for treating schistosomiasis.¹

In the last years increasing attention has emerged over RNA molecules as therapeutical agents.² Several examples of such molecules have been described *i.e.* small antisense RNAs, RNA aptamers, ribozymes and small interfering RNAs (siRNAs)³. siRNAs are 21-nucleotide RNA duplexes with a characteristic 3' end 2-nucleotide overhangs and usually employed in RNA interference as a therapy for silencing pathogens' essential genes.⁴⁻⁶ Designing siRNAs against viral sequences has proved to reduce viral load *in vitro*⁴ and *in vivo*.⁵⁻⁶ However, there is only a few reports applying siRNAs against a parasitic infection^{7,8} (*i.e.*, *in vivo* studies), none against *S. mansoni*.

In order to evaluate the therapeutical application of siRNAs against schistosomiasis, we produced such molecules directed against the HGPRTase gene of *S. mansoni* and used

the *hydrodinamical transfection* protocol to deliver them in infected mice. This procedure was originally described for efficient delivery of nucleic acids into mice tissues⁹, (liver, kidneys, spleen, pancreas and lung) and seemed to be a functional mean to achieve *S. mansoni* in the host. We thus estimated siRNAs therapeutical effect by worm counting from treated mice .

MATERIALS AND METHODS

Computational analysis. *S. mansoni* (GeneBank accession number X07883), *Mus musculus* (BC083145) and *Homo sapiens* (NM_000194) RNA and protein sequences for HGPRTase were aligned using the program BLAST 2 SEQUENCES (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>) in order to identify similar and divergent (species-specific) regions.

siRNAs design and synthesis. 21-mer sequences were chosen in the *Schistosoma mansoni* HGPRTase messenger RNA sequence starting with a guanine, a pre-requisite for *in vitro* transcription (IVT) of siRNAs.¹⁰ Since certain siRNAs may be more efficient than others¹¹, we decided to design and use simultaneously three different siRNAs directed against the target gene. The positions of these sequences (two oligonucleotides for each siRNA) in the HGPRTase coding region are: nt 1117-1137 (HGPRTase 1); nt 1119-1139 (HGPRTase 2); nt 253-273 (HGPRTase 3); nt 251-271 (HGPRTase 4); nt 584-604 (HGPRTase 5); nt 582-602 (HGPRTase 6). As negative controls we used mutated versions of all the three siRNAs and an irrelevant siRNA derived from a viral sequence (AF201929): nt 634-654 (irrelevant 13) and nt 632-652 (irrelevant 14). The nucleotide sequences of the template molecules and T7 promoter used for IVT are presented below:

HGPRTase 1:

5' CCGTTGATCAATTGATTAATCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

HGPRTase 2:

5' AAGATTAATCAATTGATCAACTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

HGPRTase 3:

5' AAGCCCATCAACAAGATCAGCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

HGPRTase 4:

5' TTGCTGATCTTGTTGATGGGCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

HGPRTase 5:

5' AAGCATAGCCAACGACAAATCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

HGPRTase 6:

5' TCGATTTGTCGTTGGCTATGCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

HGPRTase 7 (mutated):

5' CCGTTGATCTTATGATTAATCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

HGPRTase 8 (mutated):

5' AAGATTAATCATAAGATCAACTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

HGPRTase 9 (mutated):

5' AAGCCCATCAAACGGATCAGCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

HGPRTase 10 (mutated):

5' TTGCTGATCCGTTTGATGGGCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

HGPRTase 11 (mutated):

5' AAGCATAGCCAGGAACAAATCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

HGPRTase 12 (mutated):

5' TCGATTTGTTCCCTGGCTATGCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

Irrelevant 13:

5' CTGGTTGGAAGTCTTCTAGCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

Irrelevant 14:

5' GCGCTAGAAGCAGTTCCAACCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

T7 promoter:

5' GGT AAT ACG ACT CAC TAT AG 3'

Each 40-mer oligonucleotide was annealed to the T7 promoter according to the manufacturer's instructions (AmpliScribe™ T7 High Yield Transcription Kit; Epicentre, Madison, Wisconsin), generating a duplex region of 20 nucleotide that served as a template for T7 RNA polymerase. The templates were incubated at 42° for six hours for IVT. Each generated RNA oligo was annealed as follows: 1-2 (siRNA1); 3-4 (siRNA2); 5-6 (siRNA3); 7-8 (siRNA mutated 1); 9-10 (siRNA mutated 2); 11-12 (siRNA mutated 3); 13-14 (irrelevant siRNA).

Mice infection with *S. mansoni*. Swiss three-week-old female mice were tail-infected for 2 hours with one hundred cercariae each (strain BH, in water), in the presence of light. Animals were treated according to the Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (State University of Campinas – Unicamp) guidelines for animal care.

siRNA injection. Seventy days after infection, animals were tail vein-injected with either PBS buffer (fifteen animals), siRNAs (fifteen animals; five micrograms of an equimolar mixture of the three siRNAs, diluted in PBS per animal), mutated siRNAs (as describe before) or irrelevant siRNA (as describe before, except for five micrograms of only one siRNA) according to a recently described protocol for hydrodinamical transfection.¹² Injection was performed during 20--60 seconds, using a 3 mL syringe with a 27 gauge and a 0.5 inch-long needle. Experiments were done in duplicate, totalizing one hundred twenty animals.

Worm counting. Six days after the siRNAs (or PBS) injection, animals were sacrificed by cervical dislocation following perfusion.¹³ The number of parasites was counted in the liver, porta and mesenterial veins (the preferential locations of *S. mansoni* in mice) as follows: a small cut was performed in the porta vein, where worms were counted manually. Saline was then injected into the supra hepatic vein (approximately 5 mL) to allow removal of worms located in the liver veins (through the cut in the porta vein). We subsequently manually counted worms in mesenterial veins.

Effects on host encoded HGPRTase. Swiss five-week-old female mice (not infected with *S. mansoni*) were tail vein-injected with siRNAs or controls (as described above), three animals per group. Twenty four hours latter animals were sacrificed, kidneys were collected and pooled by groups. This organ was chosen because it is also target of hydrodinamical transfection.⁹ RT-PCR was performed using Ready-to-go beads (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey) and 1 µg of total RNA from kidneys. RT-PCR condition was as follows: 47°C, thirty minutes ; 95°C, five minutes ; thirty five cycles: of 95°C, thirty seconds / 57°C, thirty seconds / 72°C, one minute ; and final extension at 72°C, ten minutes. Sequences of oligos used for reaction (twenty picomoles of each in a fifty µL reaction):

Mus musculus HGPRTase 1:

5` CTT GCT CGA GAT GTC ATG AAG 3`

Mus musculus HGPRTase 2:

5` AAG CTT TAC TAG GCA GAT GGC 3`

Mus musculus α -tubulin 1:

5' CTA CAC CAT TGG CAA GGA GAT 3'

Mus musculus α -tubulin 2:

5' AAC ATT CAG GGC CCC ATC AAA 3'

Expected amplicon sizes are: 613 bp for *Mus musculus* HGPRTase, 430 pb for *Mus musculus* α -tubulin.

RESULTS AND DISCUSSION

Due to its medical importance, development of alternative schistosomiasis control approaches is of special interest. Here we show for the first time that siRNAs can successfully be applied *in vivo* against schistosomiasis. Overall, the total number of parasites per animal was reduced by approximately 27% after treatment with siRNAs compared to control groups (Table 1). The mean number of parasites in control groups was: i) buffer only - 39 (median = 40), ii) mutated siRNAs - 39 (median = 39), iii) irrelevant siRNAs - 42 (median = 44) as compared to a mean of 29 parasites (median = 28) in the siRNA-treated group ($P = 0.0023$, Kruskal-Wallis). Kaplan-Meier survival analysis confirmed the difference between the tested groups ($P = 0.0023$; Figure 2).

Praziquantel, Oxamniquine and Metrifonate are drugs used in schistosomiasis treatment, which may cause side effects; additionally not all cases are cured. Such limited chemotherapy points up the necessity to develop new drugs and/or approaches. Conventional drugs normally target proteins and mutations may lead to resistance. This continuing demand for new drugs constitutes a time-consuming and expensive task. siRNAs emerge as fantastic therapeutic potential since it is a relatively simple and cheap approach. Additionally, siRNAs are believed to mediate target RNA degradation in a highly specific fashion, thus possibly emerging as a therapeutic principle without side effects.

In our specific study, targeting RNA (and not proteins as conventional drugs) is of considerable interest once the host also encodes target gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Accession Number BC083145). *S. mansoni* and *M. musculus* proteins share 50% in identity and 67% in similarity, however they present very low

similarity in nucleotide sequence (Figure 3). This feature allowed us to use siRNAs as a species-specific drug, although their proteins are quite similar. siRNA treatment did not alter host HGPRTase transcript. Even using siRNA3, targeting one of the most conserved sequences (figure 3C, underlined sequence) between *S. mansoni* and *M.musculus*, no gene silencing could be observed by RT-PCR analysis (figure 4). This same set of siRNAs could be efficiently used in humans once such protein/RNA features describe above are conserved in humans [At protein level: (Expect = $8e-51$). Identities = 105/212 (49%), Positives = 143/212 (66%), at RNA level: (Expect = 0.003). Identities = 79/105 (75%) and = 27/29 (93%)].

The relative modest effect observed in our experiment (27% of parasite reduction; Fig. 3) may be attributed to some reasons. First, the preferential localization of *S. mansoni* in mice is the mesenteric veins, and not in the liver, where siRNAs were mainly directed to. Second, siRNAs must be ingested by parasites, pass through their digestive system, absorbed and then promote gene silencing at the cellular level. All these barriers make this approach less effective than conventional *in vitro* systems, yet not impossible as shown in *C. elegans*.¹⁴

Although we observed a certain variation in death rate among the groups, we do not believe it was due to differences in worm burden since animals of all groups were infected with the same number of cercariae and submitted to the same conditions to the end of the experiment. Rather, many animals in the mutated siRNAs-treated group (with the highest death rate) died due to cardiac failure during hydrodynamical transfection. Other possible causes of death would be related to complications of schistosomiasis.

However, considering that it was an extremely low mass of siRNAs (5 µg), such effect turns out to be quite significant. For instance, current *in vivo* protocols for pathogen combat uses three to ten times more siRNA.^{5,7,15} Additionally, this protocol was originally designed for nucleic acid delivery into host tissues; thus the mass of siRNA available in blood stream was much less than the used. Despite all these points, siRNAs presented a clear effect on parasitic control. It is possible that a longer exposure, higher mass (20 to 50 µg) and directional delivery of siRNAs could rapidly eliminate parasite from blood stream.

Successful therapeutic application of siRNAs against viruses, cancer and genetic disorders have been demonstrated, however only a few have visited their therapeutical applications over parasitic infections. It is of special importance to remember that *a priori* siRNA-based combat of parasitic diseases is easier than fighting against viruses. First because siRNAs are not required to enter the host cell, but simply be available in the blood stream for blood-feeding parasites. Second, parasites do not mutate as rapidly as viruses.

In our study, a relationship between worm burden reduction and siRNA treatment could be observed in a mammalian *in vivo* model. We propose the siRNAs mediate RNA silencing of the essential gene HGPRTase at least in part of parasites, leading to their death. The confirmation of HGPRTase gene silencing by RT-PCR in dead worms collected after treatment would be an ideal approach. However, this analysis was not possible because dead schistosomes are processed by the host and consequently not viable for molecular analyses. An alternative approach i.e. an *in vitro* system - is not yet established for schistosomes. Although the precise mechanism by which siRNAs affect worm burden

remain to be uncovered, we do believe, based on the different controls used, that the observed results were due to RNA interference.

