

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

mestrado

BC/51905

IB/81933

INSTITUTO DE BIOLOGIA



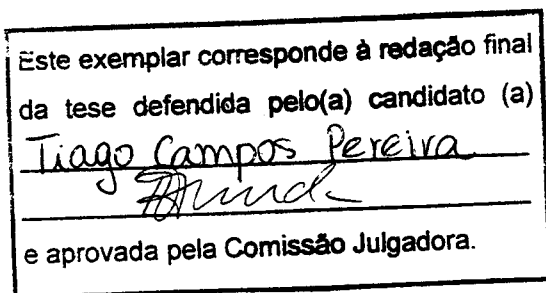
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Tiago Campos Pereira

Estudo da atividade de supressão da proteína HC-Pro
e análise do perfil de expressão de PTGS em Cana-de-açúcar



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, área de concentração Genética Vegetal e Melhoramento.

Prof. Dr. Paulo Arruda
Orientador

Campinas - SP
12/06/2002

UNIDADE	IB 31433
Nº CHAMADA	
V	EX
TOMBO BC/	
PROC.	
C	☐
D	☒
PREÇO	
DATA	
Nº CPD	

CM00177084-3

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

P414e

Pereira, Tiago Campos
 Estudo da atividade de supressão da proteína HC-Pro e
 análise do perfil de expressão de PTGS em cana-de-açúcar/
 Tiago Campos Pereira. --
 Campinas, SP:[s.n.], 2002

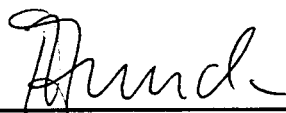
Orientador: Paulo Arruda
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia

1. Vírus. 2. Defesa. 3. Planta. I. Arruda, Paulo. II. Universidade
 Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 12 de junho de 2002

BANCA EXAMINADORA:

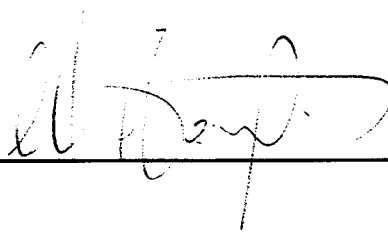
Prof. Dr. Paulo Arruda



Prof. Dr. Celso Benedetti



Dr. Marcos Cesar Gonçalves



Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

Dedico esta tese de mestrado aos meus pais,
Celso de Assis Pereira & Maria José Ferreira de Campos Pereira

“Princípio do desleixo restrito: ser desleixado o suficiente para que alguma coisa imprevista possa acontecer, mas não tão desleixado a ponto de não saber explicar o que ocorreu.”
Max Delbrück, um dos fundadores da Biologia Molecular

CONSIDERAÇÕES PESSOAIS

1. AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter me dado a saúde e a possibilidade de realizar meus estudos.

Aos meus pais **Celso** e **Maria José** que me amam incondicional e imensamente; e pelo apoio ao desenvolvimento da minha vida profissional.

Às minhas irmãs **Patrícia**, **Débora**, e famílias: **Tarcísio**, **Valdir**, **Ester** e **Israel**, por completarem minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Paulo Arruda** por mostrar o caminho para ciência de alto nível.

À Profa. Dra. **Maria Helena de Souza Goldman** (Departamento de Biologia, FFCLRP/USP, Ribeirão Preto), Prof. Dr. **Antônio Vargas de Oliveira Figueira** (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, Piracicaba) e Dr. **Celso Benedetti** (Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas) pela análise e correção de meu trabalho.

Aos Profs. do Dpto de Genética e Evolução:

À Profa Dra. **Ana Maria Lima de Azeredo-Espin**, pela amizade, carinho e por ser minha primeira tutora; ao Prof. Dr. **Adilson Leite** pelo bom humor e idéias originais; ao Prof. Dr. **Gonçalo Amarante Guimarães Pereira**, pelas conversas científicas “muito doidas, bicho”; ao Prof. Dr. **Louis Bernard Klaczko**, pelos grandes ensinamentos e discussões gerados no verão de 1998 e ao Prof. Dr. **Marcelo Menossi**, pelas muitas análises sobre as técnicas de biologia molecular não muito ortodoxas.

Ao Dr. **José Alberto Caram de Souza Dias** (Centro de Fitossanidade, Instituto Agronômico de Campinas) por ceder material biológico para esse trabalho.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. **Ivan de Godoy Maia** pela imensa paciência que tem comigo, além da extrema didática, excelência de conhecimentos, prazer em discutir, e ser um grande amigo. A sua esposa **Jaqueline** por seu carinho.

To Dr. **Thomas Tuschl** (Department of Cellular Biochemistry, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Germany), Dr. **Patrick K. T. Shiu** (Department of Biological Sciences, Stanford University, USA) e Dr. **Reuven Agami** (Division of Molecular Carcinogenesis, Division of Tumor Biology, The Netherlands Cancer Institute, Netherlands) for sending their scientific articles, which were of extreme importance to keep updated in the “*hot field*” of RNAi. To Dr. **Thomas Pirone** (Department of Plant Pathology, University of Kentucky, USA), for sending HC-Pro antibodies, used in *western blots* assays.

Aos amigos de bancada:

De Lucca (*So, now...*), pelo companheiro de todas as horas durante 54 meses; Marcos Brandalise, pela alegria, paciência e bom humor eternos; Rodrigo, pelo prazer da discussão científica; Mário, por ouvir minhas idéias; Eduardo, pela amizade, compreensão e disponibilidade; Camila, por fazer do laboratório um lugar melhor; Fabiana, pela felicidade; Daniela, pelos constantes “pode deixar que eu faço”; Letícia, por mostrar que ciência não é só trabalho; Paulo Schoghl, por ensinar a fazer data minings; Sylvia, pela alegria constante; Jiri, pelos inúmeros auxílios e discussões; Arnaldo, por mostrar que ciência é “1% inspiração e 99% transpiração”; Adriana, pelos conselhos e Izabel, pelas discussões.

Aos irmãos na Fé:

Alair, Allan (Delon), Anandréia (Figura), Akira, Bianca (Poltroninha), Beatriz (Preguiça), Celso, Daniel, Débora, Edilson, Eduardo, Fabrício (José), Felipe (Diplomata), Franklin, Geovana, Iara, Jorge, Júnior, Luciana, Luciano, Marcelo, Miriam, Patrícia, Poliano (Macanudo), Veimar (Amigo de graça), Rísia, Rodrigo (El Matador), Tereza, Thomaz (Tomatim), Zenilda e tantos outros.

Agradecimento especial à



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
pelo financiamento dado a este trabalho,
sem o qual esta Tese não se tornaria uma realidade.

Bolsista: Tiago Campos Pereira
Orientador: Prof. Dr. Paulo Arruda
Processo Número: 00/02316-5
Período: 01/06/2000 à 31/05/2002

CONSIDERAÇÕES PESSOAIS

2. A GENÉTICA

Desde que me entendo por gente gostei das ciências – todas elas. Interessei-me por genética em 1992, eu estava então na 8ª série do primeiro grau no “Colégio São Francisco Xavier” em Ipatinga. Meu professor de biologia era o Guarani, o qual disse em uma de suas aulas “a genética é o futuro da ciência, é o novo milênio”. Pronto, foi amor à primeira vista.

Decidi-me em prestar ciências biológicas pois é um curso riquíssimo em disciplinas sobre genética e objetiva principalmente a visão científica. O apoio de meus pais foi *chave* nesta decisão.

Iniciei meus estágios em 1997, no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, no “Fundão” (o laboratório lá no fundo, no final do corredor, lá no fundão). Como diz o De Lucca: “Grandes mentes passaram por ali” – o Andrés (“Mão Santa”), Edson Kemper, Ivan, Dante..... Comecei trabalhando com Edson Kemper, mas logo me interessei pela linha de pesquisa desenvolvida pelo Ivan: genética de vírus.

Quando comecei a trabalhar com HC-Pro junto ao Ivan, eu não entendia nada. Escrevemos o projeto de mestrado, mas eu não entendia bem o que eu iria fazer, o que iria descobrir, o estudo seria relevante?

Em uma das primeiras discussões que tive com o Ivan era: “Não seria ótimo se fosse desenvolvido um sistema de amplificação de RNAs? Um RCR: Replicase Chain Reaction?” Essa discussão não tinha muito a ver com meu trabalho, mas eu gostava de ficar divagando.

O tempo me mostrou quão grande foi minha sorte: cai de pára-quedas em uma das áreas atuais mais quentes da biologia molecular: *Interferência por RNA*.

É cientificamente excitante estar no local certo (CBMEG-Unicamp), com as pessoas certas (Paulo Arruda e Ivan de Godoy Maia) e estudando uma das áreas mais intrigantes da biologia, trata-se de uma singularidade.

No final de meu mestrado o destino me reservou uma grande ironia e surpresa: a via de Interferência por RNA é composta por um sistema de amplificação de mRNAs, algo que eu poderia chamar de “RCR”. A última ironia, até agora (12hs 43min 18.05.2002) é que ontem, em fase final de redação da tese, vi que sairá um artigo no dia 17 de Junho de 2002 (5 dias após minha defesa) na EMBOJ que comprova o modelo aqui proposto, de forma independente.

CONSIDERAÇÕES PESSOAIS

3. O CHEFE

Ao Professor Dr. Ivan de Godoy Maia,

Aprendi muito com você. Muitas foram nossas discussões, conversas e hipóteses. Eu, sempre teimoso, e você (quase) sempre com a razão. Passamos muito tempo juntos (apesar de que quase todos eles terem sido no laboratório...), e me recordo de muitas situações engraçadas. Vou recordar minha preferida:

Escovando os dentes no banheiro...

Tiago:

- Bicho, que tal aproveitar esses lances do De Lucca com a USP e inserirmos HC-Pro em C. elegans?

- Pra que?

- Pra ver se ela suprime RNAi em animais.

- Ah é? Como vamos gerar RNAi em C. elegans? De onde vamos tirar um microscópio com micro-manipulador para injetar o dsRNA em C. elegans? As coisas não são tão simples assim não, bicho. O que você tava pensando? Dar dsRNA para o C. elegans comer? Ele iria comer e ficar silenciado!!! Cada uma...

Passadas duas semanas

Ivan:

- Bicho, você viu o artigo que saiu na Nature?

- Não. Qual?

Timmons L, Fire A.

Specific interference by ingested dsRNA (em *C. elegans*).

Nature. 1998 Oct 29;395(6705):854.

Se fosse apenas por momentos como esse, já teria valido a pena. Mas foi muito mais – aquele almoço em Botucatu, oferecido pela Jaqueline, ummm, nem se fala.....

Mas gostaria que você soubesse que sou muito grato a você, sua amizade, companheirismo, compreensão, paciência (nem se fala).....vou ficando por aqui:

“Tinha eu muitas coisas que te escrever, mas não o quero fazer com tinta e pena. Espero, porém, ver-te brevemente, e falaremos face a face. Paz seja contigo. Os amigos te saúdam. Saúda os amigos nominalmente.” III Espístola de João, 1:13

CONSIDERAÇÕES PESSOAIS
4. PENSATA
É O PTGS UM SISTEMA IMUNE?

O PTGS é capaz de silenciar vírus, transposons e, em alguns casos, transgenes. Assim sendo, ele é atualmente interpretado como um *sistema de defesa* contra esses RNAs estranhos ao transcriptoma celular.

Poder-se-ia dizer então que ele é um *sistema imune*, já que atua contra vírus? Essa é uma discussão acalorada. Não por falta de evidências, pois o combate a vírus é dado como fato. A questão chave é: o simples *combate* a vírus poderia dar-lhe o *status* de Sistema Imune? Plantas teriam então sistema imune?

Devemos entender que as semelhanças entre o sistema imune de mamíferos (itálico) e o PTGS (sublinhado) são consideráveis:

- reconhecimento de antígenos: *proteínas*; dsRNAs
- capacidade de reconhecimento de grande gama de antígenos: *Igs com regiões hiper-variáveis*; siRNAs
- combate a esses antígenos: *fagocitose*; degradação
- especificidade: *reconhecimento de epítomos*; total complementaridade do siRNA
- existência de memória imune (mesmo que temporária)
- sinalização para amplificação da resposta específica
- problemas de auto-imunidade: *doenças auto-immunes*; co-supressão
- supressão da imunidade: *HIV*; PVY

Baseado nessas evidências minha opinião é que o PTGS seja sim, um sistema imune. Contudo, esta não é a interpretação aceita oficialmente pela ciência no momento. Acredito ser uma questão de tempo, para que outros dados sejam obtidos e que todo o modelo esteja pronto. Então a comunidade científica poderá discutir e dar seu parecer sobre o assunto.

Esta tese de mestrado agrupa alguns estudos sobre o Silenciamento Gênico Pós-transcricional (PTGS), sendo composta por 3 capítulos.

O primeiro é uma revisão bibliográfica sobre o PTGS, abrangendo desde estudos indiretos realizados em meados do século passado até a presente data.

O segundo capítulo corresponde à produção e caracterização de plantas transgênicas para a proteína “Helper component proteinase” (HC-Pro), com atividade supressora de PTGS. Seis versões diferentes da proteína foram expressas em plantas transgênicas de tabaco e um ensaio foi realizado visando associar domínios específicos à atividade de supressão de PTGS.

O terceiro capítulo corresponde a uma prospecção realizada no banco de seqüências gerado pelo projeto EST da cana-de-açúcar (Sucest). Esta investigação permitiu a identificação de genes relacionados ao PTGS em cana-de-açúcar e, pela primeira vez, a análise do perfil de expressão gênica nesta via. Este capítulo está apresentado na forma de artigo científico (em inglês) que será submetido à publicação.

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica	01
1.1 As quatro faces do silêncio	02
1.2 Silenciando vírus	06
1.3 Silenciando elementos transponíveis	09
1.4 Um futuro nada silencioso	14
1.5 Resumo	14

CAPÍTULO 2

Estudo da atividade de supressão da proteína HC-Pro em plantas transgênicas de tabaco	15
Resumo	16
Abstract	16
1 Introdução	17
2 Objetivos	19
3 Materiais e Métodos	
3.1. Plantas e vírus	20
3.2. Construção do cassete de expressão e clonagem	20
3.3. Transformação de discos foliares e regeneração	23
3.4. Seleção de plantas transgênicas	23
3.5. Análises moleculares das plantas transgênicas	24
3.6. Análises Morfo-fisiológicas	26
3.7. Ensaios de supressão usando PVX como repórter	26
3.8. Alinhamento de seqüências	26
4 Resultados	
4.1. Seleção de plantas transgênicas	27
4.2. Análises moleculares	28
4.3. Análises Morfológicas e de desenvolvimento	30
4.4. Ensaio de supressão empregando pvx como repórter	31
5 Discussão	
5.1. Produção de plantas de tabaco expressando a proteína HC-Pro de PVY	33
5.2. Envolvimento de domínios e padrões na atividade de supressão de PTGS	38

CAPÍTULO 3

Identification and expression profiles of PTGS-related genes in sugarcane by EST data mining.....	43
Abstract.....	45
Introduction.....	46
Material and Methods.....	47
Results and Discussion	
PTGS-related clusters in sugarcane.....	48
Relative Abundance.....	49
ESTs distribution among libraries.....	49
PTGS and transposon silencing.....	50
Conserved domains and structure analyses.....	51
Concluding remarks.....	51
Acknowledgments.....	52
Figure Legends.....	52
Bibliography.....	58

SIGLAS E ABREVIATURAS

aa:	amino-ácido
BAP:	6-Benzil-Aminopurina
cDNA:	DNA complementar
cRNA:	RNA complementar
CS:	co-supressão
DDM1:	<i>Deficient in DNA Methylation 1</i>
dpi:	dias após inoculação
dsRNA:	RNA dupla-fita
GFP:	green fluorescent protein
HC-Pro:	<i>Helper component proteinase</i>
IAA:	Ácido Indolacético
kb:	kilobase
MS:	<i>Murashige and Skoog Salt Mixture</i>
MSUD:	<i>Meiotic Silencing by Unpaired DNA</i>
NMD:	<i>Nonsense-Mediated RNA Decay</i>
NOS:	terminador da nopalina sintetase
nt:	nucleotídeo
pb:	pares de base
PCR:	Reação em cadeia da polimerase
pre-stRNA:	<i>pre-small temporal RNA</i>
PTGS:	Silenciamento gênico pós-transcricional
PTGS-S:	supressão de PTGS
PVX:	<i>potato virus X</i>
PVY:	<i>potato virus Y</i>
Qde:	<i>quelling-defective</i>
Rde:	<i>RNAi-defective</i>
rgs-CaM:	<i>regulator of gene silencing-calmodulin-like protein</i>
RIP:	<i>Repeat-Induced Point Mutation</i>
RISC:	RNA-induced silencing complex
RMVR:	Resistência a Vírus Mediada por RNA
RNAb:	RNA binding
RNAi:	Interferência por RNA
siRNA:	small interfering RNA
Sgs:	<i>suppressor of gene silencing</i>
ssRNA:	RNA fita simples
stRNA:	<i>small temporal RNA</i>
TEV:	<i>tobacco etch virus</i>
TGS:	<i>Transcriptional Gene Silencing</i>

Capítulo 1

Introdução - Revisão Bibliográfica

1.1. As quatro faces do silêncio

Um dos primeiros relatos sobre interações entre vírus, especificamente entre o vírus X da batata (PVX) e o vírus Y da batata (PVY), foi descrito na década de 50 (Ross, 1950). Percebeu-se uma diferença na taxa de replicação de PVX em *Nicotiana tabacum* e *Solanum tuberosum* co-infectadas com PVY. Parecia haver uma acumulação maior de PVX nesta situação do que em infecções simples.

Muitos outros trabalhos voltados para a dissecação deste fenômeno foram realizados nos anos subseqüentes (Rochow e Ross, 1954; Rochow e Ross, 1955; Rochow *et. al.*, 1955; Garcesorejuela e Pound, 1957). Quarenta anos depois, demonstrou-se por meio de análises moleculares que PVY induzia o aumento da replicação de PVX (Vance, 1995), mas uma pergunta ainda permanecia: *por que?*

Por outro lado, em 1990 um grupo de cientistas liderados por Jorgensen pretendia super-expressar o gene *chalcone synthase*, envolvido na produção de pigmentos de antocianina em petúnia. A intenção do grupo era produzir flores com uma cor púrpura mais intensa, mas observaram, porém, o desenvolvimento de algumas plantas com flores variegadas ou totalmente brancas (Figura 1). Este fenômeno foi denominado *co-supressão* e foi descrito por dois grupos distintos (CS; van der Krol *et. al.*, 1990; Napoli *et. al.*, 1990).

Dois anos mais tarde, cópias extras do gene *al-1*, essencial na biosíntese de carotenóides, foram introduzidas em *Neurospora crassa*, na tentativa de produzir colônias com uma cor laranja mais intensa. Entretanto, em aproximadamente um terço de seus experimentos, o fungo tornava-se claro ao invés de laranja profundo, indicando que algo havia suprimido o gene. O



fenômeno observado foi denominado “*quelling*” (Romano e Macino, 1992). Em 1998, uma interessante pesquisa demonstrou que a inoculação de moléculas de RNA dupla-fita (dsRNA) em *Caenorhabditis elegans* era capaz de silenciar genes de uma maneira potente e específica. Foi então criado o termo *interferência por RNA* (RNAi), porém a maneira pela qual este fenômeno ocorria era um mistério (Fire *et. al.*, 1998).

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. (Adaptado de Gura, 2000).

Durante a década de 90 muitos estudos foram feitos na tentativa de elucidar estes três últimos fenômenos, sendo que a principal ferramenta utilizada foi a obtenção e caracterização de mutantes.

Em um breve período, um número considerável de genes já havia sido identificado, entre eles: *qde-1*, *qde-2* e *qde-3* (para Quelling defective em *N. crassa*); *sgs-1*, *sgs-2* e *sgs-3* (para Suppressor of gene silencing em *Arabidopsis thaliana*); e *rde-1*, *rde-4* (para RNAi defective em *C. elegans*; Cogoni e Macino, 1997; Elmayan *et. al.*, 1998; Tabara *et. al.*, 1999; Mourrain *et. al.*, 2000; Dalmay *et. al.*, 2000; Smardon *et. al.*, 2000).

Quando esses genes foram comparados, observou-se que eles eram funcionalmente homólogos (Tabela 1; Fagard *et. al.*, 2000; Catalanotto *et. al.*, 2000; Cogoni e Macino, 1999a). Outro dado muito interessante é que em todos os três fenômenos, os genes *silenciados* apresentavam transcrição normal, porém seus mRNAs estavam sendo degradados no citoplasma.

Outras similaridades observadas entre os fenômenos acima descritos: i) são desencadeados quando o transcriptoma do organismo está alterado (presença de transgenes ou dsRNA); ii) são auto-sustentáveis, ou seja, uma vez iniciados eles permanecem por todo período de vida do organismo; iii) apresentam atuação sistêmica. Tais evidências experimentais indicavam que as três vias correspondiam a um único fenômeno: *Silenciamento Gênico Pós-Transcricional* (PTGS; Ketting e Plasterk, 2000).

Espécie	Genes		
<i>N. crassa</i>	<i>qde-2</i>	<i>qde-1</i>	<i>qde-3</i>
<i>C. elegans</i>	<i>rde-1</i>	<i>ego-1</i>	<i>mut -7</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>ago-1</i>	<i>sgs-2</i>	<i>sde-3</i>
<i>C. reinhardtii</i>	-	-	<i>mut-6</i>
Função	Início da tradução	Replicase	Helicase

Tabela 1. Homologia funcional entre os genes envolvidos com *quelling*, *co-supressão* e RNAi. Na última linha, a função de cada grupo de genes.