This work is one of a few demonstrations of siRNAs against parasitic infections *in vivo*, the first for a multicellular parasite, and the first for schistosomiasis. This approach opens new avenues of research, by applying a highly promising therapeutic agent (siRNA) to treat a variety of lifethreatening parasitic diseases. The simplicity and low-cost of siRNA-based approaches could possibly revolutionize disease treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. H. K. Rozenfeld, D. R. Serrano and I. G. Pereira for help and technical assistance. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) ,SP, Brazil (Proccess Number 02/01828-8 - TCP). I.G.M. and I.L.C. are recipients of a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

AUTHORS' ADDRESSES

Tiago Campos-Pereira

Departamento de Genética Médica
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Cidade Universitária “Zeferino Vaz”
Campinas, SP, Brasil, 13084-971
Tel: +55 19 3788 8907
Fax: +55 19 3788 8909

Vinícius D’Avila Bitencourt Pascoal

Departamento de Genética Médica
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Cidade Universitária “Zeferino Vaz”
Campinas, SP, Brasil, 13084-971
Tel: +55 19 3788 8907
Fax: +55 19 3788 8909

Ivan de Godoy Maia

Departamento de Genética
Instituto de Biociências
Universidade Estadual Paulista – UNESP
Botucatu – SP – Brasil - 18618-000
Tel: +5514 3811 6229

Luiz A. Magalhães

Departamento de Parasitologia
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Cidade Universitária “Zeferino Vaz”
Campinas – SP – Brasil, 13084-971

Eliana M. Zanotti-Magalhães

Departamento de Parasitologia
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Cidade Universitária “Zeferino Vaz”
Campinas – SP – Brasil, 13084-971

Iscia Lopes-Cendes

Departamento de Genética Médica
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Cidade Universitária “Zeferino Vaz”
Campinas, SP, Brasil, 13084-971
Tel: +55 19 3788 8907
Fax: +55 19 3788 8909

REFERENCES

1. Craig SP 3rd, McKerrow JH, Newport GR, Wang CC, 1988. Analysis of cDNA encoding the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRTase) of *Schistosoma mansoni*; a putative target for chemotherapy. *Nucleic Acids Res. 16(14B)*: 7087--7101.
2. Sullenger BA, and Gilboa E, 2002. Emerging clinical applications of RNA. *Nature 418*: 252--258.
3. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T, 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature 411*: 494--498.
4. Gitlin L, Karelsky S, Andino R, 2002. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature 418*: 430--434.
5. Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM, Epstein SL, 2004. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A 101*: 8682--8686.
6. McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA, 2003. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol. 21(6)*: 639--644.
7. Mohammed A, Dasaradhi PV, Bhatnagar RK, Chauhan VS, Malhotra P, 2003. In vivo gene silencing in *Plasmodium berghei*--a mouse malaria model. *Biochem Biophys Res Commun. 309(3)*: 506--511.

8. Urwin PE, Lilley CJ, Atkinson HJ, 2002. Ingestion of double-stranded RNA by parasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. *Mol Plant Microbe Interact.* 15(8): 747--752.
9. Liu F, Song Y, Liu D, 1999. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* (7): 1258--1266.
10. Donze O, Picard D, 2002. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 30(10): e46.
11. Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H, 2002. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* 30(8): 1757--1766.
12. McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA, 2002. RNA interference in adult mice. *Nature* 418: 38--39.
13. Yolles TK, Moore DV, DeGiusti DL, Ripsom CA, Meleney HE, 1947. A Technique for the Perfusion of Laboratory Animals for the Recovery of Schistosomes. *J. Parasitol.* 33: 419--426.
14. Timmons L, Fire A, 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395: 854.
15. Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, Felig Y, Nussbaum O, Galun E., 2003. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther.* 8(5): 769--776.

LEGENDS

Figure 1. Biochemical pathway of purine biosynthesis in *S. mansoni*. The discontinuous line represents cell boundaries. Note that HGPRTase (in red) is essential to convert hypoxanthine and/or guanine (obtained from the host blood) to guanosine monophosphate (GMP). This latter compound is a key element for RNA synthesis, and thus, for cell progression. **AMP**: adenosine monophosphate; **IMP**: inosine monophosphate; **XMP**: xanthine monophosphate.

Figure 2. Survival plot (Kaplan-Meier) analysis of the number of worms in the control groups and siRNA-treated group (reduction of 27%, $P = 0.0023$). Dotted curves indicate the 95% confidence interval for the treated group. Vertical bars indicate the 95% confidence interval for control groups. PBS: buffer only; HG: siRNA against HGPRTase; HGm: mutated version of HG; IR: irrelevant siRNAs.

Figure 3. Similarities between host's and parasite's HGPRTase. **A)** Alignment of *S. mansoni* and mouse hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase protein sequences, using the program BLAST 2 SEQUENCES (Expect = $2e-52$). Positive (+): aminoacids of similar physical-chemical properties. **B)** This high similarity is represented by a continuous and ascendant line. **C)** Alignment of respective RNA sequences (Expect = $8e-05$). **D)** Weak similarity is represented by small discontinuous ascendant fragments.

Figure 4. Species-specific effect of siRNAs. RT-PCR of HGPRTase of mice injected with PBS, siRNAs, mutated version of siRNAs (Mut) or irrelevant siRNA (Irrel) was carried before plateau. siRNAs did not reduce host's HGPRTase. α -tubulin was used as internal control. Each lane corresponds to a pool of three animals. L: Ladder 1Kb plus Invitrogen.

Figure 1

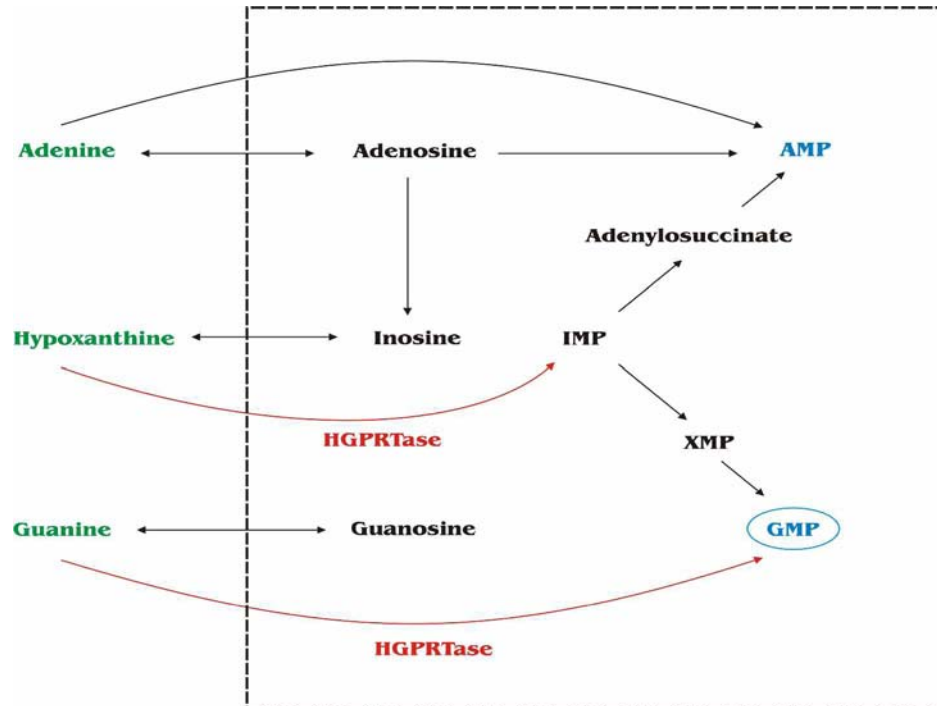


Figure 2

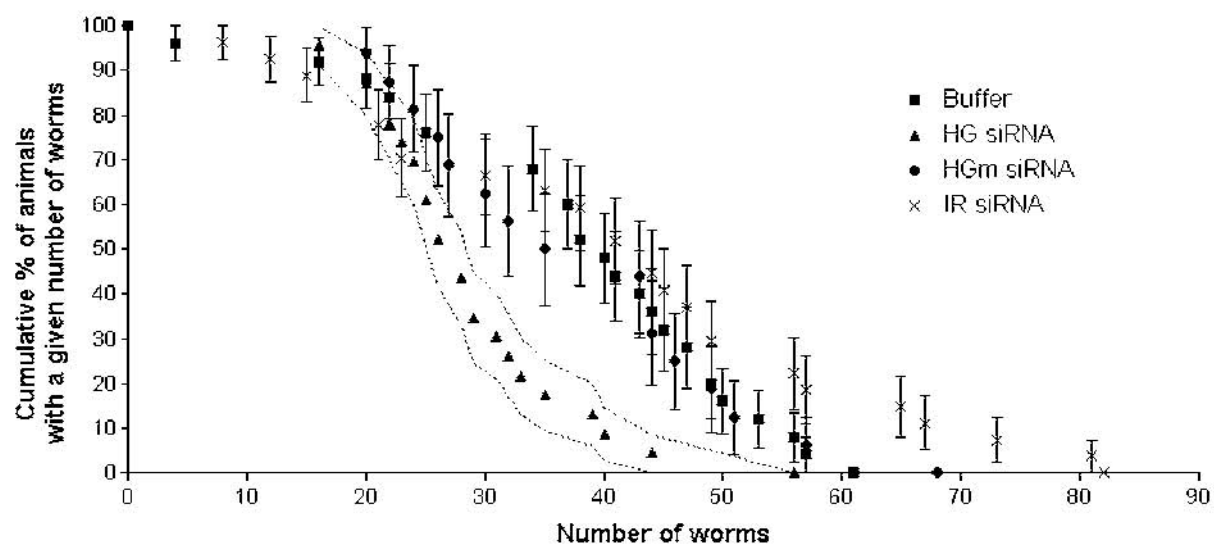


Table 1. Total number of worms observed in animals submitted to different treatments.

PBS	Number of worms	siRNAs	Number of worms	Mutated siRNAs	Number of worms	Irrelevant siRNA	Number of worms
01	34	31	24	61†	-	91	21
02	57	32	29	62	32	92	8
03	56	33	29	63	24	93	30
04 †	-	34	35	64†	-	94	12
05	43	35	39	65†	-	95	21
06	53	36	26	66	22	96	49
07	25	37 †	-	67†	-	97	23
08	47	38	22	68	20	98	41
09	44	39	23	69†	-	99	21
10	22	40 †	-	70†	-	100	15
11	38	41 †	-	71†	-	101	23
12	49	42	16	72†	-	102	41
13	37	43 †	-	73	57	103	56
14	50	44	56	74	35	104	73
15	4	45 †	-	75	51	105	56
16 †	-	46	40	76	27	106	45
17 †	-	47	32	77	30	107	67
18 †	-	48	26	78†	-	108†	-
19	20	49 †	-	79†	-	109	44
20	16	50	20	80†	-	110	44
21	38	51	25	81	46	111	65
22	41	52	28	82	68	112†	-
23 †	-	53 †	-	83†	-	113†	-
24	45	54	25	84	44	114	82
25	25	55	22	85	44	115	35
26	49	56	44	86†	-	116	49
27	37	57	31	87	26	117	47
28	61	58	20	88	49	118	81
29	40	59	28	89	43	119	57
30	34	60	33	90†	-	120	38

† Animal died before analysis.

Figure 3A

S.mansoni: 7 KADCVVIEDSFRGFPTEYFCTSPRYDECLDVVLIPNGMIKDRLEKMSMDIVDYEACNAT 66
++ VVI D G+ + FC Y E L+ V IP+G+I DR ETL+D D++ +
M.musculus: 4 RSPSVVISDDPEGYDLDFLCIPNHYAEDLEKVFIPHGLIMDRTERLADVM---KEMGGH 60

S.mansoni: 67 SITLMCVLKGKGFKLADLVGLERTVRAGIVLPMSEVFVRVKSIVYNDVSIHEPILTLGL 126
I +CVLKGK+KF ADL+D ++ R +PM+V+R+KSY ND S + + G
M.musculus: 61 HIVALCVLKGKGYKFADLLDYIKALNRNSDRSIPMTVDFIRLKSVCNDQSTGDIKVIIGD 120

S.mansoni: 127 DPSEYKDKNVLVVEDIIDTGKTTIKLISHLDSLSTKSVKVASLLVKRTSPRNDYRPFDFVG 186
D S KNLV+VEDIIDTGKT+ L+S + S K VKVASLLVKRTS YRPDFVG
M.musculus: 121 DLSTLTGKNVLIVEDIIDTGKTMQTLSSLVKQYSPKMKVASLLVKRTSRSGYRPFDFVG 180

S.mansoni: 187 FEVPNRFVVGYYALDYNDNFRDLHHICVINEVGQKKF 222
FE+P++FVVGYYALDYN+ FRDL+H+CVI+E G+ K+
M.musculus: 181 FEIPDKFVVGYYALDYNEYFRDLNHNVCVISETGKARY 216

Identities = 108/216 (50%), Positives=146/216(67%)

Figure 3B

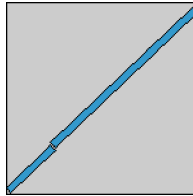


Figure 3C

S. mansoni: 553 ccagactttgttggttttgaagttccaaatcgatttgtcgttggetatgctttagactataatga 617
|||||
M. musculus: 558 ccagactttgttggttgaattccagacaagtttgttggatattgcccttgactataatga 622
|||||

S. mansoni: 427 gaagataataattgacacagggaaaaacaat 455
|||||
M. musculus: 432 gaagataataattgacactggtaaaacaat 460
|||||

Identities = 53/65 (81%), Identities = 27/29(93%)

Figure 3D

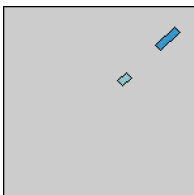
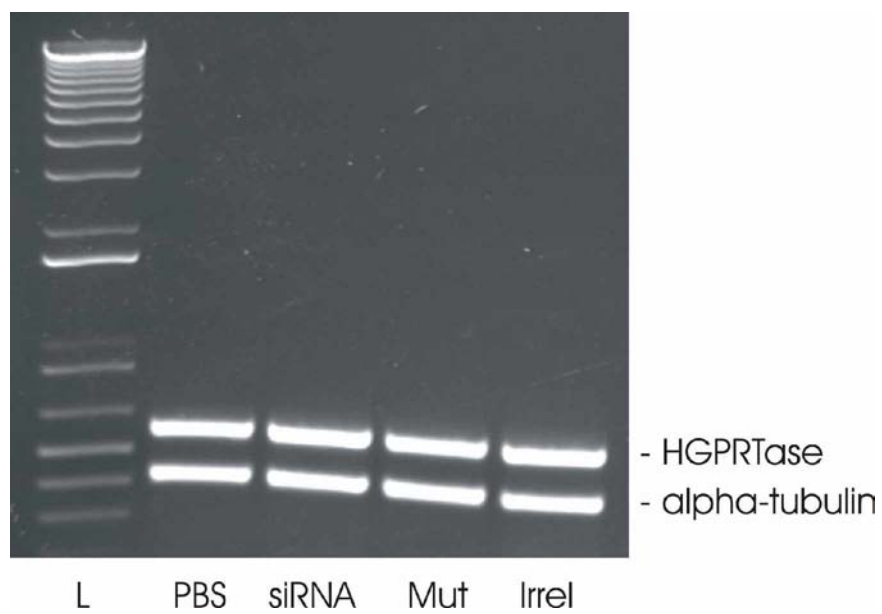


Figure 4



CAPÍTULO 6

Silenciamento temporário de MeCP2 nas vísceras
não induz ao movimento estereotipados dos membros
em camundongos

1. Introdução

A Síndrome de Rett (SR; OMIM No. 312750) é uma desordem progressiva do desenvolvimento neurológico, sendo uma das causas mais comuns de retardamento mental em mulheres com uma incidência de 1:10.000 a 1:15.000 (Hagberg *et al.*, 1983; Armstrong, 1997; Naidu, 1997). Indivíduos afetados são aparentemente normais durante o desenvolvimento pré- e perinatal (até os 18 meses), quando ocorre uma parada do desenvolvimento. Esta é acompanhada por uma desaceleração do crescimento da cabeça e cérebro, perda da fala, habilidades motoras e sociais, retardamento mental severo, ataxia do tronco e surgimento de *movimentos estereotipados* dos membros superiores (MEs) – sinal mais característico. Meninas com SR geralmente desenvolvem crises epiléticas, um padrão irregular de respiração com hiperventilação e apnéia periódica, escoliose e anormalidades na marcha. Características neuropatológicas proeminentes incluem redução da espessura cortical, redução do tamanho dos neurônios e do número de sinapses. (Jellinger *et al.*, 1988; Belichenko *et al.*, 1994; Bauman *et al.*, 1995a,b; Belichenko *et al.*, 1997; Kaufmann *et al.*, 1997).



Figura 1. Imagem representativa do movimento estereotipado - sinal clássico da SR (adaptado de Willard e Hendrich, 1999).

Estes intensos MEs apresentam um padrão que consiste de um tortuoso movimento com as mãos no sentido de espremer, lavar, bater palmas, dar tapas e outros automatismos durante horas.

Mutações na região codificante do gene *methyl-CpG-binding protein 2* (MeCP2 Genbank accession number AF158180) ligado ao cromossomo X (Xq28) foram identificadas em aproximadamente 70% dos casos clínicos de SR (Amir *et al.*, 1999; Hampson *et al.*, 2000). MeCP2 é alvo de inativação do X, se liga a dinucleotídeos metilados e está envolvido na repressão da expressão gênica dependente de metilação (Ng e Bird, 1999).

Três diferentes modelos animais para SR foram desenvolvidos através da modificação do DNA genômico, recapitulando o fenótipo associado à SR, inclusive os MEs (Chen *et al.*, 2001; Guy *et al.*, 2001; Shahbazian *et al.*, 2002b). A análise do perfil de expressão gênica através de microarrays no cérebro de camundongos selvagens e mutados para MeCP2 revelou que não existem diferenças entre ambos (Tudor *et al.*, 2002). De fato, apenas recentemente um único alvo de repressão transcricional por MeCP2 em mamíferos foi identificado: o promotor do gene BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), de expressão cerebral (Martinowich *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003).

Contudo a abundância de ilhas CpG metiladas no genoma e a expressão praticamente ubíqua de MeCP2 (Shahbazian *et al.*, 2002a) sugerem a existência de outros alvos de repressão tecido-específicos. Embora o modelo atual evidencie que SR seja causada devido à disfunção deste gene no sistema nervoso central (CNS), a contribuição da expressão visceral de MeCP2 na gênese do quadro clínico de SR não foi avaliada. Em

especial o movimento estereotipado das mãos - cuja base molecular/fisiológica é totalmente desconhecida - poderia ser desencadeada pela desrepressão de genes de ação local.

Para testar a hipótese da participação de MeCP2 visceral na gênese dos MEs conduzimos o silenciamento temporário de MeCP2 em camundongos adultos através de RNAi. Para isso utilizamos da transfecção hidrodinâmica (McCaffrey *et al*, 2002), método que permite a introdução eficiente de ácidos nucléicos *in vivo*, atingindo principalmente os seguintes órgãos: fígado, rins, pâncreas, baço, pulmão e coração. O silenciamento alcançado é contudo temporário, sendo dependente da meia-vida da proteína e da molécula utilizada para silenciamento (quatro dias para siRNAs).

2. Materiais e Métodos

Desenho de siRNAs: o desenho dos alvos foi realizado de acordo com o algoritmo *Débora* (vide capítulo 2) usando como sequência alvo o gene MeCP2 de camundongos (genbank accession number AF158181). Dois alvos foram escolhidos (figura 2) e nomeados de acordo com a posição do primeiro nucleotídeo no RNA mensageiro: MeCP2-732 e MeCP2-1089.

```
0001 atggtagctg ggatgttagg gctcagggag gaaaagtcag aagaccagga tctccagggc
0061 ctcagagaca agccactgaa gttaagaag gcgaagaaag acaagaagga ggacaaagaa
0121 ggcaagcatg agccactaca accttcagcc caccattctg cagagccagc agaggcaggc
0181 aaagcagaaa catcagaaaag ctcaggctct gcccagcag tgccagaagc ctcggttcc
0241 cccaaacagc ggcgctccat tatccgtgac cggggaccta tgtatgatga cccaccttg
0301 cctgaagggtt ggacacgaaa gcttaacaa aggaagtctg gccgatctgc tggaaagtat
0361 gatgtatatt tgatcaatcc ccagggaata gcttttcgct ctaaagtaga attgattgca
0421 tactttgaaa aggtgggaga cacctccttg gaccctaata attttgactt cacggtaact
0481 gggagagggg gcccctccag gagagagcag aaaccaccta agaagcccaa atctccaaa
0541 gctccaggaa ctggcagggg tcggggacgc cccaaaggga gcggcactgg gagaccaaaag
0601 gcagcagcat cagaagggtg tcaggtgaaa agggtcctgg agaagagccc tgggaaactt
0661 gttgtcaaga tgcccttcca agcatcgctt gggggtaagg gtgagggagg tggggctacc
0721 acatctgccc aggtcatggt gatcaaacgc cctggcagaa agcgaaaagc tgaagctgac
0781 ccccaggcca ttccctaagaa acggggtaga aagcctggga gtgtggtggc agctgctgca
0841 gctgaggcca aaaagaaagc cgtgaaggag tcttccatac ggtctgtgca tgagactgtg
0901 atcccccata agaagcgcaa gaccgggag acggtcagca tcgaggtcaa ggaagtgggtg
0961 aagcccctgc tgggtgtcac ccttggtgag aaaagcggga agggactgaa gacctgcaag
1021 agccctgggc gtaaaagcaa ggagagcagc cccaaggggc gcagcagcag tgccctctcc
1081 ccacctaaaga aggagcacca tcatcaccac catcactcag agtccacaaa ggcccccatg
1141 ccaactgctcc catccccacc cccacctgag cctgagagct ctgaggaccc catcagcccc
1201 cctgagcctc aggaacttgag cagcagcatc tgcaaagaag agaagatgcc ccgaggaggc
1261 tcaactggaaa gcgatggctg cccaaggag ccagctaaga ctcagcctat ggtcgccacc
1321 actaccacag ttgcagaaaa gtacaaacac cgaggggagg gagagcgcaa agacattgtt
1381 tcatcttcca tgccaaggcc aaacagagag gagcctgtgg acagccggac gcccggtgacc
1441 gagagagtta gctga
```

Figura 2. Sequência codificante do RNA de MeCP2 de camundongos. As sequências sombreadas são os alvos de RNAi

Este gene apresenta duas variantes de processamento (*splicing*) alternativo conhecidas: MeCP2 α e MeCP2 β (Mnatzakanian *et al.*, 2004). Ambos alvos cobrem as duas isoformas.