Uma das curiosidades do RNAi é que ele se espalha por todo organismo, não se restringindo apenas ao local da inoculação (atuação sistêmica). Da mesma forma, a co-supressão induzida em um local da planta se espalha por todo organismo. Esses experimentos demonstraram que, uma vez iniciado o processo, uma sinalização sistêmica emerge e avisa a todo organismo para silenciar o transcrito em questão. Demonstrou-se a existência de moléculas de RNA de aproximadamente 25 nucleotídeos de extensão (25nt), presentes exclusivamente em plantas apresentando CS e em *Drosophila* sob interferência de RNA (Figura 2). Estas moléculas correspondem às versões senso e antisenso do transgene (Hamilton e Baulcombe, 1999) sendo posteriormente designadas *small interfering RNAs* (siRNAs).

Uma das grandes descobertas durante a elucidação da via do PTGS refere-se à identificação do papel da *RNA polimerase dependente de RNA* (replicase) junto às moléculas de 25nt no processo de silenciamento gênico. Pesquisadores demonstraram *in vitro* que a replicase utiliza os siRNAs antisenso como iniciadores na síntese de um RNA complementar (cRNA) a partir do RNA mensageiro alvo (Figura 2; Lipardi *et. al.*, 2001).

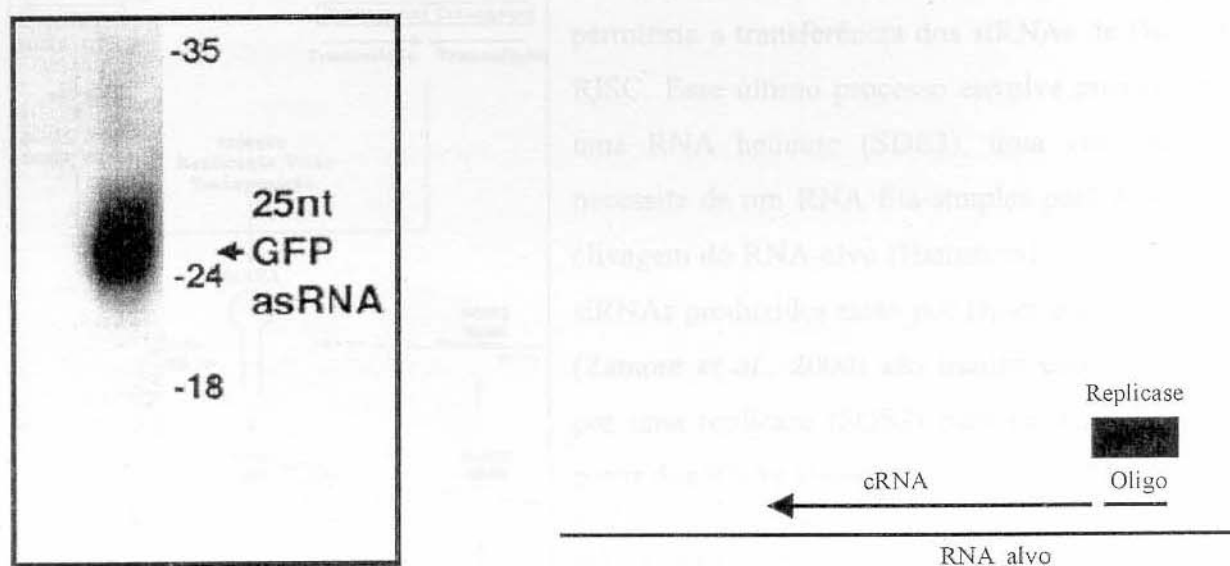
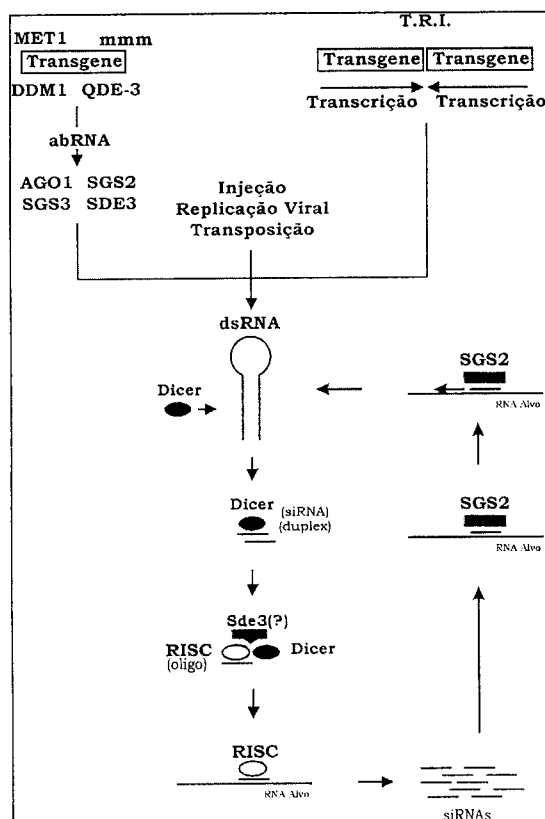


Figura 2. Oligonucleotídeos de RNA. Esquerda: identificação via *Northern blot* das moléculas de RNA antisenso de aproximadamente 25 nucleotídeos em plantas co-suprimidas para a “Green Fluorescent Protein” (GFP; Adaptado de Hamilton e Baulcombe, 1999). Direita: síntese de um dsRNA a partir da replicase, siRNA (oligo) e mRNA.

Como já se sabia nesta época que os dsRNAs eram clivados em siRNAs, pôde-se explicar a auto-sustentabilidade e o caráter catalítico do PTGS, pois siRNAs estavam gerando dsRNAs que geravam siRNAs.

De posse dos genes identificados e com base em diversas evidências experimentais, um esboço da via de silenciamento gênico pôde ser desenhado (Figura 3): metilação e alterações da cromatina do transgene mediadas pelas proteínas MET1 (DNA metiltransferase), DDM1 (Fator de remodelamento da cromatina) e QDE3 (RecQ DNA Helicase) induzem a produção de transcritos com estrutura de duplex. Esses RNAs aberrantes (abRNA) são usados como substrato por proteínas específicas tais como AGO1 (Fator Eucariótico de Iniciação de Tradução), SGS2 (RNA polimerase RNA dependente - replicase) SGS3 (função desconhecida) para gerar dsRNA mais longos. Esses abRNAs podem ser produzidos também por transgenes repetidos invertidos (TRI). Uma RNase III (Dicer) cliva os dsRNA em duplexes de 21-23 nt (siRNAs). Dicer e RISC (um complexo com atividade de endoribonuclease) possuem seqüências conservadas de funções desconhecidas denominadas *domínios PAZ* (Cerutti *et. al.*,



2000). Uma possível interação entre estes domínios permitiria a transferência dos siRNAs de Dicer para RISC. Esse último processo envolve provavelmente uma RNA helicase (SDE3), uma vez que RISC necessita de um RNA fita-simples para direcionar a clivagem do RNA-alvo (Hammond *et. al.*, 2000). Os siRNAs produzidos tanto por Dicer quanto por RISC (Zamore *et al.*, 2000) são usados como iniciadores para uma replicase (SGS2) para produzir dsRNAs a partir dos RNAs alvos.

Figura 3. Via do PTGS. A molécula central do sistema é o dsRNA, que pode ter origem em vários mecanismos: replicação viral, transposição, injeção, transcritos aberrantes ou transgenes repetidos invertidos (TRI). Uma vez identificado, o dsRNA é clivado por Dicer em duplexes de 21-25pb. O oligo antisenso deste duplex é transferido para RISC (complexo com atividade de endoribonuclease), a qual realiza a clivagem do RNA alvo, gerando mais RNAs de 21-25 nt (conhecidos como small interfering RNAs; siRNAs). Esses oligos são usados por uma

replicase para produzir um dsRNA a partir do RNA alvo, fechando a via. Esta natureza cíclica contribui na auto-sustentabilidade da via. (mmm: metilação do transgene).

1.2. Silenciando vírus

Haveria alguma ligação entre PTGS e infecção viral? Na década de 90, dois grupos independentes de pesquisa trabalhando com vírus vegetais de genoma constituído por uma molécula de RNA começaram a obter resultados intrigantes. A imunologia vegetal de então pregava que plantas transgênicas expressando produtos protéicos de origem viral seriam resistentes a estes microorganismos. Assim, Baulcombe e seu grupo iniciaram a produção de plantas transgênicas capazes de super-expressar proteínas do PVX. Obtiveram desta maneira plantas resistentes ao patógeno, mas ao contrário do que se esperava, as plantas que apresentavam maiores graus de resistência eram aquelas nas quais o transgene codificava um RNA não-traduzível (não havia presença de produto protéico viral). Este fenômeno foi então chamado de “Resistência a Vírus Mediada por RNA (RMVR)” já que o produto protéico estava ausente (Figura 4). Baulcombe concluiu que os transgenes estavam (co-)suprimindo os vírus e a si mesmos. John Lindbo e seu grupo obtiveram resultados similares com *tobacco etch virus* (TEV). Suspeitava-se que o fenômeno de co-supressão havia evoluído como um sistema de proteção contra ataques virais.

Durante os anos 90, muitos experimentos foram conduzidos na intenção de verificar a relação entre defesa a vírus e PTGS. Dentre estes, verificou-se que os vírus são ao mesmo tempo iniciadores (capazes de ativar) e alvos do PTGS. Além disso, as moléculas de RNA de 25 nucleotídeos observadas em plantas apresentando CS também eram detectadas em plantas infectadas com PVX. Havia fortes evidências a favor do PTGS como um sistema de defesa contra vírus (Ratcliff *et. al.*, 1997).



Figura 4. Resistência a Vírus Mediada por RNA. As três plantas à esquerda são transgênicas para uma versão não-traduzível de um gene de PVY. As três plantas à direita são não-transgênicas. Todas foram inoculadas com PVY, porém as transgênicas permanecem assintomáticas (Adaptado de Waterhouse *et. al.*, 2001).

Em resposta a um sistema de defesa, alguns vírus desenvolveram mecanismos de contra-defesa. As estratégias de contra-defesa virais se baseiam em proteínas supressoras de PTGS. Entre estas se encontram a proteína HC-Pro de PVY, a proteína 2b do vírus do mosaico do pepino (CMV), a proteína p25 de PVX, a proteína P15 de *Peanut clump virus* (PCV), a proteína p19 de *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) e a proteína C2 de *Tomato yellow leaf curl* vírus (TYLCV; Brigneti *et. al.*, 1998; Voinnet *et. al.*, 2000; Dunoyer *et. al.*, 2002; Qiu *et. al.*, 2002, van *et. al.*, 2002).

A descoberta destas proteínas fortaleceu a hipótese de que o PTGS tenha surgido inicialmente como um mecanismo de defesa a vírus. Desta maneira, o silenciamento de transposons ou transgenes deve-se provavelmente ao fato que as plantas os interpretam como vírus.

Começamos agora a responder a pergunta que se iniciou há mais de 50 anos: porque a replicação de PVX é elevada em plantas coinfectadas com o PVY?

Apesar de PVX codificar um supressor de PTGS (p25), esse não impede a replicação restrita do vírus. A proteína HC-Pro codificada por PVY atua suprimindo PTGS de forma sistêmica. Assim sendo, em coinfeções PVX/PVY, HC-Pro invalida o silenciamento gênico e PVX apresenta elevadas taxas de replicação (Figura 5).

Apesar de alguns trabalhos terem sido realizados na tentativa de elucidar o mecanismo molecular pelo qual HC-Pro realiza esta atividade, a mesma é ainda desconhecida, permanecendo como uma das grandes questões sobre silenciamento gênico pós-transcricional.

Recentemente foi descrita a primeira proteína vegetal capaz de suprimir PTGS. Este polipeptídeo foi identificado utilizando-se o sistema duplo-híbrido na tentativa de encontrar proteínas celulares capazes de interagir com HC-Pro. A proteína descrita está relacionada à calmodulina, sendo denominada rgs-CaM (*regulator of gene silencing-calmodulin-like protein*). Plantas transgênicas super-expressando rgs-CaM não apresentam PTGS. Considerando-se que as calmodulinas normalmente atuam ligando cálcio e ativando assim as proteínas alvo, esta descoberta aponta uma função para o cálcio na regulação da atividade de PTGS, possivelmente durante o desenvolvimento (Anandalakshmi *et. al.*, 2000).

Adicionalmente descobriu-se que concentrações não tóxicas de cádmio inibem PTGS (Ueki e Citovsky, 2001); ao passo que a inoculação de drogas que causam hipometilação, tais

como dihydroxypropyladenine e 5-azacytidine, suprimem parcialmente o silenciamento gênico (Kovarík *et. al.*, 2000).

A mais nova descoberta nesta área relata a primeira proteína supressora de PTGS conhecida que é codificada por um vírus que infecta animais (*Drosophila*): a proteína B2 de flock house virus (Hongwei *et. al.*, 2002). Os pesquisadores demonstraram ainda que plantas transgênicas expressando B2 não apresentam co-supressão, comprovando a unificação dos sistemas através de seus supressores.

Estudos de supressores de PTGS e seus mecanismos de ação correspondem a uma estratégia bastante interessante na dissecação da via de silenciamento gênico em diversos organismos.

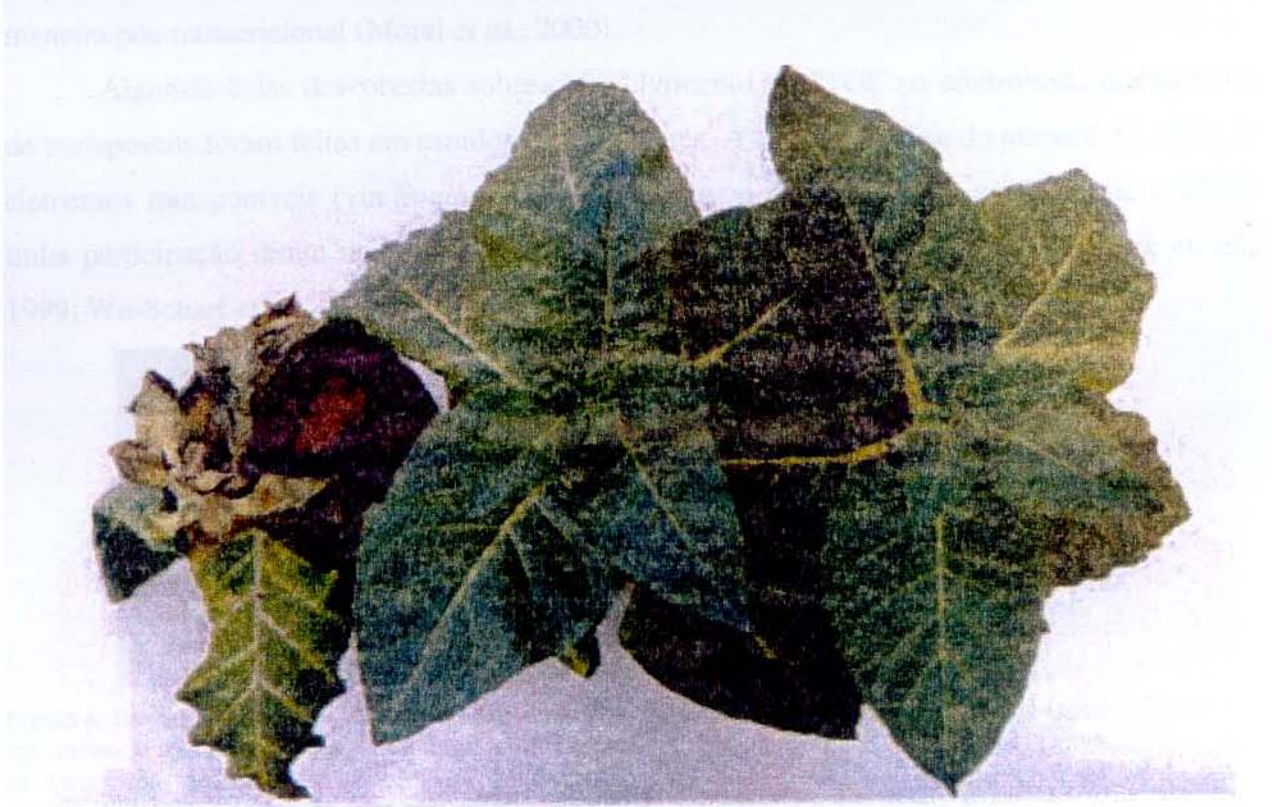


Figura 5. Supressão de PTGS pela proteína HC-Pro. Todas as plantas estão infectadas com PVX, porém a planta à esquerda (transgênica) expressa a proteína HC-Pro, permitindo a acumulação do vírus e conseqüente surgimento de sintomas severos. A planta ao centro é transgênica para outra proteína viral, e à direita é tipo-selvagem. (Adaptado de Shi *et. al.*, 1997).

1.3. Silenciando elementos transponíveis

Miura e colaboradores (2001) obtiveram um mutante em *A. thaliana* que apresentava um quadro geral de ausência de metilação. Tal mutante recebeu o nome de DDM1 (*Deficient in DNA Methylation*) e apresentava muitas anomalias de desenvolvimento. Experimentos visando identificar os fatores responsáveis por tais anomalias, conduziram a descoberta de que esse mutante apresentava elevada frequência de mobilização de transposons (Figura 6). Essa alta mobilidade de elementos transponíveis resultava da ausência de silenciamento gênico transcricional mediado por metilação (Miura *et. al.*, 2001). O fato do gene DDM1 fazer parte da via de PTGS evidenciava uma correlação desta via com o silenciamento dos transposons de uma maneira pós-transcricional (Morel *et al.*, 2000).

Algumas belas descobertas sobre o envolvimento de PTGS no controle da mobilização de transposons foram feitas em estudos com mutantes. A simples análise do número de cópia de elementos transponíveis (via *Southern blot*) demonstrou de forma clara e eficaz que o PTGS tinha participação direta na repressão desses elementos (Tabara *et. al.*, 1999; Ketting *et. al.*, 1999; Wu-Scharf *et. al.*, 2000).

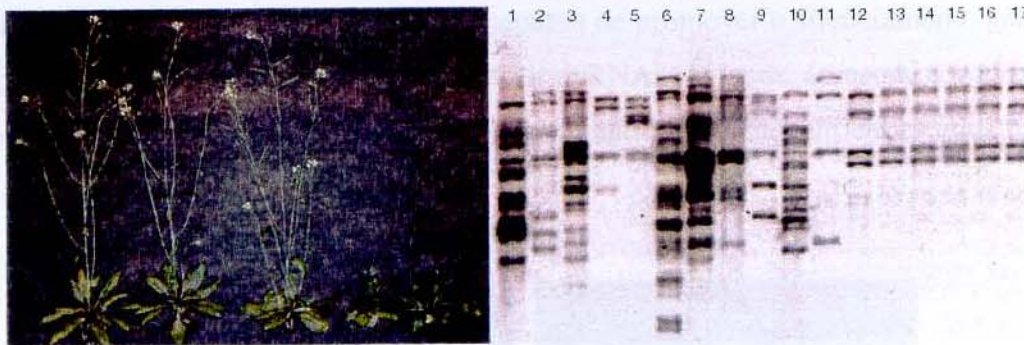


Figura 6. Esquerda: anomalias no desenvolvimento de plantas de *A. thaliana* mutadas no gene DDM1. À esquerda encontram-se três plantas selvagens e à direita três espécimes com mutações no gene DDM1. Direita: mobilização de transposons em mutantes para PTGS. Southern blot mostrando o elevado número de cópias do elemento transponível CAC1 em *A. thaliana* mutada no gene DDM1 (números 1 a 12) versus plantas selvagens (13 a 17; Adaptado de Miura *et. al.*, 2001).

Adicionalmente demonstrou-se que linhagens mutantes de *C. elegans* incapazes de co-suprimir transposons eram também incapazes de realizar silenciamento gênico pós-transcricional, evidenciando assim a ligação de ambos os fenômenos. (Ketting e Plasterk; 2000).

Provavelmente o PTGS regula a mobilização de (retro)transposons tendo como alvo dsRNAs formados durante o período de transposição.

A existência de PTGS em vertebrados era uma questão em aberto até o último milênio. Acreditava-se que estes animais tinham desenvolvido estratégias de combate a vírus mais sofisticadas que as observadas no PTGS, tais como defesa celular e humoral. Um sistema baseado em proteínas (anticorpos) e células parece ser bem mais eficiente que um sistema baseado em moléculas de RNA.

Por outro lado, considerando as diversas posições filogenéticas dos indivíduos que apresentam PTGS (fungos, plantas, protozoários, nematóides e insetos) parecia certo que a distribuição do mesmo na biosfera fosse extensa, alcançando até mesmo os vertebrados.

Alguns estudos começaram então a consolidar tal hipótese. Genes foram silenciados através de RNAi em embriões de *Mus musculus* (camundongo), *Danio rerio* (zebrafish) e *Xenopus laevis*. O desencadeamento de RNAi nestas espécies sugere que elas provavelmente apresentem os genes envolvidos na manutenção deste processo.

A existência deste sistema em *Homo sapiens* foi demonstrada num estudo recente (Figura 7), onde células humanas em cultura foram transfectadas com duplexes de RNA de 21 pares de base (Elbashir, 2001). Estes duplexes foram capazes de promover o silenciamento gênico sem a ativação da proteína kinase PKR (que, ao detectar dsRNAs extensos, apreende a tradução celular levando à morte) presente em mamíferos, representando uma vantagem em estudos usando este modelo.