Síntese de siRNAs: os siRNAs foram produzidos por transcrição *in vitro* (Donze e Picard, 2002; Yu *et al.*, 2002), tendo como oligos molde (*template*):

Template senso para MeCP2-732

5' GGG CGT TTG ATC ACC ATG ACC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template antisenso para MeCP2-732

5' CAG GTC ATG GTG ATC AAA CGC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template senso para MeCP2-1089

5' TGG TGA TGA TGG TGC TCC TTC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template antisenso para MeCP2-1089

5' AAG AAG GAG CAC CAT CAT CAC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

Template senso para Irrelevante (MHV 634)

5' CTGGTTGGAAGTCTTCTAGCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

Template antisenso para Irrelevante (MHV 634)

5' GCGCTAGAAGCAGTTCCAACCTATAGTGAGTCGTATTACC 3'

Animais: fêmeas de cinco semanas de idade da linhagem Swiss foram obtidas no Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) – Unicamp.

Interferência por RNA *in vivo*: os animais foram pesados (aproximadamente 25 gramas) anestesiados com éter, a cauda mergulhada em um banho a 40°C para visualização da veia. 5 µg de siRNA diluídos em 2,5 mL de PBS (não autoclavado) foram injetados durante 20 segundos na veia caudal utilizando um seringa de 3 mL com agulha de 27 gauge. Foram usados quatro grupos (três animais por grupo): i) controle (apenas PBS), ii) siRNA irrelevante, iii) siRNA MeCP2-732 e iii) siRNA MeCP2-1089. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEa-Unicamp).

Análise fenotípica: 24 hs após a transfecção hidrodinâmica os animais foram levantados pela cauda para visualização do movimento de seus membros posteriores por 5 minutos.

Extração e quantificação de proteínas: Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tecido renal foi coletado e macerado com tampão de extração (Tris HCl pH 6,8 100 mM, SDS 2%, DTT 25 mM) e depois centrifugado a 20.000 rpm por 20 min a 4°C. O sobrenadante é coletado em um novo tubo e armazenado a -80°C. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford.

Análise molecular: a confirmação molecular do silenciamento gênico foi feita através de western blotting. Aproximadamente 100 µg de proteína foram carregadas em SDS-PAGE 8% e resolvidos por 2,5 h a 80V. Após o eletroblotting, a membrana foi hibridizada com anticorpos primários contra MeCP2 (diluído 1/1500 ; Upstate - NY, USA ; código 07-013;) e β -actina (diluído 1/6000 ; abcam - MA, USA ; código ab8227).

3. Resultados

3.1 Síntese dos siRNAs

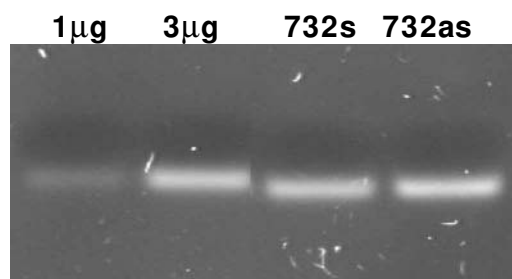


Figura 3. Síntese de siRNAs de MeCP2. Controles de massa (oligo de DNA de 20-mer) 1µg 3µg e oligos MECP2-732 senso e antisense. O rendimento em termos de massa pode variar muito dependendo do molde (*template*) utilizado.

3.2 Avaliação da eficiência do siRNAs e confirmação do silenciamento *in vivo*.

Ambos siRNAs foram testados em sua eficiência no silenciamento de MeCP2. A análise foi realizada *in vivo* e demonstrada por western blot (figura 4).

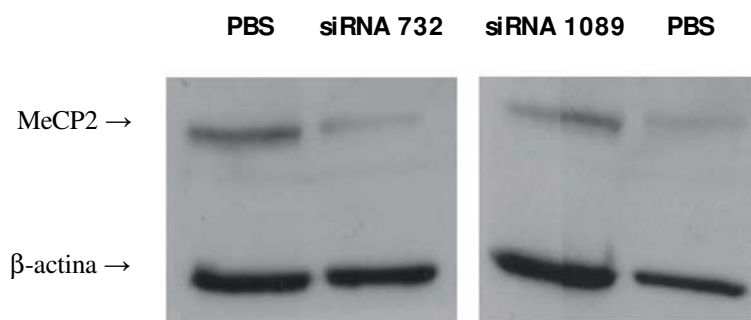


Figura 4. Confirmação do silenciamento via western blot. Os ensaios *in vivo* (amostras de tecido renal) revelaram que o siRNA 732 é mais eficiente que o 1089. A normalização dos experimentos foi feita com base na β -actina após análise densitométrica do gel.

Como previsto pelo programa *Strand Analysis*, o siRNA 732 (ΔG 1,0 kcal/mol) foi mais eficiente que o siRNA 1089 (ΔG 0,6 kcal/mol).

3.3 Análise comportamental

Os movimentos realizados pelos animais de cada grupo não diferiam entre si, não sendo observados os MEs dos membros posteriores como previamente descrito (Guy *et. al.*, 2001; Shahbazian *et al.*, 2002b).



Figura 5. Imagens representativas dos movimentos dos membros posteriores. A) tipo selvagem, B) Movimentos estereotipados de um modelo animal para SR (ambas imagens adaptadas de Guy *et. al.*, 2001). C) animal injetados com PBS apenas, D) animal injetado com siRNA 732.

4. Discussão

Este projeto, que está em andamento, objetiva neste momento a confirmação molecular do silenciamento por RT-PCR. Mas algumas conclusões já podem ser geradas.

O modelo atual considera SR como resultante única e exclusivamente da disfunção de MeCP2 no CNS. A contribuição da expressão visceral deste gene para o surgimento do quadro clínico de SR nunca foi avaliada.

MeCP2 age como um repressor transcricional cujo único alvo até então descoberto é o gene BDNF. A existência abundante de ilhas CpG no genoma sugerem a participação de MeCP2 no controle de outros genes, não apenas do CNS. Sua expressão em vários tecidos levanta a hipótese que sua disfunção em outros órgãos também possa contribuir de alguma forma para o quadro clínico de SR.

Neste trabalho conduzimos o silenciamento temporário de MeCP2 nas vísceras de animais adultos para avaliar sua participação no surgimento da característica mais clássica: os movimentos estereotipados, cuja base molecular/fisiológica é desconhecida. A hipótese que MeCP2 poderia atuar como um repressor de genes locais de efeito rápido/imediato – tais como sinalizadores celulares, hormônios ou fatores de transcrição - nas vísceras que desencadeariam uma resposta fisiológica levando em última instância aos movimentos estereotipados foi assim testada.

Nossos resultados excluem tal hipótese uma vez que a inativação visceral (fígado, pâncreas, baço, coração, rins e pulmão) não promoveram os MEs. Embora os dados aqui apresentados excluam a participação de um *gene visceral de ação imediata* como o

componente prevalente dos MEs, não podemos excluir o efeito acumulativo do mesmo e/ou durante o desenvolvimento.

5. Bibliografia

Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet.* 23(2):185-8.

Armstrong DD. (1997) Review of Rett syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56(8):843-9.
Bauman ML, Kemper TL, Arin DM. (1995a). Microscopic observations of the brain in Rett syndrome. *Neuropediatrics.* 26(2):105-8.

Bauman ML, Kemper TL, Arin DM. (1995b) Pervasive neuroanatomic abnormalities of the brain in three cases of Rett's syndrome. *Neurology.* 45(8):1581-6

Belichenko PV, Hagberg B, Dahlstrom A. (1997). Morphological study of neocortical areas in Rett syndrome. *Acta Neuropathol (Berl).* 93(1):50-61.

Belichenko PV, Oldfors A, Hagberg B, Dahlstrom A. (1994) Rett syndrome: 3-D confocal microscopy of cortical pyramidal dendrites and afferents. *Neuroreport.* 5(12):1509-13.

Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, Jaenisch R. (2001). Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet.* 27(3):327-31.

Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, Jaenisch R, Greenberg ME. (2003). Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science.* 302(5646):885-9.

Donze O, Picard D, 2002. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 30(10): e46.

Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A. (2001). A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet.* 27(3):322-6.

Hagberg B, Aicardi J, Dias K, Ramos O. (1983). A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann Neurol.* 14(4):471-9.

Hampson K, Woods CG, Latif F, Webb T. (2000). Mutations in the MECP2 gene in a cohort of girls with Rett syndrome. *J Med Genet.* 37(8):610-2.

Jellinger K, Armstrong D, Zoghbi HY, Percy AK. (1988). Neuropathology of Rett syndrome. *Acta Neuropathol (Berl).* 76(2):142-58.

Kaufmann WE, Taylor CV, Hohmann CF, Sanwal IB, Naidu S. (1997). Abnormalities in neuronal maturation in Rett syndrome neocortex: preliminary molecular correlates. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 6 Suppl 1:75-7.

Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, Sun YE. (2003). DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science.* 302(5646):890-3.

Mnatzakanian GN, Lohi H, Munteanu I, Alfred SE, Yamada T, MacLeod PJ, Jones JR, Scherer SW, Schanen NC, Friez MJ, Vincent JB, Minassian BA. (2004). A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nat Genet.* 36(4):339-41.

Naidu S. (1997). Rett syndrome: natural history and underlying disease mechanisms. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 6 Suppl 1:14-7.

Ng HH, Bird A. (1999). DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev.* 9(2):158-63.

Shahbazian MD, Antalffy B, Armstrong DL, Zoghbi HY. (2002a). Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet.* 11(2):115-24.

Shahbazian M, Young J, Yuva-Paylor L, Spencer C, Antalffy B, Noebels J, Armstrong D, Paylor R, Zoghbi H. (2002b) Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron.* 35(2):243-54.

Tudor M, Akbarian S, Chen RZ, Jaenisch R. (2002). Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(24):15536-41.

Willard HF, Hendrich BD. (1999). Breaking the silence in Rett syndrome. *Nat Genet.* 23(2):127-8.

Yu, JY, DeRuiter SL, Turner DL. (2002) RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(9):6047-52.

CAPÍTULO 7

The post-transcriptional gene silencing pathway in *Eucalyptus*

artigo aceito para publicação no periódico científico
Genetics and Molecular Biology

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736.

14025-670 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

Fone/Fax: 55 16 621-8540

E-mail: gmb.editor@sbg.org.br

Ribeirão Preto, 17 de março de 2005.

Suplemento Especial FOREST

Ref.: MS2004/ 428 - The post-transcriptional gene silencing pathway in Eucalyptus

Prezado Dr. Ivan,

Temos o prazer de informar que seu trabalho acima referenciado foi aceito para publicação na Genetics and Molecular Biology.

Como norma da revista, o manuscrito está sendo enviado para uma revisão do texto em inglês, sem ônus para os autores. Essa versão lhe será submetida para revisão final.

Agradecemos sua participação em nossa revista.