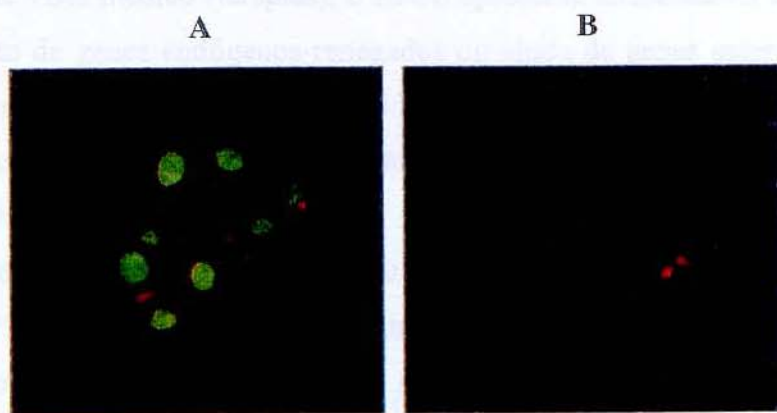


Figura 7. Silenciamento da proteína p53 em células MCF-7 (uma linhagem de câncer de mama humano). Imunofluorescência usando anticorpos contra p53 (verde) e actina como controle (vermelho). A: células não silenciadas; B: células silenciadas. (Adaptado de Brummelkamp *et. al.*, 2002).

O PTGS, interpretado atualmente como sistema de defesa a vírus, passou a ser utilizado recentemente como ferramenta de biologia molecular em três grandes áreas: *genética reversa*, *genômica funcional* e *terapia gênica*.

A genética reversa visa gerar mutantes, observar o fenótipo e associá-lo ao gene cuja função foi perdida. Em estudos de genética do desenvolvimento, a técnica de RNAi oferece fortes vantagens sobre técnicas de “knock-out” por ser mais rápida e barata além de poder ser aplicada seletivamente em diferentes estágios do desenvolvimento. Quando o gene é eliminado por “knock-out” o embrião geralmente morre antes que algo possa ser inferido sobre a função do mesmo. Caso o embrião sobreviva, anormalidades introduzidas no início do desenvolvimento podem mascarar funções secundárias sutis do gene em estágios posteriores. Além dos problemas básicos como o tempo e custo para produção de “knock-outs”.

Moléculas de RNA antisenso também têm sido utilizadas para silenciar genes, porém o tempo exigido para construção de organismos expressando o antisenso torna o procedimento não-prático.

De uma forma mais ampla, a genética reversa pode ser usada em escala genômica (genômica funcional) através de procedimentos simples e baratos como RNAi. Uma vez que os genomas de *C. elegans* e *Drosophila* (entre outros) já foram desvendados, a descoberta da função de seus genes empregando-se silenciamento gênico tem gerado um grande número de dados. Essa análise genômica seria impraticável se fosse baseada em uma plataforma de “knock-outs”.

Do ponto de vista médico (terapias), o RNAi apresenta interessantes aplicações práticas como silenciamento de genes endógenos renegados ou ainda de genes essenciais de parasitas, limitando assim sua infecção. Experimentos objetivando silenciar genes de *Drosophila* envolvidos no ciclo celular (*cyclin E* e *myc*) estão sendo realizados com o intuito de obter novos conhecimentos na biologia do câncer.

De 1998 até então, aproximadamente 500 artigos científicos envolvendo RNAi, quelling, co-supressão ou PTGS foram publicados. Contudo apenas uma pequena parte deles objetiva pesquisa básica (compreensão da via de PTGS), sendo a grande maioria voltada para estudos de natureza prática, utilizando RNAi em genética reversa.

O PTGS atua no citoplasma após a transcrição, porém existem vários outros sistemas de controle da expressão gênica descritos. Um segundo sistema bastante conhecido atua no núcleo, mais precisamente na regulação da transcrição, sendo assim chamado *Silenciamento Gênico Transcricional* (TGS, Transcriptional Gene Silencing). Ele basicamente controla a expressão gênica através da metilação das seqüências promotoras ou codificantes (Vaucheret e Fagard; 2001).

Um terceiro controle, também pós-transcricional, atua reconhecendo RNAs mensageiros que apresentam um STOP códon prematuro. Este sistema é conhecido como *Dcaimento Mediado por RNA sem-sentido* (NMD; Nonsense-Mediated RNA Decay), que atua degradando estas moléculas de mRNA, cujos produtos podem ser tóxicos para a célula (Gonzalez *et. al.*, 2001). Esse sistema realiza um patrulhamento a procura dessas moléculas que uma vez identificadas, são degradadas. Porém, diferentemente do PTGS, apenas a molécula identificada é destruída, e não todas as similares a ela de uma forma sistêmica.

Um quarto sistema é chamado *Mutação pontual induzida por repetição* (RIP, Repeat-Induced Point Mutation). Em *Neurospora*, esse mecanismo “varre” todo o genoma a procura de seqüências duplicadas, seguida pela extensiva introdução de mutações em tais seqüências. Ao contrário de PTGS, RIP é irreversível. Seqüências repetidas em *tandem* do rDNA são poupadas, ao passo que seqüências do 5S RNA e tRNA estão abaixo do limiar de detecção de RIP. Uma possível função para RIP seria a identificação e inativação de transposons que foram duplicados pelo menos uma vez (Selker, 1990; 1997).

Além desses, um novo sistema foi descoberto no fim de 2001, sendo denominado *Silenciamento meiótico por DNA não pareado* (MSUD, Meiotic Silencing by Unpaired DNA). Basicamente ele atua silenciando genes não pareados durante a meiose em *N. crassa*, numa tentativa de controlar transposons ou transgenes (Shiu *et. al.*, 2001).

Há vários outros sistemas de controle, tais como os traducionais e pós-traducionais, mostrando a necessidade de atuação de tais sistemas nos mais variados níveis dentro da célula.

Em 2000 identificou-se em *Drosophila* o gene Dicer (fatiador) o qual realiza a função de clivar o dsRNA em duplexes de 21-25 pares de base (pb) na via de PTGS (como descrito na Figura 3).

Demonstrou-se porém que Dicer realiza uma segunda função em *C. elegans*. Neste organismo existem dois genes que controlam o desenvolvimento, chamados de *let-7* e *lin-4*. Esses genes produzem pequenos transcritos precursores chamados de *pre-small temporal RNAs* (pre-stRNAs) em forma de *hairpin*, que são posteriormente clivados por Dicer em duplexes de 21-25 pb (*small temporal RNAs*; stRNAs; Figura 8). Estas moléculas são separados e o oligo antisense hibridiza-se ao mRNA-alvo impedindo a tradução (controle pós-transcricional).

Em 2001, três trabalhos paralelos demonstraram a existência de aproximadamente 100 genes codificando RNAs que, semelhantemente a *let-7* e *lin-4*, apresentam estruturas secundárias em forma de *hairpin*. Esses transcritos foram chamados de microRNAs (miRNAs), e sua função predita é atuar no controle pós-transcricional (Lau *et. al.*, 2001; Lagos-Quintana *et. al.*, 2001; Lee e Ambros, 2001). Demonstrou-se também a participação Dicer no processamento de alguns desses genes.

Um outro trabalho recente evidenciou que 3 genes necessários para a NMD (*smg-2*, *smg-5* e *smg-6*) em *C. elegans* também são necessários para RNAi (Domeier *et. al.*, 2000).

Em conjunto tais estudos demonstram que as várias vias de silenciamento estão interconectadas e que parecem ser mais amplas do que o imaginado inicialmente.

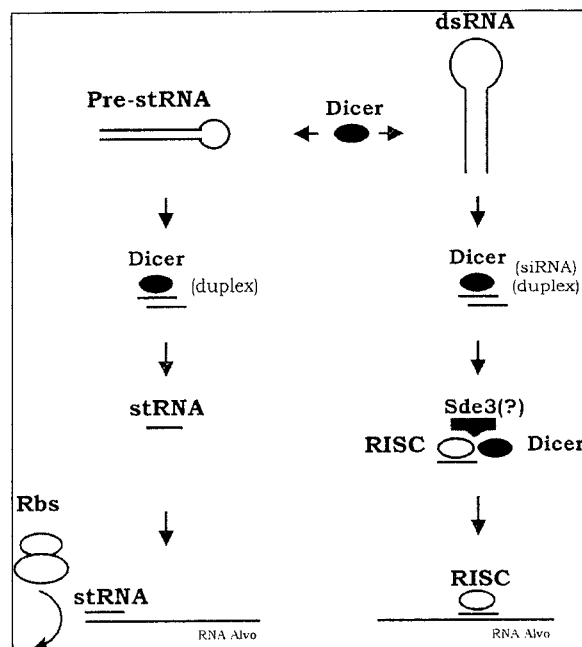


Figura 8. Conexão entre PTGS e silenciamento da tradução. As duas vias possuem em comum a enzima Dicer, a qual reconhece dsRNAs, clivando-os em duplexes de 21-23pb. O pré-stRNA é clivado em stRNA, que hibridiza-se ao mRNA alvo e impede o acesso do ribossomo (Rbs).

1.4. Um futuro nada silencioso

A possibilidade de o PTGS gerar efeitos indesejáveis na terapia gênica (*e.g.* co-supressão; Bestor, 2000) constitui um motivo para melhor compreendermos este mecanismo e gerar formas eficientes de evitá-lo. Além da utilização de RNAi em genômica funcional e genética reversa, o PTGS é também um fenômeno muito interessante para agricultura por ser um mecanismo natural de defesa a ataques virais, além de possivelmente estar envolvido na fisiologia celular e em processos de desenvolvimento vegetal (Kasschau e Carrington, 1998) que torna indispensável seu conhecimento pleno.

O avanço da genômica irá gerar uma miríade de dados, os quais poderão ser analisados de uma maneira rápida e prática através de RNAi (Fraser, 2000). A utilização de RNAi no tratamento de doenças genéticas também tem sido uma promessa. Entramos agora em uma nova fase, em que muitos ouvirão a “repercussão do silêncio”; com certeza, um Prêmio *Nobel*.

1.5. Resumo

O PTGS é hoje interpretado como um sistema de patrulhamento dos transcriptomas de um organismo. A identificação de dsRNAs é um indício de alguma anormalidade na célula (presença de vírus, transgenes ou mobilização de transposons) e os mesmos devem ser silenciados.

Esse mecanismo de controle da expressão gênica tem sido usado como ferramenta de genética reversa, genômica funcional, havendo um futuro promissor para terapias.

Capítulo 2

Estudo da atividade de supressão da proteína HC-Pro em plantas transgênicas de tabaco

RESUMO

O silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) é um mecanismo de defesa contra vírus que atua degradando RNAs relacionados a tais patógenos, e em alguns casos, de transgenes. Por outro lado, a proteína viral HC-Pro possui atividade de supressão de PTGS (PTGS-S), além de uma atividade de ligação a RNA.

Neste trabalho foram produzidas plantas transgênicas de tabaco expressando a proteína HC-Pro do vírus Y da batata (PVY), sendo estas defectivas em PTGS. Tais plantas apresentam inúmeras aplicações incluindo o uso como biorreatores e a amplificação *in vivo* de determinados vírus.

Paralelamente foi conduzido um segundo estudo empregando plantas transgênicas visando avaliar o envolvimento de domínios e motivos específicos da proteína HC-Pro na atividade de supressão de PTGS. Resultados sugerem que o aminoácido tirosina (Y), localizado junto ao motivo conservado YPCSC, envolvido diretamente com a atividade de ligação a RNA da proteína, também está implicado na atividade de supressão de PTGS. Evidencia-se assim que ambas funções estão interligadas.

ABSTRACT

Pos-transcriptional gene silencing (PTGS) is a viral defense mechanism, acting by degrading RNAs related to such pathogens, and in some instances, transgenes. On the other hand, viral protein HC-Pro presents PTGS suppression (PTGS-S) activity, besides an RNA binding nature.

In this present work, tobacco transgenic plants were constructed, expressing HC-Pro protein of potato virus Y (PVY), thus being PTGS-defectives. These plants present many applications, including their use as biorreactores and *in vivo* viral amplification.

Another parallel study using transgenic plants was conducted to evaluate the involvement of certain HC-Pro domains and motifs in PTGS suppression activity. Results suggest that aminoacid tyrosine (Y), located within conserved motif YPCSC, directly involved with RNA binding activity, is also implicated in PTGS suppression activity. Evidences indicate both functions are connected.

1. INTRODUÇÃO

A engenharia genética possibilitou a produção de plantas transgênicas expressando polipeptídeos antes não presentes em seu proteoma (*i.e.* hormônios humanos, anticorpos e proteínas virais) ou super-expressando aqueles de natureza endógena (*i.e.* enzimas de vias de biosíntese de compostos como açúcar e vitamina A) promovendo assim um enorme avanço biotecnológico. Porém a eventual ativação do mecanismo de co-supressão faz com que o fenótipo observado seja o oposto ao desejado: baixos ou nenhum nível de acumulação da proteína heteróloga (van der Krol *et. al.*, 1990). Esse processo endógeno ainda mal compreendido tem ameaçado a engenharia genética assim como a terapia gênica (Bestor, 2000).

A disponibilidade de proteínas supressoras, dentre elas a proteína HC-Pro (Helper component-proteinase) codificada pelos potyvírus, constitui uma importante ferramenta para evitar ou sobrepujar os efeitos indesejáveis advindos do PTGS. Estudos visando compreender o mecanismo de ação de tais proteínas são portanto essenciais.

A família *Potyviridae* é formada por vírus vegetais com genoma constituído por uma única molécula de RNA fita simples de polaridade positiva de aproximadamente 10 kb. Ela representa cerca de 36% dos vírus de planta atualmente descritos (Riechmann *et. al.*, 1992), causando perdas significativas em uma grande variedade de culturas.

A espécie-tipo desta família é o vírus Y da batata (PVY), o qual causa vários sintomas tais como: mosaico, encrespamento e necrose foliar. Ele é um vírus não envelopado, apresentando um capsídeo constituído por um só tipo de proteína. Sua replicação ocorre no citoplasma por intermédio de uma replicase de origem viral, havendo conseqüentemente apenas intermediários de RNA em seu ciclo.

O PVY codifica em seu genoma uma poliproteína que autoprocessada gera 9 subprodutos. Dentre eles está a proteína “fator assistente de transmissão” ou HC-Pro (Figura 1). Ela é uma proteína multifuncional (Maia *et. al.*, 1996a) envolvida em diferentes etapas do ciclo de vida dos potyvírus tais como movimento intercelular, processamento da poliproteína, transmissão planta a planta mediada por afídeos, ligação inespecífica a RNA (RNAb; Maia *et. al.*, 1996b) e supressão de PTGS (PTGS-S). A proteína usada neste estudo (Número de acesso no genbank U33454 – codificada por PVY) é composta de 456 aminoácidos (1368 pb) e que por ser derivada de uma poliproteína, não apresenta naturalmente o códon de iniciação AUG. A região central foi identificada como portadora da atividade de PTGS-S (Shi *et. al.*, 1997; Kasschau *et. al.*, 1997; Lu *et. al.*, 2001).

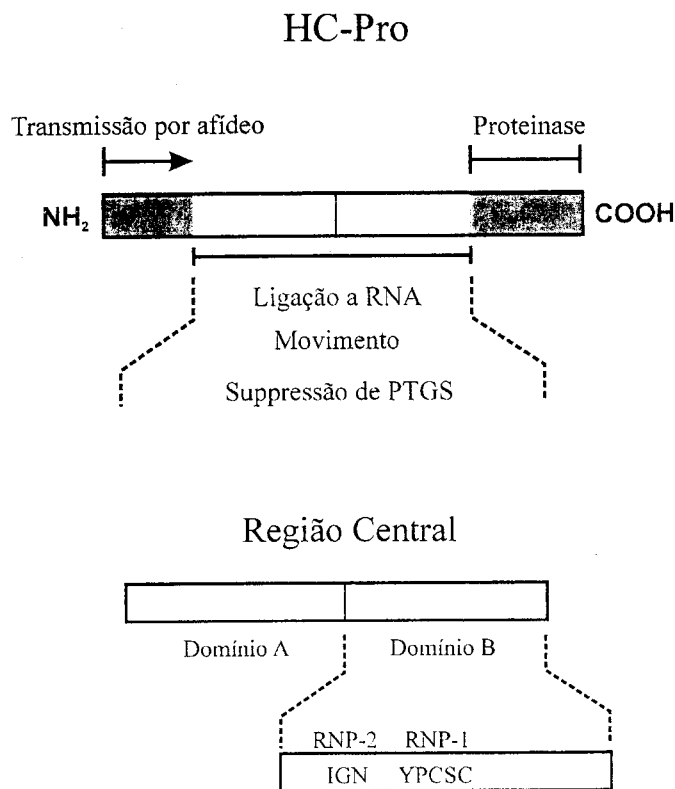


Figura 1. Representação esquemática da proteína HC-Pro e seus domínios funcionais. A porção central pode ser ainda subdividida em dois domínios de ligação a RNA distintos. Em detalhe o domínio B, no qual há dois padrões (RNP-1, RNP-2 e os aminoácidos que os constituem) diretamente envolvidos à atividade de ligação a RNA. **NH₂**: porção amino-terminal; **COOH**: porção carboxi-terminal.

Apesar de alguns trabalhos terem sido realizados na tentativa de elucidar o mecanismo molecular pelo qual HC-Pro realiza PTGS-S (Llave *et. al.*, 2000; Mallory *et. al.*, 2001), o mesmo é ainda desconhecido, permanecendo como uma das grandes questões sobre silenciamento gênico pós-transcricional.

Para compreender a maneira pela qual HC-Pro realiza esta atividade, torna-se necessária a identificação dos domínios e motivos específicos envolvidos. A possível associação destes domínios a outras funções já descritas para HC-Pro pode auxiliar a elucidar o mecanismo de PTGS-S.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste projeto são:

- 1) produzir de plantas de tabaco com supressão de PTGS, expressando a proteína HC-Pro de PVY
 - a) - confirmar a supressão de PTGS *in vivo*
 - b) - analisar possíveis alterações no desenvolvimento das plantas geradas
- 2) produzir de plantas de tabaco expressando, individualmente, cinco versões mutadas da proteína HC-Pro
- 3) relacionar tais mutações à atividade de supressão de PTGS pela HC-Pro

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PLANTAS E VÍRUS

A espécie de planta utilizada para expressar HC-Pro foi *Nicotiana tabacum*, linhagem SR1. Os vírus utilizados nos experimentos de supressão (PVX e PVY) foram gentilmente cedidos pelo Dr. José Alberto Caram de Souza Dias (Centro de Fitossanidade, Instituto Agronômico de Campinas).

3.2. CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO E CLONAGEM

Foram escolhidas seis versões de HC-Pro para produção de plantas transgênicas: uma tipo-selvagem, duas versões truncadas e três versões com mutações pontuais (Figura 2).

A versão tipo-selvagem, foi escolhida para ser usada como controle positivo. As versões truncadas apresentam deleções de domínios centrais (A ou B; Figura 1), associados a RNAb e PTGS-S. As versões com mutações pontuais apresentam substituições de aminoácidos em motivos altamente conservados e previamente associados à RNAb ou intensificação de replicação (Figura 1, Maia e Bernardi, 1996b; Kasschau *et. al.*, 1997).

O clone de cDNA da proteína HC-Pro assim como as versões contendo deleções em sua região central foram previamente construídas e encontravam-se clonados no plasmídeo pDMC200 (Figura 3). Para a expressão em plantas, os respectivos cDNAs foram subclonados no plasmídeo pBI2x35S (digerido *NcoI/SstI*) para fusão dos mesmos com o promotor 35S duplicado (2x35S) do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV; Figura 3). Logo em seguida, após digestão com *HindIII* (parcial)/*SstI*, os cassetes foram inseridos em pBI121 para posterior transformação. Esse plasmídeo possui um marcador (gene *nptII*) que confere resistência a kanamicina. Os plasmídeos contendo as diferentes versões da proteína HC-Pro foram então introduzidos em *Agrobacterium tumefaciens* (LBA 4404) para posterior transformação dos discos foliares de tabaco.

Os mutantes pontuais da proteína HC-Pro, inicialmente clonados em pUC19, foram subclonados em pT7 digerido com as enzimas *EcoRI/XbaI* (Figura 4). Após digestão com *NcoI/XbaI* e purificação em gel, os insertos foram então transferidos para pDMC200. Em seguida foram subclonados em pBI2x35S (digerido *NcoI/SstI*) para fusão dos mesmos ao promotor 2x35S, e posteriormente inseridos em pBI121 (digestão *HindIII/SstI*). Os plasmídeos resultantes foram inseridos em *A. tumefaciens* para posterior transformação dos discos foliares de tabaco.