Atenciosamente,



Fábio de Melo Sene

Editor

Genetics and Molecular Biology

editor@gmb.org.br

The post-transcriptional gene silencing pathway in *Eucalyptus*

Flávio Tetsuo Sasaki¹; Tiago Campos-Pereira² and Ivan de Godoy Maia^{1*}

¹Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP, 18618-000 - Botucatu/SP

²Departamento de Genética Médica, FCM, UNICAMP, 13084-971 - Campinas/SP

* Corresponding author – Fax: 14 3815-3744; e-mail: igmaia@ibb.unesp.br

Key words: gene silencing, PTGS, RNA silencing, EST, *Eucalyptus*

Running Title: PTGS pathway in *Eucalyptus*

ABSTRACT

Post-transcriptional gene silencing (PTGS) is a conserved surveillance mechanism that identifies and cleaves double-stranded RNA molecules and their cellular cognate transcripts. The RNA silencing response is actually used as a powerful technique (named RNA interference) for potent and specific inhibition of gene expression in several organisms. To identify gene products in *Eucalyptus* sharing similarities with enzymes involved in the PTGS pathway, we queried the expressed sequence tag database of the Brazilian Eucalyptus Genome Sequence Project Consortium (FORESTs) with the amino acid sequences of known PTGS-related proteins. Among twenty-six prospected genes, our search detected fifteen assembled sequences encoding products presenting high level of similarity (E value $<10^{-40}$) to proteins involved in PTGS in plants and other organisms. We conclude that most of the genes known to be involved in the PTGS pathway are represented in the FORESTs database.

INTRODUCTION

Post-transcriptional gene silencing (PTGS) is a widely conserved surveillance system that acts at the transcriptome level. It identifies long double stranded RNA molecules (dsRNA) such as those generated during virus replication, transposons mobilization or aberrant RNA synthesis. These molecules act as trigger signals for the PTGS machinery, guiding the cell to an alert state.

Once identified, trigger dsRNAs are cleaved by a cellular dsRNA-specific endonuclease named Dicer (DCL for Dicer-like in plants; Bernstein *et al.*, 2001; Zamore *et al.*, 2000; Schauer *et al.*, 2002) into ~21-23 nucleotide duplexes known as small interfering RNAs (siRNAs; Hamilton and Baulcombe, 1999). Somehow, a Dicer-associated protein (R2D2) “senses” thermodynamical free energy of siRNA 5' ends, binding to its more stable one (Tomari, *et al.*, 2004). This process coordinates Dicer (re-) positioning over siRNA and duplex winding by an RNA helicase (SDE3 in plants; Dalmay *et al.*, 2001) through its more unstable termini, allowing the loading of one strand into a multi-component complex termed RISC (for RNA induced silencing complex; Hammond *et al.*, 2000).

RISC is composed by several proteins of unknown function (Gemin 3 and 4, VIG and dFXR; Hutvagner and Zamore, 2002; Caudy *et al.*, 2002) and by multiple nucleases such as Slicer (or Argonaute 2), the catalytic endonuclease responsible for mRNA target cleavage (Parker *et al.*, 2004; Liu, *et al.*, 2004; Song, *et al.*, 2004; Meister, *et al.*, 2004; Rand, *et al.*, 2004), Tudor-SN, a micrococcal nuclease homologue (Caudy *et al.*, 2003) and probably Wex, a 3'-5' RNase D-like protein (Glazov *et al.*, 2003). Loaded siRNA guides RISC to the target RNA promoting its endonucleolytic cleavage and thus allowing 3'-5' (Wex) and 5'-

3' (AtXRN4; Souret *et al.*, 2004) exoribonucleases to act on the generated unprotected ends (Figure 1).

In plants and worms, the system is self-sustained and amplified by the activity of a siRNA-primed RNA-dependent RNA polymerase (RdRP or RDR; Mourrain *et al.*, 2000; Dalmay *et al.*, 2000). In certain cases, such as in silencing induced by dsRNA-replicating viruses, the requirement of an RdRP activity is bypassed (Dalmay *et al.*, 2000). In *Caenorhabditis elegans*, local introduction of dsRNA leads to systemic silencing that is probably mediated by a transmembrane protein named SID-1 (Winston *et al.*, 2002). The activity of a protein of unknown function with coiled-coil domains (SGS3) is also required for gene silencing (Mourrain *et al.*, 2000).

PTGS can also affect the genome promoting alterations such as DNA methylation (through MET1; Finnegan *et al.*, 1996) and chromatin remodeling (through DDM1; Jeddeloh *et al.*, 1999) at loci homologous to the target RNA (Morel *et al.*, 2000).

PTGS phenomenon, also called RNA silencing, is a potent means to counteract foreign sequences and its natural role in host defenses against transposable elements and viruses has been demonstrated. Consistent with this defense role, a great number of viral suppressors of RNA silencing have been identified so far (Voinnet *et al.*, 1999). A gene encoding an endogenous RNA silencing suppressor was discovered in tobacco (named *rgs-CaM*; Anandalakshmi *et al.*, 2000) and was proposed to be involved in endogenous gene regulation.

RNA silencing has been observed in plants, protozoans, insects, fungi (named quelling) and mammals (named RNA interference; RNAi), indicating common aspects and

functional analogy among pathways. RNAi is actually used as an experimental approach to suppress the expression of specific transcripts, thus becoming a powerful tool to dissect gene function and a promising therapeutical technology.

In this paper we provide an inventory of the putative genes involved in the PTGS pathway of *Eucalyptus* by exploring the expressed sequence tag (EST) information generated in the Brazilian Eucalyptus Genome Sequence Project Consortium (FORESTs). Knowledge about this pathway will contribute to establish RNAi-based protocols aiming functional genomic studies in this important tree.

MATERIALS AND METHODS

To identify gene products sharing similarities with enzymes involved in the PTGS pathway (Figure 1), similarity searches against cluster consensus sequences (contigs) in the FORESTs database (<https://forests.esalq.usp.br>) were performed using BLAST search programs (Altschul *et al.*, 1990). The database was firstly prospected using query sequences from known PTGS-related proteins (Table 1) and the TBLASTN algorithm. Positive hits (e-values < 10^{-40}) were validated against existing homologous sequences in the GenBank nonredundant protein database by using BLASTX. To further validate annotation, a protein domain analysis was performed using the Reverse Position Specific-BLAST (RPS-BLAST) algorithm at www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi, Pfam (Bateman *et al.*, 2000) and SMART (Schultz *et al.*, 2000) databases. An estimate of the relative abundance of the identified putative genes was generated based on EST counts per corresponding contig.

RESULTS AND DISCUSSION

The FORESTs database was mined for *Eucalyptus* gene products potentially involved in the PTGS pathway (Figure 1). We have searched for genes encoding 26 PTGS-related proteins and have found matches for 15 of them (Table 1). Among the identified EST clusters, the one annotated as MET1 homologue exhibited a low e-value ($2e-11$) but contained a highly conserved methyltransferase domain, indicating that it probably encodes a DNA methyltransferase. Searches also revealed several clusters with significant sequence and domain similarities to the four *Arabidopsis* homologues of Dicer (DCL1 to 4) and four clusters encoding RDR6 (also known as SDE1/SGS2).

Using the amino acid sequences of AGO-1, AGO-2 and AGO-4 as queries, nine clusters encoding Argonaute proteins were identified. AGO proteins are a common component of all RISC-related complexes and are defined by the presence of two conserved domains: an ~20 kDa N-terminal PAZ domain and an ~40 kDa C-terminal PIWI domain, which is in fact a (cryptic) RNase H domain responsible for RNA target cleavage (Song *et al.*, 2004). At least ten AGO homologues have been identified in the *Arabidopsis* genome. Among them, AGO-1 is involved in the siRNA and microRNA (miRNA) pathways (Vaucheret *et al.*, 2004) while AGO-4 plays a role in locus-specific siRNA accumulation and RNA-directed DNA methylation (Zilberman, *et al.*, 2003; Zilberman, *et al.*, 2004). In *Drosophila*, *Homo sapiens* and *Mus musculus*, AGO-2 mediates target mRNA cleavage (Okamura *et al.*, 2004; Meister, *et al.*, 2004; Liu, *et al.*, 2004). Since these proteins are closely related to each other, and biochemical characterization of AGO-2 in plants is still missing, the correct

assignment of the annotated *Eucalyptus* clusters proved to be difficult without further analyses.

We were also able to assign three clusters to AtXRN4, two clusters to SGS3, one cluster to SDE3 and a cluster to rgs-CaM (2e-41), a calmodulin-related protein that acts as a cellular suppressor of PTGS (Anandalakshmi *et al.*, 2000).

In contrast, BLAST searches revealed no gene product with significant similarity to RDE-4 (R2D2 in *Drosophila*), a dsRNA binding protein that interacts with RNA molecules identical to the trigger dsRNA during RNAi in *C. elegans* (Tabara *et al.*, 2002). Likewise no HEN1-related clusters could be found in the FORESTs database. HEN1 is a protein of 942 amino acids playing a role in siRNA and miRNA accumulation in plants (Boutet *et al.*, 2003). We do believe, however, that this protein is present in *Eucalyptus* but is not represented in the FORESTs database. Moreover, we did not find any EST cluster similar to proteins that have been genetically or biochemically linked to the PTGS pathway in humans (Gemin 3 and 4 of unknown function), *Drosophila* (RNA-binding proteins VIG and dFXR associated to RISC) and *C. elegans* (MUT-7 RNase D also known as WEX in *Arabidopsis*; ERI-1, a siRNA-degrading RNase; Kennedy *et al.*, 2004).

An estimate of the relative abundance of the identified genes was obtained by comparing the number of times ESTs were assigned to a particular contig. An overall view of the obtained results shows that the enzymes involved in PTGS are poorly represented in the FORESTs database (Figure 2, table 2). In general, transcripts encoding proteins of the AGO family, DCL family and RDR6 figured as the most extensively represented.

In summary, several EST clusters could be assigned to proteins of known functions in PTGS in plants and other organisms, covering almost the entire pathway (Figure 1 and Table 1). The identification of components of the PTGS pathway within the generated set of *Eucalyptus* ESTs provides a good evidence for the conservation of the RNA silencing mechanism among different plant species and organisms. Recent findings suggest that RNA silencing and related pathways are involved in several cellular processes such as defense, RNA surveillance and development. Elucidation of the molecular mechanisms underlying these processes is an important step towards the full understanding of the PTGS phenomenon. From our analyses, we can conclude that *Eucalyptus* encodes a functional RNA silencing pathway. This collection of PTGS-related ESTs provides an interesting resource for molecular and functional genomic studies in this important tree.

RESUMO

O silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) é um sistema natural de defesa que reconhece e degrada moléculas de RNA dupla-fita (dsRNAs) tais como RNAs virais em replicação e elementos de transposição em mobilização. Este mecanismo é o mesmo que permite o silenciamento potente e específico de genes na técnica de “Interferência de RNA” amplamente utilizada em estudos de genética reversa e genômica funcional. Neste estudo foi realizada uma prospecção no banco de seqüências expressas (EST) do projeto FORESTs visando identificar enzimas envolvidas na via do PTGS em *Eucalyptus*. Foram identificados ESTs cujos produtos gênicos apresentam alta similaridade (e-value $<10^{-40}$) com enzimas relacionadas ao PTGS em plantas e outros organismos. Dentre os vinte e seis genes prospectados, quinze deles foram anotados em eucalipto cobrindo portanto grande parte da via em estudo.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the *Eucalyptus* Consortium for the computer facilities and to FAPESP for the financial support. T.C-P. is supported by FAPESP and I.G.M. is a recipient of a research fellowship from CNPq.

REFERENCES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search toll. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, Herr JM, Mau C, Mallory A, Pruss G, Bowman L and Vance VB (2000) A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 290: 142-144.
- Bateman A, Birney E, Durbin R, Eddy SR, Howe KL and Sonnhammer EL (2000) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 28: 263-266.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM and Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
- Boutet S, Vazquez F, Liu J, Beclin C, Fagard M, Gratias A, Morel JB, Crete P, Chen X and Vaucheret H (2003) A genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Curr Biol* 13: 843-848.
- Caudy AA, Myers M, Hannon GJ and Hammond SM (2002) Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* 16: 2491-2496.
- Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, Denli AM, Bathoorn AM, Tops BB, Silva JM, Myers MM, Hannon G.J. and Plasterk RH (2003) A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* 425: 411-414.
- Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S and Baulcombe DC (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101: 543-53.
- Dalmay T, Horsefield R, Braunstein TH and Baulcombe DC (2001) SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J* 20: 2069-2078.
- Glazov E, Phillips K, Budziszewski GJ, Meins FJr, and Levin JZ (2003) A gene encoding an RNase D exonuclease-like protein is required for post-transcriptional silencing in *Arabidopsis*. *Plant J* 35: 342-349.
- Hamilton AJ and Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D and Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.

- Hutvagner G and Zamore PD (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297: 2056-2060.
- Kennedy S, Wang D and Ruvkun G (2004) A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 427: 645-649.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L and Hannon GJ (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305: 1437-1441.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G and Tuschl T (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15: 185-197.
- Morel JB, Mourrain P, Beclin C and Vaucheret H (2000) DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 10: 1591-1594.
- Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo TA and Vaucheret H (2000) *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101: 533-542.
- Okamura K, Ishizuka A, Siomi H and Siomi MC (2004) Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev* 18: 1655-1666.
- Parker JS, Roe SM and Barford D (2004) Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J* 23: 4727-4737.
- Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke DW and Ray A (2002) *DICER-LIKE1*: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci* 7: 487-491.
- Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP and Bork P (2000) SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* 28: 231-234.
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ and Joshua-Tor L (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305: 1434-1437.
- Souret FF, Kastenmayer JP and Green PJ (2004) AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell* 15: 173-183.
- Rand TA, Ginalski K, Grishin NV and Wang X (2004) Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 14385-14389.
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP and Zamore PD (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 17: 49-63.

- Tabara H, Yigit E, Siomi H and Mello CC (2002) The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* 109: 861-871.
- Tomari Y, Matranga C, Haley B, Martinez N and Zamore, PD (2004) A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306: 1377-1380.
- Vaucheret H, Vazquez F, Crete P and Bartel DP (2004) The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* 18: 1187-1197.
- Voinnet O, Pinto VM and Baulcombe DC (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* 96: 14147-14152.
- Winston WM, Molodowitch C and Hunter CP (2002) Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* 295: 2456-2459.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA and Bartel DP (2000) RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33.
- Zilberman D, Cao X and Jacobsen SE (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299: 716-719.
- Zilberman D, Cao X, Johansen LK, Xie Z, Carrington JC and Jacobsen SE (2004) Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr Biol* 14: 1214-1220.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Schematic representation of the molecular steps in PTGS pathway. Nuclear events at the loci of the target gene or transgene are promoted by MET1, DDM1 and QDE3 (a RecQ DNA helicase). PTGS is triggered by long dsRNA molecules that are converted by the ribonuclease III Dicer (or Dicer-like enzymes) into small interfering dsRNAs of 21-23 nucleotides (siRNA). One strand of siRNA is transferred from DCL to RISC, thus directing target RNA cleavage. Unprotected generated ends are targets for exonucleases (Rnase D and AtXRN4). A siRNA-primed RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) synthesizes new dsRNA molecules from target RNA thus perpetuating the process. Sid-1 is a transmembrane protein required for systemic signaling in *C. elegans*.

Figure 2. Cluster distribution and total number of ESTs (in each cluster) encoding enzymes involved in the PTGS pathway.