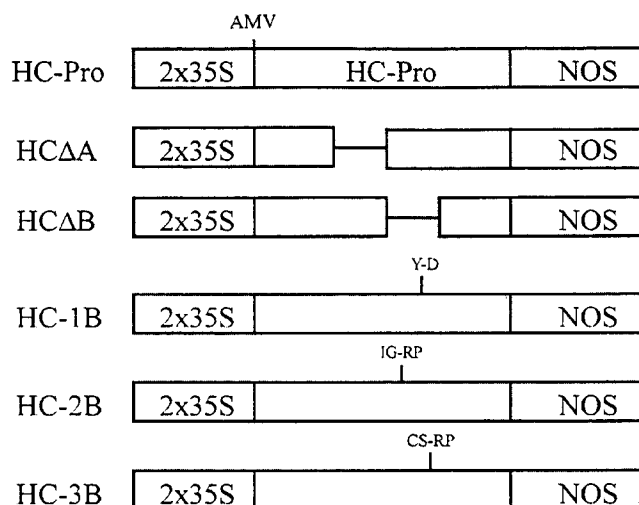


Figura 2. Representação esquemática (fora de escala) das versões da proteína HC-Pro usadas na transformação de tabaco. A construção básica é constituída por um duplo promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (2x35S de CaMV); um “enhancer” de tradução advindo do vírus do mosaico da alfafa (AMV); região codante da proteína HC-Pro (ou mutantes) com códon de iniciação inserido e o terminador de Nopalina sintetase (NOS). **HC-Pro**) HC-Pro tipo-selvagem; **HCΔA**) Versão com deleção no domínio A (aa 81-233); **HCΔB**) Versão com deleção no domínio B (aa 233-367); **HC-1B**) Versão com mutação pontual em Y²⁸⁸ para D; **HC-2B**) Versão com mutações pontuais em I²⁴⁸G²⁴⁹ para RP e **HC-3B**) Versão com mutações pontuais em C²⁹⁰S²⁹¹ para RP.

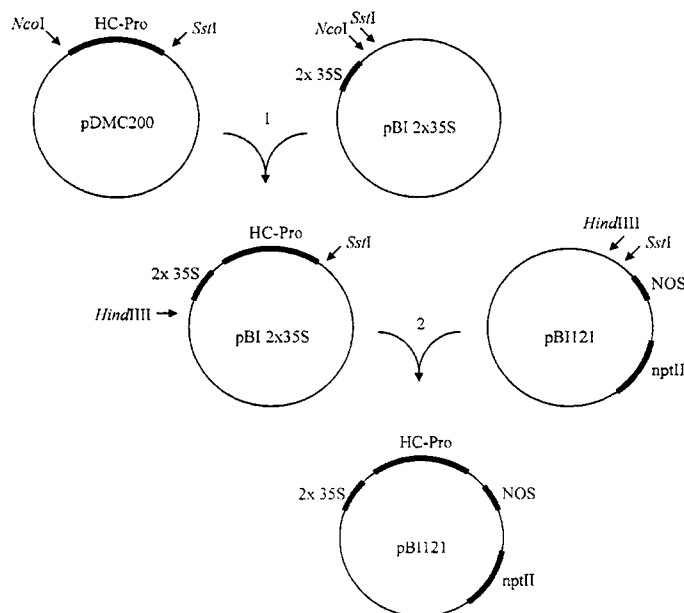


Figura 3. Estratégia para construção do cassete de expressão de HC-Pro (HC-Pro tipo-selvagem, HCΔA e HCΔB) em plantas. Duas clonagens foram realizadas, até a obtenção da construção final. As setas lineares indicam os sítios das endonucleases envolvidas nas clonagens. NOS: terminador da nopalina sintetase; nptII: gene que gera resistência a kanamicina.

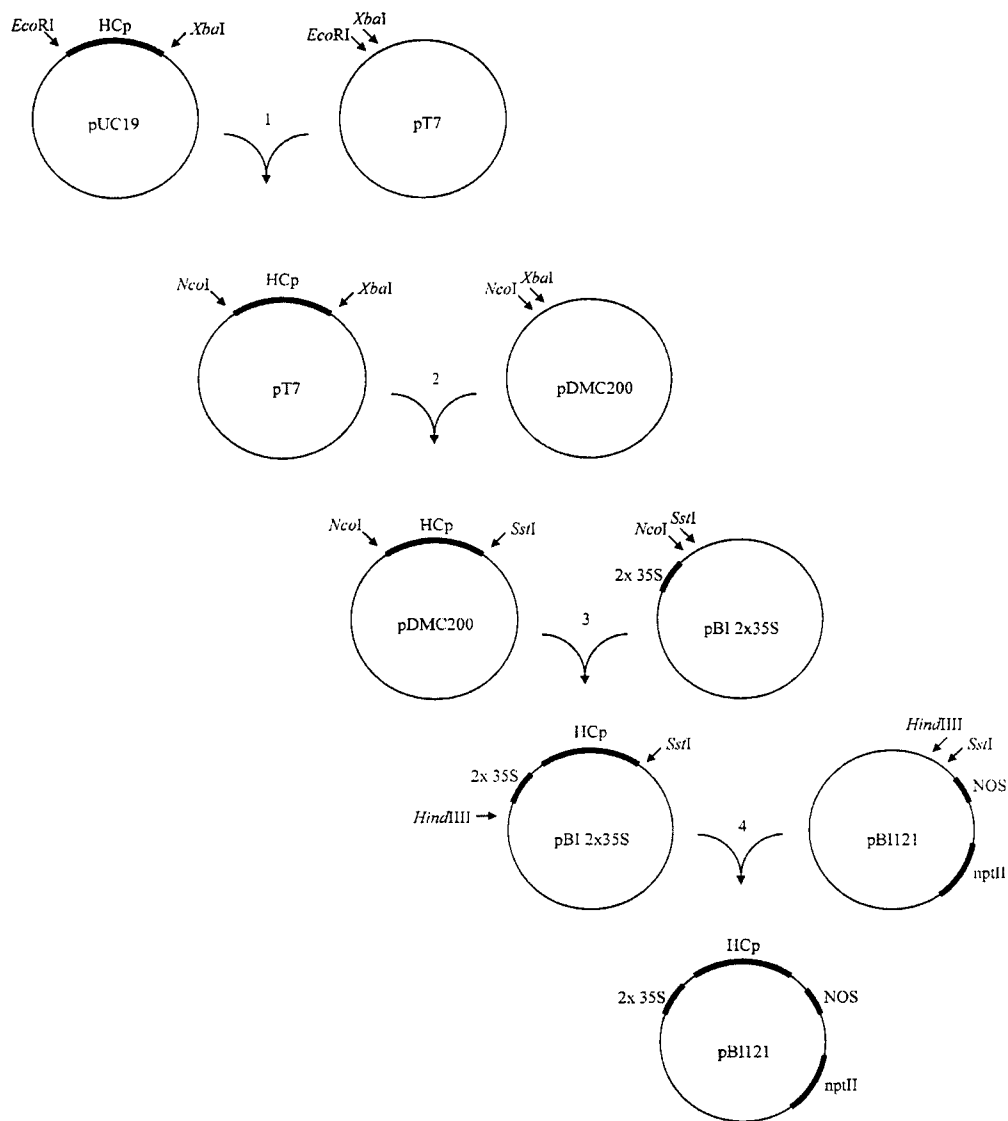


Figura 4. Estratégia geral para construção dos três cassetes de expressão de HC-Pro contendo mutações pontuais (HCp – correspondente a HC-1B, HC-2B e HC-3B) em plantas. Quatro clonagens foram realizadas, até a obtenção da construção final. As setas lineares indicam os sítios das endonucleases envolvidas nas clonagens. NOS: terminador da nopalina sintetase; nptII: gene que gera resistência à kanamicina.

3.3. TRANSFORMAÇÃO DE DISCOS FOLIARES E REGENERAÇÃO

Todo o processo de transformação de discos foliares de tabaco, rotina em nosso laboratório, foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Discos foliares foram cortados de folhas jovens de tabaco (*Nicotiana tabacum*, linhagem SR1, germinadas e crescidas *in vitro*) e depositados em placas de Petri estéreis contendo 20 ml de meio MS* (Murashige and Skoog Salt Mixture – Gibco BRL). Os discos foram então transferidos para placas contendo agrobactéria em suspensão no meio MS onde foram deixados por 1 minuto.

Em seguida, os discos foram repassados para placas contendo papel filtro estéril para absorver o excesso de solução com agrobactéria e transferidos para placas definitivas contendo 20 ml de meio MS adicionado de 6-Benzil-Aminopurina (BAP; 1,0 mg/l) e Ácido Indolacético (IAA; 0,1 mg/l), onde permaneceram incubados no escuro durante 2 dias a 25°C.

Após esse período, os discos foram transferidos para tubos Falcon™ de 50 ml contendo meio MS adicionado de Cefotaxima (500 µg/ml) e Kanamicina (50 µg/ml). Eles permaneceram sob leve agitação por 5 minutos para deixar o material livre de agrobactérias. Em seguida foram transferidos para placas de Petri com papel filtro estéril para eliminar o excesso de meio.

Os discos foram então repassados para placas contendo meio MS sólido adicionado de BAP (1mg/l), IAA (0,1 mg/l), Kanamicina (50 mg/l) e Cefotaxima (500 mg/l) e incubados por 1 semana no escuro.

Em seguida eles foram transferidos para placas de Petri contendo o meio acima descrito e expostos à luz, onde permaneceram até obtenção de calos. Plântulas originadas dos calos foram transferidas para meio de enraizamento MS (sem a presença de reguladores de crescimento).

* Meio MS: Sais MS (4,3g/L); Sacarose (30g/L); vitaminas MS (1000X) e ágar (8g/L). pH ajustado para 5,7 com KOH.

3.4. SELEÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS

Plântulas (R_0) foram regeneradas a partir de discos foliares. Foram obtidas plântulas R_1 e R_2 a partir de sementes submetidas a ciclos de seleção em kanamicina, seguidos de confirmação da inserção do transgene por PCR (Polimerase Chain Reaction).

As sementes foram esterilizadas e plaqueadas em meio MS com kanamicina (100 mg/L). A esterilização foi feita em câmara de fluxo laminar, onde as sementes ficaram imersas em etanol 70% por 1 minuto, lavadas duas vezes com água deionizada autoclavada e imersas por 2 vezes em

hipoclorito de sódio 1% durante 20 minutos. Em seguida foram lavadas 5 vezes em água deionizada autoclavada e plaqueadas em meio MS [4,3 g/L de sais MS (GibcoBRL); 1 ml de Murashige and Skoog Modified Vitamin Powder (1000X; Sigma); 20g de sacarose; 3g de agente gelificante (Phytigel; Sigma); pH 5,8]. As plantas resistentes foram transportadas após 4 semanas para uma estufa.

3.5. ANÁLISES MOLECULARES DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS

Para verificar a integração do transgenes no genoma vegetal, DNA genômico das plantas regeneradas foi extraído de acordo com protocolo descrito por Konieczny e Ausubel (1993) e posteriormente submetido a PCR.

A presença do transgene nas plantas transformadas com a versão selvagem da HC-Pro bem como com as versões contendo as respectivas mutações pontuais foi analisada empregando-se os oligonucleotídeos 35S (5'-ACAATCCCCTATCCTTCG-3') e P3 (5'-GCTCTAGATTAGTTCTTTGCATCC-3'). O oligonucleotídeo P3 é complementar aos nucleotídeos 1071- 1094 do clone de cDNA da HC-Pro ao passo que o oligonucleotídeo 35S corresponde à região 3' terminal do promotor 35S de CaMV (Figura 5). Neste caso, um fragmento de aproximadamente 1100 pb deve ser amplificado. Os oligonucleotídeos 35S e P3 também foram empregados na análise das plantas transformadas com a versão HCΔA resultando num produto de amplificação de 630 pb. As plantas contendo a versão HCΔB foram analisadas empregando-se os oligonucleotídeos 35S e P2 (5'-GCTCTAGATTATCCCTTTGATGG-3'; complementar aos nucleotídeos 679-691 do clone de cDNA da proteína HC-Pro), gerando um fragmento de aproximadamente 690 pb. O programa de PCR incluiu um ciclo de desnaturação a 95°C por 5 min e 35 ciclos de amplificação (95°C por 30 s, 54°C por 30 s, 72°C por 90 s) seguido de um ciclo final a 72°C por 5 min.

A presença dos transcritos correspondentes aos diferentes transgenes foi evidenciada via RT-PCR. A extração de RNA total foi realizada utilizando-se o reagente TRIzol® (GibcoBRL) conforme protocolo do fabricante.

A reação de transcrição reversa (RT) foi conduzida empregando-se o kit “SuperScript™II RNase H⁻ Reverse Transcriptase” (Gibco) segundo as instruções do fornecedor. O oligonucleotídeo utilizado nesta reação foi o WT-R (5'-CTAGATTAACCAACTC-3'), o qual é complementar à região 3' terminal do transcrito da HC-Pro (1361-1368nt; Figura 5). Na reação de PCR subsequente foi utilizado o oligonucleotídeo WT-R em combinação com os oligonucleotídeos: Del-5 (5'-CCATCGATATGGTAACGTTAGAG-3'; complementar aos nucleotídeos 290-303 do clone de cDNA da HC-Pro) para todas as versões exceto HCΔA. Os produtos gerados foram de 1100pb para as

versões HC-1B, HC2-B, HC-3B e 680pb para versão HCΔB. Para a construção HCΔA foi usado o oligo HC-ClaI (5'-CCATCGATATGTCTGAATGCAGAC-3'; complementar aos nucleotídeos 1-12) junto ao oligo WT-R gerando um fragmento de aproximadamente 910pb. O programa de PCR incluiu um ciclo de desnaturação a 95°C por 5 min seguido de 35 ciclos de amplificação (95°C por 30 s, 42°C por 30 s, 72°C por 90 s) e um ciclo final a 72°C por 5 min.

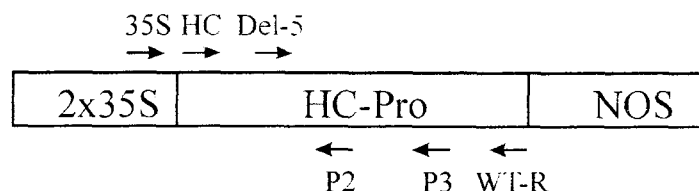


Figura 5. Posição relativa dos oligos utilizados para análises de PCR e RT-PCR. Acima da construção básica de HC-Pro se encontram os oligos senso; abaixo, os oligos antisenso. Em vermelho aqueles usados para PCR, em azul os utilizados na RT-PCR. HC: HC-ClaI

A identificação das plantas transgênicas com maiores níveis de expressão para cada versão de HC-Pro foi feita através de *Northern blot*. A extração de RNA total de plantas transformadas foi realizada utilizando-se o reagente TRIzol® (Gibco) conforme protocolo do fabricante.

Para realização do *Northern*, foram carregados aproximadamente 5µg de RNA total em gel de agarose 1%, tampão MOPS denaturante (5% formaldeído). A transferência do RNA do gel para membrana de Nylon (Hybond™-N⁺ Amersham Pharmacia Biotech) foi realizada por 8 horas, de acordo com Maniatis, utilizando SSC 10X (salt sodium citrate) como tampão de transferência. Todos os outros experimentos (*western*, análises morfo-fisiológicas e ensaios de supressão foram feitos com as plantas com os maiores níveis de expressão).

A sonda empregada neste experimento foi gerada realizando-se a digestão do clone de cDNA da HC-Pro (originalmente clonado em pMal) com as enzimas de restrição *SalI* e *EcoRI*, liberando assim um fragmento de 300 pb. Após purificação em gel, o fragmento foi marcado radioativamente utilizando-se o kit de marcação “Megaprime™ DNA labelling systems” (Amersham). A sonda marcada foi então purificada em coluna contendo Sephadex G-50 e sua atividade específica determinada. A seguir realizou-se os procedimentos de pré-hibridização e hibridização conforme descrito.

A presença da proteína HC-Pro foi observada em experimentos de *Western blot* de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Resumidamente, o extrato total de proteína é fracionado em eletroforese, transferido para um suporte sólido (membrana de nitrocelulose) e hibridizado com anticorpos

primários. A hibridização com um segundo anticorpo conjugado a uma enzima, contra os anticorpos primários, permite a identificação da proteína alvo.

Foi utilizada uma solução de anticorpos policlonais (diluição 1/500) gentilmente cedidos por Thomas Pirone (Department of Plant Pathology, University of Kentucky, USA). Estes anticorpos foram produzidos em coelho e dirigidos contra HC-Pro. Extratos protéicos provenientes de plantas infectadas com PVY foram usados como controle positivo e extratos de plantas de tabaco não infectadas como controle negativo.

3.6. ANÁLISES MORFO-FISIOLOGICAS

Estudos detectaram a formação de tumores (por razões não claras) na região de transição caule-raiz em plantas de tabaco expressando HC-Pro de *tobacco etch virus* (TEV) ou super-expressando a proteína endógena rgs-CaM (também supressora de PTGS; Anandalakshmi *et al.*, 2000). Visando uma análise comparativa, avaliamos segunda geração das plantas transgênicas quanto a alterações morfológicas e de desenvolvimento.

3.7. ENSAIOS DE SUPRESSÃO USANDO PVX COMO REPÓRTER

O ensaio de supressão foi baseado nos experimentos de Vance *et. al.* (1995) inoculando-se mecanicamente (usando carburundum) PVX na 2ª folha inferior de plantas transgênicas de tabaco com aproximadamente 6 semanas de idade. Todas as plantas se apresentavam na mesma fase de desenvolvimento. Para avaliar a acumulação de PVX, um *Northern blot* foi realizado utilizando 5µg de RNA total extraído da 2ª folha acima da folha inoculada 10 dias pós-inoculação (dpi). Como sonda foi usado um fragmento de 563 pb obtido através da digestão com *XhoI/StuI* da porção 3' do genoma de PVX (clonado no plasmídeo pP2C2S; Chapman *et. al.*, 1992) e uniformemente marcado com ³²P.

3.8. ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS

As seqüências protéicas de HC-Pro de TEV (Número de acesso NP-062908), PVY (Número de acesso no genbank AAC54827) e rgs-CaM (Número de acesso no genbank AAK11255) foram alinhadas no programa “Clustal X”. A tabela de similaridade e identidade entre as mesmas foi realizada no programa “Boxshade”.

4. RESULTADOS

4.1. SELEÇÃO DE PLÂNTULAS TRANSGÊNICAS

Plântulas R_1 apresentaram segregação média de 3:1 (transgênicas : não transgênicas). As plantas resistentes foram auto-fecundadas gerando a R_2 , cuja seleção em kanamicina apresentou na maioria dos casos quase 100% de plântulas resistentes (Figura 6).

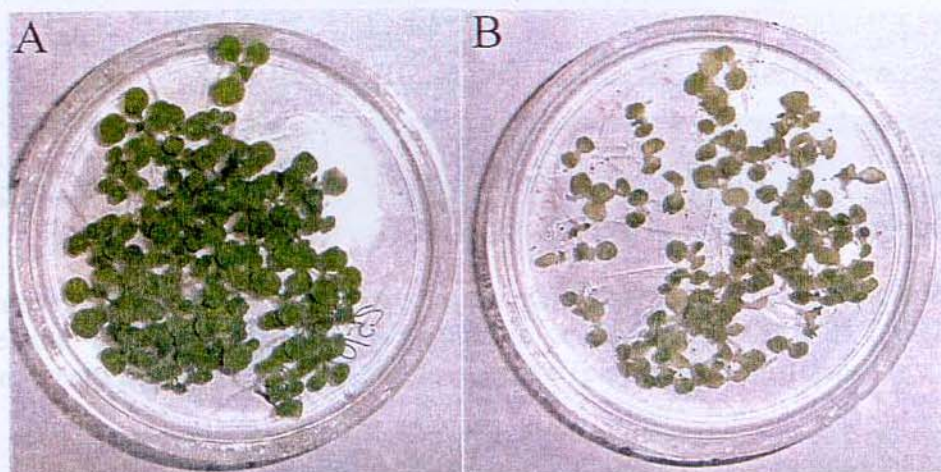


Figura 6. Seleção de plântulas R_2 em meio MS contendo kanamicina: praticamente todas as plantas são resistentes ao antibiótico. A) Plântulas transformadas com a versão HC-Pro tipo-selvagem. B) Controle negativo (*i.e.* plântulas não transformadas).

4.2. ANÁLISES MOLECULARES

O ensaio de PCR empregando DNA genômico extraído das plantas da segunda geração (R2) confirmou a presença dos transgenes correspondentes (Figura 7). Os fragmentos amplificados apresentam o tamanho esperado (HCΔA, 630 pb; HCΔB, 690 pb e aproximadamente 1100 pb as outras versões).

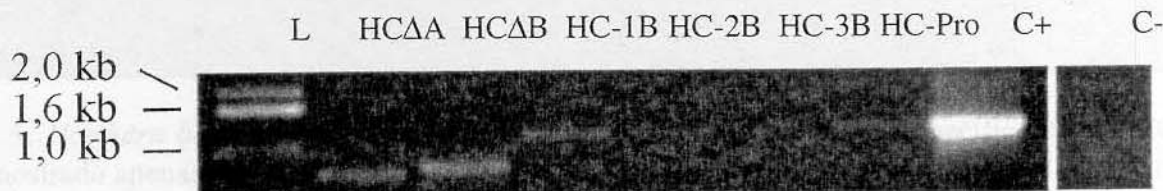


Figura 7. Confirmação da presença do transgene em plantas de segunda geração via PCR. L: marcador de peso molecular 1Kb (Gibco BRL); C+: Controle positivo (*i.e.* cDNA da proteína HC-Pro tipo-selvagem clonado em plasmídeo); C-: Controle negativo (planta não transformada).