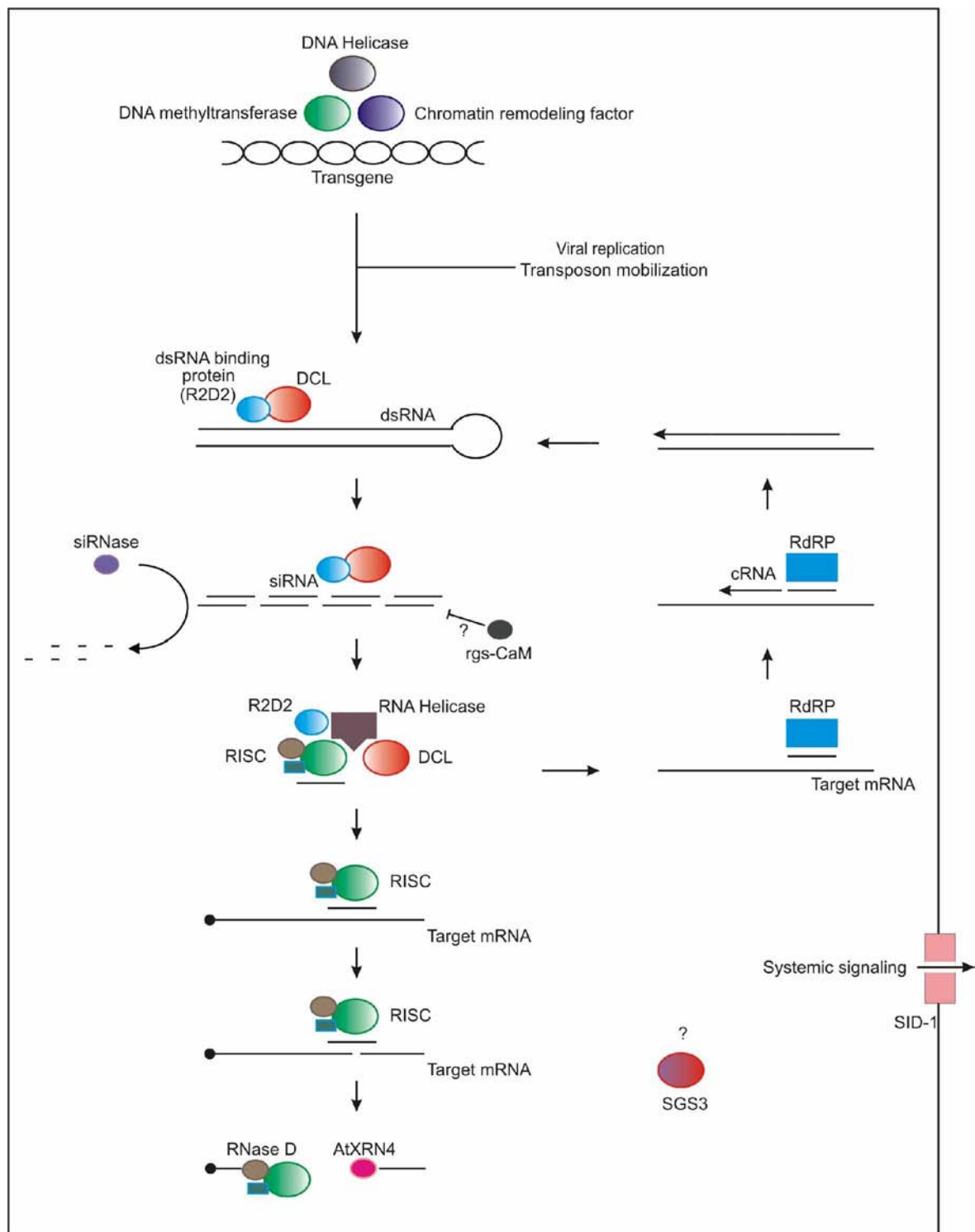


Figure 1

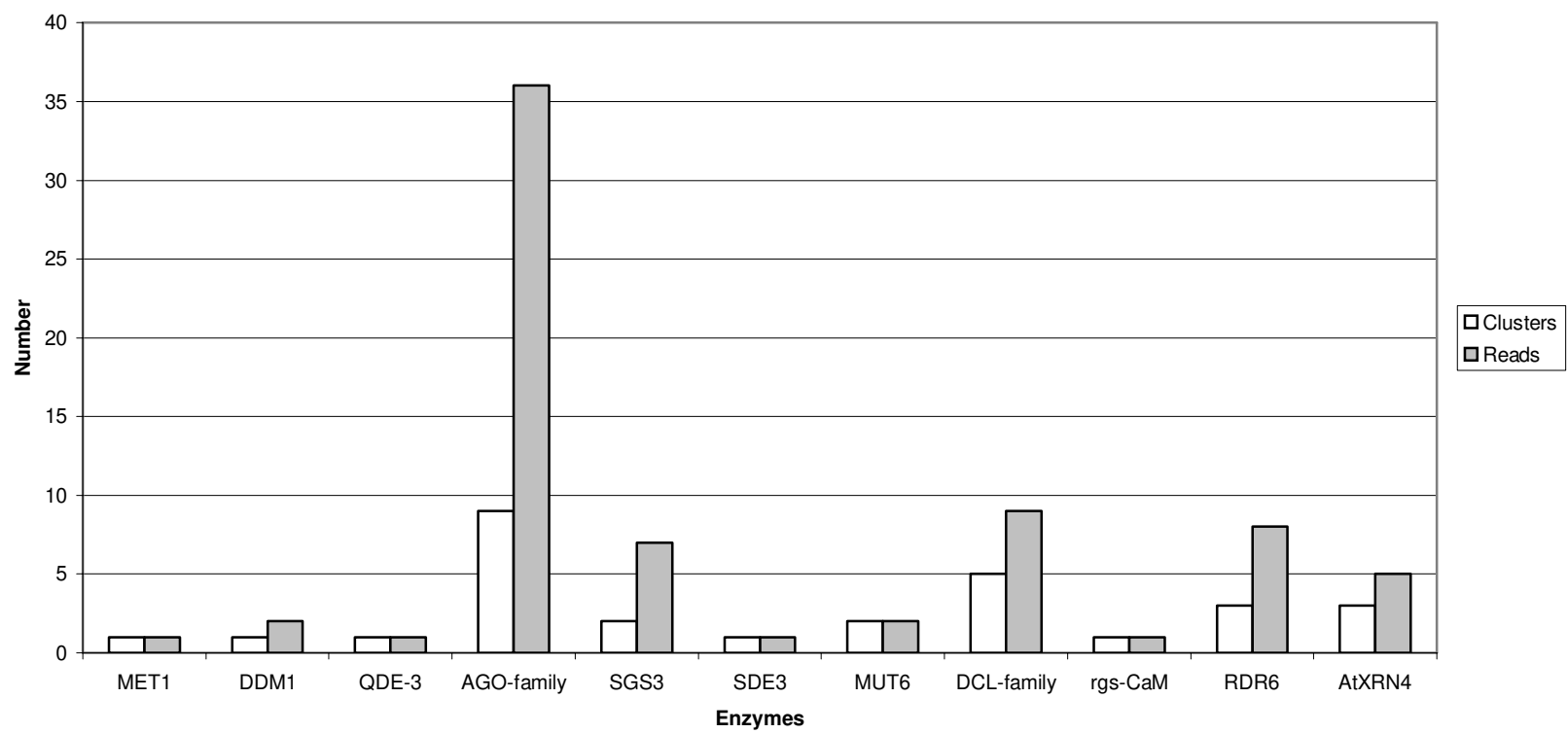


Figure 2

Table 1. PTGS-related proteins and homologues identified in Eucalyptus

Number	Name		Organism	Function	Access	Clusters	e-value	Identity	Coverage	
1	MET1		<i>Zea mays</i>	DNA methyltransferase	AAG15406	EGSBSL4219H01.g	2e-11	55%	8%	
2	DDM1		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chromatin remodeling factor	At5g66750	EGMCST7267G07.g	e-150	72%	44%	
3	QDE-3		<i>Neurospora crassa</i>	RecQ DNA Helicase	AAF31695	EGCCSL4031H03.g	2e-54	50%	11%	
4	Argonaute family	AGO.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Involved in siRNA and miRNA pathways	At1g48410	EGEQST6003A06.g EGEQRT3002E10.g EGEQST2200C06.g	0.0 0.0 0.0	86% 76% 61%	43% 78% 50%	
5		AGO.2	<i>Drosophila melanogaster</i>	RISC component	NP_730054	EGEQSL5001E09.g EGJEST2008F12.g EGBMRT6278A01.g	4e-89 8e-53 e-130	63% 44% 67%	25% 23% 35%	
6		AGO.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Control of siRNA accumulation and DNA methylation	At2g27040	EGJFFB1207F01.g EGMCRT6006C01.g EGEQFB1034D02.g	3e-70 e-153 1e-75	83% 73% 67%	16% 38% 23%	
7		SGS3		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Unknown	At5g23570	EGQHST6221A03.g EGJFLV2207H03.g	1e-49 3e-42	41% 41%	46% 33%
8		SDE3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RNA helicase	At1g05460	EGEZWD2227F09.g	2e-77	58%	23%	
		MUT6	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		AF305070	EGJFRT3163C04.g EGACLV3290A02.g	1e-86 2e-64	71% 61%	16 % 10%	
9	DCL1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	dsRNA-specific endonuclease (RNase III)	At1g01040	EGEQWD2256B05.g	e-139	72%	18%		
10	DCL2			At3g03300	EGEZWD2267C04.g	2e-71	56%	18%		
11	DCL3			At3g43920	EGEPST6161G12.g EGACSL5244C02.g	e-139 2e-50	60% 55%	27% 12%		
12	DCL4			At5g20320	EGSBCL1312G08.g	2e-63	57%	13%		
13	rgs-CaM		<i>Nicotiana tabacum</i>	Supressor of PTGS	AAK11255	EGEZRT5203G11.g	2e-41	62%	72%	
14	RDR6		<i>Arabidopsis thaliana</i>	RNA-dependent RNA polymerase	At3g49500	EGRFST6265B04.g EGEZST2003F10.g EGQHCL1342B05.g	2e-92 2e-77 3e-56	61% 37% 54%	22% 39% 18%	
15	AtXRN4		<i>Arabidopsis thaliana</i>	5'-3' exoribonuclease	At1g54490	EGBGRT6263B05.g EGEZCL1262C10.g EGBGWD2290C10.g	1e-80 2e-72 7e-42	60%	26%	

GENE	Number of clusters	Number of reads
MET1	1	1
DDM1	1	2
QDE-3	1	1
AGO-family	9	36
SGS3	2	7
SDE3	1	1
MUT6	2	2
DCL-family	5	9
rgs-CaM	1	1
RDR6	3	8
AtXRN4	3	5

Table 2. Number of clusters and reads of each gene in FOREST.

Number	Name	Organism	Function	Access Number	Clusters	e-value	Identity
16	Vig	<i>Drosophila melanogaster</i>	Constitutes RISC	AAF53437	EGEQLV2200C06.g	7e-21	(118/423) 27%
17	dFXR	<i>Drosophila melanogaster</i>	Constitutes RISC	CAD19444	Low hits	----- --	----- -----
18	dFMR1	<i>Drosophila melanogaster</i>	dsRNA binding protein	AAG22045	Low hits	----- --	----- -----
	RDE-4	<i>Caenorhabditis elegans</i>		CAA83012	Low hits	----- --	----- -----
19	DExH-box helicase	<i>Caenorhabditis elegans</i>	RNA Helicase	NP_501018	Low hits	----- --	----- -----
	Gemin3	<i>Homo sapiens</i>		AAF14544	No validation		
	p68	<i>Homo sapiens</i>		AAB84094	Problem in validation	----- --	----- -----
20	WEX	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RNase D	AAO33765	Low hits	----- --	----- -----
21	SID-1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	systemic signaling	AAL78657	Low hits	----- --	----- -----
22	HEN1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	siRNA and miRNA accumulation	AAL05056	Low hits	----- --	----- -----
23	Gemin4	<i>Homo sapiens</i>	unknown	AAF35283	Low hits	----- ---	----- -----

Table 3. PTGS related genes not found at FOREST.

CAPÍTULO 8

Produção acadêmico-científica

Introdução

O programa de genética e biologia molecular da Universidade Estadual de Campinas leva em consideração toda a produção acadêmica e científica gerada ao longo do desenvolvimento da tese. Neste sentido, este capítulo apresenta de forma objetiva a compilação desta produção (estágios, cursos e aulas ministrados, produtos biotecnológicos, publicação de resumos em congressos, artigos submetidos etc).

1. EXPERIÊNCIA DOCENTE

Estágio docente (1)

Universidade Estadual de Campinas - Unicamp
Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas

Período: Agosto - Novembro 2003

Disciplina: MD 680 - Genética Humana - Curso de Graduação para Biologia

Cursos ministrados (3)

Internacionais

- 1) Título: “Introdução à técnica RNA interference: silenciamento do gene MeCP2 em camundongos adultos.”

Organização:

Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT)
Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia (CBAB)
Laboratório de Genética Molecular, DGM, FCM, Unicamp

Natureza: Teórico-prático

Período: 05 a 16 de julho de 2004

Duração: 54 horas (32 horas práticas, 22 horas teóricas)

Local: Laboratório de Genética Molecular, DGM, FCM, Unicamp

Participantes: 7 brasileiros, 6 argentinos, 2 uruguaios e 1 colombiano

Nacionais

- 1) Título: “Utilizando a técnica *RNA Interference* (RNAi) para silenciamento gênico”

Organização:

Sociedade Brasileira de Genética
Laboratório de Genética Molecular, DGM, FCM, Unicamp

Natureza: Teórico

Período: 17 a 19 de setembro, 2003

Duração: 3 horas

Local: 49º Congresso Nacional de Genética - 2003, Águas de Lindóia - SP

Participantes: aproximadamente 100 alunos

Regionais

- 1) Título: Introdução à técnica de “Interferência por RNA”
Curso de pós-graduação - 06-10 dezembro de 2004
Dpto de Genética, Instituto de Biologia, Unesp Botucatu

Monitoria de Disciplina (2)

Disciplina: BG 581 - Genética Molecular
Período: março a junho 2003
Local: CBMEG, Unicamp

Disciplina: BG 581 - Genética Molecular
Período: março a junho 2005
Local: CBMEG, Unicamp

Orientações (13)

Aluno (1): Júlio H. K. Rozenfeld
Nível: Iniciação Científica
Local: Dpto de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp
Projeto: RNA interference na região hepática de camundongos.
Período: Novembro 2002 - Junho 2003

Alunos (6): Ângela L. Drezza, Maria Clara D. Fregolente, Izabel J. Martini, Flávia O. Pinho, Juliana H. C. Smetana, Simone S. Tsuneda
Nível: Graduação
Local: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Unicamp
Projeto: Avaliação do bombardeamento de dsRNA como método de indução de RNAi em drosophilas adultas.
Período: Março 2003 - Junho 2003

Aluno (1): Vinicius D'Ávila Bitencourt Pascoal
Nível: Estagiário (graduando)
Local: The RNA interference Laboratory, DGM, FCM, Unicamp
Projeto: RNA interference em camundongos adultos
Período: Março 2004 - atual

Alunos (5): Bruno Vaz de Oliveira, Dorival Martins Junior, Thiago Luz Farani, Nathalia Luiza Andreazza, Rafael Yamashita Ikemori
Nível: Graduação
Local: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Unicamp
Projeto: Silenciamento do gene bcl-2 por RNAi
Período: Março 2005 - Junho 2005

Aulas, seminários e palestras ministradas (40)

Para graduação: 3
Para pós-graduação: 17
Para profissionais graduados: 3

Em congressos locais: 2
Em congressos nacionais: 3
Em cursos internacionais: 12

2. RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS (13)

Campos-Pereira, T.; Maia, I.G.; Grippo, M.; Gilioli, R.; Lopes-Cendes, I. Silencing of MeCP2 in adult mice through RNA interference.. ASHG 2004 Toronto

Vinícius Pascoal, **Tiago Campos-Pereira**, Ivan G. Maia, Luiz A. Magalhães, Eliana M. Zanotti-Magalhães and Iscia Lopes-Cendes. RNA interference against a parasitic infection. ASHG 2004 Toronto

Grippo, M., **Campos-Pereira, T.**; Maia, I.G.; Gilioli, R.; Lopes-Cendes, I. In vitro RNA interference against MHV-3 virus. ASHG 2004 Toronto

Tiago Campos-Pereira, Ivan de Godoy Maia, Mariangêla Grippo, Rovilson Gilioli, Iscia Lopes-Cendes. "RNA interference in adult mice: *in vivo* silencing of MeCP2. SBBq 2004

Tiago Campos Pereira, Ivan de Godoy Maia, Iscia Lopes-Cendes. "Desenvolvimento de um algoritmo avanço para design de siRNAs." Congresso "Transformando biotecnologia em bionegócios". Campinas - SP, 2004

Tiago Campos-Pereira, Mariangêla Grippo, Rovilson Gilioli, Iscia Lopes-Cendes. Avaliação in vitro da técnica interferência por RNA no combate ao vírus MHV3. 50º Congresso Nacional de Genética, Florianópolis - SC (2004).

Campos-Pereira, T., Maia, IG, Grippo, M, Gilioli, R, Lopes-Cendes, I RNA Interference of MeCP2 in adult mice does not lead to stereotyped forelimb movements. 50º Congresso Nacional de Genética, Florianópolis - SC (2004).

Silenciamento in vitro de um gene essencial de *S. mansoni*. Vinicius Pascoal, Carlos Tonhatti, **Tiago C. Perreira**, Ivan G. Maia, Profa. Dra. Eneida de Paula, Profa. Dra. Eliana M.Z. Magalhães, Prof. Dr. Luiz A Magalhães e Profa. Dra. Iscia L. Cendes, - XII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp. 2004

Campos-Pereira T., Maia IG, Magalhães LA, Zanotti-Magalhães EM, Lopes-Cendes I. RNA interference (RNAi) against a parasite infection. 49º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia (2003).

Drezza AL, Fregolente MCD, Martini IJ, Pinho FO, Smetana JHC, Tsuneda SS, **Campos-Pereira T.** Evaluation of dsRNA bombardment as a way of triggering RNA interference (RNAi) in adult drosophila. 49º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia (2003).

Silva MS, **Pereira TC**, Maia IG. Análise da expressão do gene rgs-CaM em plantas transgênicas expressando diferentes versões de um supressor viral de silenciamento gênico. 49º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia (2003).