A fim de constatar a presença do transcrito correspondente aos diferentes transgenes, um experimento de RT-PCR foi realizado empregando-se RNA total extraído das plantas transgênicas em estudo e oligonucleotídeos específicos. A maioria das plantas analisadas apresentou atividade transcricional sendo observado um produto de amplificação com tamanho esperado (HCΔA, 910pb; HCΔB, 680pb e aproximadamente 1100 pb as outras versões; Figura 8).

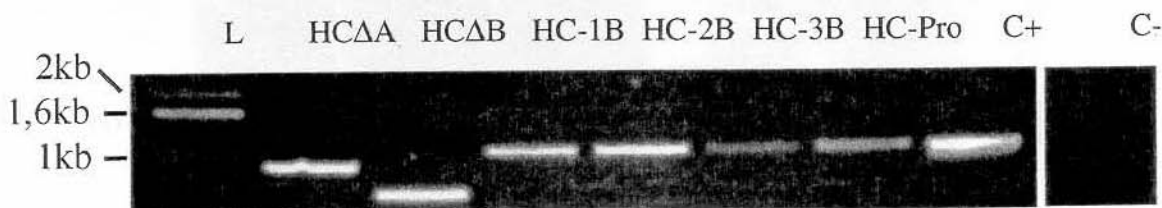


Figura 8. Análise por RT-PCR das plantas transgênicas de HC-Pro positivas em PCR. Todos os produtos de amplificação observados tem tamanho esperado. L: marcador de peso molecular de 1 Kb (Gibco BRL); C+: controle positivo (*i.e.* cDNA da proteína HC-Pro tipo-selvagem clonada em plasmídeo). C-: planta não transformada.

A realização de *Northern blots* (Figura 9) permitiu a identificação das linhagens de maiores níveis de expressão. Testamos de três a sete linhagens por versão de HC-Pro, escolhendo aquelas de maior expressão para continuar os procedimentos.

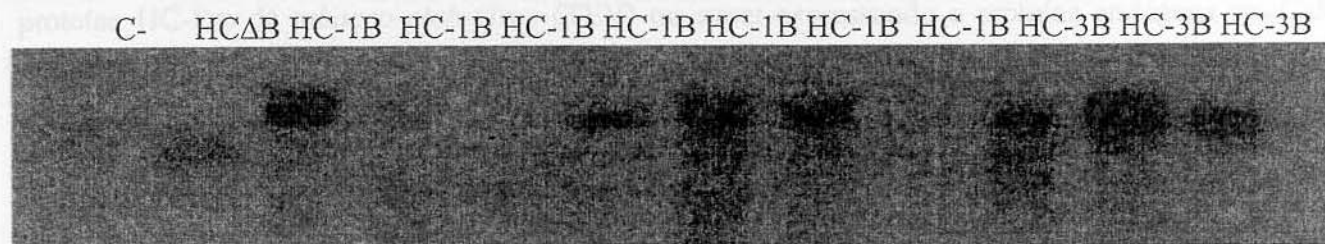


Figura 9. *Northern blot* das plantas PCR positivas empregando-se sonda específica contra HC-Pro. Aqui mostrado apenas *Northern* de algumas das plantas transformadas para HCΔB, HC-1B e HC-3B. Controle negativo (C-): planta de tabaco não transformada.

A presença da proteína HC-Pro e das demais versões em estudo foi investigada em um experimento de *Western blot* utilizando anticorpos policlonais dirigidos contra a proteína HC-Pro purificada de plantas infectadas. A imunodeteção da proteína HC-Pro (tipo-selvagem) e demais versões em extratos protéicos das diferentes plantas transgênicas está representada na Figura 10. Apenas as versões truncadas (HCΔA e HCΔB) não foram identificadas.

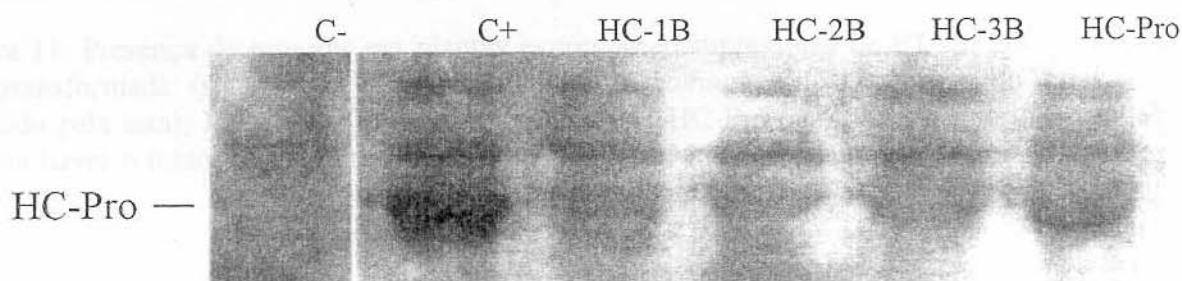


Figura 10. Imunodeteção da proteína HC-Pro das plantas transgênicas de tabaco. C-: Controle negativo (*i.e.* planta não transformada e não infectadas); C+: controle positivo (*i.e.* planta não transformada infectada com PVY). O controle negativo apresenta uma banda inespecífica que está presente em todas as plantas. Há uma segunda banda inespecífica presente apenas nas plantas transgênicas. A posição da proteína HC-Pro está indicada.

4.3. ANÁLISES MORFOLÓGICAS E DE DESENVOLVIMENTO

Nenhuma alteração morfológica clara foi observada nas plantas transgênicas, e seu tempo de desenvolvimento foi semelhante à de plantas não transformadas. Não foram detectados tumores na região de transição raiz-caule (Figura 11), normalmente identificados em plantas expressando a proteína HC-Pro de *tobacco etch virus* (TEV) ou super-expressando a proteína endógena rgs-CaM (também supressora de PTGS; Anandalakshmi *et al.*, 2000).

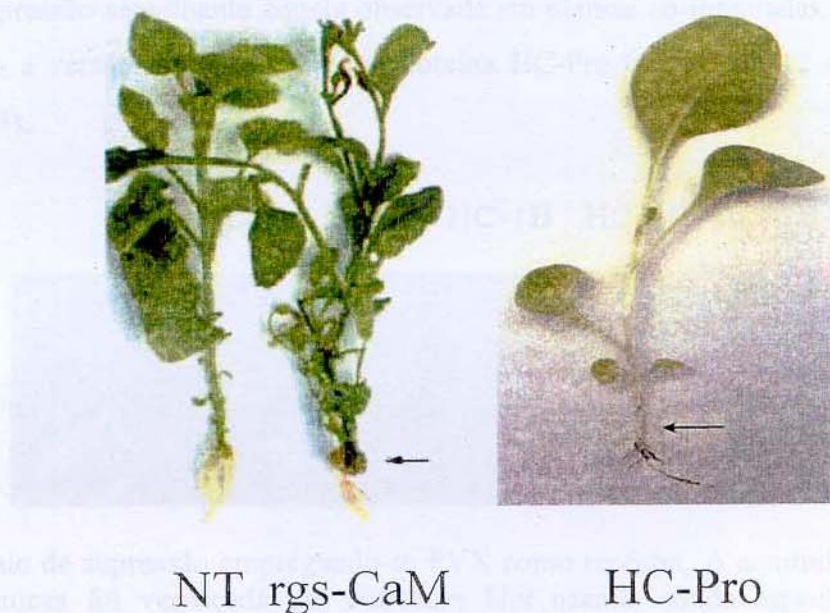


Figura 11. Presença de tumores em plantas expressando supressores de PTGS. **NT**: *N. benthamiana* não transformada (sem tumor); **rgs-CaM**: *N. benthamiana* super-expressando rgs-CaM (tumor indicado pela seta); **HC-Pro**: *N. tabacum* expressando HC-Pro (sem tumor; seta indica o local onde deveria haver o tumor) (A foto das plantas NT e rgs-CaM foram adaptadas de Anandalakshmi *et. al.*, 2000).

4.4. ENSAIO DE SUPRESSÃO EMPREGANDO PVX COMO REPÓRTER

O ensaio de supressão usando PVX como repórter demonstrou que as versões de HC-Pro contendo mutação pontual no aminoácido (aa) tirosina (Y) do padrão YPCSC (HC-1B), mutação pontual nos aa IG do motivo IGN (HC-2B) ou deleção total do domínio B (HCΔB; Figura 12), tem a sua capacidade de supressão de PTGS debilitada (resultando em baixa acumulação de PVX). Já as versões contendo deleção no domínio A ou mutação nos aa CS do padrão YPCSC apresentam atividade de supressão semelhante àquela observada em plantas co-infectadas com PVX e PVY (C+) ou expressando a versão tipo-selvagem da proteína HC-Pro (na Figura 12 comparar HC-Pro com HCΔA e HC-3B).

C+ HCΔA HCΔB HC-1B HC-2B HC-3B HC-Pro

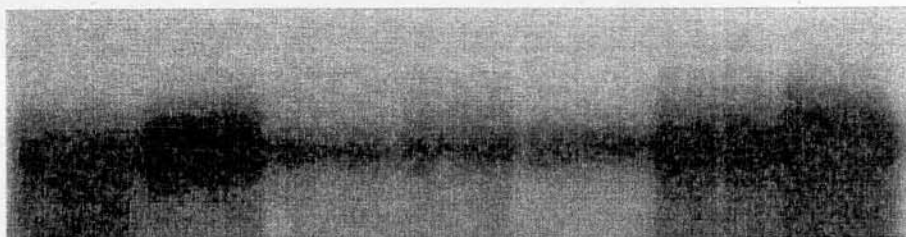


Figura 12. Ensaio de supressão empregando-se PVX como repórter. A acumulação de RNA viral nas plantas transgênicas foi verificada por *Northern blot* usando sonda específica. C+ : Planta co-infectada PVX-PVY. Controle Negativo de supressão de PTGS: planta HC-2B, que conhecidamente não suprime PTGS (Kasschau *et. al.*, 1997)

As plantas transgênicas inoculadas com PVX apresentaram, em alguns casos, sintomas de mosaico intenso cerca de 10 dpi semelhantes àqueles encontrados nas plantas co-infectadas com PVY (Figura 13).

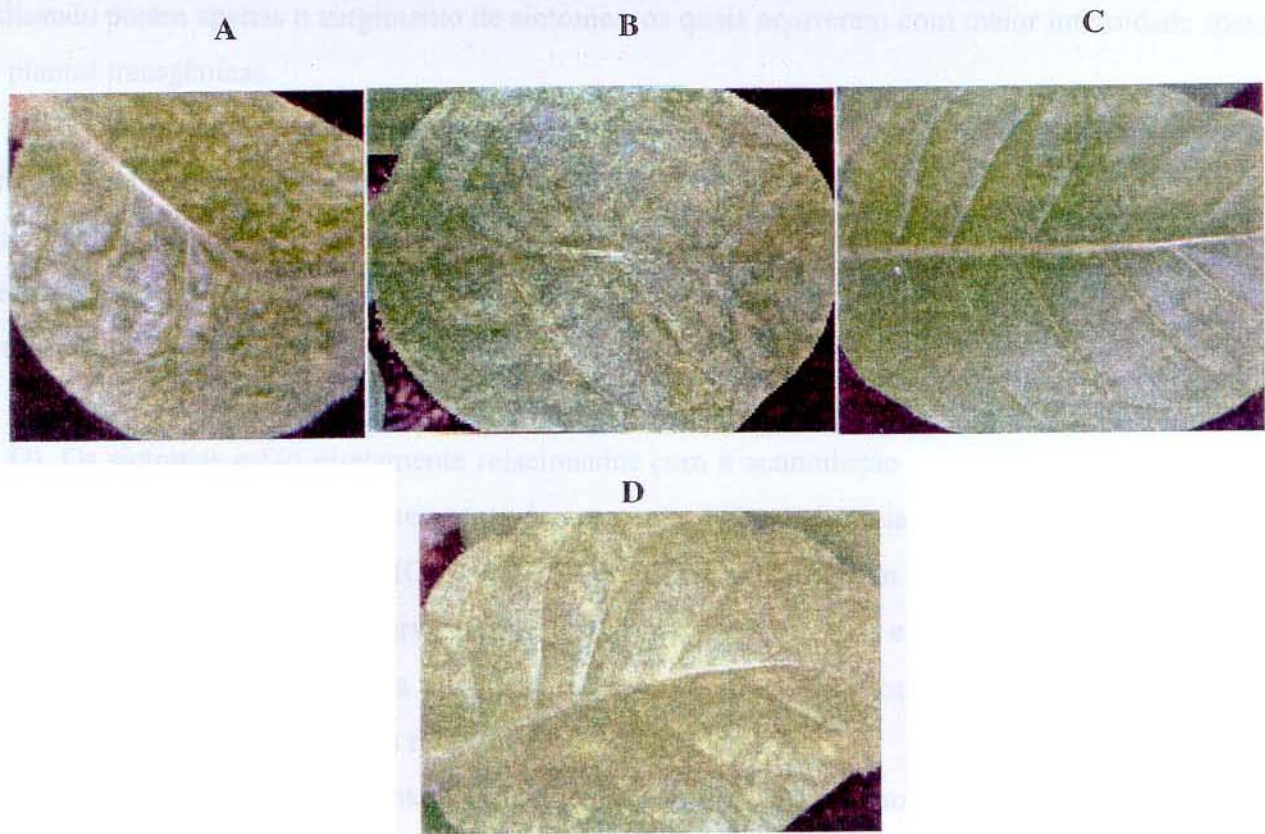


Figura 13. Sintomas causados por PVX. **A:** mosaico intenso em tabaco não transformado co-infectado por PVX/PVY (21 dpi); **B:** mosaico intenso em tabaco expressando a proteína HC-Pro tipo-selvagem (10 dpi); **C:** mosaico suave em tabaco não transformado (21 dpi) e **D:** mosaico de nível intermediário, observado nas plantas de tabaco transformadas com as versões de HC-Pro contendo mutações pontuais. Nas plantas transformadas com as demais versões estudadas, os sintomas foram similares ao observado em **D**.

5. DISCUSSÃO

5.1. PRODUÇÃO DE PLANTAS DE TABACO EXPRESSANDO A PROTEÍNA HC-PRO DE PVY

Os ensaios demonstraram a atividade de supressão de HC-Pro *in vivo*. Plantas expressando esta proteína apresentaram acumulação de PVX em níveis similares àqueles observados durante co-infecções PVX/PVY (Figura 12; comparar HC-Pro e C+). Dois ensaios adicionais foram feitos, analisando porém apenas o surgimento de sintomas, os quais ocorreram com maior intensidade apenas em plantas transgênicas.

É interessante notar que as plantas transgênicas par HC-Pro (tipo-selvagem) apresentaram sintomas de mosaico similares àqueles observados em plantas co-infectadas, porém em um tempo muito menor (Figura 13; 10dpi em plantas transgênicas HC-Pro *versus* 21dpi em plantas co-infectadas). Tal fato deve-se provavelmente a já existência de um “pool” de HC-Pro nas plantas durante a inoculação de PVX.

Todas as outras versões de HC-Pro apresentaram um mosaico de nível intermediário (Figura 13, D). Os sintomas estão diretamente relacionados com a acumulação do vírus, porém não única e exclusivamente. Assim, vemos que apesar de apresentar baixas acumulações de PVX (Figura 12), as plantas expressando as versões HCΔB, HC-1B e HC-2B apresentaram sintomas relativamente mais fortes se comparados com os observados em plantas não transformadas e infectadas com PVX apenas. Esse fato pode ser devido à uma atividade residual de supressão exercida por padrões ainda não definidos em HC-Pro ou domínios relacionados à patogenicidade.

Esses experimentos demonstram claramente a atividade supressora de HC-Pro nestas plantas, tornando possível a realização de várias propostas interessantes. O interesse direto desta linhagem é a sua utilização como biorreatora. A expressão de proteínas heterólogas em plantas é de grande interesse devido ao baixo custo de produção, ao fato de ser um eucarioto e de proceder processamento pós-traducional semelhante ao sistema animal. Porém em determinadas situações ocorre baixa acumulação do polipeptídeo em questão. Isto se deve, em alguns casos, ao fenômeno de co-supressão e a expressão de proteínas sem a indesejável ocorrência deste processo é de grande interesse. Laboratórios como o nosso, por exemplo, que trabalham com produção de hormônios, anticorpos, peptídeos antimicrobianos e fármacos em plantas, vêem essa linhagem como altamente promissora. A susceptibilidade da mesma a vírus pode entretanto ser um inconveniente.

Uma vez que PTGS e *quelling* são fenômenos relacionados, fungos expressando HC-Pro seriam de grande interesse para produção de proteínas heterólogas (agindo como linhagens biorreatoras). Apesar de sua atividade ter sido demonstrada apenas em plantas, é possível HC-Pro seja

capaz de atuar em fungos, baseando-se numa recente descoberta (Hongwei *et. al.*, 2002). Neste estudo os pesquisadores demonstraram que a proteína B2, supressora em sistemas animais, mantém sua atividade em sistemas vegetais.

O desenvolvimento de estratégias de combate a vírus vegetais economicamente importantes exige que os mesmos sejam bem estudados e caracterizados. Porém a obtenção de grandes quantidades de massa viral é um obstáculo para estes estudos. Uma das razões para essa dificuldade é a ação do PTGS, que impede a acumulação do patógeno. É provável que a ausência do sistema de defesa anti-viral nas plantas aqui desenvolvidas permita elevada replicação e acumulação destes patógenos (Savenkov e Valkonen, 2001). Essa *amplificação in vivo* representa uma maneira simples, barata e rápida de obtenção de grandes quantidades de massa viral para pesquisas. Neste caso, seria possível a amplificação *in vivo* de 228 de espécies virais (Tabela 1) em *N. tabacum*, dentre as quais muitas correspondem a espécies de importância econômica. Este número é superestimado uma vez que alguns destes vírus já codificam supressores de PTGS (como o PVY).

Tabela 1. Vírus que infectam *N. tabacum*. (Informações obtidas no site: [http://image.fs.uidaho.edu/vide/famly124.htm#Nicotiana tabacum](http://image.fs.uidaho.edu/vide/famly124.htm#Nicotiana%20tabacum))

Abutilon mosaic bigeminivirus	Grapevine chrome mosaic nepovirus	Potato T trichovirus
Alfalfa mosaic alfamovirus	Grapevine fanleaf nepovirus	Potato U nepovirus
Alstroemeria (?) ilarvirus	Guar top necrosis virus	Potato V potyvirus
Alstroemeria mosaic potyvirus	Henbane mosaic potyvirus	Potato yellow dwarf nucleorhabdovirus
Amaranthus leaf mottle potyvirus	Hibiscus latent ringspot nepovirus	Primula mosaic potyvirus
Arabis mosaic nepovirus	Hippeastrum mosaic potyvirus	Primula mottle (?) potyvirus
Arracacha A nepovirus	Hop American latent carlavirus	Prune dwarf ilarvirus
Arracacha B (?) nepovirus	Humulus japonicus ilarvirus	Radish mosaic comovirus
Arracacha Y potyvirus	Ivy vein clearing (?) cytorhabdovirus	Raspberry ringspot nepovirus
Artichoke Italian latent nepovirus	Kalanchoe isometric virus	Red clover necrotic mosaic dianthovirus
Artichoke yellow ringspot nepovirus	Kyuri green mottle mosaic tobamovirus	Red clover vein mosaic carlavirus
Asparagus 2 ilarvirus	Lamium mild mottle fabavirus	Rhynchosia mosaic bigeminivirus
Asparagus 3 potexvirus	Lilac chlorotic leafspot capillovirus	Ribgrass mosaic tobamovirus
Asystasia gangetica mottle (?) potyvirus	Lilac ring mottle ilarvirus	Rose (?) tobamovirus
Barley stripe mosaic hordeivirus	Lisianthus necrosis (?) necrovirus	Rubus Chinese seed-borne (?) nepovirus
Bean distortion dwarf (?) bigeminivirus	Lucerne Australian latent nepovirus	Silene X (?) potexvirus
Bean yellow mosaic potyvirus	Lucerne Australian symptomless (?) nepovirus	Solanum nodiflorum mottle sobemovirus
Beet curly top hybrigeminivirus	Lucerne transient streak sobemovirus	Sonchus cytorhabdovirus
Beet pseudo-yellowings (?) closterovirus	Lychnis ringspot hordeivirus	Sowbane mosaic sobemovirus
Belladonna mottle tymovirus	Maclura mosaic macluravirus	Soybean crinkle leaf (?) bigeminivirus
Bidens mosaic potyvirus	Maracuja mosaic (?) tobamovirus	Soybean mild mosaic virus
Blueberry leaf mottle nepovirus	Marigold mottle potyvirus	Soybean mosaic potyvirus
Blueberry necrotic shock ilarvirus	Melandrium yellow fleck bromovirus	Spinach latent ilarvirus
Bramble yellow mosaic (?) potyvirus	Melilotus mosaic (?) potyvirus	Strawberry latent ringspot (?) nepovirus
Broad bean wilt fabavirus	Melon Ourmia ourmiavirus	Sunn-hemp mosaic tobamovirus
Burdock yellow mosaic (?) potexvirus	Milk vetch dwarf nanavirus	Sweet clover necrotic mosaic dianthovirus
Cacao necrosis nepovirus	Myrobalan latent ringspot nepovirus	Sweet potato latent (?) potyvirus
Cacao yellow mosaic tymovirus	Narcissus latent macluravirus	Sweet potato mild mottle ipomovirus
Carnation ringspot dianthovirus	Neckar River tombusvirus	Sweet potato ringspot (?) nepovirus
Cassava African mosaic bigeminivirus	Nerine potyvirus	Tamarillo mosaic potyvirus
Cassava green mottle nepovirus	Nicotiana velutina mosaic (?) furovirus	Telfairia mosaic potyvirus
Cassava Indian mosaic bigeminivirus	Odontoglossum ringspot tobamovirus	Tobacco etch potyvirus
Cassava Ivorian bacilliform ourmiavirus	Okra leaf-curl bigeminivirus	Tobacco leaf curl bigeminivirus
Cassia mild mosaic (?) carlavirus	Olive latent 1 (?) sobemovirus	Tobacco mild green mosaic tobamovirus
Cassia severe mosaic (?) closterovirus	Olive latent 2 (?) ourmiavirus	Tobacco mosaic satelliivirus
Celery latent (?) potyvirus	Orchid fleck (?) rhabdovirus	Tobacco mosaic tobamovirus
Cherry leaf roll nepovirus	Paprika mild mottle tobamovirus	Tobacco mottle umbravirus
Chickpea chlorotic dwarf (?) monogeminivirus	Parietaria mottle ilarvirus	Tobacco necrosis necrovirus
Chicory yellow mottle nepovirus	Parsnip yellow fleck sequivirus	Tobacco necrosis satelliivirus
Chilli veinal mottle (?) potyvirus	Passionfruit woodiness potyvirus	Tobacco necrotic dwarf luteovirus
Chino del tomat, bigeminivirus	Patchouli mosaic potyvirus	Tobacco rattle tobavirus
Citrus ringspot virus	Pea early browning tobavirus	Tobacco ringspot nepovirus
Clover wound tumor phytoreovirus	Pea mosaic potyvirus	Tobacco streak ilarvirus
Clover yellow vein potyvirus	Pea streak carlavirus	Tobacco stunt varicosavirus
Commelina X potexvirus	Peach enation (?) nepovirus	Tobacco vein-distorting (?) luteovirus
Cowpea chlorotic mottle bromovirus	Peach rosette mosaic nepovirus	Tobacco vein mottling potyvirus
Cowpea mosaic comovirus	Peanut chlorotic streak caulimovirus	Tobacco wilt potyvirus
Cowpea mottle (?) carmovirus	Peanut clump furovirus	Tobacco yellow dwarf monogeminivirus
Cowpea severe mosaic comovirus	Peanut stunt cucumovirus	Tobacco yellow net (?) luteovirus
Croton yellow vein mosaic bigeminivirus	Pelargonium line pattern (?) carmovirus	Tobacco yellow vein assistor (?) luteovirus
Cucumber green mottle mosaic tobamovirus	Pelargonium vein clearing (?) cytorhabdovirus	Tobacco yellow vein (?) umbravirus
Cucumber necrosis tombusvirus	Pelargonium zonate spot ourmiavirus	Tomato aspermy cucumovirus
Cymbidium ringspot tombusvirus	Pepino mosaic potexvirus	Tomato Australian leafcurl bigeminivirus
Datura Colombian potyvirus	Pepper Indian mottle potyvirus	Tomato black ring nepovirus
Datura distortion mosaic potyvirus	Pepper mild mosaic (?) potyvirus	Tomato bushy stunt tombusvirus
Datura innoxia Hungarian mosaic (?) potyvirus	Pepper mild mottle tobamovirus	Tomato golden mosaic bigeminivirus
Datura mosaic (?) potyvirus	Pepper Moroccan tombusvirus	Tomato mild mottle (?) potyvirus
Datura necrosis potyvirus	Pepper mottle potyvirus	Tomato mosaic tobamovirus
Datura shoestring potyvirus	Pepper ringspot tobavirus	Tomato mottle bigeminivirus
Datura yellow vein nucleorhabdovirus	Pepper severe mosaic potyvirus	Tomato Peru potyvirus
Dioscorea latent (?) potexvirus	Pepper Texas bigeminivirus	Tomato ringspot nepovirus
Dogwood mosaic (?) nepovirus	Pepper veinal mottle potyvirus	Tomato spotted wilt tospovirus
Eggplant green mosaic potyvirus	Physalis mosaic tymovirus	Tomato top necrosis (?) nepovirus
Eggplant mild mottle (?) carlavirus	Pittosporum vein yellowing nucleorhabdovirus	Tomato yellow leaf curl bigeminivirus
Eggplant mottled crinkle tombusvirus	Plantain X potexvirus	Tomato yellow mosaic bigeminivirus
Eggplant mottled dwarf nucleorhabdovirus	Plum American line pattern ilarvirus	Tulare apple mosaic ilarvirus
Eggplant severe mottle (?) potyvirus	Plum pox potyvirus	Tulip chlorotic blotch potyvirus
Elderberry latent (?) carmovirus	Poinsettia mosaic (?) tymovirus	Tulip halo necrosis (?) virus
Elm mottle ilarvirus	Poplar mosaic carlavirus	Turnip mosaic potyvirus
Epirus cherry ourmiavirus	Potato 14R (?) tobamovirus	Turnip rosette sobemovirus

Eucharis mottle (?) nepovirus
 Foxtail mosaic potexvirus
 Frangipani mosaic tobamovirus
 Galinsoga mosaic carmovirus
 Grapevine Bulgarian latent nepovirus

Potato A potyvirus
 Potato Andean mottle comovirus
 Potato aucuba mosaic potexvirus
 Potato black ringspot nepovirus
 Potato mop-top furovirus

Ullucus mild mottle tobamovirus
 Ullucus mosaic potyvirus
 Watermelon mosaic 2 potyvirus
 Wild potato mosaic potyvirus
 Wisteria vein mosaic potyvirus

Esta rápida amplificação de vírus *in vivo* pode ser ainda utilizada em sistemas de quarentena. Extratos de plantas sobre observação seriam inoculadas em plantas suprimidas. Os eventuais vírus seriam amplificados nestas plantas num período de tempo bem menor e promovendo, em alguns casos, o surgimento de sintomas que facilitariam a sua detecção.

Uma vez que já há plantas transgênicas expressando HC-Pro de TEV, estudos comparativos entre as respectivas proteínas de PVY e TEV podem também ser conduzidos, tais como capacidades de supressão de PTGS e transmissão mediada por afídeos. Caso se determine comparativamente, por exemplo, que HC-Pro de PVY apresenta maior capacidade de PTGS-S que a respectiva proteína de TEV, seu uso seria preferencial para produção de linhagens biorreatoras.

Algumas pesquisas propõem que o PTGS esteja envolvido no desenvolvimento. Estudos em *C. elegans* mostraram que indivíduos nulos para replicase ou Dicer apresentaram defeitos no desenvolvimento da linhagem germinativa; a esterilidade foi também observada em indivíduos Dicer^{-/-} (Smardon *et. al.*, 2000; Knight e Bass, 2001). Uma vez que Dicer está envolvida na produção de stRNAs, mutantes para esse gene apresentam várias outras alterações no desenvolvimento. Contudo, a análise das plantas aqui geradas mostra não haver letalidade, esterilidade ou defeitos de desenvolvimento no estado de supressão de PTGS. Isso demonstra uma clara diferença entre indivíduos defectivos em PTGS, isto é, com sistema imune inoperante; e suprimidos em PTGS, com sistema imune operante porém invalidado.

As plantas com supressão de PTGS poderão ser utilizadas em estudos mais específicos da relação PTGS e desenvolvimento vegetal, uma vez que há hipóteses que o silenciamento gênico promova a regulação de genes durante o desenvolvimento (Kasschau e Carrington, 1998). Plantas defectivas em PTGS se apresentam como ótimos modelos para estes estudos.

Com relação à ausência do tumor nas plantas de tabaco expressando a proteína HC-Pro de PVY obtidas neste estudo, esta característica pode estar associada a dois fatores: i) à espécie de planta transformada, em nosso caso *N. tabacum*, (versus *N. benthamiana*); ou ii) à versão da proteína utilizada, em nosso caso, de PVY (versus HC-Pro de TEV).

As proteínas HC-Pro de TEV e PVY possuem 45,4% de identidade e 56,8% de similaridade (Tabela 2 e Figura 14). Esta diferença porém não deve ser a responsável por este fato uma vez que plantas capazes de expressar a proteína rgs-CaM também apresentam o tumor e que tal proteína não

tem similaridade significativa com outras proteínas HC-Pro. Desta forma, a provável causa da ausência do tumor é o “background” genético da espécie usada na transformação.

Tabela 2. Identidades (sombreadas) e similaridades entre proteínas HC-Pro de TEV e PVY e rgs-CaM

	TEV	PVY	rgs-CaM
TEV	----	56.8	11.3
PVY	45.4	----	12.1
rgs-CaM	5.8	5.9	----

TEV	-----HECTRGVSVERCGEVAAILTQALSPCGKITCKRCMVETPDIVEGESGESVTNQGX
PVY	SNADNFWKGLDGNWARMRYPSDHTCVAGLPVEDCGRIAALMTHSILPCYKITCPTCAQQYANLPASDLFKLLHKHAR
rgs-CaM	-----
consensus	
TEV	-LLAMLKEQYPDFPMAEKLLTRFLQQKSLVNTNLTACVSVKQLIGDRKQAPFTHVLAVSEILFKGNKLTGADLEEAS
PVY	DGLSRLGSDKDRFIHVNKFLVLEHLTEPVDLNLLELFNEIFKSIGEKQAPFKNLNINLNNFFLKGGKENTAHQWQVAQ
rgs-CaM	-----MESVSVPSVENKSYFSRLRKRFSLKKATTTTITTTITTDYLSMS--SSSKSNNSG
consensus	
TEV	THMLEIARFLNNRTENMRIGHLGSFRNKISSKAHVNNALMCDNQLDQNGNFIWGLRGAHAKRFLKGFTEIDPNEG
PVY	LSLLELARFQKNRTDNIKKGDISFFRNKLSAKANWNLYLSCDNQLDKNANFLWGQREYHAKRFFSNFFEEVDPSKGY
rgs-CaM	ELERVFTYFDENGDKVSPAELRRCVKAVGGELTVEEAEMAVRLSDSDGGLLG-----
consensus	
TEV	DKYVIRKHIRGSRKLAIGNLIMSTDFQTLRQQIQGETIERKEIGNHCISMRNGNYVYPCCVTLLEDGKAQYSDLKHP
PVY	SAYEVRRKHPNGTRKLAIGNLVVPLDLAEFRQKMGDYRKQPGVSKKCTSSKDGNYVYPCSCCTLLDDGSAIESTFYPP
rgs-CaM	-----LEDFTKLMEGMEERN-----KESELIGAFGMYEMEG-----SGYITP
consensus	
TEV	TKRHLVIGNSGDSKYLDLPVLNEEKMYIANEGYCYMNIFFALLVNVKEEDAKDFTKFIRDITIVPKLGAWPTMQDVAT
PVY	TKKHLVIGNSGDQKYVDLPKGDSEMLYIAKQGYCYINIFLAMLINVSEEDAKNFTKKVRDMCVPKLGTWPTIMDLAT
rgs-CaM	KSLKMLSLRGESTSIDNCKAMIQRFIDNGDGVLFNDFEFKAMMTS-----
consensus	
TEV	ACYLLSILYPDVLAELPRILVDHDKTMHVLDVSYGSRRTTGYHMLKMNTTSQLIEFVHSGLESEMKTYNVG
PVY	TCAQMRIFYPDVHDAELPRILVDHDTQCHVVDVSGSQTTGYHILKASSVSQLILFANDELESIDIKHYRVG
rgs-CaM	-----
consensus	

Figura 14. Alinhamento entre HC-Pro de TEV, HC-Pro de PVY e rgs-CaM. Cores - Preto: diferentes; azul: similares; vermelho: idênticos e magenta: conservados. Consensus *: aminoácidos idênticos nas três proteínas; . : aminoácidos idênticos ou similares em duas proteínas.

Os elementos transponíveis, mas especificamente os retro-transposons, também são alvos de silenciamento gênico uma vez que realizam transposição através de dsRNAs. Demonstrou-se que plantas defectivas para PTGS apresentam alta mobilização de transposons (Ketting *et. al.*, 1999; Tabara *et. al.*, 1999; Miura *et. al.*, 2001). Essa mobilização é facilmente verificada através de *Southern blots*, que evidenciam o elevado número de cópias de elementos transponíveis em plantas sem PTGS.

Plantas suprimidas para PTGS podem ser úteis na dissecação do envolvimento de PTGS no controle a transposons. Seria muito interessante verificar se essa mobilização ocorre também em um estado de supressão de PTGS. Caso sim, HC-Pro seria a primeira proteína viral conhecida capaz de mobilizar elementos transponíveis.

5.2. ENVOLVIMENTO DE DOMÍNIOS E PADRÕES NA ATIVIDADE DE SUPRESSÃO DE PTGS

O ensaio de supressão realizado usando as plantas expressando as diferentes versões da proteína HC-Pro apresentou resultados bastante interessantes. O domínio A não ter participação aparente na supressão de PTGS já que a deleção desta região (Figura 12; HCΔA) não afetou a atividade de PTGS-S.

Em contrapartida, o ensaio em questão demonstrou um forte envolvimento do domínio B e do padrão IGN na supressão de PTGS (Figura 12; HCΔB e HC-2B). A deleção/mutação deste domínio/padrão levou a uma redução considerável da acumulação de PVX. Assim, uma forte participação do motivo IGN na atividade de PTGS-S, mediada pelo domínio B pode ser observada.

O motivo YPCSC, também presente no domínio B, aparenta estar fortemente envolvido na atividade de PTGS-S, porém uma participação diferencial dos aa em questão parece ocorrer. Isto pode ser comprovado ao se comparar à acumulação de PVX nas plantas HC-1B e HC-3B. A planta HC-1B possui uma mutação de YPCSC para DPCSC, ao passo que a HC-3B possui mutação de YPCSC para YPRPC. Verificou-se desta maneira que o aa tirosina (Y) apresenta-se mais fortemente envolvido na atividade de PTGS-S neste padrão.

Os resultados obtidos, embora coerentes, necessitam de um maior número de repetições para serem considerados definitivos. Se tais observações vierem a se confirmar em novos ensaios, alguns pontos importantes podem ser levantados:

- O domínio A, e conseqüentemente sua atividade de RNAb, são desnecessários para PTGS-S.
- A atividade de PTGS-S é realizada unicamente pelo domínio B.
- O motivo IGN, desnecessário para atividade de RNAb, é fundamental para PTGS-S.
- Os aa CS do padrão YPCSC, para os quais a atividade de RNAb não foi ainda determinada, não são essenciais para PTGS-S.
- O aa Y, presente no motivo anterior, apresenta-se fortemente envolvido no PTGS-S e RNAb, evidenciando que ambas funções possam estar relacionadas (Tabela 3).

Tabela 3. Correlação entre as atividades de PTGS-S e RNAb dos motivos presentes no domínio B da proteína HC-Pro. Um único aminoácido (entre os analisados), tirosina (Y), está envolvido em ambas funções, evidenciando uma possível correlação.

	Envolvimento em RNAb	Envolvimento em PTGS-S
<u>IGN</u>	Não	Sim
<u>YPCSC</u>	Sim	Sim
<u>YPCSC</u>	?	Não

De uma maneira geral, nossos resultados apontam o domínio B como a região mínima da proteína HC-Pro (até o momento) capaz de realizar supressão de PTGS (Figura 15). Essa análise inicial também evidencia um envolvimento parcial entre a atividade de RNAb mediada pela tirosina (Y) e PTGS-S (Tabela 3). A atividade de RNAb do domínio A, assim como a mediada pelo padrão IGN não seriam necessárias.

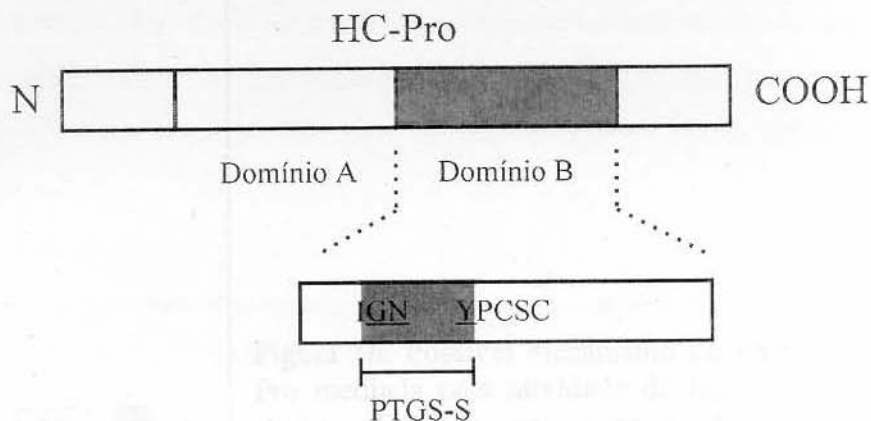


Figura15. Domínios e padrões de HC-Pro associados a PTGS-S. Em vermelho o domínio B e a possível região dentro deste domínio envolvido à supressão. N: porção amino-terminal; COOH: porção carboxi-terminal.

Estudos *in vitro* sobre a atividade de ligação a RNA (RNAb) de HC-Pro demonstraram que esta é inespecífica, ou seja, a proteína é capaz de ligar-se a qualquer molécula de RNA (Maia e Bernardi, 1996b). Foram encontrados dois domínios centrais A e B, respectivamente entre os aa 81-233 e 233-367 (Figura 1), que quando deletados reduzem consideravelmente esta atividade. Dentro do domínio B foram ainda mapeados 2 padrões altamente conservados (RNP-1 e RNP-2; Figura 1). Uma mutação introduzida em RNP-1 (padrão YPCSC) determinou a perda total da atividade de RNAb, ao passo que a deleção total do domínio B não (Urcuqui-Inchima *et. al.*, 2000). Este resultado provavelmente se deve a forte participação deste padrão na determinação da conformação tridimensional (e atividade) de HC-Pro.

Outras pesquisas demonstraram que siRNAs complexados à proteínas (talvez Dicer ou RISC) ficam protegidos da ação de nucleases (Lipardi *et. al.*, 2001); que HC-Pro apresenta atividade de ligação a ssRNAs de 30 nt (Maia e Bernardi, 1996b) e que é capaz de eliminar os siRNAs (Mallory *et. al.*, 2001). Assim sendo, um possível modelo de supressão de PTGS mediado pela atividade de RNAb pode ser descrito: HC-Pro “roubaria” siRNAs de Dicer (ou RISC), e ao contrário desta, não os protegeria da ação de nucleases celulares. A exposição a essas nucleases seria responsável pela eliminação dos siRNAs, essenciais à manutenção de PTGS (Figura 16).

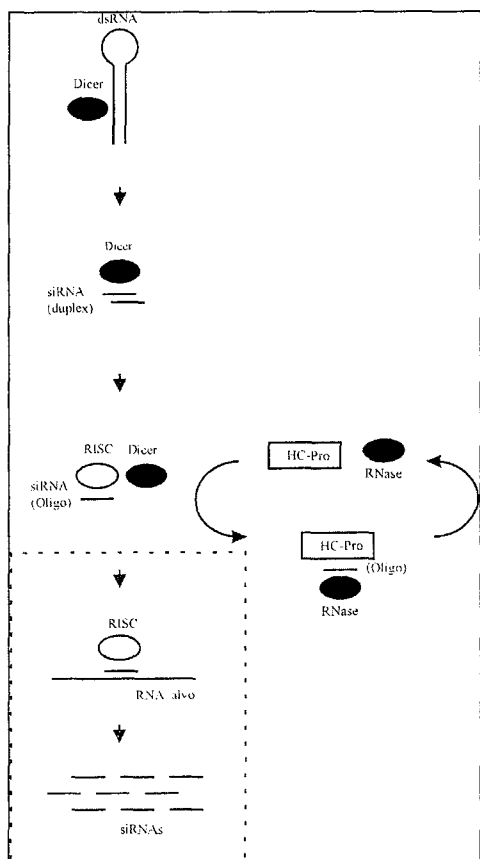


Figura 16. Possível mecanismo de supressão da proteína HC-Pro mediada pela atividade de ligação a RNA. HC-Pro teria maior afinidade por ssRNA do que Dicer ou RISC, complexando assim os siRNAs. A ação de uma ribonuclease celular eliminaria esses RNAs, e o restante da via (em retângulo descontinuo) não se processaria.

Um artigo que está no prelo (Silhavy *et. al.*, 2002 – 17 de Junho) estuda o mecanismo de supressão realizada pela proteína p19 de um tombusvírus. Os pesquisadores verificaram que p19 é capaz de se ligar os siRNAs (duplexes) que são gerados durante o processo, prevenindo o desenvolvimento de silenciamento local e sistêmico. Este trabalho vem a comprovar o modelo aqui proposto de forma independente.

Assim sendo, poder-se-ia esperar uma similaridade entre as seqüências de ambas proteínas. Contudo isso não se verifica. Esta geral ausência de similaridade entre as diversas supressoras de PTGS é um fato intrigante. Possíveis explicações para isso seriam: i) atividade de supressão em diferentes partes da via ou ii) atividade na mesma parte da via, porém com adaptações de seqüência e estrutura adequadas ao sistema específico.

A não acumulação de PVX em HCΔB poderia ser justificada pela ausência da proteína (não detectada em *western blot*). Porém, como foi observado neste mesmo ensaio de supressão, as versões HC-1B e HC-2B (com mutações no domínio B) também não acumulam PVX em altos níveis. Desta forma, a não supressão de PTGS em HCΔB deve-se provavelmente à deleção de motivos essenciais para a atividade, e não pela ausência da proteína. O comprometimento da atividade de supressão das versões da proteína HC-Pro contendo mutações pontuais no domínio B corroboram tal ponto de vista.

Adicionalmente, a versão HCΔA, a qual também não foi detectada via *western blot*, apresentou grande acumulação de PVX. Este dado demonstra que, mesmo sem a detecção da proteína, a atividade supressora pôde ser confirmada. Esta atividade mostrou-se similar àquela observada para a proteína HC-Pro tipo-selvagem, o que constitui um forte indicativo da presença de tal proteína nas plantas transgênicas correspondentes. Conseqüentemente evidencia-se que os domínios agem de forma independente, e não sinérgica.

A não detecção das versões truncadas de HC-Pro por *western blot* não implica na ausência das mesmas. Alguns estudos com versões mutadas de HC-Pro foram incapazes de imuno-detectar a proteína (Kasschau e Carrington, 2001; Saenz *et. al.*, 2001). Uma possível explicação é que algumas mutações geram instabilidade do polipeptídeo. Adicionalmente, o estudo que demonstrou a atividade de supressão de rgs-CaM em *N. benthamina* não demonstrou a presença da proteína mas apenas do transcrito (Anandalakshmi *et. al.*, 2000).

Plantas HC-2B são úteis para vários outros estudos. Trabalhos anteriores em protoplastos demonstraram que TEV com essa mutação não apresenta *intensificação da replicação*, função creditada a HC-Pro até certo tempo atrás. Atualmente sabe-se que na verdade HC-Pro não intensifica a

replicação, mas sim suprime o sistema que regula negativamente a replicação viral (PTGS). Desta forma, estudos de supressão em plantas HC-2B colaboram na confirmação desta última hipótese.

Plantas expressando HC-Pro tipo-selgavem podem ser usadas em estudos sobre RMP tendo como alvo a proteína HC-Pro. Porém plantas expressando HC-2B podem ser utilizadas nestes estudos com a vantagem adicional de não haver interferência de PTGS-S no estudo.

Estudos demonstraram ainda que HC-Pro induz a expressão do gene *rgs-CaM*. A proteína *rgs-CaM* quando super-expressa em plantas transgênicas, também é capaz de suprimir PTGS. Levantou-se a hipótese de que HC-Pro funcione na realidade como um ativador da expressão de *rgs-CaM*, que por sua vez seria a verdadeira supressora de PTGS.

Desta forma, a análise da indução de *rgs-CaM* nas plantas HC-2B pode esclarecer esse ponto. Caso estas plantas não induzam a expressão de *rgs-CaM*, fica evidenciado que tal indução é mediada pelo motivo específico (IGN) e mais, que a atividade de PTGS-S seja realizada na verdade por *rgs-CaM*. Por outro lado, caso plantas HC-2B induzam a expressão de *rgs-CaM*, fica evidenciado que tal motivo não está atuando como ativador (Tabela 4).

Tabela 4. Relação entre atividades de PTGS-S e indução de *rgs-CaM* (*rgs-i*).

	HC-2B	Conclusão
<i>rgs-i</i>	+	Outro domínio (não IGN) induz <i>rgs-CaM</i>
	-	IGN induz <i>rgs-CaM</i> <i>rgs-CaM</i> suprime PTGS

Capítulo 3

Identification and expression profiles of PTGS-related genes in sugarcane
by EST data mining

CAPÍTULO 3

Identification and expression profiles of PTGS-related genes in sugarcane by EST data mining

Tiago C. Pereira¹, Ivan G. Maia² and Paulo Arruda¹*

¹ Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6010, 13083-970, Campinas, SP, Brasil

² Instituto de Biociências – Departamento de Genética - UNESP, 18618-000, Botucatu, SP, Brasil

Running title: PTGS-related genes in sugarcane

Key words: post-transcriptional gene silencing, EST, sugarcane, expression profile

* Corresponding author - e-mail: ipatinga@unicamp.br

ABSTRACT

Post-transcriptional gene silencing (PTGS) is an RNA surveillance system aiming the degradation of aberrant molecules such as double-stranded RNAs. Once several genes related to this process are already cloned in different organisms, we explored the data generated in the Brazilian “Sugarcane Expressed Sequence Tag” project (SUCEST) to identify putative PTGS-related proteins in a monocotyledonous plant. Several EST clusters sharing significant sequence similarity to all ten currently known proteins involved in gene silencing were identified and their relative abundance determined. The involvement of PTGS in transposon silencing was also analyzed, thus shedding some light to this system in sugarcane.

INTRODUCTION

The existence of a new mechanism of gene regulation spread in a wide variety of organisms including fungi (Cogoni and Macino, 1997), protozoans (Ngo *et al.*, 1998), plants (Mourrain *et al.*, 2000) and animals (Fire *et al.*, 1998) was recently demonstrated. This general system, known as post-transcriptional gene silencing (PTGS), acts by identifying and specifically degrading aberrant RNAs such as long double-stranded molecules (dsRNAs). These are present, for example, in plant cells infected with virus. Once the system is able to quell the replication of these pathogens (Ratcliff *et al.*, 1997), PTGS has been interpreted as an ancestor defense system against virus and transposons (Wu-Scharf *et al.*, 2000; Ketting *et al.*, 1999; Tabara *et al.*, 1999).

Genes involved in the PTGS process have been identified allowing the construction of a yet fuzzy pathway (Figure 1; reviewed in Vance *et al.*, 2001). Basically, PTGS is activated by dsRNA molecules produced during transposition, viral replication, and aberrant RNA (aRNA) synthesis. Additionally, PTGS could be also triggered by experimental injections of synthetic dsRNA (Fire *et al.*, 1998). These dsRNAs are subsequently cleaved by a dsRNA-specific endonuclease (named Dicer in *Drosophila*) into small interfering RNA molecules of 21-25 nt (siRNAs; Bernstein *et al.*, 2001), which in turn drive a ribonuclease complex (called RISC; Hammond *et al.*, 2000) to degrade cognate mRNA, producing more siRNAs. These molecules act as primers for a RNA dependent RNA polymerase (SGS2; Mourrain *et al.*, 2001; Lipardi *et al.*, 2001), producing more dsRNAs and self-perpetuating the mechanism. Despite some progress in understanding the PTGS phenomena has been achieved, much less is known about the conservation of this pathway in different organisms.

Our objective in this paper was to search for genes encoding proteins potentially involved in the gene silencing pathway of sugarcane by exploring the data generated in the Brazilian “Sugarcane Expressed Sequence Tag” project (SUCEST). Although the occurrence of gene silencing in transgenic sugarcane is already described (Ingelbrecht *et al.*, 1999), it should be important to know whether the essential steps of the PTGS pathway are conserved in this plant. In using this large-scale procedure we identified 58 EST clusters encoding products with similarity to proteins involved in PTGS. The analysis of the relative abundance of the identified ESTs together with library distribution data revealed interesting patterns of expression. An analysis of PTGS involvement in transposon silencing was also conducted. The annotated EST sequences, derived from diverse sugarcane cDNA libraries, offer an attractive tool for further understanding the PTGS phenomena in monocotyledonous plants such as sugarcane, maize and sorghum.

MATERIAL AND METHODS

Sequence comparisons were conducted by a set of homology-based searches against cluster consensus sequences (contigs obtained using Phrap algorithm) in the SUCEST database using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990). Keyword searches were also performed using a provisional functional assignment generated by automated annotation. The resulting hits were validated against existing homologous sequences deposited in GenBank (National Center for Biotechnological Information). An estimate of the relative abundance for each annotated gene was conducted by EST counts per corresponding contig. Tissue expression profiles were based on the relative EST abundance among different libraries. Analyses of coiled-coil secondary structures were conducted using the program “COILS” - Coiled domains prediction – at <http://www.ch.embnet.org>. Conserved domains analyses were conducted using the program “Reverse Position Specific BLAST” (RPS-BLAST) at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>. Parameters: Advanced options for the BLAST server – Expected: 10.

RESULTS AND DISCUSSION

PTGS-related clusters in sugarcane

The SUCEST database was mined for sugarcane gene products potentially involved in the gene silencing pathway (Figure 1). Amino acid sequences of enzymes known to be implicated in this process were used as queries for tBLASTn searches against the cluster consensi database of SUCEST. Using this procedure we identified 58 sugarcane EST clusters sharing significant sequence similarity (e-value $< 10^{-40}$) to enzymes implicated in PTGS (Table 1). The only exception to this was the *Nicotiana tabacum* encoded rgs-CaM polypeptide (Anandalakshmi *et. al.*, 2000), to which an EST cluster with a relative low similarity (e-value 10^{-17}) was found. It is interesting to note that an EST cluster sharing significant sequence similarity (e-value 10^{-126}) to the SGS3 protein was annotated. This protein is encoded by *Arabidopsis thaliana* and is not found in *Caenorhabditis elegans* or *Drosophila melanogaster*, indicating that this might be a plant-specific protein.

MUT6 encoded by *Chlamydomonas reinhardtii* (Wu-Scharf *et. al.*, 2000) and SDE3 encoded by *A. thaliana* (Dalmay *et. al.*, 2001) are related proteins, both of them being RNA helicases involved in PTGS. The identified sugarcane contigs, however, showed higher similarity to MUT6 (e-value 0.0) than to SDE3 (e-value 10^{-87}). Searching has also revealed a gene product with amino acid sequence relatedness to a RecQ DNA helicase (QDE3 gene; Cogoni and Macino, 1999b) originally described in fungi, thus representing likely a novel plant gene.

RISC is thought to be a multicomponent ribonuclease, and AGO2 (another member of AGO family) was recently shown to be a part of this complex in *Drosophila* (Hammond *et. al.*, 2001). This protein, used here as a marker for RISC presence and activity, was also identified in sugarcane. As matter of fact, AGO1 (from *Arabidopsis*; Fagard *et. al.*, 2000) and AGO2 (from *Drosophila*; Hammond *et. al.*, 2001) are quite similar; thus, all clusters identified as AGO2 were first classified as AGO1. This fact is not a problem since AGO1 is also considered to join the RISC complex (Hammond *et. al.*, 2001).

Relative Abundance

An overall view shows that the enzymes involved in the PTGS pathway are poorly represented, since only 481 among 260,781 ESTs were related to this path (approximately 0,18%). 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. As shown in Figure 2, transcripts encoding products with sequence similarity to the initiation factors AGO1 (Fagard *et. al.*, 2000) and AGO2 figured as the most abundant, probably due to their participation on the highly active process of translation. Transcripts encoding the SGS3 protein of unknown function and the enzymes involved in DNA methylation (MET1; Finnegan *et. al.*, 1996), chromatin remodeling (DDM1; Jeddeloh *et. al.*, 1999), dsRNA cleavage (Dicer), and RNA unwinding (MUT6) represented the group with relative medium abundance. In contrast, transcripts related to SDE3, QDE3, rgs-CaM and SGS2 figured as the least abundant. Since rgs-CaM is involved in PTGS suppression, it's reasonable to expect a downregulation of its expression in adult plants thus allowing the occurrence of gene silencing. On the other hand, its transcriptional level may increase during periods of gene silencing regulation such as development.

ESTs distribution among libraries

ESTs distribution among different libraries revealed many interesting aspects of PTGS (Table 2). The first observation is that only flowers and lateral buds presented a practically complete path. This observation however may be a consequence of total EST reads per library since flower library presented the highest number of reads (64,095). The absence of some proteins in certain libraries may indicate its rarity rather than its real absence. However, even when libraries were normalized, i.e. reads were recount considering that all libraries presented 12,000 reads (Figure 3), flowers appeared as the second most active tissue.

The observed PTGS tissue-distribution may reflect strategies against virus infection. Once virus induced gene silencing is triggered by dsRNA, it may be expected that all enzymes responsible for detecting these molecules (AGO1, SGS2, SGS3 and probably SDE3) should be present. This indicates the tissue continuous “alert state”, a condition of promptness to fight against virus. Flowers, lateral buds, stem, leaf-root transition zone and root are clearly in such state, although other tissues may not be excluded.

AGO1, AGO2 and DDM1, present in all libraries, are the most expressed enzymes (Table 2). The widespread distribution of the first two enzymes is explained by their involvement in translation. Since DDM1 is also involved in transcriptional silencing, one could expect that its presence in all tissues would avoid transcription of aRNAs. Once aRNAs are identified, systemic signaling emerges promoting transcriptional silencing of this specific sequence in any part of the plant.

It was recently demonstrated that Dicer is also involved in a pathway related to the production of small temporal RNAs (stRNAs; Hutvágner *et. al.*, 2001), which control developmental timing in *C. elegans*. Although the existence of such a pathway in plants is not yet known, it's tempting to speculate that Dicer-like proteins could play such a role in apical meristem. This hypothesis is supported by a recent work (Jacobsen *et. al.*, 1999) showing that recessive mutant plants for CAF, a Dicer-like protein from Arabidopsis, present unregulated cell division in floral meristems, thus indicating that CAF is probably related to development control.

A previous study (Anandalakshmi *et. al.*, 2000) showed that transcripts from *N. tabacum* rgs-CaM accumulate at relative high levels in stem and root, but at very low levels in other tissues. This is in accordance to our data, strengthening the chance of our cluster, although presenting relative low e-value, being the sugarcane rgs-CaM homologue. Since rgs-CaM is a PTGS suppressor protein, its expression is low to probably allow the occurrence of PTGS. The actual reason for its expression in roots, apical meristems and leaf-root transition is not yet clear.

Plantlets without developed leaves and roots grown *in vitro* and infected with *Herbaspirillum rubrisubalbicans* or *Acetobacter diazotrophicans* (two distinct SUCEST libraries) didn't show any increase in PTGS-related transcripts. This is in accordance to the concept of a "virus defense mechanism". Moreover, the abundance of PTGS-related ESTs in seeds is low, as expected, since the majority of plant viruses are nontransmissible by seeds.

PTGS and transposon silencing

Another function performed by PTGS is transposon silencing as these transposable elements (TEs) move by dsRNA intermediates.

A direct correlation between TEs and PTGS (Figure 3) may be observed when comparing the total number of PTGS reads in a library (here considered as PTGS activity) and total number of TEs

reads in the same tissue (Table 2; Rossi *et al.*, 2001). As TEs reads increase, PTGS activity trends to increase. These data were submitted to linear regression (Figure 4), demonstrating a clear correlation between PTGS and TEs. Transposon silencing may also answer why callus library presents the highest levels of PTGS-expressed genes, as TEs are abundant in such library.

Conserved domains and structure analyses

To further strength the sequence relatedness of the identified EST products with known PTGS-related enzymes, analyses of conserved domains were performed in deduced amino acid (aa) sequences from almost full-length EST clusters. The selected clusters were: AGO1, MET1 and rgs-CaM. Amino acid sequences deduced from ESTs encoding putative AGO1 and MET1 present similar patterns of domain distribution as compared to already known proteins. On the other hand, the rgs-CaM protein from *N. tabacum* possesses three EF-Hand domains of 23 aa in its C-terminus, while 4 EF-Hands of 23 aa in average size are found in the putative sugarcane homologue. This observation further strengthens the idea that sugarcane indeed encodes an rgs-CaM homologue, which may contain others EF-Hand domains. It's interesting to note that a pair of EF-Hand domains constitutes an "Eps15 homology domain" that recognize proteins containing Asn-Pro-Phe (NPF) sequences (Paoluzi *et al.*, 1998). Although it was demonstrated that rgs-CaM interacts in vivo with the *Tobacco etch virus* (TEV) encoded helper component-proteinase (HC-Pro; Anandalakshmi *et al.*, 2000), a viral suppressor protein, this activity is probably not performed by this specific domain since TEV HC-Pro presents no NPF motifs. SGS3 predicted secondary structure is composed of coiled coil regions and a quite similar pattern of coils is predicted in the putative sugarcane protein.

Concluding remarks

We have found matches for all ten currently known and cloned genes encoding proteins involved in gene silencing (summarized in Table 1). The identification of components of the PTGS pathway within the generated set of sugarcane ESTs provides a good evidence for the conservation of the PTGS mechanism among different plant species and organisms. The identified ESTs constitute a necessary step to additional dissection of this important pathway in plants.

ACKNOWLEDGMENTS

TCP is supported by FAPESP. IGM was recipient of a FAPESP postdoctoral fellowship. PA is recipient of a research fellowship from CNPq.

FIGURE LEGENDS

Figure 01. Schematic representation of the PTGS pathway. Methylation and chromatin structure alterations of transgene carried out by MET1, DDM1 and QDE3 proteins induce the production of transcripts with duplex structure. These aberrant RNAs (aRNAs) are used as substrate by specific proteins such as AGO1, SGS2, SGS3 and SDE3 to generate longer dsRNA molecules. These aRNA molecules may also be produced by inverted transgene repeats (IR). A Dicer-like RNase enzyme cleaves dsRNA molecules into small interfering double stranded RNAs of 21-23 nucleotides (siRNAs). Dicer and RISC may interact by common PAZ domains thus allowing siRNA transfer. This process probably involves an RNA helicase (SDE3), once RISC activity needs a single-stranded RNA to direct cleavage of target RNA (Hammond *et al.*, 2000). The siRNA molecules produced even by Dicer or RISC (Zamore *et al.*, 2000) are used as primers by an RNA dependent RNA polymerase (SGS2) to produce dsRNAs from target RNAs. HC-Pro (a viral protein) interacts with rgs-CaM (a plant protein) being both of them suppressors of gene silencing. HC-Pro probably binds to single stranded siRNAs and, opposite to Dicer, allows their degradation by a cellular ribonuclease. mmm means transgene methylation.

Figure 02. Distribution of the identified contigs (and corresponding ESTs) encoding PTGS-related enzymes in sugarcane. The precise number of reads *per* contig are indicated in Table 1.

Figure 03. Correlation between PTGS and Transposable Elements (TEs) based in EST abundance. ESTs were recounted, keeping the proportion of 12,000 total reads per library. Libraries: 1: lateral buds; 2: leaf-roll; 3: flowers; 4: apical meristem; 5: leaves; 6: stem (first internode); 7: leaf-root transition zone; 8: root; 9: seeds; 10: Sten Bark; 11: callus; 12: plantlets infected with *Acetobacter diazotrophicans*; 13: plantles infected with *Herbaspirillum rubrisubalbican*.

Figure 04. Liner regression showing a positive correlation between PTGS and transposition.

Figure 01

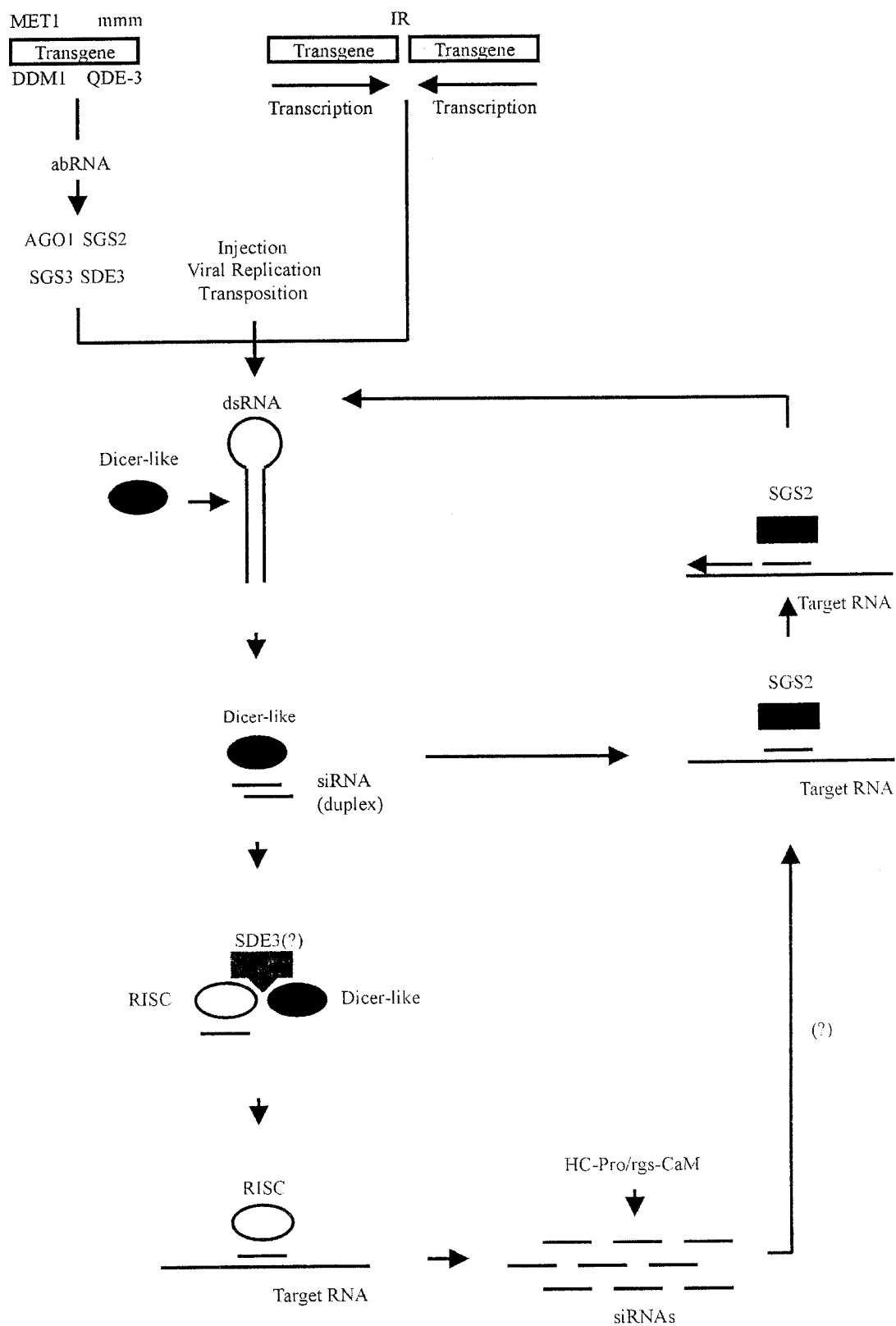


Figure 02

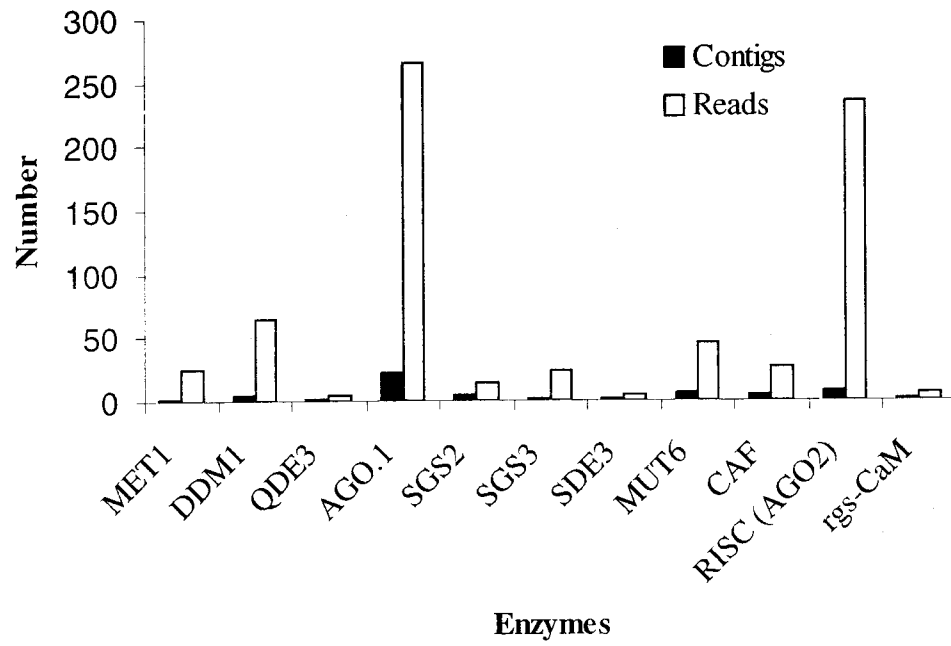


Figure 03

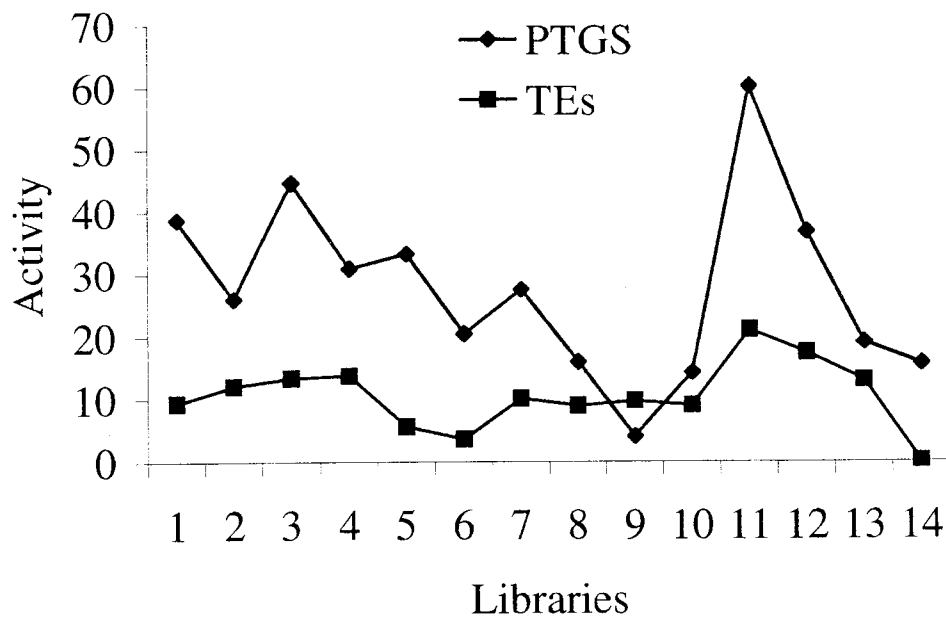


Figure 04

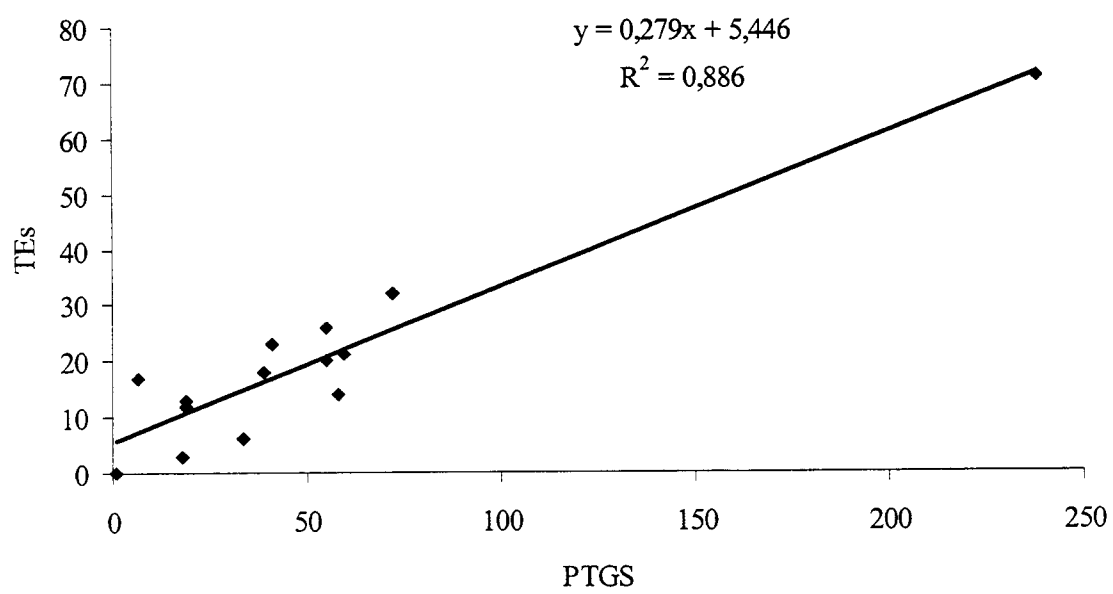


Table 1. Enzymes involved in the PTGS pathway in different organisms and related contigs found in sugarcane.

NAME	ORGANISM	FUNCTION	ACCESSION*	CONTIGS	e-value	IDENTITY	READS
MET1	<i>Zea mays</i>	DNA methyltransferase	AAG15406	SCRFLB1054H11.g SCUTLR1037G02.g	0.0 6e-48	96% 93%	25
DDM1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chromatin Remodeling Factor	AF143940	SCQSLR1040B09.g SCCCLR1C02D02.g SCCCLB1021G11.g SCCCLR1C07F08.g	0.0 e-117 2e-67 6e-58	63% 89% 78% 75%	64
QDE-3	<i>Neurospora crassa</i>	RecQ DNA Helicase	AAF31695	SCVPLB1020E11.g	4e-78	71%	5
AGO1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2C	U91995	SCCCLR2004H12.g SCCCCL3005C12.b SCAGLR1064G07.g SCCCRZ2C01C08.g SCCCST1002F10.g SCCCCL3080E12.g SCCCCL3080A03.g SCCCFL2002D09.g SCSBFL1045A02.g SCSBAM1086G07.g SCQGRZ3014H09.g SCCCLB1004D06.g SCMCCL6056H07.g SCQGLR1086G11.g SCCCCL4008D06.g SCVPRZ3031C08.g SCEPAM2011H07.g SCRFL8051D07.g SCRUFL1111D03.g SCEZLR1009H11.g SCRUFL1111D03.b SCCCLR1079E06.g	0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 e-140 e-137 e-126 3e-93 6e-88 8e-80 1e-73 2e-73 6e-73 2e-67 6e-67 2e-63 9e-57 5e-51 3e-48 1e-46 3e-43	76% 80% 76% 75% 84% 73% 81% 83% 75% 78% 64% 72% 55% 44% 68% 55% 64% 68% 59% 70% 62% 44%	265
SGS2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RNA-dependent RNA polymerase	AAF73959	SCJFRT2056H02.g SCSBRZ3123G10.g SCQSST1037D08.g SCCCFL1100F01.g SCSBFL4014C04.g	1e-95 6e-92 7e-84 3e-81 5e-47	68% 71% 61% 65% 62%	15
SGS3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Unknown	AAF73960	SCCCLB1C03B12.g SCRLFL1006E10.g	e-126 1e-69	43% 45%	24
SDE3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RNA Helicase	AAK40099	SCJLRZ1019H11.g SCEPLR1008C12.g	1e-87 1e-61	61% 49%	4
MUT6	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	DEAH-box RNA Helicase	AF305070	SCVPCL6043B03.g SCMCCL6049H02.g SCRRLRZ3115H09.g SCCCRZ1004G10.g SCMCFL5008F09.g SCJLLR1011D10.g SCBGLR1003F06.g	0.0 e-169 e-117 2e-78 2e-42 2e-42 1e-41	64% 46% 48% 36% 45% 56% 44%	46
CAF (Dicer-like)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	dsRNA endonuclease	AAF03534	SCEPAM1024G07.g SCSGFL4035F04.g SCVPLB1017H01.g SCSFAD1113G06.g SCQGR1042C03.g	5e-92 3e-91 4e-90 9e-67 8e-61	81% 86% 39% 66% 45%	27
RISC (AGO2)	<i>Drosophila melanogaster</i>	Ribonuclease	HSM2001**	SCCCLR2004H12.g SCCCCL3005C12.b SCCCCL3080A03.g SCCCRZ2C01C08.g SCCCCL3080E12.g SCQGLR1086G11.g SCAGLR1064G07.g SCCCST1002F10.g	1e-90 4e-89 4e-66 5e-63 1e-60 3e-53 1e-49 5e-44	30% 30% 24% 31% 24% 41% 27% 30%	235
rgs-CaM	<i>Nicotiana tabacum</i>	Gene silencing regulation	AAK11255	SCQGR1043H08.g	1e-17	52%	6

* Accession numbers are referent to the proteins used as queries for tBLASTn searches in Sucest. **

Protein sequence according to Hammond *et. al.* 2001.

Table 2. Distribution of ESTs among different sugarcane libraries.

	MET1	DDM1	QDE3	AGO1	SGS2	SGS3	SDE3	MUT6	CAF	RJSC (AGO2)	rgs-CaM	TE
LB	1	4	2	21	2	6			5	17		14
LR	1	6		14			1	4	1	12		18
FL	10	18	2	89	7	12		10	10	80		71
AM	5	11		23				6	5	19	3	32
LV	4	3		5				1		5		3
ST		3		11	3	3		2	1	11		6
RZ		1		22	2	2	3	6		18	1	20
RT	2	4		13	1	1		5	2	11	2	23
SD		1	1	3						2		17
SB		2		7				3		7		12
CL	1	7		26				2		24		21
AD				24				6	3	22		26
HR	1	4		7						7		13
NR								1				0

Leftmost column: Sucest libraries; number of ESTs per library. Abbreviations were: LB: lateral buds; LR: leaf-roll; FL: flowers; AM: apical meristem; LV: leaves; ST: stem (first internode); RZ: leaf-root transition zone; RT: root; SD: seeds; SB: Sten Bark; CL: callus; AD: plantlets infected with *Acetobacter diazotrophicans*; HR: plantles infected with *Herbaspirillum rubrisubalbican*; NR, normalized library of all tissues and TE: transposable element.

BIBLIOGRAPHY

- Altschul, SF, Gish, W, Miller, W, Myers, EW, Lipman, DJ** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Anandalakshmi R, Marathe R, Ge Xin, Herr Jr. 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.
- Bawden FC, Kassanis B** (1945) The suppression of one plant virus by another. *Annals of Applied Biology* 32: (1) 52-&
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ.** (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
- Bestor TH.** (2000) Gene silencing as a threat to the success of gene therapy *J CLIN INVEST* 105: (4) 409-411.
- Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC.** (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* 17(22):6739-46.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R.** (2002) A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science.* 296(5567):550-3.
- Daniel Silhavy, Attila Molnar, Alessandra Lucoli, Gyorgy Szitty, Csaba Hornyik, Mario Tavazza and Jozsef Burgyan** (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBOJ* 21 (12) no prelo.
- Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, Cogoni C.** (2000) Gene silencing in worms and fungi. *Nature.* 404(6775):245.
- Cerutti L, Mian N, Bateman A.** (2000) Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci.*25(10):481-2.
- Chapman S, Kavanagh T, Baulcombe D.** (1992) Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *PLANT J.* 2(4):549-57.
- 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: 10233-10238.
- Cogoni C, Macino G.** (1999a) Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature.* 399(6732):166-9.
- Cogoni C, Macino G.** (1999b) Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science* 286: 2342-2344.

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*. 101(5):543-53.

Dalmay T, Horsefield R, Braunstein TH, Baulcombe DC. (2001) SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *EMBO J*. 20: 2069-2078.

Domeier ME, Morse DP, Knight SW, Portereiko M, Bass BL, Mango SE. (2000) A link between RNA interference and nonsense-mediated decay in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 289(5486):1928-31.

Dunoyer P, Pfeffer S, Fritsch C, Hemmer O, Voinnet O, Richards KE. (2002) Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clumpvirus. *Plant J*. 29(5):555-67.

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(6836):494-8.

Elmayan T, Balzergue S, Beon F, Bourdon V, Daubremet J, Guenet Y, Mourrain P, Palauqui JC, Vernhettes S, Vialle T, Wostrikoff K, Vaucheret H. (1998) Arabidopsis mutants impaired in cosuppression. *Plant Cell*. (10):1747-58.

Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C, Vaucheret H. (2000) AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 11650-11654.

Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES. (1996) Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 8449-8454.

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: 806-811.

Fire A. (1999) RNA-triggered gene silencing. *TRENDS GENET* 15: (9) 358-363.

Garcesorejuela C, Pound GS (1957) The multiplication of tobacco mosaic virus in the presence of cucumber mosaic virus or tobacco ringspot virus in tobacco. *Phytopathology* 47: (4) 232-239.

Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. 106(1):23-34.

Gonzalez CI, Bhattacharya A, Wang W, Peltz SW. (2001) Nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 274(1-2):15-25.

Gura T. (2000) A silence that speaks volumes. *Nature*. 404(6780):804-8.

Hamilton AJ, Baulcombe DC. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 286(5441):950-2.

- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ.** (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.
- Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ.** (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi . *Science* 293:1146-50.
- Hongwei Li, Wan Xiang Li, Shou Wei Ding.** (2002) Induction and Suppression of RNA Silencing by an Animal Virus. *Science* 296:1319-21.
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD.** (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293:834-8.
- Ingelbrecht IL, Irvine JE, Mirkov TE.** (1999) Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection Of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. *Plant Physiol.* 119: 1187-1198.
- Jacobsen SE, Running MP, Meyerowitz EM.** (1999) Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development.* 126:5231-5243.
- Jeddeloh JA, Stokes TL, Richards EJ.** (1999) Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat Genet.* 22: 94-97.
- Kasschau KD, Carrington JC.** (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *CELL* 95: (4) 461-470.
- Kasschau KD, Carrington JC.** (2001) Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology.* 285(1):71-81.
- Kasschau KD, Cronin S, Carrington JC.** (1997) Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 228(2):251-62.
- Ketting RF, Haverkamp TH, van Luenen HG, Plasterk RH.** (1999) Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 15;99(2):133-141.
- Ketting RF, Plasterk RH.** (2000) A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature.* 404(6775):296-8.
- Knight SW, Bass BL.** (2001) A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *SCIENCE* 293(5538):2269-71.
- Konieczny A, Ausubel FM.** (1993) A procedure for mapping *arabidopsis* mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* 4: (2) 403-410.

- 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.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T.** (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 294(5543):853-8.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP.** (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 294(5543):858-62.
- Lee RC, Ambros V.** (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 294(5543):862-4.
- 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.
- Llave C, Kasschau KD, Carrington JC.** (2000) Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *P NATL ACAD SCI USA* 97: (24) 13401-13406.
- Lu RF, Li WM, Wang HY, Guo M, Peng XX.** (2001) [The primary role of central region of HC-pro of potato Y potyvirus in synergism of plant viruses] *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 17(3):264-8.
- Maia IG, Bernardi F.** (1996b) Nucleic acid-binding properties of a bacterially expressed potato virus Y helper component-proteinase J *GEN VIROL* 77: 869-877.
- Maia IG, Haenni AL, Bernardi F.** (1996a) Potyviral HC-Pro: A multifunctional protein. *J GEN VIROL* 77: 1335-1341.
- Mallory AC, Ely L, Smith TH, Marathe R, Anandalakshmi R, Fagard M, Vaucheret H, Pruss G, Bowman L and Vance VB.** (2001) HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *THE PLANT CELL* 13(3):571-83.
- Miura A, Yonebayashi S, Watanabe K, Toyama T, Shimada H, Kakutani T.** (2001) Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature.* 411(6834):212-4.
- 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.
- 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, Vaucheret H.** (2000) *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101: 533-542.
- 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 plants. *Plant Cell* 2: (4) 279-289.

- Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E.** (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 14687-14692.
- Paoluzi S, Castagnoli L, Lauro I, Salcini AE, Coda L, Fre' S, Confalonieri S, Pelicci PG, Di Fiore PP, Cesareni G.** (1998) Recognition specificity of individual EH domains of mammals and yeast. EMBO J 17(22):6541-50.
- Qiu W, Park JW, Scholthof HB.** (2002) Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. Mol Plant Microbe Interact. 15(3):269-80.
- Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC.** (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. Science 276: 1558-1560.
- Riechmann JL, Lain S, Garcia JA.** (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. J GEN VIROL 73: 1-16.
- Rochow WF, Ross AF** (1954) Relative concentration of potato virus-X in double and single infections. Phytopathology 44: (9) 504-504.
- Rochow WF, Ross AF, Siegel BM** (1955) Comparison of local-lesion and electron-microscope particle-count methods for assay of potato virus-X from plants doubly infected by potato virus-X and virus-Y. Virology 1: (1) 28-39.
- Rochow WF, Ross AF.** (1955) Virus multiplication in plants doubly infected by potato virus-X and virus-Y. Virology 1: (1) 10-27 1955.
- Romano N, Macino G.** (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. Mol Microbiol. 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.
- Rossi M, Araujo PG and Sluys MAV.** (2001) Survey of transposable elements in sugarcane expressed sequence tags (ESTs) . Genetics and Molecular Biology 24(1-4) 147-154.
- Saenz P, Quiot L, Quiot JB, Candresse T, Garcia JA.** (2001). Pathogenicity determinants in the complex virus population of a Plum pox virus isolate. MOL. PLANT MICROBE INTERACT. 14(3):278-87.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Savenkov EI, Valkonen JP.** (2001) Potyviral helper-component proteinase expressed in transgenic plants enhances titers of Potato leaf roll virus but does not alleviate its phloem limitation. Virology 283(2):285-93.
- Selker EU.** (1990) Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. Annu Rev Genet. 24:579-613.

- Selker EU.** (1997) Epigenetic phenomena in filamentous fungi: useful paradigms or repeat-induced confusion? *Trends Genet.* 13(8):296-301.
- Shi XM, Miller H, Verchot J, Carrington JC, Vance VB.** (1997). Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. *VIROLOGY.* 231(1):35-42.
- Shiu PK, Raju NB, Zickler D, Metzenberg RL.** (2001) Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell.* 107(7):905-16.
- Smardon A, Spoerke JM, Stacey SC, Klein ME, Mackin N, Maine EM.** (2000) EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol.* 10(4):169-78.
- Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC.** (1999) The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell.* 15;99(2):123-32.
- 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.
- Urcuqui-Inchima S, Maia IG, Arruda P, Haenni AL, Bernardi F.** (2000) Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding *VIROLOGY* 268: (1) 104-111.
- 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.* (4):291-9.
- van WR, Dong X, Liu H, Tien P, Stanley J, Hong Y.** (2002) Mutation of three cysteine residues in Tomato yellow leaf curl virus-China C2 protein causes dysfunction in pathogenesis and posttranscriptional gene-silencing suppression. *Mol Plant Microbe Interact.* 15(3):203-8.
- Vance V, Vaucheret H.** (2001) RNA silencing in plants - defense and counterdefense. *Science* 292: 2277-80.
- Vance VB, Berger PH, Carrington JC, Hunt AG, Shi XM.** (1995) 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology.* 206(1):583-90.
- Vance VB.** (1991) Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y. *Virology.* 182(2):486-94.
- Vaucheret H, Fagard M.** (2001) Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet.* 17(1):29-35.
- Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC.** (2000) A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell.* 103(1):157-67.

- Waterhouse PM, Wang MB, Lough T.** (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*. 411(6839):834-42.
- Wu-Scharf D, Jeong B, Zhang C, Cerutti H.** (2000) Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science* 290: 1159-62.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP.** (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33.
- Zhao Z, Cao Y, Li M, Meng A.** (2001) Double-stranded RNA injection produces nonspecific defects in zebrafish. *Dev Biol*. 229(1):215-23.