Tiago Campos-Pereira, Ivan G. Maia, Luiz A Magalhães, Eliana M. Zanotti-Magalhães & Iscia Lopes-Cendes. Initial evaluation of RNA interference (RNAi) against a parasite in mice. XXXII Reunião Anual SBBQ - Caxambu - MG (2003).

T. C. Pereira, I. G. Maia, F. T. S. Nogueira, V. E. de Rosa Jr. & P. Arruda. Identification and Cold stress effects on the expression profiles of RNAi-related genes in sugarcane. XXXII Reunião Anual SBBQ - Caxambu - MG (2003).

3. PARTICIPAÇÃO EM CURSOS (1)

Título: Interferência Por RNA: estratégias de inativação em mamíferos.

Organizador: Sociedade Brasileira de Genética

Local: 50º Congresso Nacional de Genética - Florianópolis, SC

Período: 7 a 10 de setembro de 2004

4. PUBLICAÇÕES EM REVISTAS CIENTÍFICAS (3)

Flávio Tetsuo Sasaki, **Tiago Campos-Pereira**, Ivan de Godoy Maia. The post-transcriptional gene silencing pathway in *Eucalyptus*. In press.

Campos-Pereira, T., Maia, I.G., Magalhães, L.A., Zanotti-Magalhães, E.L., Lopes-Cendes, I. *Small interfering RNAs (siRNAs) reduce worm burden in Schistosoma mansoni-infected mice* - submetido.

Grippe, M.C., **Pereira, T.C.**, Pascoal, V.D.B., Aline, P., Gilioli, R., Maia, I.G. and Lopes-Cendes, I. 5' triphosphate of *in vitro* transcribed siRNAs induce an antiviral response. Em preparação

5. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS E OUTRAS REUNIÕES (7)

XXXIIIª Reunião Anual da SBBQ - Caxambu, MG (2004)

50º Congresso Nacional de Genética - Florianópolis, SC (2004)

XX Semana da Biologia - São José do Rio Preto, SP (2004)

Transformando Biotecnologia em Bionegócios, Campinas, SP (2004)

XXXIIª Reunião Anual da SBBQ - Caxambu, MG (2003)

49º Congresso Nacional de Genética - Águas de Lindóia, SP (2003)

Palestra: “ O papel do professor no processo ensino-aprendizagem” - Unicamp, (2003)

6. PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS (11)

Fármacos e Similares (6)

Produto: siRNAs contra *Schistosoma mansoni*.

Autores: **Campos-Pereira, T.**, Maia, I.G., Magalhães, L.A., Zanotti-Magalhães, E.L., Lopes-Cendes, I.

Produto: siRNAs contra *murine hepatitis virus (MHV)*.

Autores: Grippo, M., **Campos-Pereira, T.**, Maia I.G., Gilioli R., Lopes-Cendes, I.

Produto: siRNAs para silenciamento de MeCP2 em camundongos.

Autores: **Campos-Pereira, T.**, Maia, Lopes-Cendes, I.

Produto: siRNAs para silenciamento de FAK.

Autores: **Campos-Pereira, T.**, Pascoal, V.D.B., Clemente, C., Maia, I.G., Franchini, Kleber Gomes, Lopes-Cendes, I.

Produto: siRNAs para silenciamento de ACE (ECA) em ratos.

Autores: Rocha, A.M., Romão, T.M., **Pereira, T.C.**, Pascoal, V.D.B., Machado, M.P.R., Maia, I.G., Franchini, K.G., Lopes-Cendes, I., da Silva, V.J.D.

Produto: siRNAs para silenciamento de Stat 5 a/ b.

Autores: **Campos-Pereira, T.**, Pascoal, V.D.B., da Cunha, D., Aline, P., Maia, I.G., Boscherio, A.C., Lopes-Cendes, I.

Processos (1)

Débora: algoritmo avançado para design de siRNAs

Autores: **Campos-Pereira, T.**, Maia, I.G. e Lopes-Cendes, I.

Softwares (3)

Strand Analysis - versão alfa

Autores: Secolin, R., Pascoal, V. D.B., **Pereira, T.C.**, Maia, I.G. e Lopes-Cendes, I.

Strand Analysis - versão beta

Autores: Secolin, R., Pascoal, V. D.B., **Pereira, T.C.**, Maia, I.G. e Lopes-Cendes, I.

Strand Analysis - versão gama

Autores: Secolin, R., Pascoal, V. D.B., **Pereira, T.C.**, Maia, I.G. e Lopes-Cendes, I.

Outros (1)

Produto: Plantas de tabaco imunossuprimidas para produção de vírus.

Autores: Tiago Campos-Pereira, Ivan de Godoy Maia, Paulo Arruda.

ADENDUM

produção de siRNAs por transcrição *in vitro*
transfecção hidrodinâmica
protocolos de ética

1. Produção de siRNAs por transcrição *in vitro*

1.1 Conceito

Os siRNAs foram produzidos em nosso laboratório através de *transcrição in vitro* (IVT) a partir de oligos de DNA de 40-mer (Yu *et al.*, 2002). Resumidamente, estes oligos apresentam uma região que se comporta como um promotor para a T7 RNA polimerase (figura 1), permitindo a síntese de um oligo de RNA de precisamente 21-mer (em vermelho).

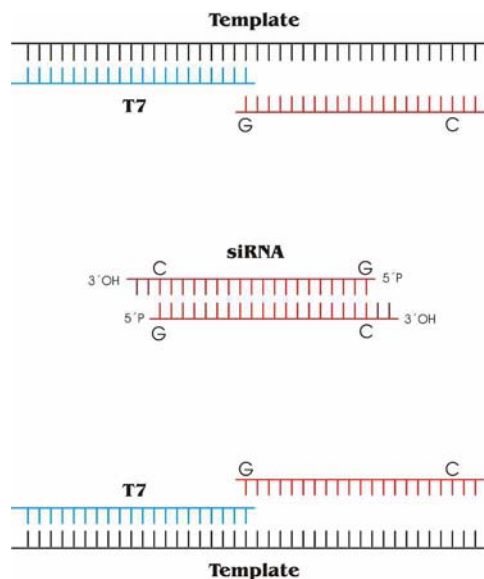


Figura 1. Produção de siRNAs através da transcrição *in vitro*. Os oligos molde anelam-se ao oligo T7 para formar um duplex, que serve como promotor da T7 RNA polimerase. Em vermelho os oligos gerados.

Todo o procedimento para produção de siRNAs envolve os seguintes passos: re-suspensão, anelamento, transcrição *in vitro*, defosforilação (o grupo fosfato que age como ativador de resposta interferon (Kim *et al.*, 2004) e quantificação.

1.2 Resuspensão e anelamento dos oligos

Cada oligo (molde e T7) é obtido a na escala de 100 nmoles, (IDT, representada pela Promega/Biobrás). Eles são ressuspensos em água ultrapura a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e subsequentemente diluídos para 125 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Considerando que:

- a IVT necessita de 1 μg de duplex (T7:molde em razão equimolar) em 8 μL
- peso molecular do oligo T7 é 6125 g/mol
- peso molecular médio de um oligo molde (template) é 12300 g/mol

os oligos são anelados no seguinte formato:

2,656 μL do oligo T7 a 125 $\text{ng}/\mu\text{L}$	($\approx 0,333 \mu\text{g}$)
5,336 μL do oligo molde a 125 $\text{ng}/\mu\text{L}$	($\approx 0,667 \mu\text{g}$)
8 μL do duplex	($\approx 1 \mu\text{g}$)

Para o anelamento usamos um volume dez vezes maior (80 μL) devido à perda durante o processo, que ocorre a 95°C por 5 minutos seguido de 20 minutos à RT.

1.3 Transcrição *in vitro*

Kit utilizado: *Ampliscribe T7 High Yield Transcription Kit* (Epicentre, Madison)

8 μL	de duplex (T7:molde – 1 μg)
2 μL	10x AmpliScribe T7 Reaction Buffer
6 μL	25 mM de NTP mix
2 μL	100 mM DTT
2 μL	AmpliScribe T7 Enzyme Solution
20 μL	

2 horas
42°C

Em seguida:

Adicionar 1 μL de *DNase I*
15 minutos, 37°C

1.4 Quantificação

Um microlitro da IVT é separado em gel de agarose 1% em tampão TAE (80 V, 10 min) junto a 2 controles de massa: 1 μg e 3 μg do oligo T7, cujo tamanho (20-mer) é semelhante aos oligos gerados. A determinação da massa é feita por densitometria das bandas através de um programa do sistema de fotodocumentação *Eagle Eye*.

Dez microgramas de cada oligo são então precipitados por acetato de sódio e etanol e ressuspensionado com 10 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para o próximo passo.

1.5 Defosforilação

2,7 μL (400 picomoles = 2,7 μg de ssRNA)
5 μL de tampão
4 μL (4U) de fosfatase alcalina (CIAP 1U/ μL)
38,3 μL de H_2O

50 μL

37°C por 30 min

Adicionar:

5 μL de tampão
4 μL (4U) de fosfatase alcalina (CIAP 1U/ μL)
41 μL de H_2O

100 μL

37°C por 30 min

2. Transfecção hidrodinâmica

2.1 Materiais: seringas de 3 mL e agulhas de 27 gauge; 0,5 polegada de comprimento.

2.2 Procedimento: os camundongos são pesados, anestesiados com éter em uma câmara, a cauda é mergulhada rapidamente em banho a 40°C por 10 segundos (para visualização da veia). A seguir injeta-se cinco microgramas de siRNA (diluído em 2,5 mL de PBS - 10% da massa corpórea) rapidamente na veia caudal (de 10 a 20 segundos).



A



B



C



D

Figura 4. Transfecção hidrodinâmica. Etapas: anestesia (A); visualização da veia caudal (B); injeção de siRNAs (C e D).

Bibliografia

Kim DH, Longo M, Han Y, Lundberg P, Cantin E, Rossi JJ. (2004). Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. **Nat Biotechnol.** 22(3):321-5.

Yu, JY, DeRuiter SL, Turner DL. (2002) RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(9):6047-52

3. Protocolos de ética

Todos procedimentos envolvendo animais foram submetidos ao Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA), Unicamp – em anexo.



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **495-2**, sobre "**Avaliação in Vivo da Técnica de 'Interferência de Rna' no Combate ao Schistosoma Mansonii**" sob a responsabilidade de **Iscia Teresinha Lopes-Cendes** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 07/02/2003.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **495-2**, entitled "**In Vivo Evaluation of 'RNA Interference' in Combat of Schistosoma Mansonii**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 07, 2003.

Campinas, 07 de Fevereiro de 2003.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonse
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 507-1 sobre "Estabelecimento da Técnica de "RNA Interference" na Região Hepática de Camundongos Adultos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 21 de Março de 2003.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 507-1, entitled "Establishment of the "RNA Interference" Technique in the Hepatic Region of Adult Mice", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on March 21, 2003.

Campinas, 21 de Março de 2003.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente
CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária Executiva
CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
Caixa Postal 6109
CEP -13083-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE: (19) 3788-6359
FAX 55 19 32893124



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 761-1, sobre "SILENCIAMENTO DO GENE MECP2 EM CAMUNDONGOS NEONATOS" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes / Tiago Campos Pereira está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 17 de fevereiro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 761-1, entitled "SILENCING OF MECP2 GENE IN NEONATE MICE", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 17, 2005.

Campinas, 17 de fevereiro de 2005.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP