



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0806742-2 A2**

(22) Data de Depósito: 18/01/2008
(43) Data da Publicação: 13/09/2011
(RPI 2123)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/82
C12N 15/85

(54) **Título:** MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA MODULAR A VIA DE miRNA

(30) **Prioridade Unionista:** 18/01/2007 US 60/881,433, 18/01/2007 US 60/881,434

(73) **Titular(es):** Lionel Navarro, Olivier Voinnet, Plant Bioscience Limited

(72) **Inventor(es):** Lionel Navarro, Oliver Voinnet

(74) **Procurador(es):** Flavia Salim Lopes

(86) **Pedido Internacional:** PCT IB2008000987 de 18/01/2008

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/087562de 24/07/2008

(57) **Resumo:** MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA MODULAR A VIA DE miRNA. A presente invenção refere-se a um espectro específico de miRNAs de planta e animal que confere resistência aumentada a patógenos virulentos. Plantas deficientes de acúmulo de miRNA são hipersuscetíveis a patógenos bacterianos não-virulentos e bactérias virulentas suprimem as vias de miRNA por meio de proteínas tipo III secretadas (TTS) injetadas. Métodos e composições para modular a via de miRNA em plantas e animais são descritos, através dos quais os efeitos adversos sobre o desenvolvimento da planta e animal são evitados ou minimizados.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODOS E
COMPOSIÇÕES PARA MODULAR A VIA DE miRNA".

PEDIDOS RELACIONADOS

5 Esse pedido reivindica o benefício da patente U.S. Nº
60/881.443 e 60/881.434, ambos depositados em 18 de Janeiro de 2007,
que estão incorporados aqui por referência em suas totalidades.

CAMPO DA INVENÇÃO

Composições e métodos para conferir um amplo espectro de re-
sistência a patógeno, contra patógenos de animais e plantas.

10 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Nos anos recentes, houve uma avaliação continuamente cres-
cente da complexidade e dos efeitos pleiotrópicos do silenciamento de gene
e dos componentes do maquinário de silenciamento de gene. A partir de e-
feitos observados inicialmente através da supressão de transgene da ex-
15 pressão de gene endógeno em plantas de petúnia, surgiu uma percepção
mais clara de efeitos em plantas e animais que abrangem a defesa antiviral
e controle de transposons através de metilação de DNA dirigida por RNA.

RNA pequeno, Dicers e Argonautas: o núcleo bioquímico de silenciamento
de RNA

20 O "silenciamento de RNA" refere-se, coletivamente, a diversos
processos baseados em RNA em que todos resultam em inibição específica
para sequência de expressão de gene, tanto em níveis transcricional, de es-
tabilidade de mRNA ou traducional. Esses processos partilham três caracte-
rísticas bioquímicas: (i) formação de (ds)RNA de fita dupla, (ii) processamen-
25 to de dsRNA em dsRNAs pequenos com 20 a 26 nt com extremidades em
zigue-zague ("staggered ends"), e (iii) ação inibitória de uma fita selecionada
de dsRNA dentro de complexos efetores que atuam sobre RNA/DNA parci-
almente ou totalmente complementares. Apesar de vários mecanismos po-
derem gerar dsRNA, o processamento de sRNA e as etapas efetoras têm
30 um núcleo bioquímico comum. sRNAs são produzidos por enzimas do tipo
RNaseIII chamadas Dicers¹ com domínios distintos de ligação a dsRNA,
RNA helicase, RNaseIII e PAZ (Piwi/Argonauta/Zwille). Uma das duas fitas

de sRNA se liga a complexos efetores chamados RISCs (complexo de silenciamento induzido por RNA) que invariavelmente contêm um membro da família da proteína Argonauta (Ago). Agos têm um domínio PAZ que se liga a sRNA e também contêm um domínio PIWI que fornece atividade endonucleolítica ("slicer") para aqueles RISCs programados para clivar RNAs^{2,3}-alvo. De fato, Ago2 humana carregada com sRNA sozinha constitui um complexo de clivagem RISC competente *in vitro*, mas várias proteínas adicionais podem ser componentes funcionais de RISCs *in vivo*⁴.

Aqui, foram revisadas evidências recentes de que várias vias fundamentadas sobre o núcleo Dicer-Ago executam um conjunto diverso de funções biológicas dirigidas por sRNA em plantas superiores. Essas incluem a regulação de expressão de gene endógeno, repressão de transposon, defesa viral e formação de heterocromatina. O foco está, primariamente, sobre as plantas por que elas exibem um espectro quase completo efeitos de silenciamento de RNA conhecidos, mas as similaridades e as diferenças com outros organismos também são discutidas.

Vias de silenciamento de RNA desencadeadas exogenamente que resultam em clivagem de transcrito de transgenes que produzem dsRNA e IR-PTGS: úteis mas misteriosas

O silenciamento pós-transcricional de gene (PTGS) foi descoberto em *Petunia* transgênica como perda de ambas as expressões⁵ de transgene (tanto na configuração senso quanto antissenso) e de gene endógeno homólogo. Os loci de transgene frequentemente produzem dsRNA porque eles formavam arranjos com modelos de integração complexa^{6,7}. Além disso, a eficácia de PTGS era muito aumentada pela expressão senso e antissenso simultâneas⁸ ou pela produção direta de um dsRNA longo a partir de transgenes de repetição invertida (IR)⁹. O último processo, IR-PTGS, forma atualmente a base de RNAi experimental em plantas e envolve pelo menos duas classes de sRNA distintas denominadas (si)RNAs curtos de interferência. siRNAs de 21 nt são considerados guiar a clivagem de mRNA, enquanto que siRNAs de 24 nt podem mediar, exclusivamente, modificações de cromatina^{10,11}. Ambas as classes de siRNA se acumulam como popula-

ções ao longo da sequência completa de transcritos de IR. Embora amplamente usada como uma ferramenta de pesquisa, IR-PTGS permanece como um dos processos de silenciamento de RNA em planta menos compreendido (figura 1A). A figura 1A mostra como um construto de transgene de repetição invertida (IR), empregado tipicamente para RNAi em plantas, produz transcritos de fita dupla (ds) com braços perfeitamente complementares. Duas enzimas distintas similares à Dicer (DCL) processam os transcritos ds. DCL3 muito provavelmente produz siRNAs da classe de tamanho de 24 nt, que podem dirigir a modificação de DNA/histona e loci homólogos (veja Figura 3) e parece dispensar a clivagem de RNA. DCL4 é provavelmente a enzima preferida para a produção de siRNAs de 21 nt de extensão a partir do dsRNA. Uma fita de siRNA se incorpora em RISC carregado com AGO1 para guiar a clivagem endonucleolítica de RNA homólogo, levando a sua degradação. Ambas as espécies de siRNA são protegidas da degradação pela adição de conjuntos metila nas terminações 3' de cada fita de RNA, pela metiltransferase HEN1.

Portanto, até recentemente, nenhum mutante defeituoso nessa via tinha sido recuperado, apesar dos esforços consideráveis em vários laboratórios. Uma provável explicação é que os altos níveis de dsRNA produzidos em IR-PTGS promovem as atividades de Dicers e RISCs diferentes, que poderiam atuar normalmente em vias distintas, para mediar o silenciamento de maneira redundante. Análises recentes de "knockouts" combinatórios de Dicer em *Arabidopsis* suportam essa idéia^{12,13}. Entretanto, a enzima similar a Dicer4 (DCL4) parece uma enzima preferida para IR-PTGS por que ela foi especificamente necessária para acumulação de siRNA de 21 nt e silenciamento de um transgene IR¹⁴ específico para o floema, moderadamente expresso. DCL2 também pode estar envolvida em RNAi, por que ela processa alguns substratos endógenos de DCL4 em siRNAs de 22 nt de extensão na ausência de DCL4^{12,13}, embora permaneça obscuro se essas moléculas podem substituir funcionalmente os siRNA de 21 nt, produtos de DCL4.

S-PTGS e silenciamento transitório: introdução de RDR

Existem vários exemplos nos quais inserções de transgene de

cópia única que produzem transcritos senso desencadeiam PTGS. Essa via, senso (S)-PTGS, tem sido operada usando restreamentos genéticos futuros de *Arabidopsis* que forneceram observações sobre como o dsRNA é produzido (figura 1B). Esses restreamentos convergiram para a identificação da RNA polimerase RDR6 dependente de RNA, uma das seis RDRs^{15,16} putativas de *Arabidopsis*. RDR6 é acreditada reconhecer e usar como modelos certos transcritos de transgene com características aberrantes que incluem a ausência de 5''capping''. Por exemplo, a mutação de *Arabidopsis* XRN4, uma 5'-3' exonuclease que degrada mRNAs não protegidos, intensificou a acumulação de mRNAs de transgene não protegido. Isso favoreceu a sua conversão para dsRNA por RDR6 e a subsequente degradação de todos os transcritos de transgene através da via S-PTGS¹⁷. RDR6 muito provavelmente sintetiza fitas complementares a partir de seus modelos de RNA, resultando na produção de dsRNA, por que uma mutação missense no motivo GDD, essencial para a atividade catalítica de todas as RDRs caracterizadas, é suficiente para aliviar S-PTGS¹⁶.

Embora Dicer que produz siRNAs a partir de produtos de RDR6 continue a ser formalmente identificada, a acumulação de siRNA por S-PTGS em *Arabidopsis* requer a proteína "coiled-coil" de função desconhecida SGS3¹⁶, a RNaseD exonuclease WEX¹⁸, uma metil transferase HEN1¹⁹ específica para sRNA e a RNA helicase SDE3²⁰ putativa (figura 1B). Na Figura 1B, a via é mostrada como sendo produzida por RNAs com características aberrantes, embora eles possam ser disparos alternativos. As aberrações de RNA podem incluir a ausência de uma cauda poli-A ou a ausência de 5' "capping". A última levaria normalmente à degradação de RNA através da atividade da 5'-3' exonuclease XRN4. A ausência de XRN4 poderia promover o acúmulo de mRNA não protegido, desencadeando dessa maneira sua conversão para dsRNA pela ação combinada de RDR6, SGS3, SDE3 e, possivelmente, WEX. O dsRNA resultante é então processado por uma DCL, muito provavelmente DCL4 (veja o texto), produzindo siRNAs que são exclusivamente da classe de tamanho 21 nt e metilados por HEN1. Essas moléculas podem se engajar em dois conjuntos de reações. Primeiro, elas podem

ser usadas como iniciadores por RDR6 para reforçar a produção de dsRNA a partir de modelos de fita única através de um fenômeno conhecido como "transitoriedade" (veja Figura 2). Elas também podem se incorporar a RISC carregado por AGO1 para guiar a clivagem específica para sequência de RNA homólogo. Os produtos de clivagem resultantes podem ser percebidos como RNAs aberrantes e, assim, poderiam promover ainda a produção de dsRNA, resultando em uma reação amplificada.

Diferente de RDR6, SDE3 não é estritamente necessária para silenciamento de transgene e assim poderá determinar de maneira acessória as estruturas secundárias encontradas em modelos de RDR²⁰. Consequentemente, um homólogo de SDE3 é parte do complexo RDR de *Schizosaccharomyces pombe*²¹. SDE3 também poderá atuar em outras etapas do silenciamento de RNA por que a proteína homóloga Armitage é necessária para a reunião de RISC em *Drosophila*, um organismo privado de genes *RDR*²². WEX está relacionado ao domínio de exonuclease de *mut-7*, necessário para o silenciamento do transposon e de RNAi em *C.elegans*, mas seu papel em S-PTGS permanece ambíguo²³. A metilação catalisada por HEN1 das terminações hidróxi livres protege sRNAs de *Arabidopsis*, incluindo siRNAs de S-PTGS, da oligo-uridilação, uma modificação que promove sua instabilidade (veja a seção sobre miRNA do contexto abaixo)²⁴.

Em um rastreamento de mutante de S-PTGS, uma extensa série alélica de *ago1* foi recuperada, argumentando que entre os 10 parálogos AGO de *Arabidopsis*, AGO1 está especificamente envolvido nessa via^{25,26}. Até alelos fracos de *ago 1* perderam completamente os siRNAs de S-PTGS, sugerindo inicialmente um papel para AGO1 na produção de siRNA mais do que uma ação²⁶. Entretanto, desde que AGO1 é reconhecida agora como uma atividade slicer no miRNA de planta - e RISCs carregados com siRNA, a perda de siRNAs em *ago 1* também pode resultar de sua incorporação pobre em RISC, intensificando sua modificação. Entretanto, um papel para AGO1 na produção de siRNA - possivelmente ligado à síntese de dsRNA dependente de RDR6 - não pode ser excluído por que alguns mutantes *ago1* deficientes de acúmulo de siRNA de S-PTGS não mostram defeitos em IR-

PTGS²⁷.

RDR6, e talvez outros componentes de S-PTGS, também está envolvido no fenômeno de silenciamento relacionado, transitoriedade^{28,29}. Transitoriedade é a "transição" de siRNAs primários de regiões de direcionamento (que correspondem a um intervalo de sequência de um RNA direcionado) para siRNAs secundários fora do intervalo inicial (figura 2). A Figura 2 mostra como no silenciamento de RNA transitório, uma fonte de dsRNA de siRNAs primários promove a produção de siRNAs secundários em ambas 5' e 3' do intervalo inicialmente direcionado de um transcrito. A produção 5' siRNAs secundários (caso 1) pode ser explicada pela síntese da fita complementar dependente de RDR6/SGS3/SDE3 que é iniciada por um dos siRNAs primários. A produção de 3' siRNAs secundários (caso 2) não pode ser explicada por uma reação primada, e é possível que fragmentos de RNA que resultam da clivagem de transcrito dirigida por siRNA primário sejam reconhecidos como aberrantes, iniciando dessa maneira a síntese de dsRNA como em S-PTGS. As reações em 5' e 3' não devem ser consideradas mutuamente exclusivas, já que siRNAs produzidos em (2) podem iniciar a síntese posterior de dsRNA de acordo com o esquema descrito em (1). DCL4 é mostrada como envolvida putativamente na biogênese de 5' e 3' siRNA secundário. Diferente de siRNAs primários (que podem ter 21 nt e 24 nt de extensão), um siRNA secundário é exclusivamente da classe de 21 nt de extensão. Permanece não esclarecido se siRNAs primários com 24 nt podem desencadear o silenciamento de RNA transitório.

Em plantas, essa transição pode ocorrer tanto a 5' quanto a 3' do intervalo primário, possivelmente refletindo as atividades dependentes de iniciador e independentes de iniciador de RDR6. A transitoriedade serve como um mecanismo de amplificação de siRNA que também é responsável pelo extenso movimento de silenciamento através de plantas transgênicas³⁰. siRNAs secundários são exclusivamente da classe de 21 nt de extensão³⁰. Assim, dado que siRNAs de S-PTGS parecem se acumular como espécies de 21 nt³², que DCL4 produz os siRNAs de 21 nt a partir de transcritos de IR¹⁴ e que as atividades de DCL4 e RDR6 estão acopladas para a biogê-

se de siRNA de 21 nt que atua em *trans* (veja abaixo), é tentador especular que DCL4 também é a Dicer preferida para a produção de siRNA em ambos os S-PTGS e transitoriedade (figura 1B, 2).

Qual seria a função biológica de uma via amplificada e não autônoma da célula sobre siRNAs de 21 nt ? Pelo menos uma resposta é a defesa antiviral. siRNAs de 21 nt derivados de vírus se acumulam em células infectadas³¹ e plantas comprometidas pela função de RDR6 são hipersuscetíveis a vários vírus^{16,32}. Uma resposta amplificada de RDR iniciada por siRNAs virais (transitoriedade) e/ou produzidas por RNAs aberrantes derivados de vírus (via S-PTGS) poderão assegurar que o maquinário de silenciamento progride na mesma velocidade que as altas taxas de replicação do patógeno. Essa natureza sistêmica da resposta poderia imunizar as células que estão prestes a serem infectadas, resultando, em alguns casos, em exclusão viral. Consistente com essa idéia, os meristemas de *Nicotiniana benthamiana* com atividade comprometida de RDR6 podem ser invadidos por vários vírus, embora aqueles tecidos sejam normalmente imunes à infecção³³.

Vias de silenciamento de RNA endógeno envolvidas na regulação pós-transcricional

20 MicroRNAs

Em plantas, miRNAs são produzidos como espécies de sRNA de fita única de 20 a 24 nt, removidos de transcritos não-codificadores endógenos com extensa estrutura de repetição invertida. miRNAs atuam em *trans* sobre transcritos-alvo celulares para induzir sua degradação através de clivagem ou para atenuar a produção de proteína (figura 1C)³⁴. A Figura 1C mostra como transcritos de (pri)miRNA primário com estruturas de repetição invertida são produtos de RNA polimerase II (Pol II). A posição do miRNA maduro está enquadrada. A ação nuclear combinada de DCL1, HYL1 e HEN1 produz um miRNA maduro, metilado. Após a exportação nuclear, possivelmente medida pela exportina 5 homóloga de HASTY de *Arabidopsis*, o miRNA maduro associa-se a RISC carregado de AGO1 para promover dois conjuntos possíveis de reações que não são mutuamente exclusivas. Uma

primeira reação poderia levar à clivagem endonucleolítica de RNA homólogo, como dirigidas por siRNAs de 21 nt. Isso poderá resultar em um fragmento de clivagem poliuridilado 5' - uma modificação que talvez promova sua rápida transformação - e um fragmento 3' mais estável que poderá ser degradado pela exonuclease XRN4. O esquema também acomoda a possibilidade de que miRNAs maduros poderão ter efeitos específicos para sequência no núcleo (veja o texto). Essas atividades nucleares incluem a clivagem de RNA (após a incorporação em um RISC nuclear putativo) assim como a metilação de DNA.

Atualmente, aproximadamente 100 genes *MIRNA* de *Arabidopsis* que se distribuem em 25 famílias distintas foram identificados³⁵, mas possivelmente existam muito mais. miRNAs têm papéis biológicos importantes no desenvolvimento da planta e do animal, como evidenciados pelos acentuados defeitos de desenvolvimento da superexpressão de vários miRNA e de mutantes com perda de função³⁴. Por exemplo, os elementos-chave regulatórios da resposta da planta ao hormônio auxina, que especifica a forma do órgão e o eixo do corpo da planta, são controlados pelos miRNAs^{36,37}. miRNAs também regulam a acumulação de fatores de transcrição (TFs) envolvidos na identidade/número do órgão floral^{38,39}, forma da folha⁴⁰, assimetria abaxial/adaxial da folha^{41,42} e formação de raiz lateral⁴³. Além disso, D-CL1 e AGO1, envolvidos na via de miRNA, são eles próprios regulados por miRNAs^{44,45}. Entretanto, miRNAs de planta com alvos confirmados envolvidos no metabolismo primário e secundário foram identificados^{36,46}, indicando que seus papéis não estão confinados a ajustes do desenvolvimento. miRNAs devem, de fato, ter amplas implicações na fisiologia da planta e na adaptação ambiental.

Transcrição e biogênese de miRNA

A maioria dos genes de miRNA de planta e animal residem entre genes que codificam proteína ou dentro de íntrons⁴⁷. Muitos são, provavelmente, unidades de transcrição independentes e seus padrões de expressão geralmente mostram excelente especificidade do tipo tecidual ou até celular, em concordância com um papel na padronização e na manutenção

de estados celulares diferenciados^{48,49}. Entretanto, os fatores de transcrição ou mecanismos pós-transcricionais que especificam a expressão de gene de miRNA de planta permanecem desconhecidos. Muitos dos transcritos de miRNA primário humano (pri-miRNAs) são sintetizados pela RNA polimerase II (Pol II), devido ao fato de que pri-miRNAs têm 5' caps típicos em Pol II e caudas de poli-A, sua síntese é inibida por fármacos que inibem Pol II e Pol II é encontrada em seus promotores *in vivo*⁵⁰. Do mesmo modo, embora menos abrangente, as evidências também apontam para Pol II como a polimerase principal na produção de pri-miRNAs de planta³⁵.

10 Após a transcrição, pri-miRNAs de mamífero são processados através de uma via biossintética bem-definida. A RNaseIII Drosha e seu cofator essencial DGCR8/Pasha – ambos constituintes do complexo Microprocessador nuclear – catalisam cortes iniciais na base do "stem-loop" de pri-miRNAs para produzir pré-miRNAs. Os pré-miRNAs são processados por Dicer em miRNAs maduros após a exportação nuclear dependente de Exportina-5⁵¹. As plantas não têm um equivalente direto de Microprocessador. Em *Arabidopsis*, a biossíntese de miRNA depende especificamente de DCL1^{52,53}, que é necessária para o processamento gradual nuclear de pri-miRNAs. Se a própria DCL1 catalisa todas as reações envolvidas é incerto⁵⁴.

20 HASTY homólogo de exportina-5 de planta está envolvido na biogênese de miRNA⁵⁵, mas seu papel exato não está claro em mamíferos onde o produto pré-miRNA do Microprocessador é uma carga verificada experimentalmente⁵⁶. Mutantes *hasty* exibem acumulação diminuída de alguns, embora nem de todos, miRNAs em ambas as frações nuclear e citoplasmática⁵⁵. Essas

25 observações apoiam a existência de sistema de exportação de miRNA independentes de HASTY e questionam se miRNAs ou complexos contendo miRNAs são de fato cargas diretas de HASTY.

Em plantas e animais, o processamento de Dicer ocorre em associação com proteínas que se ligam a dsRNA específico. Primeiramente observado com o complexo Dcr2-R2D2 necessário para o carregamento de RISC na via de RNAi de *Drosophila*⁵⁷, isso também foi encontrado agora para o complexo Dcr1-Loqs envolvido na via de miRNA de *Drosophila*⁵⁸ e Di-

cer-TRBP assim como Dicer-PACT em células humanas^{59,60}. DCL1-HYL1 constituem um complexo similar que atua no processamento de pri-miRNA na via de miRNA de *Arabidopsis* (figura 1C)⁶¹⁻⁶⁴. Em todos os casos, Dicer produz um duplex entre o miRNA maduro (miR) e sua fita complementar (miR*)⁶⁵. A fita miR é geralmente menos estavelmente pareada em sua extremidade 5' e é, conseqüentemente, carregada como a fita-guia em RISC, enquanto que a fita miR* é degradada⁶⁶ (figura 1C). Na via de RNAi de *Drosophila*, R2D2 atua como um sensor de assimetria termodinâmica de siRNA duplexes e Loqs, TRBP, PACT e HYL1 podem possivelmente desempenhar papéis similares.

HEN-1 é um metil transferase que se liga a S-adenosil metionina (SAM) que metila as terminações 2' hidróxi de miR/miR* duplexes, uma reação aparentemente específica para o reino vegetal^{67,68}. A metilação protege miRNAs de atividades que uridilam e degradam sRNAs de planta na extremidade 3'²⁴, mas não é necessária para a clivagem guiada de miRNA dependente de RISC em extratos de *Arabidopsis* (Qi, 2005#5064). Todas as classes de sRNAs de plantas conhecidas são metiladas por HEN1²⁴, mas essa modificação parece impactar diferencialmente sobre a estabilidade de sRNA, talvez refletindo interações variáveis entre HEN1 e complexos distintos de proteína ou populações distintas de sRNA. Por exemplo, o supressor de silenciamento viral Hc-Pro previne a metilação de siRNAs derivados de vírus, mas não de miRNAs⁶⁹, e vários alelos mutantes de *hen 1* existem, nos quais a acumulação de miRNA, mas não de siRNAs de S-PTGS, é prejudicada¹⁹.

25 Atividades de miRNA de planta

A maioria dos miRNAs identificados de planta têm complementaridade quase perfeita com seus alvos e promovem sua clivagem. Isso é seguido pela oligo-uridilação e rápida degradação do fragmento de clivagem 5'⁷⁰ e a degradação lenta do fragmento de clivagem 3' mediada, pelo menos em alguns casos, por XRN4⁷¹ (figura 1C). miRNAs de animal exibem geralmente complementaridade imperfeita e reprimem a produção de proteína a partir de mRNAs-alvo intactos. Entretanto, é possível que a ação de ambos

os miRNAs de planta e animal resulte de uma combinação de ambos os processos, cujas respectivas contribuições provavelmente variam dependendo da extensão da complementaridade miRNA:alvo. Embora o(s) RISC(s) que atua(m) na via de miRNA de planta permaneça(m) mal definido(s), AGO1 se associa com miRNAs e os alvos de miRNA são clivados *in vitro* pela AGO1 purificada por imuno-afinidade. Assim, em plantas, o mesmo Argonauta parece funcionar como uma Slicer para ambos os miRNA e RISCs carregados com siRNA, contrastando com as situações em *Drosophila* e *C. elegans*. Componentes de RISC de planta diferentes de AGO1 aguardam identificação e pode ser até que vários RISC alternativos existam, dado o número de genes similares a AGO em *Arabidopsis*.

miRNAs maduros de planta são detectados em ambas as frações celulares nuclear e citossólica⁵⁵. Igualmente, RISC programado com miRNA de *let-7* pode ser imunopurificado a partir de frações celulares nucleares humanas⁷², indicando que miRNAs de planta e de animal podem ter funções nucleares (figura 1C). Essas podem incluir a clivagem de RNA, como sugerida pela atividade direcionada ao íntron de miR173 de planta⁷³, mas também pode compreender modificações de DNA homólogo⁷⁴. Assim, em *Arabidopsis*, o reconhecimento de miR165 do transcrito combinado *PHB* aparentemente direciona a *cis*-metilação sobre o DNA molde de *PHB*. Essa metilação é enigmática, entretanto, já que ela ocorre a vários kb a jusante do sítio de ligação de miRNA⁷⁴. É concebível que a clivagem induzida por miRNA do transcrito *PHB* nascente desencadeie a formação de dsRNA iniciada na terminação 3' do transcrito através de uma atividade de RDR independente de iniciador com processabilidade moderada. A produção de siRNA resultante poderá então estar confinada à terminação 3' e poderá mediar a metilação de DNA de acordo com esquemas discutidos em uma seção posterior dessa revisão. Intrigantemente, alguns, embora poucos, siRNAs correspondendo a partes a jusante de vários alvos de miRNA foram detectados em *Arabidopsis*, embora nenhum fosse diretamente complementar à sequência de *PHB* metilado⁷⁵. A metilação direta de DNA guiada por miRNA em *cis* e/ou em *trans* também foi sugerida a partir da observação de que al-

guns miRNAs de 21 nt de *Arabidopsis* acumulam-se como uma segunda espécie de 24 nt em estágios específicos do desenvolvimento⁶⁵.

siRNAs transatuentes: mistura de ações de miRNA e siRNA

siRNAs transatuentes (ta) são uma classe recentemente descoberta de sRNAs endógenos de planta. Eles derivam de transcritos não-codificadores, de fita única, os pri-tasiRNAs, que são convertidos em dsRNA por RDR6-SGS3, dando origem a siRNAs produzidos como espécies distintas em uma fase de 21 nt específica^{76,77} (figura 1D). A Figura 1D mostra como transcritos primários (pri) transatuentes de siRNA são RNAs não-codificadores desprovidos de extensas estruturas de "fold-back". Um miRNA incorporado em RISC carregado com AGO1 guia a clivagem endonucleolítica do pri-tasiRNA. Esse corte gera dois fragmentos de clivagem, um dos quais age como um modelo para RDR6, levando à produção de dsRNA. DCL4 inicia o processamento exclusivamente a partir de terminações de dsRNA que correspondem ao sítio de corte do miRNA inicial, para produzir tasiRNAs planejados em etapas que são metilados por HEN1. produzir tasiRNAs guiam, subsequentemente, a clivagem de mRNAs homólogos, logo incorporados em RISC carregado com AGO1. As reações coloridas descritas no enquadramento ilustram a importância do corte promovido do miRNA inicial na determinação do estágio apropriado para tasiRNAs (1). O planejamento incorreto (2) poderá resultar na produção de RNAs pequenos "off-target".

O envolvimento de RDR6-SGS3 é sugestivo da biogênese de siRNA em S-PTGS, mas as necessidades genéticas dessas vias não são idênticas, por que a acumulação de tasiRNA é normal no mutante hipomórfico *ago 1-27* e nos mutantes imperfeitos em *SDE3* e *WEX*⁷⁶. Muito similares a miRNAs de planta, tasiRNAs maduros guiam a clivagem e a degradação de transcritos celulares homólogos. Até agora, loci que gera tasiRNA (*TAS1-3*) foram identificados apenas em *Arabidopsis*⁷³, mas eles provavelmente existem em outras espécies de planta e possivelmente em outros organismos que contêm RDRs tais como *C. elegans* ou *N. crassa*.

A produção de tasiRNA envolve uma mistura interessante de

ação de miRNA e o maquinário da biogênese de siRNA. Pri-tasiRNAs contêm um sítio de ligação para miRNA que guia a clivagem em um ponto definido. O corte guiado do miRNA inicial tem duas consequências importantes. Primeiro, ele desencadeia a transitoriedade mediada por RDR6 sobre os produtos de clivagem de pri-tasiRNA, permitindo a produção de dsRNA tanto a 5' quanto a 3' do sítio de clivagem⁷³. Segundo, ele fornece uma terminação bem-definida para dsRNA importante para a exatidão de uma reação de "slicing" em estágios, realizada por DCL4, que produz tasiRNAs maduros (figura 1D).

Qual o papel biológico de tasiRNAs? *rdr6*, *sgs3* e *dcl4*, todos exibem acelerada transição da fase juvenil para adulta^{12,13,77,78}, indicando que tasiRNAs podem regular essa característica. Os alvos de tasiRNA incluem dois fatores de resposta à auxina (ARF)TFs e uma família de proteínas de repetição de pentatricopeptídeo, embora não haja evidência para o envolvimento de apenas um alvo funcionalmente caracterizado (ARF3/ETTIN) na transição da fase juvenil para adulta⁷⁹, nem foram observados defeitos heterocrônicos na inserção de mutantes que rompem os loci de *TAS1* ou *TAS2*^{76,78}. Mutantes em *AGO7/ZIPPY* exibem um defeito de transição de fase similar⁸⁰, sugerindo que *AGO7* poderia ser parte de um RISC programado para tasiRNA específico, embora tasiRNAs coimunoprecipitam com *AGO1* para formar um RISC competente para clivagem {Qi, 2005 #5064}.

Transcrito de siRNAs antissenso natural

Um exemplo foi descrito recentemente no qual um par de genes vizinhos sobre fitas opostas de DNA (genes *cis*-antissenso) dá início a uma espécie de siRNA único a partir da região de superposição de seus transcritos⁸¹. Essa espécie de siRNA de 24 nt – denominado de transcrito de siRNA antissenso natural (nat-siRNA) – guia a clivagem de um dos dois transcritos parentes e é produzido em uma via única que envolve DCL2, RDR6, SGS3 e a subunidade NRPD1a similar a RNA polimerase dependente de DNA atípico (veja a discussão de vias de silenciamento de RNA direcionadas à cromatina abaixo). A clivagem guiada por nat-siRNA desencadeia a produção de uma série de siRNAs de 21 nt planejados, secundários, uma reação similar à

biogênese de tasiRNA exceto que a Dicer envolvida é DCL1. O papel de nat-siRNAs secundários não está esclarecido atualmente, mas a clivagem guiada por nat-siRNA primário contribui para a adaptação ao estresse e, dado o grande número de pares de genes cis antissenso em plantas e outros genomas^{82,83}, esse exemplo isolado pode refletir um amplo mecanismo de regulação de gene.

Vias de silenciamento de RNA direcionadas para cromatina

Além de atuar sobre RNA, siRNAs podem orientar a formação de heterocromatina transcricionalmente silenciosa em fungos, animais e plantas. A heterocromatina de planta é caracterizada por dois conjuntos de modificações: metilação de citosinas e de resíduos de histona lisina específicos (histona 3 Lys9 (H3K9) e histona 3 Lys27 (H3K27) em *Arabidopsis*)⁸⁴. Em alguns organismos, essas modificações atuam como plataformas de união para proteínas que promovem condensação de cromatina. Citosina metiltransferases de *Arabidopsis* incluem o DRM 1/2 rigorosamente homólogo necessário para a metilação de todo DNA de novo, MET1 necessária para a manutenção replicativa de metilação em sítios CG e CMT3 necessária para a manutenção em sítios CNG e CNN assimétricos (revisados em^{85,86}). Histona metiltransferases envolvidas na metilação de H3K9 e H3K27 pertencem ao conjunto de homólogos de Su(Var)3-9 e incluem KYP/SUVH4 e SUVH2 em *Arabidopsis*⁸⁷.

Em vários organismos, siRNAs que correspondem a vários loci silenciosos endógenos incluindo retrotransposons, 5S rDNA e repetições centroméricas, foram encontrados⁸⁵. Eles são referidos como siRNAs cis-atuantes (casiRNAs) por que eles promovem modificações de DNA/histona nos loci que os geram. Em plantas, casiRNAs são metilados por HEN1 e são predominantemente de 24 nt de extensão. Seu acúmulo é especificamente dependente de DCL3 e, em muitas circunstâncias, de RDR2. A acumulação de casiRNA também requer uma isoforma (que contém as subunidades NRPD1a e NRPD2) de uma RNA polimerase dependente de DNA putativo e específico de planta, denominada PolIV⁸⁸⁻⁹⁰. PolIV pode atuar como um RNA polimerase específica para silenciamento que produz transcritos para serem

convertidos em siRNAs pelas ações de RDR2 e DCL3. Entretanto, muitos aspectos das atividades de silenciamento relacionadas à PolIV permanecem obscuras. Portanto, é incerto se PolIV possui de fato atividade de RNA polimerase. Além disso, uma isoforma distinta de PolIV com as subunidades NRPD1b e NRPD2 é necessária para a metilação promovida por siRNAs derivados de IR com homologia de promotor de transgene, sugerindo que a ação de complexos de PolIV pode não ser confinada à biogênese de siRNA⁹¹. Finalmente, a necessidade de NRPD1a para a acumulação de nat-siRNA na presença de ambos mRNAs antissenso (produzidos por PolII) sugere que PolIV pode ter funções relacionadas ao silenciamento independentes da atividade de RNA polimerase dependente de DNA⁸¹. Outros fatores envolvidos na metilação promovida por siRNA derivado de IR incluem o fator de remodelagem de cromatina DRD1⁹² e a histona desacetilase putativa HDA6⁹³, cuja atividade pode ser necessária para fornecer histona lisinas livres para metilação por enzimas KYP/SUVH (figura 3). Atualmente, é incerto se DRD1 e HDA6 também estão implicados no silenciamento de loci endógenos. siRNAs de 24 nt podem atuar em um complexo RISC, talvez relacionados ao complexo de silenciamento transcricional induzido por RNA, RITS, caracterizado na fissão de levedura⁹⁴. Esse complexo pode conter AGO4 por que mutantes de *ago 4* têm fenótipos que se superpõem com aqueles de *rdr2*, *dcl3*, *nrpd1a* e *nrpd2*¹¹. Nos loci afetados pelas mutações acima, a metilação de CNG e particularmente de CNN está acentuadamente reduzida, apesar da perda de metilação de CG ser menos pronunciada, consistente com a observação de que a metilação do promotor de CG dependente de MET1 pode ser mantida na ausência de um RNA viral codificado desencadeador de TGS⁹⁵.

O próprio DNA ou transcritos nascentes são ambos possíveis alvos de casiRNAs (figura 3A e 3B, respectivamente). Na Figura 3A, o transcrito polII/polIII nascente é clivado através da ação de AGO4 programada por siRNA, resultando em um RNA truncado que é convertido em dsRNA pela ação de RDR2. O dsRNA é então processado por DCL3 em siRNAs de 24 nt que direcionam depois a clivagem de transcritos nascentes e podem

guiar, possivelmente, atividades sequenciais de histona desacetilases (por exemplo, HDA6), histona metil transferases (por exemplo, KYP, SUVH2) e/ou DNA metiltransferases(CMT3/DRM). Não está claro se a modificação de histona precede a metilação de DNA ou não. O processo pode envolver
5 também fatores de remodelagem de cromatina promovidos por siRNA tais como DRD1. As posições de PolIVa e PolIVb naquelas reações estão atualmente mal definidos de forma inadequada.

Na Figura 3B, os mesmos efetores estão envolvidos, mas, nesse cenário, RDR2 usa transcritos nascentes como modelos e AGO4 carregada com siRNA é recrutada para guiar as modificações de cromatina mais
10 do que a clivagem de RNA.

Na via de RNAi heterocromática de *S. pombe* que resulta em metilação de H3K9 (mas não em citosina), a transcrição-alvo por PolII é necessária para a ação de siRNA e Ago1 se associa com transcritos nascentes⁹⁶. A metilação de histona dirigida por siRNA do promotor EF1 A humano também foi dependente da transcrição ativa de PolII⁹⁷. Entretanto, o pareamento de base direto de siRNA-DNA não pode ser excluído. Por exemplo, em experimentos que envolvem siRNAs direcionados por promotor derivado de vírus, o intervalo de DNA metilado sobre os promotores direcionados combina com a fonte de siRNA primário e não se estende adicionalmente sobre
20 quaisquer das regiões transcritas⁹⁵. Se siRNAs interagem de fato diretamente com DNA, como a dupla hélice se torna disponível para o pareamento com siRNA? PolIV poderia facilitar esse acesso, por exemplo, pelo deslocamento ao longo do DNA com helicases associadas. Os mecanismos moleculares precisos subjacentes ao recrutamento específico para sequência de
25 citosina e histona metiltransferases para silenciar loci também permanecem difíceis de entender, já que as associações entre siRNA e tais enzimas foram relatadas em apenas um único caso, em células humanas⁹⁷. De fato, uma alça autosustentável, na qual a produção de siRNA e a metilação de
30 DNA/histona são mutuamente dependentes, parece existir em loci silenciosos endógenos, surgindo a possibilidade de que a produção de siRNAs direcionados a cromatina *in vivo* podem mesmo ser uma consequência mais do

que uma causa da metilação de DNA/histona (figura 3).

A via de RDR2/DCL3/NRPD1/AGO4 tem papéis claros no controle de transposon e na manutenção da integridade do genoma em plantas, por que a perda de casiRNA causada pelas mutações nos fatores acima reativa a atividade de transposon. Essa via também pode manter a heterocromatina em repetições centroméricas, que parece ser mandatório para a segregação exata de cromossomo em *S. pombe*⁹⁸. O maquinário que gera siRNA de 24 nt também pode atuar para silenciar genes que codificam proteína. Por exemplo, a expressão do regulador-chave negativo de florescência *FLC* é mantido em nível baixo no ecotipo de *Arabidopsis* na florescência precoce devido à presença de um transposon intrônico que causa modificações repressivas na cromatina através da ação de uma via dependente de NRPD1a/AGO4⁹⁹. Entretanto, vários mecanismos adicionais, não necessariamente mediados por siRNAs, são responsáveis pela regulação epigenética de expressão de genes em plantas. Por exemplo, em *Arabidopsis*, a mutação do fator de remodelagem da cromatina DDM1 tem consequências muito mais amplas sobre o silenciamento da cromatina do que qualquer mutante simples conhecido no silenciamento do maquinário de RNA^{100,101}. Além disso, a regulação de gene por proteínas similares a polcomb em *Arabidopsis* não está ligada ao silenciamento de RNA¹⁰².

Tabela 1 Sinopse de proteínas com papéis em vias de RNA pequeno em *Arabidopsis*

Proteína	Domínios e motivos	Atividade bioquímica	Via	Ref.
DCL1	RNase III dsRNA bd DEAD-box helicase PAZ	Síntese de miRNA	miRNA nat-siRNA	55, 85
HYL1	DUF283(função desconhecida)	dsRNA bd	miRNA	61, 62
HST	dsRNA bd	Exportina putativa	miRNA	58
AGO1	RanGTP bd PAZ Piwi	siRNA Slicer miRNA Slicer	miRNA S-PTGS tasiRNA Cromatina(?)	
HEN1	dsRNA bd Lupus La RNA bd S-adenosil bd	sRNA metil transferase	Todas as vias de sRNA	19, 24, 53, 67
RDR6	GDD específica para RdRP	RNA polimerase dependente de RNA	S-PTGS Transitoriedade tasiRNA	15, 16, 29, 30, 73, 76, 85
SGS3	Coiled-coil Zn ^{II} putativa	Desconhecida	nat-siRNA S-PTGS Transitoriedade tasiRNA	16, 76, 85
DCL4	RNase III dsRNA bd Helicase PAZ	Síntese de siRNA de 21 nt	nat-siRNA tasiRNA IR-PTGS S-PTGS	12, 14
WEX	3'-5' exonuclease	3'-5' exonuclease putativa	S-PTGS	18
SDE3	Helicase DEAD Box	RNA helicase putativa	S-PTGS	20, 30
DCL2	RNase III dsRNA bd PAZ	Síntese de siRNA de 22/24 nt	S-PTGS Transitoriedade	85
DCL3	RNaseIII Helicase DEAD Box PAZ	Síntese de siRNA de 24 nt	nat-siRNA	
RDR2	RdRP	RNA polimerase putativa dependente de RNA	Cromatina	
AGO4	PAZ Piwi	Não esclarecida	Cromatina	11

Tabela 1 continuação

Proteína	Domínios e motivos	Atividade bioquímica	Via	Ref.
NRPD1a	RNA polimerase	RNA polimerase putativa dependente de RNA	Cromatina nat-siRNA	85, 88-91
NRPD1b	RNA polimerase	RNA polimerase putativa dependente de DNA	Cromatina	89, 91
NRPD2	RNA polimerase	RNA polimerase putativa dependente de DNA	Cromatina	88-91
HDA6	Histona desacetilase	Histona desacetilase putativa	Cromatina	93
DRD1	DNA relacionado a SNF2 e ATP bd Helicase	Remodelagem de cromatina putativa	Cromatina	92
CMT3	Citosina DNA metiltransferase Cromodomínio Domínio adjacente a Bromo	Citosina DNA metiltransferase	Cromatina	88
DRM1/2	Citosina DNA metiltransferase	Citosina DNA metiltransferase	Cromatina	88
MET1	Citosina DNA metiltransferase Domínio adjacente a bromo	Citosina DNA metiltransferase	Cromatina	88
KYP	Domínio SET Domínio Zn ^{II} -bd pré-SET Domínio Pós-SET Domínio YDG EF-hand	H3K9 metil transferase	Cromatina	87
SUVH2	Domínio SET Domínio Zn ^{II} -bd pré-SET Domínio YDG	H3K9 metil transferase	Cromatina	103

Resistência à doença em plantas e animais

Há uma extensa evidência de que a via de RNAi em planta desempenha papéis essenciais na defesa antiviral¹⁰⁴. RNA de fita dupla derivado de genomas virais é fragmentado em siRNAs pelas atividades redundantes de ambas DCL4 (a principal Dicer antiviral) e DCL2 (uma substituta de DCL4)¹⁰⁵. Esses siRNAs então incorporados em RISC (o Complexo de Silenciamento Induzido por RNA) para mediar a "slicing" de transcritos virais e dessa maneira reduzir a carga viral global em células de planta¹⁰⁵. AGO1 é provavelmente uma proteína efetora de RISC carregado com siRNA, embora outros parálogos de AGO também possam estar envolvidos¹⁰⁶. Um sinal de célula para célula e de longa distância para o silenciamento de RNA também explica a difusão sistêmica da resposta imune inata antiviral através das plantas¹⁰⁴. Como uma estratégia de contra-ataque, os vírus codificam proteínas supressoras que são direcionadas contra processadores e efetores principais de silenciamento antiviral. Por exemplo, a proteína P19 de tombusvírus sequestram siRNAs e previnem seu uso por RISC¹⁰⁷, a proteína 2b do vírus *Cucumber mosaic* interage fisicamente com AGO1 e inibe a atividade de clivagem¹⁰⁶, e a proteína P38 do *Turnip crinckle virus* (vírus do encrespamento do nabo) inibe acentuadamente a atividade de DCL4¹⁰⁵. DCL3 (que produz siRNAs heterocromáticos) e DCL1 (que produz miRNAs) não parecem ter um impacto significativo sobre a acumulação de vírus na planta.

Além da defesa antiviral, existe atualmente pouca informação disponível sobre o papel das vias de RNA pequeno na defesa contra outros tipos de patógenos incluindo bactérias e fungos, que são responsáveis pelas principais perdas econômicas mundiais. Em plantas, a resistência a bactérias e fungos tem sido mais exaustivamente estudada no contexto de interações específicas para o gênero, nas quais uma proteína de resistência (R) específica protege a planta contra um gênero particular de patógeno¹⁰⁸. Esse reconhecimento altamente específico leva à ativação de respostas de defesa e morte celular local referida como "resposta hipersensível" (HR). Um exemplo bem-caracterizado de indução de HR através de interação específica para o gênero é fornecido pelo gene *RPS2* de *Arabidopsis* que confere resis-

tência à cepa DC3000 de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst* DC3000) produzindo a proteína desencadeadora *AvrRpt2* correspondente. A presença de ambos os componentes RPS2 e *AvRpt2* levam à resistência, enquanto que a ausência de um ou outro componente leva à doença¹⁰⁸.

5 Ao lado da interação específica para o gênero está um mecanismo de defesa basal que desempenha um papel principal na "resistência não-hospedeira", que é responsável pelo fato da maioria das plantas e animais ser resistente à maioria dos patógenos. A defesa basal conta com ambas as respostas constitutiva e induzível. A resposta da defesa basal induzível é desencadeada após a percepção de estimuladores gerais conhecidos
10 como "padrões moleculares associados a patógeno" (PAMPs). Um de tais PAMP é um motivo conservado com 22 aminoácidos (flg-22) da flagelina bacteriana¹⁰⁹, que é reconhecido em diversas espécies de planta, incluindo *A. thaliana*. A percepção de flg-22 desencadeia uma resposta imune inata
15 em plantas que eleva a resistência a cepa virulenta *Pst* DC3000¹¹⁰. Como uma estratégia de contra-ataque, patógenos bacterianos evoluíram para suprimir as respostas de defesa basal pela injeção de proteínas TTS, referidas como "efetoras"¹¹¹. Esses efetores bacterianos são, portanto, fatores de virulência: sua ausência causa uma diminuição de sintomas da doença e uma
20 inabilidade geral do patógeno em proliferar sobre as folhas.

miRNAs e a resposta de defesa basal

Foi mostrado, recentemente, que miR393, um miRNA canônico e conservado de planta, é rapidamente induzido por flg-22, levando à repressão de toda a cascata de sinalização que normalmente orchestra a resposta ao fitormônio auxina¹¹². Esse relato é de Navarro, L., *et al.*, *Science* (2006) 312:436-439, incorporado aqui por referência. A repressão resultante da sinalização de auxina restringe o crescimento bacteriano, implicando a auxina na suscetibilidade a doença e a supressão da sinalização de auxina mediada por miRNA na resistência à doença. Teorizou-se que miR303 não
25 era um exemplo isolado e que um grande conjunto de miRNAs pode atuar como reguladores positivos da resposta de defesa da planta a patógenos.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Um espectro específico de miRNAs de planta e animal confere resistência aumentada a patógenos virulentos. Foi mostrado que plantas deficientes na acumulação de miRNA são hiper-suscetíveis a patógenos bacterianos não-virulentos. Como um corolário, foi mostrado que bactérias virulentas desenvolveram estratégias para suprimir a via de miRNA em plantas, por exemplo, pelo uso de algumas proteínas secretadas do tipo III (TTS) injetadas.

Em um aspecto, a invenção é promovida para um método de modular a via de miRNA em plantas e animais que compreende a introdução em uma planta ou animal de um construto de ácido nucleico, que compreende um promotor constitutivo ou responsivo a patógeno operativamente ligado a uma sequência de pri-miRNA responsiva-padrão molecular associada ao patógeno (PAMP) ou a uma sequência que codifica um componente envolvido na biogênese ou atividade de miRNA, incluindo ainda elementos *cis*-regulatórios dentro ou a 5' do dito promotor. Em uma modalidade particular, a via de miRNA modulada é diferente daquela de miR393. Em outra modalidade ainda, a dita via regulada inclui miR393.

Em uma modalidade, tal modulação da via de miRNA em plantas e animais é realizada de tal maneira que os efeitos adversos sobre o desenvolvimento da planta e do animal são evitados ou minimizados.

Em outra modalidade, são fornecidas composições e métodos para conferir resistência aumentada a patógenos, em plantas e animais, pela modulação seletiva da via de miRNA. Em uma modalidade, a via de miRNA modulada é diferente daquela de miR393; em outra modalidade ainda, a via inclui aquela de miR393.

A invenção fornece métodos para identificar compostos úteis na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais pelo uso de supressores derivados de bactéria de silenciadores de RNA como sondas moleculares. Tais fatores que silenciam RNA provavelmente interagem diretamente com alguns dos supressores de silenciamento bacteriano como descrito acima.

A invenção também é dirigida para a identificação de compostos

ou o estabelecimento de abordagens genéticas para agir contra a supressão bacteriana de silenciamento de RNA em ambas as células de planta e animal. As abordagens globais conferem resistência a patógenos de planta e animal.

5 As abordagens bioquímicas e genéticas conhecidas por aqueles versados na técnica são usadas para identificar alvos Bss adicionais. Essas abordagens incluem, mas não são restritas, a rastreamento de duplo híbrido de levedura de bibliotecas de cDNA de planta ou imunoprecipitações bioquímicas usando versões marcadas de Bss. Os componentes identificados
10 interagem (tanto fisicamente quanto geneticamente), possivelmente, com, por exemplo, DCL1, AGO1, HEN1, SERRATE e podem ser usados ainda para manipular especificamente atividades de miRNA, usando os métodos descritos acima. Significativamente, essas proteínas Bss também são usa-
15 das para inibir a função de miRNA em células de animais como observado com alguns supressores virais de silenciamento de RNA derivados de vírus patogênicos de planta que também são funcionais em células de animais.

 Outro aspecto da invenção tira vantagem da habilidade de Bss de suprimir o silenciamento de transgenes, intensificando dessa maneira a produção de proteínas recombinantes usando hospedeiros nos quais as pro-
20 teínas Bss são eficazes. Em uma modalidade, tais hospedeiros são plantas. A célula ou planta recombinante hospedeira é modificada para conter um sistema de expressão para a proteína desejada, tal como um terapêutico fundido com uma proteína Bss. Técnicas bioquímicas e de biologia molecu-
25 lar padronizadas são empregadas para construir sistemas de expressão adequados e para modificar células hospedeiras para a produção da proteína desejada. Alternativamente, construtos separados para a proteína Bss e pa-
30 ra a proteína desejada podem ser usados e cotransformados na mesma célula ou organismo. Em virtude da presença da proteína Bss, os mecanismos celulares que poderiam silenciar sua expressão são inibidos. Assim, o nível de produção é intensificado e, se a proteína desejada é produzida com uma sequência marcadora, a purificação é simplificada.

 Outra aplicação emprega a disponibilidade de proteínas Bss pa-

ra identificar compostos que reprimam a infecção bacteriana pelo rastreamento de candidatos a compostos para melhorar os efeitos de tais proteínas. Os compostos identificados também podem ser úteis em outras aplicações quando os mecanismos de silenciamento estão desejavelmente aumentados. Nesse método, os compostos que contra-atacam experimentalmente a supressão desencadeada por Bss de silenciamento de RNA e restauram um fenótipo da nervura clorótica normal são selecionados. Compostos endógenos que têm esse efeito também podem ser identificados pela mutagenização de plantas nas quais o silenciamento foi suprimido usando as proteínas Bss e pela identificação de alterações genéticas em plantas nas quais o silenciamento de RNA foi restaurado.

Além disso, pelo aumento constitutivamente ou condicionalmente da atividade dos componentes da via de miRNA identificados como aqui descrito acima, a resistência aumentada a um amplo espectro de patógenos é obtida em uma variedade de espécies de cultivo. Esse método também permite a resistência aumentada, induzível, que é desejável por que ela não é, ou é menos, prejudicial para o desenvolvimento e fisiologia da planta em condições não infecciosas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figuras 1A-1D mostram as vias de silenciamento de RNA pós-transcricionais em plantas. A Figura 1A mostra a via IR-PTGS; Figura 1B mostra a via S-PTGS; Figura 1C mostra a via de micro(mi)RNA; e a Figura 1D mostra a via transatruante (ta)siRNA; e a Figura 1D mostra a via transatruante (ta)siRNA.

Figura 2 mostra o silenciamento transitório de RNA.

Figuras 3A e 3B mostra o silenciamento de RNA atingido por cromatina, mostrando dois de vários cenários mutuamente exclusivos que possivelmente são responsáveis por modificações de cromatina direcionadas a siRNA em loci endógenos. Ambos os cenários são baseados em esquemas circulares e amplificados nos quais a produção de siRNA e a modificação de cromatina reforçam um ao outro.

Figura 4 mostra a super-representação de elementos W-box no

promotor AtmiR393b.

Figura 5 mostra formações típicas "stem loop" associadas com pri-miRNA.

5 Figuras 6A e 6B demonstram a suscetibilidade de mutantes deficientes em miRNA a patógenos fúngicos e bacterianos. A Figura 6A mostra a suscetibilidade a patógenos fúngicos e a Figura 6B a patógenos bacterianos.

10 Figuras 7A-7E mostram resultados experimentais que confirmam que a via de miRNA confere resistência basal assim como não hospedeira a bactérias.

Figura 8A-8D demonstram que a infecção por TuMV suprime a resistência basal assim como não-hospedeira a bactérias.

Figuras 9A-9C demonstram que a cepa virulenta Pst DC3000 pode suprimir indução de alguns miRNA responsivos a PAMP.

15 Figuras 10A-10D fornecem resultados experimentais que demonstram que PstDC3000 codifica a proteína secretada do Tipo III que suprime a biossíntese e/ou atividade de miRNA.

20 Figuras 11A-11F fornecem resultados experimentais que demonstram que HopT1-1 suprime uma função de silenciamento mediada por RISC^{miRNA}.

Figuras 12A-12D apresentam resultados experimentais que demonstram que a superexpressão de HopY1 suprime a função de RISC^{miRNA}.

25 Figuras 13A-13E apresentam resultados experimentais que mostram que HopU1 suprime a inibição traducional desencadeada de miRNA e siRNA.

MODOS DE REALIZAR A INVENÇÃO

30 Pela exploração dos elementos de resistência a patógeno e seu relacionamento com as vias de silenciamento, determinou-se vários fatores e métodos para aumentar a resistência de plantas e animais à infecção por patógeno, para identificar componentes críticos para a resistência e para rastrear compostos e agentes que são úteis na intensificação da resistência. Por exemplo, componentes conhecidos da via de miRNA (por exemplo, D-

CL1, AGO1, HEN1, SERRATE) e os componentes identificados como descrito aqui acima (por exemplo, AtGRP7, GRP8) são modificados tal que eles se tornam resistentes à ação de proteínas Bss. A manipulação de alelos resistentes desses componentes é obtida de acordo com métodos conhecidos por aqueles versados na técnica, incluindo, mas não limitado, a mutagênese direcionada ao sítio de aminoácidos-chave e transgênese assim como Targeted Induced Local Lesions in Genomes (TILLING) de espécies de cultivo não-transgênicas. O método descrito fornece resistência natural e/ou manipulada à ação de Bss e confere dessa maneira defesa basal aumentada a espécies de cultivo contra patógenos virulentos.

As sequências identificadas no Exemplo 1 abaixo e listadas na Tabela 2 que expressam pri-miRNA são operativamente ligadas a promotores adequados e usadas para modificar plantas para conferir resistência à infecção virulenta. Uma dessas sequências, miR393 foi anteriormente mostrada como sendo induzida transcricionalmente por flg-22. Sua superexpressão constitutiva confere resistência aumentada a *PstDC3000* virulento (Navarro, L., *et al.*, *Science* (2006)312:436-439). Sequências adicionais de pri-miRNA assim identificadas são usadas para elevar a resistência da planta contra um amplo espectro de patógenos. Essas sequências individuais ou em conjuntos, designadas pato-miRNAs ("patho-miRNAs"), são expressas transgenicamente em plantas usando métodos conhecidos por aqueles versados na técnica, tais como para a superexpressão de um dos dois *loci* de miR393 (Navarro, L., *et al.*, *supra*). A expressão dessas sequências (+40 nt a montante e a jusante) tanto é constitutiva quanto, preferivelmente, é dirigida por promotores que são amplamente conhecidos por serem responsivos a patógenos bacterianos, fúngicos e virais. Exemplos de tais promotores incluem, mas não estão restritos a WRKY6 e PR1. O método fornece resistência aumentada, induzível, o que é desejável por que ela não é, ou é menos, prejudicial ao desenvolvimento e fisiologia da planta em condições não-infectantes.

Além disso, vários desses pato-miRNAs são conservados através de espécies de planta (monocotiledôneas e dicotiledôneas), indicando

que pato-miRs derivados de *Arabidopsis* poderão ser diretamente eficazes em uma grande variedade de culturas.

São preparados construtos em que, em uma modalidade, um promotor responsivo constitutivo ou de patógeno (incluindo, mas não limitado, por exemplo, ao promotor WRKY6, o promotor PR1 e similares) está operativamente ligado a uma sequência de ácido nucleico que é transcrita em uma ou mais sequências individuais de pato-miR para conferir resistência a patógenos não relacionados em várias espécies de planta, incluindo cultivos.

Análises computadorizadas revelam uma super-representação de elementos regulatórios específicos localizados a 1,5 ou 2 quilobases (kb) a montante das estruturas "stem-loop" de pato-miR. Alguns desses elementos regulatórios foram descritos previamente: como um exemplo, o promotor *At-miR393a* responsivo a flg-22 contém 10 elementos W-box, enquanto que o promotor *At-miR393b*, que não é responsivo ao tratamento com flg-22, contém apenas 3 elementos W-box. Veja Figura 4. A Figura 4 mostra a super-representação do elemento W-box dentro da sequência promotora *At-miR393a*. 1,5 quilobase a montante da estrutura "stem-loop" de *At-miR393a* foram extraídos e analisados quanto a representação de elementos W-box. Em vermelho na figura e sublinhado na sequência fornecida abaixo está o núcleo da sequência do elemento W-box. Também foi identificado uma super-representação do elemento caracterizado AuRE responsivo à auxina assim como o elemento RY dentro de subconjuntos de promotores pato-miR. Além disso, foi encontrada uma super-representação de novos elementos referidos como elemento de MiRNA Induzido por Flg-22 (FIM). Esses últimos representam uma fonte original de elementos de DNA responsivos a patógeno a serem usados e manipulados em abordagens convencionais para intensificar a resistência a patógeno. Tais abordagens incluem a geração de segmentos quiméricos de DNA contendo múltiplas cópias desses conhecidos ou novos elementos *cis*-regulatórios. O método aqui descrito é assim usado para hiperinduzir especificamente a expressão de genes que codificam proteína ou genes que não-codificam proteína (por exemplo, genes de miRNA) em infecções por patógenos, em plantas, incluindo cultivos.

Assim, um promotor artificial responsivo a patógeno carregando múltiplas cópias de elemento FIM ou, alternativamente, um promotor nativo pato-miR, operativamente ligado a uma sequência codificadora de genes de defesa da planta ou a sequências não-codificadoras (por exemplo, sequências de miRNA) que desempenhem um papel na resistência à doença, podem ser usados no controle da expressão para resistência a doença. Essa abordagem permite a expressão condicionada e eficaz de genes que codificam proteína ou de genes que não-codificam proteína durante infecções por patógenos.

Como a via de miRNA é a principal via de silenciamento de RNA em vertebrados superiores, e como as células de mamíferos são comumente infectadas por patógenos bacterianos TTS, mecanismos similares de defesa/contradefesa são operacionais em mamíferos. Achados recentes também realçam o papel-chave de miRNAs na resposta imune inata de animal. Pelo uso de genes sensores de miRNA similares àqueles exemplificados aqui para *Arabidopsis*, mas incorporando componentes de bactérias patogênicas para seres humanos ou outros animais (por exemplo, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*), são testados métodos e composições que interferem com a atividade/biogênese de miRNA em células cultivadas humanas ou de animal. Proteínas efetoras TTS individuais que se responsabilizam por essa interferência e são os fatores-chave da virulência que neutraliza as respostas imunes inatas do mamífero à patógenos que ameaçam a vida são assim identificadas. Essa tecnologia fornece um método através do qual a transfecção de plasmídeos que codificam proteínas TTS individuais (junto com suas chaperonas correspondentes), em células humanas que expressam um sensor de miRNA que compreende as sequências de controle de expressão de geradores de miRNA em animal operativamente ligados a um construto de sequência repórter permite a identificação de agentes terapêuticos. Moléculas que interferem com a atividade da proteína TTS sem danificar as funções de miRNA celular são selecionadas como candidatas a um estudo posterior e de desenvolvimento de fármaco. Células humanas cultivadas coexpressando o sensor de miRNA e proteínas

TTS bacterianas são submetidas à liberação com alto ritmo de transferência de uma grande coleção de moléculas ativas. Aquelas moléculas que suprimem a expressão do sensor de miRNA são isoladas e testadas posteriormente quanto ao seu efeito terapêutico potencial como descrito acima.

5 Proteínas Bss de patógenos de mamíferos identificadas através dos métodos descritos aqui acima também são proteínas úteis para isolar componentes de animal envolvidos na biogênese e/ou atividade de miRNA usando abordagens bioquímicas e genéticas conhecidas por aqueles versados na técnica. Essas abordagens incluem, mas não estão restritas ao ras-
10 treamento de duplo híbrido de levedura de bibliotecas de cDNA de mamífero, imunoprecipitações bioquímicas e rastreamentos genéticos futuros para a perda da função de Bss em células mutagenizadas com sulfonato de etilmetila (EMS). Os componentes identificados possivelmente interage (tanto fisicamente quanto geneticamente) com, por exemplo, Dicer de mamífero,
15 Drosha de mamífero, TBP de mamífero, e podem ser usados ainda para manipular especificamente atividades de miRNA em mamíferos.

Usando os métodos de rastreamento de alta eficiência descritos aqui acima, são identificadas as moléculas ativas que promovem ou intensificam a atividade de componentes conhecidos da via de miRNA de mamífero
20 (por exemplo, Dicer de mamífero, Drosha de mamífero, TBP de mamífero) e dos componentes da via de miRNA de mamífero identificados acima. O tratamento de células humanas ou de outro animal com tais moléculas intensifica a defesa basal para uma ampla faixa de patógenos.

Pela intensificação, constitutivamente ou condicionalmente, da
25 atividade dos componentes da via de miRNA de mamífero identificados acima, é obtida uma resistência aumentada a um amplo espectro de patógenos em uma variedade de células hospedeiras de mamífero. A expressão condicionada é conferida, por exemplo, pelo promotor NF κ B. O método descrito possibilita assim resistência aumentada, induzível, o que é desejável por que
30 ela não é, ou é menos, prejudicial ao desenvolvimento e fisiologia da planta em condições não-infectantes. Os métodos dessa invenção são aplicáveis a todas as infecções que envolvem a injeção/liberação de fatores de origem

parasitária. Exemplos incluem fungos biotróficos tais como *E. cichoracearum*, um oídio que se superacumula sobre ambos os mutantes *hen1-1* e *dcl1-9* e portanto provavelmente secretam proteínas efetoras para suprimir as vias de silenciamento de RNA.

5 As proteínas Bss também podem ser usadas para inibir a função de miRNA a fim de alterar processos fisiológicos e de desenvolvimento normalmente orquestrados por essas pequenas moléculas de RNA. Isso é obtido pela fusão de sequências codificadoras de Bss com promotores específicos para tecido de planta conhecidos por aqueles versados na técnica (dirigindo a expressão em, por exemplo, raízes, folhas, caule e inflorescências),
10 que também podem incluir elementos promotores de pato-miR aqui identificados. O método aqui discutido possibilita, assim, a expressão específica para tecido de proteínas Bss para controle espacial e temporal da função de miRNA.

15 As proteínas Bss são usadas, assim, para suprimir o silenciamento de transgene e permitir alta expressão de quaisquer proteínas de interesse (por exemplo, moléculas terapêuticas). Em uma aplicação, construtos únicos ou múltiplos que carregam o(s) gene(s) de interesse e um construto que carrega um cDNA de Bss (por exemplo, HopU1) fundidos a um promotor
20 forte são coliberados na planta (usando um ensaio transitório mediado por *Agrobacterium*). Esse ensaio transitório pode ser realizado em folhas de *N. benthamiana*, na qual o ensaio transitório é mais eficiente, ou preferencialmente em culturas de célula de planta (tais como células Co1-0 de *Arabidopsis*). A(s) proteína(s) de interesse é (são) purificada(s) posteriormente
25 usando métodos conhecidos por aqueles versados na técnica e suas atividades biológicas testadas. O uso de culturas de célula de planta permitirá a produção de grandes quantidades de proteína recombinante. Além disso, esse sistema facilitará as etapas de purificação de proteína já que os materiais de partida conterão quantidades reduzidas de componentes derivados de
30 planta que são indesejados na purificação de proteína (por exemplo, polifenóis).

Versões mutadas de HopN1 (com substituições C172S, H238A

ou D299A, abolidas em suas atividades de cisteína protease) serão particularmente úteis para essa abordagem já que essas versões mutantes não serão, ou serão pouco, reconhecidas por proteínas resistentes (o que desencadeia a morte programada da célula hospedeira que poderia impactar negativamente sobre os rendimentos de proteína recombinante).

Outra aplicação está em um método para identificar compostos que agem contra a supressão do silenciamento de RNA bacteriano. Proteínas Bss e um construto sensor de miRNA (por exemplo, sensor 171) ou o transgene SUC-SUL (ou quaisquer outros construtos repórter de silenciamento) são coexpressos estavelmente em plantas e pulverizados com uma biblioteca de compostos para identificar as moléculas que agem contra a supressão do silenciamento de RNA desencadeado por Bss. Como um exemplo, as plantas SUC-SUL que expressam HopT1-1 apresentam um fenótipo atenuado para a nervura clorótica devido à supressão da atividade de RISC contendo AGO1. Essas plantas são pulverizadas com uma bateria de moléculas para identificar compostos que agem contra a supressão do silenciamento de RNA desencadeado por Bss e restaurar igualmente um fenótipo normal de nervura clorótica. Tais moléculas são usadas para conferir um amplo espectro de resistência a patógenos em várias espécies de planta incluindo cultivos.

Alternativamente, as plantas são mutagenizadas (usando métodos conhecidos por aqueles versados na técnica, tais como a mutagênese por EMS) para identificar mutantes nos quais o silenciamento de RNA é restaurado. Por exemplo, plantas SUC-SUL que expressam HopT1-1 são mutagenizadas e os mutantes que restauram o fenótipo da nervura clorótica normal isolados. Os genes correspondentes são identificados posteriormente usando métodos conhecidos por aqueles versados na técnica (por exemplo, clonagem baseada em mapa). Ortólogos de tais genes, em várias espécies de planta incluindo cultivos, são identificados e métodos usados para "knock-out" ou "knock-down" esses genes em particular são aplicados.

Como bactérias patogênicas de animal também usam o sistema de secreção tipo três para liberar as proteínas-chave de virulência, bactérias

patogênicas de animal (incluindo bactérias patogênicas humanas) também têm evoluído para suprimir o silenciamento de RNA. Tais genes de virulência bacteriana são fundidos com um promotor forte (por exemplo, CMV) e liberados em células de animais usando métodos conhecidos. Níveis de miRNAs endógenos assim como de alvos de miRNAs são monitorados para identificar proteínas que suprimem o silenciamento de RNA (como realizado em sistemas experimentais de planta descritos acima). Essas proteínas Bss, derivadas de bactérias patogênicas de animal, são posteriormente coexpressas em células de animais com um construto sensor de miRNA. Moléculas que restauram uma expressão normal do sensor de miRNA são posteriormente identificadas e usadas para conferir resistência aumentada a patógenos bacterianos. Tais moléculas representam, potencialmente, substitutos de antibióticos. Alternativamente, as células de animais acima são mutagenizadas usando métodos conhecidos por aqueles versados na técnica e os genes correspondentes identificados. Métodos que possibilitam o "knock-down" ou "knock-out" de tais genes são usados para elevar a resistência a patógenos bacterianos. Tais métodos incluem, mas não estão restritos a, uso de siRNAs artificiais dirigidos contra repressores endógenos da supressão desencadeada por Bss do silenciamento de RNA.

Os aspectos não limitantes da invenção são os seguintes.

1. Um método para modular a via de miRNA em plantas e animais que compreende a introdução em uma planta ou animal de um construto de ácido nucleico que compreende um promotor responsivo constitutivo ou de patógeno operativamente ligado a uma sequência que codifica miRNA ou uma sequência que codifica uma proteína efetora de miRNA, opcionalmente incluindo ainda elementos cis-regulatórios dentro ou a 5' do dito promotor.

Esse método pode ser planejado tal que os efeitos adversos sobre o desenvolvimento da planta ou do animal sejam evitados ou minimizados e pode fornecer resistência a patógeno aumentada após a expressão na dita planta ou animal, por exemplo, pelo emprego de sequências de controle induzíveis ou condicionais.

Nesse método, a proteína efetora é uma proteína descrita na Tabela 1, por exemplo, DCL1, AGO1, SERRATE e/ou HEN1.

2. Um método para identificar compostos úteis na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais pela monitoração da expressão em uma célula de planta ou animal de um transgene sensor que informa a atividade de miRNAs endógenos em resposta a perturbação causada pela exposição da dita célula de planta ou animal a um candidato a composto.

3. A invenção também fornece um supressor de silenciamento bacteriano, por exemplo, HopN1, HopH1, HopPto, HopT1, HopY1 ou HopU1 ou seus derivados funcionais.

Esses podem ser usados em um método para modular seletivamente a expressão de miRNA em uma célula pelo contato da dita célula com o supressor de silenciamento bacteriano.

4. Um método para identificar miRNAs associados com a resposta de uma planta ou animal a um estimulador patogênico. Uma planta ou um animal ou uma célula de planta ou de animal é exposta a um estimulador patogênico e comparada com uma planta ou um animal ou uma célula de planta ou de animal substancialmente idêntica não exposta ao estimulador patogênico. A flutuação transcricional de miRNAs computacionalmente preditos ou experimentalmente validados como transcritos primários é monitorada e comparada. A invenção também é dirigida a um miRNA isolado estimulado por patógeno assim identificado.

A invenção também é dirigida a um método para conferir resistência intensificada a patógeno sobre uma planta ou animal ou célula de planta ou de animal pela expressão efetiva de um miRNA estimulado por patógeno identificado acima. A expressão pode ser sob o controle operativo de um promotor que é ativado pela exposição ao patógeno, por exemplo, promotor WRKY6 ou promotor PR1.

Um ou mais elementos regulatórios cis-atuantes também podem ser fornecidos a montante ou incorporados dentro do dito promotor e da sequência que codifica miRNA. O elemento regulatório cis-atuante pode ser um W-box, um elemento AuxRE, um elemento RY, um elemento FIM, múlti-

plos desses elementos ou suas combinações.

5. Um método para determinar o papel de um miRNA pela supressão de miRNA em um célula que exhibe de outra maneira a expressão do dito miRNA pelo contato da dita célula com um supressor bacteriano de silenciamento (Bss).

6. Um método para modular a resistência em um animal à infecção por um patógeno, que compreende tanto intensificar a expressão de componentes da via de miRNA suprimidos pelas proteínas secretadas pelo dito patógeno quanto aumentar a resistência de componentes da via de miRNA à supressão por proteínas secretadas pelo dito patógeno.

7. Um método de conferir resistência em uma planta à patógenos que compreende selecionar plantas com componentes da via de miRNA resistentes à ação de supressores de silenciamento, tais como supressor bacteriano de silenciamento, e plantas selecionadas por esse método.

8. Um método para manipular, especificamente, a acumulação de miRNA a fim de alterar os processos fisiológicos e de desenvolvimento normalmente orquestrados por aquelas moléculas, pela fusão de uma sequência que codifica Bss com um promotor específico para tecido de planta que direciona a expressão em raízes, folhas, caule, inflorescências, opcionalmente incluindo elementos promotores de pato-miR para obter um controle espacial e temporal da atividade de miRNA.

9. Um método para explorar a supressão desencadeada por Bss da atividade de silenciamento de RNA sem reconhecimento pelas plantas. Isso inclui gerar mutantes que podem ainda suprimir as vias de miRNA e siRNA mas que não podem mais ser percebidos pelos genes R derivados de planta. HopN1 mutada nas tríades catalíticas pode ser usada por que esses mutantes suprimem a biogênese de miRNA no mesmo nível como faz HopN1 de tipo selvagem, mas não é percebida pelas proteínas R.

10. Um método para identificar componentes da via de siRNA e/ou miRNA pelo uso de proteínas Bss como sondas moleculares em ambas as células de planta e de animal e restaurar componentes que interagem fisicamente com tais proteínas.

11. Um método para suprimir a função de miRNA em células de animal pelo uso de proteínas Bss derivadas de bactérias patogênicas de planta tais como Pst DC3000. As proteínas são fundidas a promotores constitutivos humanos e transfectadas em células de animal a fim de suprimir a
5 função de miRNA. Isso pode ser usado em combinação com a expressão recombinante das proteínas desejadas.

12. Um método para superexpressar proteínas recombinantes (por exemplo, proteínas humanas com atividade terapêutica) em células de planta. Isso poderá ser realizado pela expressão de proteínas Bss que ini-
10 bem o silenciamento de transgene. Essa abordagem é realizada preferencialmente em culturas de célula usando um ensaio transitório de *Agrobacterium*. As proteínas recombinantes purificadas são testadas posteriormente quanto as suas atividades biológicas e usadas como medicamentos.

13. Um método para identificar moléculas que promovem a
15 transcrição de fatores endógenos envolvidos na atividade de biogênese de miRNA. Um método emprega construtos nos quais as sequências de controle da expressão de miRNA são acopladas com sequências repórter. Outro método emprega construtos repórter que são silenciados pelo miRNA. No primeiro caso, as moléculas ou alterações genéticas que aumentam a ex-
20 pressão de repórteres são intensificadoras da expressão de miRNA. No segundo caso, o oposto é verdade.

14. Um método para identificar compostos que agem contra a supressão desencadeada por Bss do silenciamento de RNA tanto em células de planta quanto de animal. Essa abordagem compreende o uso de células
25 de planta ou de animal que coexpressam um construto repórter de silenciamento de RNA com uma proteína Bss. As moléculas que restauram a expressão normal do gene repórter de silenciamento de RNA são identificadas e usadas para elevar a resistência a bactérias em plantas e animais. Tais moléculas podem ser usadas como antibióticos em células de animais. Al-
30 ternativamente, repressores endógenos da supressão desencadeada por Bss de silenciamento de RNA são identificados pelo uso de mutagênese das ditas linhagens de célula de planta ou animal que coexpressam um construto

repórter de silenciamento de RNA e uma proteína Bss.

15. As abordagens aqui descritas são usadas para identificar proteínas secretadas a partir de parasitas que podem suprimir as vias de silenciamento de RNA.

5 Os exemplos a seguir são oferecidos para ilustrar mas não limitam a invenção.

EXEMPLOS

Os Exemplos mostram que 1) um espectro específico de miRNAs de planta confere resistência aumentada a patógenos virulentos; e que
10 2) plantas deficientes em acumulação de miRNA são hiper-suscetíveis a patógenos bacterianos virulentos e não-virulentos e que, como corolário, uma bactéria virulenta pode ter desenvolvido estratégias para suprimir a via de miRNA, por exemplo, pelo uso de algumas das proteínas secretadas tipo III (TTS) injetadas.

15 Todos os resultados abaixo são gerados em modelos da espécie *Arabidopsis thaliana*, como ilustrativos de plantas em geral incluindo cultivos. Embora as especificações dos exemplos que se seguem sejam fornecidas para capacitar plenamente aqueles versados na técnica a entender e praticar essa invenção, fornecer o melhor modo de praticar essa invenção e
20 fornecer uma descrição exaustiva da invenção, a invenção não deve ser interpretada como sendo limitada às especificações como delineadas nesses exemplos.

Exemplo 1

25 Um espectro específico de miRNAs de planta é regulado positivamente pelo peptídeo flg-22

Um conjunto de transcritos de miRNA primário foi identificado usando frações de RNA total isoladas de plantas naïve ou tratadas com flg-22. flg-22 é um peptídeo que estimula uma resposta a padrões moleculares associados a patógeno (PAMP). Complementos reversos com sequências
30 de 60 nt de extensão localizadas a montante de "stem loops" preditos e validados de pré-miRNA foram apresentados sobre um arranjo e usados como sondas para traçar o perfil de transcritos de miRNA primário após o trata-

mento com flg-22.

Como observado nos Antecedentes acima, miRNA é gerado inicialmente a partir de transcritos de RNA primário (pri-miRNA) que são subsequentemente clivados em transcritos de pré-miRNAs a partir dos quais os transcritos de miRNA são formados. Como os transcritos de pri-miRNA são caracterizados por uma estrutura "stem loop", como mostrado na Figura 5, a identificação de "stem loops" nas estruturas de RNA preditas permitiu a identificação de localizações putativas para localizações de pri-miRNA no genoma.

O método descrito acima foi aplicado para plantas de tipo selvagem assim como vários mutantes de silenciamento, incluindo *dcl4-1* e *dcl1-9*.

Foram identificados 68 pri-miRNAs, que são significativamente regulados positivamente após o tratamento com flg-22 em pelo menos um antecedente genético (tanto os antecedentes de Col-0, *dcl1-9* quanto de *dcl4-1*). Alguns desses transcritos de pri-miRNA primário não foram ainda descritos em outros relatos indicando que vários miRNAs são expressos especificamente após tratamentos de estresse biótico mas não em condições padronizadas de crescimento. A maioria desses precursores dá início a extensas estruturas de "fold-back".

As sequências dos 68 precursores de miRNA induzidos por flg-22 são mostradas na Tabela 2. As sequências destacadas em negrito são as sequências de miRNA maduras preditas.

Tabela 2

>mirspot730
 TTAGATCATCATCCATGGCACTGACGCCGTTACGGCAACTGCCGTAGACGTTGTTGTTGCCGTGA**ACGGC**
GTGAGTGCCGTAGATTATTGGCTTAT

>mirspot107/997/998
 TCTCGCTAGAGCTCTTCTCTCCCGGCTGTCTCCTGCCTCCTGCCTAAG**CGATGGCCTGGAGAGTGCTCTAGT**
 GGTG

>mirspot156
 GAGTGATAGCCAT**TGGCATGGAAGAAAGTGAGATT**TGCCTCAATCGATCGTGAATCAAAACCTTATGATTA
 TCACTGCAAGCTTTACCTTCTTCTTAGCCATGATTATCACTG

>miRspot193
 ATCAAGTGTGGGG**TGTCGAGAGTCTTTAGATTTGGT**GTGAATAAATCTGACAATTTGGATTGAACTCTGCT
 TTGACATCCTGACATTAGAA

>miRspot894 (mi398c)=miRspot4=895=402=896
 TGGATCTCGACAGGTTGATATGAGAACACACGAGCAATCAACGGCTATAACGACGCTACGTCATTGTTAC
 AGCTCTCGTTTCA**TGTCTCTCAGGTCACCCCTGCT**GAGCTCTTT

>AtmiR398a
 TTCAAAGGAGTGGCATGTGAACACATATCCTAIGGTTTCTTCAAATTTCCATTGAAACCATTGAGTTTT**GT**
GTTCTCAGGTCACCCCTTIGAACTT

>miRspot701/703/704/706/709
 GTCACTGGACCGCAAGAGCATTGATAGGACTCACITCCATCTCCA**ATGTCTCATGAGGGTCCATGAC**

>mirspot711/712/713/325
 CTGTCACTGGACCGCAAGAACATTGATAGGGCACACTCCATCTCTA**ATGTCTCATGAGGGTCAATGACAC**

>mirspot326/715
 CTGGACCGCAAGAGCATTGATAGGGGTCCTCCATCTCCA**ATGTCTCATGATGCTCCATGA**

>AtmiR395f
 ATGTCCCTT**TGAGTTCCCTTAAACGCTT**CATTGTTT**CATACTTTGTTATCATCTATCGATCGATCAATCAAT**
 CTGATGAACA**CTGAAGTGT**TTGGGGGG**ACTCT**AGGTGACATC

>mirspot108
 TCGGGTTCT**CGGGTCCGGTTC**AAT**TCCGGT**TTTTGACCCGAACCTGTTTCCGTCTTCTTCTCAACGGTTAT
 GCTTCTGAAGTGATATCACCACTCTCTCTCGTCTGAACCTGAATTTCAACCCGACCCGACTCCA**ACTT**

>mirspot110/1002/460/miR160c
 CGTTAT**GCCTGGCTCCCTGTATGCC**ACGAGTGGATAACCGATTTGGTTTTAA**AAATCGGCTGCCGGTGGCGT**
 ACAAGGAGTCAAGCATGACCAG

>AtmiR393a (miRspot90)
 GCAACTAGAGGAAGGAT**TCAAAGGGATCGCATTGATC**CTAATTAAGGTGAATTC**CCCCATATTTCTTTA**
 TAATTGGCAAATAAAATCACA**AAAATTTGCTTGGTTTTGGATCATGCTATCTCTTTGGATT**CATCCTTCGGT
 AGCT

>miRspot255/mirspot1102
 GATGTGTCTATATCTTTCTCTATCCCCACTCCAATCAATTTCAAGTTATTATTA**AAATTATCTTGATTTCG**
 TAAAGAGTTAGTTTTG**TAAAGTACGTAAAATTTGAAAA**CAATTAATTA**AAAAATGAAGTTGGGTGGGGA**
AGAGGCAGATATGAACACGTAGTGAGGATA

>miRspot142/1016/1018
AAAGTTGTTTCGTTTGCCIGTCGCTGGTTCAACGACCAAAAGTAGCGACCAGCGACCCGAATTTTTGATCGC
TGAAATTTTTAGCGATCAGTCGCTGGTTTCAGCGATTAGTCGCT**GCTTTTGGTTCGCTGAATCCAGCGACAT**
GCAAACGAACAAC

>mirspot35/23 (miR405)
AATTAATAAGTTATGGGTTGACCAACCTATTTAACATA**ATGAGTTGGGTCAACCCATAACT**CATTTAAT
TT

>mirspot292
ATCTATAGCAGCAAAGCTTTTTTGTCATGAGAAGAAGAAGAATAAGAGGTCAAAGAAGATCTCTATT
ATGATGCTCCTTCTGAAGCT**TTGAGAAAGCATT**TT**TGTCGCAT**ATGGGTTT

>miRspot300
CCTATGTCCTCATAACACACATTCTCTCAAA**ACTCATT**TT**CTTCGTC**CCGGT**CCCC**CTCTTTAAATAGCGCT
TCTCTCCCTT**CATT**CATAACATACAT**TGAT**CACATCCATGAAGAAGGAGAGGAAGAGACAAGTACAGGAGGA
GGAGGAGGAGAAGGAGGTGGAGGTTGTTGTGGTGGATGCCTGA

>miRspot495/496/497 (At-miR396b)
ATCCIGGTCATACT**TTCCACAGCTTTCTTGA**ACTTTCTTTTT**CATT**CCATTGTTTTTTTTCTTAAACAAA
AGTAAGAAGAAAAAACTTTAAGATTAAGC**ATTTT**GGAAGCTCAAGAAAGCTGTGGGAAAACATGACAAT
TCAGGGTT

>miRspot73/miR169a/384
CAACGGAGTAGAATTGCATGAAGTGGAGTAGAGTATA**ATGCAGCCAAGGATGACTTGCCG**GAACGTTGTTA
ACCATGCATATGAATAATGTGATGATTAATTATGTGATGAACATATTTCTGGCAAGTTGTCCTTCGGCTAC
ATTTGCTCTCTTCTCTCATGCAAAC**TTT**CTTG

>miRspot375
CCAAAAGTTGTTTGTTCCTATCGCTGATT**CAGCG**ACAAAAATTAGCGACAGTCGCCAGCGACTGCAATT
TTAGTCGCTGAAATTTTAGCGATCAGTCGTTGGTT**TCAGCG**ATTAGTTGCTGCTTTTGGT**CGCTGGATC**
CAGCGACATGCAAACGAACA**ACTTTG**

>miRspot383/miR419
GAA**ATTATGAATGCTGAGGATGTT**GTTATTACGAGCAATGAGATGCTTTTTTTTTAAAAA**AAAAA**TTTGGT
TGCTTGCTTGCAAGAGGACATCTTAGCATCAA**ATTG**

>miRspot1213
TTTTTTCTTAGCTTTCCAATCTCTGCC**TTTTCTCTGGTCT**CTATA**TCGTCGTTTTGCT**TACATTTGATTG
GGAGTAGTAAAGATGAAGAGAC**AGATCGGATCGGAGGAAGAGAG**GAAGAAGAGAGAAATGGT

>miRspot658/275
CGCCTTCTTCC**TTCCCTAGT**CATTCACTCTTCTCTA**ACTTCGCTTTTTTTTT**TGGAGAGCAAAGGTGATGAT
GAATGCAGAGGAAGATACT

>miRspot441
TTCTGTTGCTTTGTCGCTGGCGACTGAAACCAGCGACAGCGACCAAAAGTTGTT**CGTTGCCTGT**CGCTGGT
TCAGCGACCAAA**ACTAGT**GACAGTCGCCAGCGACCGACCGCA

>miRspot316
TAATTTATTTGAGGGGAGAAAT**TTTGACACGGAAGCATAGCTCC**ATATCCTTCAATGGAGGTGIGGCTCT
TCAACAAAAATACCCCCCTCTTGA**AACTCTGTTT**CACCACACCTCCATTGAAGGACCTGAAGCTATGCTTC
CTTGTCATATTCTTACCATCAAATA**AAATGCT**

>miRspot64
TTTTAGAGGTGAATCTATTTTAGAGGCATTGTCTCCAATGGTCACTTCTAAAATAGAGTTTCTTCAAAA
TAGAGGAAAAATAGAGATGAATTGTAGAGATCTCTATTTATAGAGACAAAAAGTAAATATCTCTATTTTT
TCTCTATTATAGAGAACTCTATTTTAGAGGTGATCATTGGAGCACAATCCCTCCAAAATAGAA**TCACCT**
CTA

>miRspot919
TGCAGAATAAAAAATGAATAGACTAGAA**CAATGTAACAATGTATTTT**GTGTGGTATTT**ttggtcttggtcag**
ttctggtccc

>miRspot418/941 IGR At1g40143-136 and IGR At1g40129-131
AGGGTTTAGGGTTTAGGGTTTAGGGTTAAAGGTT**atggtttagggtttacggttt**
GGGTTTGGGATTTAGGGTATAGGGTTAGGCTAAAGAATTTATGATTTTATGTGTAGGATTGAATATAAAA
CTAGA**ACCTCAACA**AGATACCGAAGAGTGACCGAACTGCTCACGACGTTCTAA**ACCCAGCTCA**

>miRspot948 IGR At1g40118-112 and IGR At1g40135-137
ACTAGATGCTTTGTTTATCATTGAGCATAAGCACTAGAACCGCAACCGTATCCGGATGCCTAAAGTAGGA
TTTAGGTTTTAAAGTTTGGGAT**ttatggtttagggtttagggtt**TAAGGGTTTAGGGTTAACAGTTTATGGT
TTAGGGTTTAGG

>miRspot1169 IGR At3g30859-0867
TttcagaccaatgaggataggatatgaTTATTGGAGTCTCTAACAGGATTTACAAGCCAAGGIGAAAATGT
 AGGAATTACTCGTCCACCGAGTGGGTCTTGTACGCCCTCGATCATCTGATCCATCATCTGGTCCATC

>miRspot142 IGR At1g47370-At1g47380
 AAGTTGTTTCGTTTGCCITGTCGCTGGTTCAGCGACCAAAAGTAGCGACCAGCGACCGCAATTTTTGATCGCT
 GAAATTTTTAGCGATCAGTCGCTGGTTCAGCGATTAGTCGCT**gcttttggtcgctgaatcca**GCGACATG
 CAAACGAACAACCTT

>miRspot1019 IGR At1g72880-890
 AAAGTTGTTTCGTTTGCCITGTCGCTGGTTCAGCGACCAAAAGTAGCGACAGTCGCCAGCGATCAGCGACCGC
 AATTTTTGGTTCGCTGAAATTTTTAGCGATCAGTCGCTGGTTCAGCGATTAGTCGCT**gcttttggtcgctg**
gatccaGCGACAAGCAAACGAACAACCTTA

>miRspot1020 IGR At1g10680-690 mirSpot1019 paralog
 AAAAGTTGTTTGTTTGCCITATCGCTGATTAGCGACAAAAATTAGCGACAGTCGCCAGCGACTGCAATTTT
 TAGTCGCTGAAATTTTTAGCGATCAGTCGTTGGTTCAGCGATTAGTTGCT**gcttttggtcgctggatcca**
 GCGACATGCAAACGAACAACCTTTG

>miRspot953 IGR At1g40113-115 941/418 and 948 paralog
 CCGGATTCCGGAAGCTTAAAAGTATAATTTAGGTTTTAAAGTTTGGTATCTATTGTTTAGGGTTTAGGTTT
 AAGGTTTAGGGTTCAGAGTT**atgggttagggttacgggt**CCGG

>miRspot607 IGR At5g23220-23230
 ACTCTTAAATTTGGTAGATTCAAGTTTGATTCAACAATTTCTGGGTGTTGCAACGAATTTGATAGAAAATT
 TGGTAATTTAAAGG

>miRspot650 IGR At5g33250-251
 GGTTTCATTGCATATTTCTAAAACAAAGCAAAAAAAAAACAATGTCCGCCAGCTCGGGATCGATCGTTCC
 CGTTCAGCAGACGATTTTACTTCGTTGGATGAGTTTT**ggatcgatcgatccgaactgg**GGAACATTTTTT
 TTTTGGCTTTGTTTTCAGAAATATGCAATGCAAACA

>miRspot1018 IGR At1g35990-7000 paralog of miRspot 1019/1020
 AAGTTGTTTCGTTTGCTTGTTCGCTGGTTCAGCGATCAAAAGTAGCGACAGTCGCCAGGGACCAGCGACCGT
 AATTTTTGTCGTTAAAATTTTTAGCGATTAGTCGCT**gcttttggtcgctgaatcca**GCGACATGCAAACGA
 ACAACTT

>miRspot1147 IGR At2g07687-784
 TT**gggaggatgccggggtgtgct**AGTAAGCAAAATGGGAAGTTGATCCGATCTTAAGTAGCCCAGGATCCAT
 CCCAGG

>miRspot1204 IGR At5g06250-6260
 AGAATTGAAGATGCATGGAATGGTGTGTGGGAAAGGCAAAGCACCATGACTTCACAAGTTGCGTGAGGGCA
 AAGTATCTATTTTGGGTGAAACATTTTGCCCTCTCAGCCGTTGGATCTCTTTCTTCTTCAT**catcattc**
cgatcctctttIGTTC

>miRspot1208 At1g34844
 AGTTGTGCTCTTTG**agtaggaggaccattggggt**TACGGATGATGAGAGAGAGATCCATGGTGCATTCCA
 AACCAGGGTATCAGCTCCAGAACCAATCGATCTTCTTAGTTGGGACTAGCA

>miRspot1213 IGR At5g67411-420
 CGAGTCTTTGAGTTGAGTTGAGTCGCCGTCGG**ggtgaagcgaggtggtgag**CACCCAAATGATCTGTTGAG
 CCAACGTGGCGTCGTTTATTGATTCGATGGCGTTTTCGCAATGGAGGAGAAGCTGCTCCATGCAGTTAGCATCA
 CCGCTAAGAGATTTG

>miRspot199 IGR At1g480090-095
 TCTCTTAACTTTGATGAAACCTAGGCAATTGTCTCTTAGTTAAGAGATAA**ttggtcttggtttc**acccaaat
 tTAAGAGA

>miRspot205 IGR At2g01940-950
 ATCTCTCTCTCGTTTTTCATCATTTGTGCTAACACGCAGAGAGGTTTGCAGATTCTGCAGctatg**ttgt**
cacataaagagaggTGGAGAGAGAGAGAA

>miRspot258 At4g13900 pseudogene
 GAACTATCCTGGGTTTGAACTCGAGTGGTTTGTGGTATTGGACCTTCAAGCCTGTTGTAAGAGAAGTTTCAT
 CCGCGCTAGAAATGTGAGTTCCCGAGCTCTCTGGGATACTGCCGGATAATCTGTTTTGAGATAGATCCA
 ATG**attggagattgctcaagtttgat**AGAGATGGTGG

>miRspot298 IGR At1g01470-80
 AGGAGGATTTGAGTTTTGACATTCAGACGATAAAAATTATGAACTAGGTCTAGTCACGTGGTTCGACCGCT
 GAGAGTTTCCGGCGTGAAGTGAAGTAAAAT**tcagtagagcatgtgattgact**TGACCAAAGAGTCCAAAC
 CCACCA

>miRspot315 IGR At2g24780-790
GGGACIAAAATCCGTTATCCGCGGGTATTCCGAATCCGGATCCGTTGATCCGATCCGGAAAACCGAATAATTA
GGTCCGACGGATCCGGAT**acgagtcgagcgggatctgg**ATACGAGTCCG

>miRspot1174 IGR At3g10113-116
GTAGTCCGTTTGTGTGTCACITTTGGTTCGTCCG**gggttcgtagttttgagagat**ATCTTCGAGCTATCCCC
TACCTGGCGCGCCAACCTGTTGATGCACGAATCACACAAGTACGAAAATGGCATCTCTAGGGAAGGAAGAAG
AATCTTTCTAATTAATGACGAGCCCGCGACTTAGCGGAATTGGACGGATTAC

>miRspot352 IGR At4g06613-06614
TTTGGTGGACTATTTTCACTGGGAAGCATTGATTGTAT**ccccaatggtgagcatttggtg**GIGTTCGCCA
ATGTTGTGCATTTGTTGGTGTTC**cccc**AATGTTGAACATTTGGTGGTGTGCCCCATTGGTGGTGTTCCTAG
GCCTGAGATTTGTGTCGGACCGGT

>miRspot369 IGR At5g16470-560
CATATGATTGTTCCGGAACTTTACAGGCTTCTGTTAAATCTCTGTCCTGATTAGGCATGTTTGGTAAGCG
TATCTTTTGTGTTGAAGCCGTGGGGATTT**gaggaagagtgaaagtttctgca**ACTCATGTT

>miRspot582 IGR At1g06550-560
TAGATGGGCCTTGGGTTGCAAAGAAT**aagcccatatcattcagagc**TTTAATGACAGATGGGCCTTGGGTT
GCAATGAATAAGCCCATCACATTCAGAGCTTTAATGGTATATGGGCCTTAGGTTGCAAAGAATAAGTCCAT
CA

>miRspot155 IGR At4g11130-40
GTGATGATAGGAGCAAGAAAGAAAGTAAGAATTGCGTTGATCAGAAAATCAAGATATCCAACCTTGTGGAGG
TTTTGATTACAGATGCAATTCTCACCTTCTTCATGCCATGACCATCAC

>miRspot194 (At-miR404)
TCGAAACGAACACAAAACCTGCGGTTGCGACAGCGGCTGCGGCAACGTTGGCGCGACGAAACGAACAACA
ACCTGCGGCAGT**gttaccggtgcccgtgcccga**ACCAGCCGCTGCCGC

>miRspot1047 (At-miR404)
TCGAAACGAACACAAAACCTGCGGTTGCGACAGCGGCTGCGGCAACGTTGGCGCGACGAAACGAACAACA
ACCTGCGGCAGT**gttaccggtgcccgtgcccga**ACCAGCCGCTGCCGC

>miRspot29 (At-miR405a)
TCAAAATGGCTAACCCAACCTCAACTCAACTCATAATCAAATGAGTTTAGGGTTAAATGAGTTATGGGTTGA
CCCAACCCATTTAACAAAATGAGTTGGGTCAACCCATAACTCATTAAATTTGATG

>miRspot43 (At-miR405a)
TCAAAATGGGTAACCCAACCTCAACTCAACTCATAATCAAATGAGTTTAGGGTTAAATGAGTTATGGGTTGA
TCCAACCCATTTAACAAAATGAGTTGGGTCAACCCATAACTCATTAAATTTG

>miRspot506 (At-miR416)
CGAAACTGAACCCGGTTTGTACGTACGGACCGCGTCTGTTGGAATCCAAAAGAACC**gggttcgtagctacgc**
tggtcaTCC

>miRspot854 (At-miR166f)
AAGTTCAGGTGAATGATGCTCGGCTCGAGACCATTCAATCTCATGATCTCATGATTATAACCGATGATGATG
ATGATG**tcgGaccaggttcattcccc**TCAA

>miRspot76/92/74 (At-miR169d)
GTATCATAGAGTCTTGCATGGAAAATTAAGAATGAGATTGAGCCAAGGATGACTTGCCGATGTTATCAA
CAAATCTTAACCTGATTTTGGTGTCCGGCAAGTTGACCTTGCTCTGTTTCTTTCTTTTCTTTTCAATGTCA
AACTCTAGATAT

>miRspot512 (At-miR172e)
GTAGTCCGAGATGCAGCACCATTAAGATTACAAAGAGATGTGGTTCCCTTTGCTTTCGCCCTCTCGATCCGC
AGAAAAGGGTTCCCTTATCGAGT**ggaatcttgatgatgctgcat**CAGCAAATAC

>miRspot83 (At-miR394b)
CTTACAGAGATCT**ttggcattctgtccacctcc**TCTCTCTATATTTATGTGTAATAAGGTACGTATCTAC
GGTGTGTTTCGTAAGAGGAGGTGGGCATACTGCCAATAGAGATCTGTTAG

>miRspot182 (At-miR395e)
ATGTTTTCTAGAGTTCTCTGAGCACTTCATTGGAGATACAATTTTTTATAAAAATAGTTTTCT**actgaagt**
gtttgggggaactcccGGGCTGAT

>miRspot3 (At-miR397b)
TAGAAAACATAATTGAATGCAACGCTGATATATACTTCTTTAATTAATCAACAATGGAATAAAAATAAGT
AAAATTACATCAACGATGCACCTCAATGATGTTCAATCA

>miRspot5/4 (At-miR398b)
TGGATCTCGACAGGGTTGATATGAGAACACACGAGTAATCAACGGCTGTAATGACGCTACGTCATTGTTAC
AGCTCTCGTTTT**catgtgttctcaggtcaccctg**CTGAGCTCTT

```

>miRspot18/788 (At-miR405a)
TAAATGGTTAACCCATTTAACAATTCAACCCATCAAATGAAATGAGTTATGGGTTAGACCCAACTCATTTA
ACAAAatgagttgggtctaaccataaactCATTTAATTATAAACTCATTGATTATGAGTTGGGTTGGGT
GGGTTACCCATTTTGA
>miRspot383 (At-miR419)
AAAttatgaatgctgaggatggtgTTATTACGAGCAATGAGATGTCCTTTTTTAAAAAATTTGGTT
GCTTGCTTGCAAGAGGACATCTTAGCATCAAATTT
>miRspot690 (At-miR836)
ATTCGTTTTTAAAAGTCTCCACGCATCAAAGGAAACACAGGAAAACAGAGCATTATTTGATGGTAAGGA
ATATGACAAGGAAGCATAGCTTCAGGTCCCTTCAATGGAGGTGTGGTGAAACAGAGTTTCAAGAGGGGGTA
TTTTIGTTGAAGGACCACACCTCCATTGAAGGATATGGAGCTATGCTTCCGTGTCAAATATTTCTCCCTC
AAATAAATTATATCTCTTCTAGTGTTCCTTCGAT
>miRspot1039 (At-miR842)
GAGCTTCACTTTTCAATTGTCCATATTTGTTGACCTAAGAAAACATAAGTGGGATGACGGATCTGACCATG
ATGGTGTTCGATCCCTGGACAATAACTACATCATAATAAATTTCTGCAAaccatcatggtcggattca
TCATCCCGCTTATAGCTCTCTTTTCGAAAATGTTTCTGTCACCCTGAACGGTACTG

```

Entre os pri-miRNAs induzidos por flg-22, vários que correspondem a sequências maduras de miRNA são conservados no milho e no arroz.

- 5 O método mencionado anteriormente também pode ser usado para identificar o espectro completo de miRNAs estimulados por estimuladores comuns que exibem padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs) tais como flg-22.

- 10 Transcritos primários de miRNA suprimidos por proteínas supressoras tais como aquelas associadas com bactérias virulentas podem ser identificados pela estimulação de folhas Col-0 de tipo selvagem com Pst DC3000 *hrcC* (uma bactéria Pst DC3000 que não pode injetar proteínas supressoras nas células hospedeiras) e Pst DC3000 virulentas (que podem) por 6 horas e pela seleção posterior de transcritos primários de miRNA (u-
- 15 sando o método acima) que são regulados positivamente por Pst DC3000 *hrcC* mas não por Pst DC3000 virulenta como descrito abaixo. Como esses pri-miRNAs são transcricionalmente reprimidos por proteínas TTS de Pst DC3000, eles provavelmente atuam como componentes-chave da resposta de defesa antibacteriana. O método mencionado acima também pode ser
- 20 usado para identificar o espectro completo de transcritos de miRNA que são regulados positivamente por patógenos biotróficos e necrotróficos não relacionados assim como estresses abióticos.

Exemplo 2

Plantas mutantes com acumulação de miRNA comprometida são mais sus-

cetíveis a patógenos virulentos

Foi demonstrado o envolvimento da via de miRNA na resistência à doença da planta, pela estimulação de mutantes *hen1-1* e *dcl1-9* de *Arabidopsis* com um oídio virulento *Erysiphe cichoracearum* ou com *Pst*DC3000 virulenta. Foi encontrado que *hen1-1* é hiper-suscetível a ambos, fungo e bactéria, e que *dcl1-9* exibe suscetibilidade aumentada a *Erysiphe cichoracearum* e sintomas intensificados de doença após infecção com *Pst* DC3000 virulenta (figura 6A, B e C). Na Figura 6A, ambos *hen1-1* e *dcl1-9* são hiper-suscetíveis ao oídio. Plantas La-er com seis semanas de idade, *hen1-1* e *dcl1-9* foram infectadas com esporos de *E. cichoracearum* (isolado UEA) e o crescimento do fungo foi avaliado visualmente 10 dpi (painel superior). O crescimento fúngico e a esporulação também foram avaliados microscopicamente após a coloração da folha com trypan blue em 2-3 dpi (painéis inferiores).

Na Figura 6B, ambos *hen1-1* e *dcl1-9* exibem sintomas intensificados de doença avançada após a infecção com *Pst* DC3000. La-er, *hen1-1* e *dcl1-9* foram estimuladas com 10^5 unidades formadoras de colônia (cfu/ml) de *Pst* DC3000 e os sintomas da doença bacteriana avaliados visualmente em 3 dpi.

Como mostrado na Figura 6C, *Hen1-1* exibe títulos maiores de *Pst* DC3000. La-er, *hen1-1* e *dcl1-9* foram tratadas como na Figura 6B e o crescimento bacteriano medido em 4 dpi.

A intensificação constitutivamente ou condicionalmente da atividade/expressão de componentes envolvidos na atividade ou biogênese de miRNA, tais como DCL1, AGO1, SERRATE, HEN1, usando os métodos acima aumentando a resistência a um amplo espectro de patógenos é obtida em uma variedade de plantas, incluindo espécies de cultivo. O método descrito possibilita, assim, resistência aumentada, induzível, o que é desejável por que ela não é, ou é menos, prejudicial ao desenvolvimento e fisiologia da planta em condições não-infectantes.

Linhagens transgênicas de *Arabidopsis* carregando regiões 1,5 Kb a montante de genes envolvidos na biogênese e/ou atividade de miRNA

(por exemplo, DCL1) são fundidas com um sequência repórter. Essas linhagens transgênicas são usadas para rastrear compostos químicos que desencadeiam a regulação positiva de mRNA ou proteína repórter.

Isso é obtido pela monitoração de níveis de miRNA (usando métodos conhecidos por aqueles versados na técnica tais como análise Northern, análise por RT-PCR semi-quantitativa ou análise por RT-PCR quantitativa) após a exposição dessas linhagens transgênicas a uma biblioteca de agentes químicos. As moléculas que induzem os níveis de mRNA (ou proteína) repórter são usadas posteriormente para conferir resistência antibacteriana e antifúngica em uma variedade de espécies de plantas incluindo cultivo.

Exemplo 3

Plantas deficientes em miRNA são suscetíveis a bactérias não-virulentas

A indução, por flg-22, de um subconjunto de pato-miRs (veja Exemplo 1) sugere que a via de miRNA desempenha um papel importante na resistência basal a patógenos. Mutantes *dcl1-9* e *hen1-1* de *Arabidopsis* foram estimulados com *Pst* DC3000 deficiente em proteína secretada tipo três (TTS). *Pst* DC3000*hrcC*, uma cepa que em *Arabidopsis* de tipo selvagem é incapaz de produzir uma infecção efetiva, foi injetada nesses mutantes. Ambos os mutantes exibiram sintomas de doença desenvolvida, lembrando o fenótipo induzido pela bactéria virulenta sobre *Arabidopsis* de tipo selvagem (figuras 7A e 7B).

Na Figura 7A, ambos *hen1-1* e *dcl1-9*, mas não mutantes deficientes em si-RNA, estão comprometidos na resistência basal. Col-0, *dcl2-1*, *dcl3-1*, *dcl4-2*, *dcl3-1/dcl4-2*, *dcl2-1/dcl4-1*, *dcl2-1/dcl3-1/dcl4-2*, *rdr6-1*, *rdr2-1*, *La-er*, *hen1-1* e *dcl1-9* foram estimulados com *hrcC PstDc3000* em uma concentração de 10^6 unidades formadoras de colônia (cfu/ml) e os títulos bacterianos foram medidos 6 dpi.

Na Figura 7B, ambos *hen1-1* e *dcl1-9* exibiram sintomas de doença quando inoculados com a cepa *hrcC Pst* DC3000. As inoculações foram feitas como na Figura 7A e os sintomas da doença bacteriana foram avaliados visualmente.

Foi descoberto que a indução de WRKY30 (um gene marcador de defesa basal bem-caracterizado) estava comprometida em ambos os mutantes *hen1-1* e *dcl1-9* estimulados com *Pst* DC3000 *HrcC* (figura 7C), indicando uma perda de resposta de defesa basal naquelas plantas. Na Figura 7C, a indução do gene WRKY30 estava prejudicada em ambos *hen1-1* e *dcl1-9* tratados com a cepa *hrcC Pst* DC3000. As inoculações foram feitas como na Figura 7A e os níveis de WRKY30 foram analisados por RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) em amostras 12 horas após a inoculação.

Igualmente, ambos *hen1-1* e *dcl1-9* apresentaram infecção com o patógeno bacteriano não-hospedeiro de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (NPS3121) (figura 7D), que é normalmente virulento para feijões, mas não para *Arabidopsis*. Na Figura 7D, ambos *hen1-1* e *dcl1-9* estão comprometidos na resistência não hospedeira. *La-er*, *hen1-1* e *dcl1-9* foram estimulados com *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (NPS3121) em uma concentração de 10^6 unidades formadoras de colônia (cfu/ml) e os títulos bacterianos foram medidos 4 dpi.

A indução de WRKY30 também estava prejudicada após o estímulo com *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (NPS3121) (figura 7E). Na Figura 7E, a indução do gene WRKY30 estava prejudicada em ambos *hen1-1* e *dcl1-9* tratados com *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (NPS3121). As inoculações foram realizadas como na Figura 7D e os níveis de WRKY30 foram analisados por RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) em amostras 12 horas após a inoculação. Significativamente, resultados similares foram obtidos com *Pseudomonas fluorescence* não patogênica (dados não mostrados).

Também foi descoberto que o vírus TuMV (que codifica o supressor viral de silenciamento P1-HcPro) suprime a resistência basal à bactéria não-virulenta *Pst* DC3000 *hrcC* e *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (NPS3121), sugerindo que a supressão do maquinário de silenciamento de RNA deve desempenhar um papel fundamental na infecção polimicrobiana.

A Figura 8A mostra que a infecção por TuMV resgata sintomas

da doença bacteriana de Pst DC3000 *hrcC* mutante. Plantas Co1-0 foram tratadas com 10^6 cfu/ml de Pst DC3000 *hrcC* por 6 dias (painel esquerdo) ou SAP inoculado com TuMV por 7 dias e tratado posteriormente com 10^6 cfu/ml de Pto DC3000 *hrcC* por outros 6 dias (painel direito).

5 A Figura 8B mostra que a infecção por TuMV resgata o crescimento bacteriano de Pst DC3000 *hrcC* mutante. Plantas Co1-0 de tipo selvagem foram tratadas como na Figura 8A e os títulos bacterianos foram medidos 6 dpi.

10 A Figura 8C mostra que a infecção por TuMV resgata os sintomas de doença bacteriana de *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* (NPS3121) não-hospedeira. Plantas Co1-0 de tipo selvagem foram tratadas com 10^6 cfu/ml de *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* (NPS3121) por 4 dias (painel esquerdo) ou SAP inoculado com TuMV por 7 dias e tratado posteriormente com 10^6 cfu/ml de *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* (NPS3121) por outros 4 dias (painel direito).

15 A Figura 8D mostra que infecção por TuMV resgata o crescimento bacteriano de *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* (NPS3121). Plantas Co1-0 de tipo selvagem foram tratadas como na Figura 8C e os títulos bacterianos foram medidos 4 dpi.

20 Exemplo 4

Proteínas de Silenciamento Bacteriano Suprimem a Identificação de miRNA de Supressores de Silenciamento Bacterianos (Bss)

25 Também foi concluído a partir dos resultados do Exemplo 3 que patógenos, tais como vírus e bactérias virulentas, devem ter desenvolvido estratégias para suprimir os componentes do maquinário de silenciamento.

30 Para testar essa hipótese, foi investigado primeiro se Pst DC3000 virulenta poderia suprimir a transcrição de miRNAs responsivos a PAMP. Foi medido o impacto da liberação do efector Pto DC3000 (proteína TTS) sobre a expressão de pri-miRNA. Pto DC3000 virulenta, ou sua contrapartida não-virulenta Pto DC3000 *hrcC*, foi inoculada em plantas Co1-0 de *Arabidopsis* e os vários níveis de vários pri-miRNAs induzidos por Pto DC3000 *hrcC* (referidos como responsivos a PAMP) foram então monitora-

dos durante um período de tempo de 6 horas. Em plantas tratadas com Pto DC3000, a indução de pri-miR393a/b e pri-miR396b responsivos a PAMP foi significativamente suprimida 6 horas após a inoculação (hpi), como foi a indução dos marcadores de defesa basal *WRKY30* e *Flagellin Receptor kinase 1 (FRK1)* usados como controles internos (figura 9A). A Figura 9A mostra que a indução de miRNAs responsivos a PAMP é suprimida por Pst DC3000 virulenta. Folhas Co1-0 de tipo selvagem foram inoculadas com Pst DC3000 *hrcC* em uma concentração de 2×10^7 cfu/ml e os níveis de transcritos de miRNA primários responsivos a PAMP foram monitorados por RT-PCR semi quantitativa durante um período de tempo de 6 horas. Pri-miR166a foi usado como um controle negativo nesse experimento. Em contraste, os níveis de pri-miR166 e pri-miR173 insensíveis a PAMP permaneceram inalterados.

foram usadas então as linhagens transgênicas previamente descritas miR393a-p::eGFP e miR393b-p::eGFP, que reportam a atividade transcricional de miR393. Em 6 hpi, Pto DC3000 *hrcC* causou um aumento nos níveis de eGFP mRNA em ambas as linhagens transgênicas, indicando a presença de elementos responsivos a PAMP a montante de *MIR393a* e *MIR393b* (figura 9B). A Figura 9B mostra que Pst DC3000 suprime a indução de miR393a/b a nível transcricional. As linhagens transgênicas que expressam os transgenes mir393a-p::eGFP ou miR393b-p::eGFP foram tratados como na Figura 9A por 6 horas e os níveis de transcrito de eGFP foram monitorados por RT-qPCR. A quinase similar a receptor FRK1 foi usada como controle positivo nesse experimento. Entretanto, essa indução foi comprometida por Pto DC3000, como foi a indução do controle de FRK1. Como as duas bactérias diferem nas suas habilidades de liberar efetoras TTS em células hospedeiras, esses resultados sugerem que algumas proteínas bacterianas injetadas suprimem especificamente a ativação transcricional de pri-miR393a/b e talvez de outros miRNAs responsivos a PAMP.

Para identificar tais proteínas bacterianas, foram liberados efetores de Pst DC3000 individuais (dirigidos pelo promotor forte 35S) em folhas *efr1* mutantes, um mutante no qual o ensaio transitório com *Agrobacterium* é facilitado e os níveis de pri-miRNA responsivo a PAMP foram monitorados. A

liberação de AvrPtoB reduz significativamente os níveis de pri-miR393a/b e pri-miR396b sem efeito significativo sobre pri-miR166a insensível a PAMP (figura 9C). A Figura 9C mostra que AvrPtoB suprime a acumulação de pri-miRNAs responsivos a PAMP. Plantas mutantes Efr1 foram Agroinfiltradas em uma OD de 0,4 com 35S::GUSintron, 35S::AvrPtoB e os níveis de pri-miRNA monitorados por análise RT-PCR semi-quantitativa. Assim, AvrPtoB inibe potencialmente a expressão de miRNA responsivo a PAMP à nível transcricional.

Foi testado posteriormente se a via global de miRNA poderia ser afetada por efetores de *Pst* DC3000. Para esse propósito, foram geradas plantas transgênicas Col-0 que expressam um construto sensor que descreve a atividade de miR171. miR171, quando expresso, silencia um construto repórter de GFP. Tais plantas transgênicas expressam constitutivamente um gene repórter *GFP* no qual um sítio-alvo de miR171 é adicionado em 3'UTR do gene *GFP* (figura 10A). O sítio-alvo de miRNA foi modificado a fim de evitar a transitoriedade do transgene desencadeada por RDR6, como previamente descrito. Como miR171 é bem expresso em folhas, nenhum sinal de GFP pode ser detectado em condições de crescimento padronizadas. Folhas das linhagens sensoras de miR171 foram estimuladas com *Pst* DC3000 virulenta e *Pst* DC3000 deficiente em TTS não-virulenta e os níveis de GFP foram monitorados durante o decorrer do experimento. Foi encontrado que *Pst* DC3000 virulenta, mas não *Pst* DC3000, restaura a expressão do gene de GFP 24 horas após a inoculação (figura 10A). A Figura 10A mostra como *Pst* DC3000 restaura a expressão de GFP nas linhagens sensoras de miR171. Representação esquemática do construto sensor de miR171 (painel superior). Folhas de linhagens sensoras de miR171 foram inoculadas com "mock" (MgCl₂) (painel esquerdo), *hrcC Pst* DC3000 (painel central) e *Pst* DC3000 virulenta (painel direito). Fotografias foram feitas 30 horas após a inoculação (hpi). Nesse ensaio foi usada uma concentração de 10⁵ unidades formadoras de colônia (cfu/ml). Esse resultado indica que algumas proteínas TTS atuam como supressoras da via de miRNA tanto pela inibição da biogênese de miRNA quanto pela inibição da atividade de miRNA.

Exemplo 5

Identificação de Proteínas que Suprimem as Vias de miRNA

Para identificar tais fatores bacterianos, 23 genes individuais de efector de TTS (dirigidos pelo promotor forte 35S) foram transfectados transitoriamente em folhas mutantes de *Arabidopsis efr1* (figura 10B). A Figura 10B mostra que a acumulação de ambos miR173 e tas255 é parcialmente prejudicada em folhas que expressam hopN1, H1 e Pto. Os 23 construtos foram liberados transitoriamente em folhas de *Arabidopsis* usando transformação com *Agrobacterium* e uma análise Northern de baixo peso molecular foi realizada usando sondas de oligo complementares aos RNAs pequenos de miR173 e tas255). Os níveis de miR173 e Tas255 endógenos (que depende da atividade de miR173 para sua biogênese) foram monitorados. Foi encontrado que três daquelas proteínas (a cisteína protease HopN1, HopH1 e AvrPto) causaram uma diminuição significativa nos níveis do estado estacionário de miR173 e Tas255 (figura 10C). A Figura 10C mostra que a acumulação de miR173 e tas255 está drasticamente prejudicada em folhas que coexpressam hopN1 e hopH1. Uma liberação transitória de construtos que superexpressam hopN1 e hopH1 foi realizada como descrito na Figura 10B. A análise Northern foi feita como na Figura 10B. Além disso, esses efeitos foram aditivos depois da coliberação de HopN1 e HopH1, indicando que essas proteínas interferem, diretamente ou indiretamente, com fatores distintos do hospedeiro envolvidos no silenciamento de RNA. Ambas as versões de HopN1 de tipo selvagem e mutante, a última sendo alterada na tríade catalítica predita de cisteína (C172S, H283A e D299A resgataram a expressão de GFP quando liberada em plantas *efr1* transgênicas que expressam o construto sensor de miR171 descrito acima (dados não mostrados). Todas as versões mutantes de HopN1 eram estáveis *in planta* como ensaiado pela análise Western (dados não mostrados).

A Figura 10D mostra que a supressão desencadeada por HopN1 de silenciamento de RNA não necessita da atividade de cisteína protease. Plantas mutantes *efr1* que expressam o construto sensor de miR171 foram agroinfiltradas (OD=0,4) com 35S::GUSintron, 35S::hopN1-HA,

35S::HopN1 C172S, 35S::HopN1 H283A e os níveis de GFP foram analisados visualmente sob UV. Isso indica que a atividade de cisteína protease não é necessária para a supressão do silenciamento de RNA. Todas juntas, as proteínas TTS identificadas suprimem a biogênese de miRNA. Elas são assim referidas aqui como "Supressores de silenciamento bacteriano" (Bss).

As sequências de nucleotídeos (sequências codificadoras) das proteínas Bss que suprimem a biogênese de miRNA são as seguintes:

>sequência codificadora de AvrPtoB

```
ATGGCGGGTATCAATAGAGCGGGACCATCGGGCGCTTATTTTGTGGCCACACAGACCCCGAGCCAGTATC
GGGGCAAGCACACGGATCCGGCAGCGGGCCAGCTCCTCGAACAGTCCGCAGGTTTCAGCCCGACCCCTCGA
ATACTCCCCCGTTCGAACCGCGCCCGCACCCGCCAACCCGGACGTGAGAGGCTTTTCAGATCCACGGCGCTG
TCGGCCAAACCAGGGAGTGGCTGGAGCAGGGTATGCCTACAGCGGAGGATGCCAGCGTGCCTCCTAGGCC
ACAGGTGACTGCCGATGCCGCAACCGCCGCTGCAGAGGCAAGACGCACGCCCGAGGCAACTGCCGATGCCA
GCGCACC CGTAGAGGGGGCGGTTCACACGCCAACAGTATCGTTCAGCAAT TGGTCAGTGAGGGCGCTGAT
ATTTTCGATACTCGTAACATGCTCCGCAATGCAATGAA TGGCGACGAGTCGCTTTTCTCGAGTAGAACA
GAACATATTTCCGCCAGCAITTTCCCGAACATGCCCATGTCATGGAA TCAGCCGAGATTCCGGAAC TCGCTATCG
AGCTCCGTGGGGCGCTTCGTTCGAGCGGTTACCAACAGGCGGCGTCAGCGCCAGTGAGGTCGCCCCACGCCA
ACACCGGCCAGCCCTGCGGCATCATATCGGGCAGCAGTCAGCGTTCTTTATTGGACGGTTTGCCCGTTT
GATGGCGCCAAACCAGGGACGGTTCGTGCAACTGCCGCTCTCAGACGCCGGTTCGACAGGAGCCCGCCAC
GCGTCAACCAAAGACCCATACCGGTCGACAGGGCTGCGATGCGTAA TCGTGGCAATGACGAGGCGGACGCC
GCGCTGCGGGGGTTAGTACAACAGGGGGTCAATTTAGAGCACCTGCGCACGGCCCTTGAAAGACATGTAAT
GCAGCGCTCCCTATCCCCCTCGATATAGGCAGCGCGTTGCAGAATGTGGGAATTAACCCAAAGTATCGACT
TGGGGGAAAGCCTTGTGCAACATCCCCCTGCTGAATTTGAATGTAGCGTTGAATCGCATGCTGGGGCTGCGT
CCCAGCGCTGAAAGAGCGCCTCGTCCAGCCGTCCTCCGCTGGCTCCCGCGACCCCTCCAGGCGACCCGGATGG
TAGCGGTGCAACACGATTGCGGGTGATGCCGGAGCGGGAGGATTACGAAAATAATGTGGCTTATGGAGTGC
GCTTGCTTAACTGAAACCCGGGGTGGGGGTAAGGCAGGCTGTTGCGGCCCTTTGTAACCGACCCGGGCTGAG
CGGCCAGCAGTGGTGGCTAATATCCGGGCAGCCCTGGACCCCTATCGCGTCACAATTCAGTCAGCTGCGCAC
AATTTGAAAGCCGATGCTGAACTGAAAGAGCTGGGTTTAAAGGATGCGGCAGATCATCACACGGATGACG
TGACGCAC TGTCTTTTGGCGGAGAATTGTGCTGAGTAATCCGGATCAGCAGGTGATCGGTTTGGCGGGT
AATCCGACGGACAGTCCGAGCCTTACAGCCAAGAGGGAAATAAGGACCTGGCGTTTATGGATATGAAAAA
ACTTGCCCAATTCCTCGCAGGCAAGCCTGAGCATCCGATGACCAGAGAAACGCTTAAACGCCGAAAATATCG
CCAAGTATGCTTTTAGAATAGTCCCCTGA
```

10 **>Sequência codificadora de HopH1:**

```
ATGATCACTCCGTCTCGATATCCAGGCATCTATATCGCCCCCTCAGTAACGAACCGACAGCAGCTCACAC
ATTTAAAGAACAAGCAGAGGAAGCACTTGACCATATCAGCGCCGCACCCTCTGGCGATAAGCTATTGCGAA
AAATATCCAATCTTGCCAGTCAAAAAGATAGAAAAGTCACGCTAAAAGAGATTGAAATAAATAACCAGTGT
TATACCGAAGCTGTTCTGAGCAGGAGGCAACTGGAAAAGTACGAACCAGAAAAC TTTAACGAGAACC GGCA
CATGTCATCACAGCTATCACGAAAGGGACCTTTACCAAAGGTGAAGGAAGCAACCGGAT TATTGGCTGGT
CACCAGACAAAGCAAGCATACTGCTTAAATCAGAAATGGCTCACCGTTACACCTTGGAAATGGATAACGACGAC
AAAAATCACGACCC TAGCTCATGAGCTCGTTTATGCTCGACATGTGTTAGGTGGCAGCTCCTTAGCGGATGG
CGGAGATCGCTATAATCCACGTACGGGATCTGGCAAAGAGGAACTTAGGGCCGTTGGATTAGATAAGTACC
GCTATTCACTTACAAAAAACCGTTCAGAGAACTCCATCCGAGCTGAACACGGCCCTGCCTCTGCGCATGAAG
TACAGGGCACATCAATAG
```

>Sequência codificadora de HopN1:

ATGTATATCCAGCAATCTGGCCCAATCAGGGGTTGCCGCTAAGACGCAACACGATAAGCCCTCGTCATT
 GTCCGGACTCGCCCCGGTTCGTCGGATGCGTTCCGCCGTTTTCATCCCGAAAAGGCGGGCCCTTTGTCC
 CATTGGAGGGGCATGAAGAGGTCCTTTTCGATGCGCGCTCTTCCTTTTCGTCCGTCGATGCCGCTGATCTT
 CCCAGTCCCAGCAGGTACAACCCAGCTTCATTTCGTTGCGTACCCTGCTACCGGATCTGATGGTCTCIAT
 CGCCTCATTACGTGACGGCGCCACGCAATACATCAAGACCAGAATCAAGGCTATGGCGGACACAGCATAG
 GCGCGACTGCGAACATCGAAGCCAAAAGAAAGATTGCCAAGAGCAGGGCTGTCAGCTTGTCCACCCGTTT
 CACCAGAGCAAATTTCTATTGAAAAAACATATCGATGATAGAGCGTTTGTGCTGATTATGGCCGCGCGGG
 TGGCGACGGGCACGCTTGTCTGGGGCTATCAGTAAATTTGTTGTCAGAGCCGTGCAAAAGGGCAGTCGGATG
 AGGCCTTCTTTACAAACTGGAGGACTATCAGGGCGATGCATTGCTACCCAGGGTAATGGCTTCCAGCAT
 ATCGAGCAGCAGGCCTATTCAAACAAGTTGCAGAACCAGCACCTATGCTTCTGGACACACTTCCCAAGTT
 GGGCATGACACTTGGAAAAGGGCTGGGCAGAGCACAGCAGCGGCACATGCGGTTGCTCTGGAAAACCTTG
 ATCGCATCTCAAAGCAGTGTGACGCCCCGTAAGACCAGATGCTTCTGTTTTGAGTGATAGCCATGCG
 ATGGCTCTGCATCAGGACAGTCAGGGATGCTGCATTTTTGATCCTCTTTTGGCGTGGTTCAGGCAGA
 CAGCTTACGCAACATGAGCCATTTCTTGTGATGTGTTCAGCGCGACGTAGGTACGCACTGGCGTGGCA
 CCGAGCAACGCTCTGCAACTGACCGAAATGTTGCCAGAGCAGACTTTCACCTTGCATAA

>Sequência codificadora de AvrPto:

ATGGGAAATATATGTGTCGGCGGATCCAGGATGGCCCATCAGGTGAAC TCCCAGACCGAGTTAGTAACAA
 CTCGGGTGACGAAGATAACGTAACGTCAGTCAACTGCTGAGCGTCAGACATCAACTTGGCGAGTCTGCTG
 GTGTACCAAGAGATCAGCATGAATTTGTTAGTAACCAAGCACCTCAAAGCCTGAGAAATCGCTACAACAAT
 CTTTACTCACATACGCAAAGAACACTGGATATGGCGGACATGCAGCATAGGTACATGACGGGAGCGTCAGG
 AATCAATCCGGGAATGCTGCCACATGAGAATGTGACGATATGCGTAGCGCTATAACTGATTGGAGTGACA
 TGGCGAAGCTCTGCAGTACGCAATGGGTATCCATGCCGACATCCCACCGTCTCCAGAGCGATTGTTGCG
 ACTATGAACCCGAACCGATCAATTCGAATGTCAACACTTCTCTCTAGCCCGTACCCTAACTGGCAATGA

5

As sequências de aminoácidos das proteínas Bss que suprimem a biogênese de miRNA são as seguintes:

>Sequência de aminoácidos de HopPtoB:

MAGINRAGPSGAYFVGHDTPEPVSQAHGSGSGASSSNSPQVQRP SNTPP SNAPAPPPTGRERLSRSTAL
 SRQTREWLEQQMPTAEDASVRRRPQVTADAATPRAEARRTPEATADASAPRRGAVAHANSIVQQLVSEGAD
 ISHTRNMLRNAMNGDAVAFSRVEQNI FRQHF NPMFMHGISRSE LAIELRGALRRVHQQAASAPVRSPTP
 TPASPAASSSSGSSQRS LFGFRFLMAPNQGRS SNTAASQTPVDRSPPRVNQRP IRVDRAMRNNGNDEADA
 ALRGLVQQGVNLEHLR TALERHVMQRLF I PLDIGSALQNVGINP SIDLGESLVQHP LNLNLVALNRMLGLR
 PSAERAPRPAVPVAPATASRRPDGTRATRLRVMPEREDYENNVA YGVRLLNLNPGVGRQVAFAFVTDRAE
 RPAVVANIRAALDP IASQFSQLRTISKADAESEELGFKDAADHHIDDVTHCLFGGELSLSNPDQQVIGLAG
 NPDTDSQPYSQEGNKDLAFMDMKKLAQFLAGKPEHPMTRET LNAENI AKYAFRIVP

>Sequência de aminoácidos de HopH1:

MYIQQSGAQSGVAAKTQHDKPSLSGLAPGSSDAFARFHPEKAGAFVPLEGHEEVFFDARSSFSVDAADL
 PSPEQVQPLHSLRLLPDLMVSIASLRDQATQYIKTRIKAMADNSIGATANIEAKRKIAQEHGCQLVHPF
 HQSKFLFEKTIDDRAFAADYGRAGGDGHACLGLSVNWCQSRAGQSDEAFFHKLEDYQGDALLPRVMGFQH
 IEQQAYS NKLQNAAPMLLD TLPKLGMTLGKGLGRAQHAHYAVALENLDRLKAVLQPGKDQMLLFLSDSHA
 MALHQDSQGC LHFDFLFGVVQADSF SNMSHF LADVFKRDVGTGTHWRGTEQRLQLSEMVPRADFHLR

10

>Sequência de aminoácidos de Hopn1:

MYIQQSGAQSGVAAKTQHDKPSLSGLAPGSSDAFARFHPEKAGAFVPLEGHEEVFFDARSSFSVDAADL
 PSPEQVQPLHSLRLLPDLMVSIASLRDQATQYIKTRIKAMADNSIGATANIEAKRKIAQEHGCQLVHPF
 HQSKFLFEKTIDDRAFAADYGRAGGDGHACLGLSVNWCQSRAGQSDEAFFHKLEDYQGDALLPRVMGFQH
 IEQQAYS NKLQNAAPMLLD TLPKLGMTLGKGLGRAQHAHYAVALENLDRLKAVLQPGKDQMLLFLSDSHA
 MALHQDSQGC LHFDFLFGVVQADSF SNMSHF LADVFKRDVGTGTHWRGTEQRLQLSEMVPRADFHLR

>Sequência de aminoácidos de AvrPto:

MGNICVGGSRMAHQVNSPDRVSNNSGDEDNVTSSQLLSVRHQLAESAGVPRDQHEFVSNQAPQSLRNRYNN
 LYSHTRQRTILDMADMQRHYMTGASGINPGLPHENVDDMRSAITDWSDMREALQYAMGIHADIPSPERFVA
 TMNPNGISIRMSTLSPSPYRNWQ

Exemplo 6

Identificação de Proteínas que Suprimem RISC Contendo AGO1

Foi investigado então se quaisquer efetores de Pst DC3000 poderiam suprimir a função de RISC que contém AGO1 como observado com alguns supressores derivados de vírus de silenciamento de RNA. O mesmo conjunto de 23 efetores de Pto DC3000 foi testado adicionalmente quanto a possível interferência com as atividades de miRNA. A expressão transitória de um ou mais HopT1-1 não afetou a acumulação de miR834, mas aumentou dramaticamente os níveis de seu alvo cognato, a proteína 4 que interage com COP (CIP4) (figura 11). Em contraste, nem os níveis de miR834 nem os de CIP4 foram alterados após a liberação transitória de efetores HopC1, -X1 (figura 11A) não relacionados de Pto DC3000.

A Figura 11A mostra que a superexpressão de hopT1-1 promove a acumulação de mir384-alvo e não tem efeito significativo sobre os níveis estacionários de miR834. Folhas *erf1* mutantes foram agroinfiltradas com o construto 35S::hopT1-1 (OD=0,4) e os níveis de miR834 assim como de miR834-alvo (proteína 4 que interage com COP, CIP4) foram monitorados 3 dias após a infiltração por análise Northern (painel superior) e análise Western (painel inferior), respectivamente.

Esses resultados sugerem que HopT1-1 age a jusante da biogênese de miRNA, potencialmente pela inibição de RISC direcionado a AGO1, que é recrutada pela maioria dos miRNAs de planta.

Para testar essa hipótese, foi usada a linhagem repórter SUC-SUL (SS)¹²⁰, na qual a expressão específica em floema de um transgene repetido invertido desencadeia um RNAi autônomo não-celular do transcrito de SULPHUR (SUL) endógeno, resultando em um fenótipo clorótico que se expande além da vasculatura (figura 11B). A Figura 11B mostra que um alelo fraco de *ago1* suprime o silenciamento artificial sem efeito significativo sobre os níveis estacionários de siRNAs com 21-24 nt. A mutação de *Ago1-12* suprime o silenciamento artificial ativado por uma forma de grampo artificial, atingindo o "sulphure" endógeno (SUL) e direcionado pelo promotor específico para floema (SUC2). *Ago1-12* suprime o fenótipo de nervura clorótica desencadeado pelo transgene SUC-SUL (painel superior). A mutação de

Ago1-12 não interfere significativamente com a acumulação de siRNA de 21-24 nt como ensaiado pela análise Northern (painel inferior). Das espécies de siRNA de *SUL* com 21 nt (dependente de DCL4) e 24 nt (dependente de DCL3), apenas o primeiro é necessário para RNAi em uma maneira estritamente dependente de AGO1.

O construto 35S::*HopT1-1* foi transformado em *SUC-SUL* e duas linhagens T2 independentes foram selecionadas, mostrando acumulação de mRNA de *HopT1* moderada (#4) e acentuada (#22) (figura 11C). A Figura 11C mostra que a superexpressão de *HopT1-1* suprime o fenótipo *SUC-SUL* sem efeito significativo nem sobre a acumulação de siRNA de 21-24 nt nem sobre a de miRNA endógeno. Supressão do fenótipo de nervura clorótica ativada pelo transgene *SUC-SUL* (painel superior). Northern com baixo peso molecular sobre 21-24 *SUL* siRNA (painel central e direito). RT-PCR sobre mRNA de *HopT1* (painel central e esquerdo), LMW Northern de um subconjunto de miRNAs endógenos (painel inferior). Ambas as linhagens exibiram pouca ou nenhuma clorose e acumularam níveis maiores de mRNA de *SUL*. Entretanto, a acumulação de siRNAs de *SUL* permaneceu inalterada, mimetizando os efeitos da mutação de *ago1-12* em plantas *SUC-SUL*. Também como em mutantes *ago1-12*, os níveis de vários miRNAs canônicos estavam normais em linhagens que expressam *HopT1-1* apesar da grande acumulação de seus transcritos-alvo.

A Figura 11D mostra a representação esquemática que descreve o efeito esperado de uma perturbação de uma função RISC^{miRNA}. A Figura 11E mostra que a superexpressão de *hopT1-1* promove a acumulação do alvo de miR834 (CIP4) sem efeito sobre a acumulação de miR384. Resultados da análise Western usando um anticorpo anti-CIP4. Figura 11F mostra que a superexpressão de *hopT1-1* promove o acúmulo de alvos de miRNA. Um subconjunto de alvos de miRNA está mais elevado em duas linhagens transgênicas independentes que superexpressam *hopT1-1* (painel esquerdo). O mesmo subconjunto de alvos de miRNA está mais elevado em mutantes *ago1-11* e *ago1-12* (painel direito). Coletivamente esses resultados indicam que *HopT1-1* provavelmente interfere com a função de AGO1-RISC,

resultando na supressão de miRNA, assim como das atividades de siRNA.

Foram obtidos resultados similares quando foi superexpressos o efector hopY1 na linhagem repórter de silenciamento SUC-SUL (figura 12), exceto que um discreto aumento nos níveis de 21-24 nt SUL siRNA assim como de miRNAs endógenos foi observado nesse caso particular. Linhagens que superexpressam HopY1 exibiram um aumento significativo na acumulação de vários alvos de miRNA (figura 12). A Figura 1C mostra que a superexpressão de hopY1 aumenta discretamente a acumulação de alguns miRNAs endógenos. Entretanto, apesar de seu efeito sobre a atividade de miRNA, HopY1 não induziu uma alteração drástica do desenvolvimento (figura 12A). A Figura 12A mostra que a superexpressão de HopY1 reduz o fenótipo de nervura clorótica ativado pelo transgene SUC-SUL. A Figura 12B mostra que a superexpressão de HopY1 aumenta discretamente a acumulação de 21-24 nt SUL siRNAs. A Figura 12D mostra que a superexpressão de HopY1 promove a acumulação de um subconjunto de alvos de miRNA assim como de mRNA de SUL.

As sequências de nucleotídeos que codificam as proteínas Bss que interferem com a função de RISC^{miRNA} são as seguintes:

>Sequência codificadora de HopT1-1:

```

ATGATGAAAACAGTCAGCAATCACTCGATACCCAGTACAAATCTCGTCGTGGATGCGGGAACGGAACTTC
GGCGCAGAAAATCCCAGCCGGTTTGCAGCGAAAATCCAGCGTAACAGCAAGATCGAAAAAGCAGTCATCGAAC
ACATTGCCGACCACCCGGCAGCGAAAATGACAATAAGCGCGCTGGTTGACACGTTGACAGACGTTTTTGTG
AGGGCTCATGGGGAGGTTAAGGGGTGGGCGAAAATCGTCCAGGCAGTCTCTCGCCCTCATGACAGTAATCG
ACACGGCAGTGGAGTGCTCAGCCCGCGCTTTGATGTAATGGGGAGTGTGGTTGGAATGCGGCAGCTATCC
GGGCCACCAGTCGGTCCGGACGCTTCGAGAGAAAGGTACACTGTTCACTAACCTTATGCTCAGTAACAAC
TTTAAACATTTGCTTAAACGAGTGGTTAACGATCCAGCCTTGACAGAAAAGCTCGACGGTGGGTTAGACCT
CAACTATCTGAAGGCTTGTGAAGGCGATCTTATGTCATGTCAGGGTGGGCTGCACGGGCTAGCGAAAAGTC
GTGAACAAAATTGGCAAAGCCCGGTATGAAACGGCATCAAATCTTAGCCAGACGCTGATCAGTGCACGTGAG
TTGGCTTTTCATCGTCACAATCCGGTTAATCATCCGTCGCCCCAAACGAAAAGTGGGCTTCGATAAGGGTTT
GCCTGAGGAACTGATCTGCAGGTTCTGAGAGGCCATGGCAGCAGTGTATGGAGTGTAAAACCGGGCAGCG
ATTTCCGAAAGCGTGCTGAAGTTCTGGAAAGCCTATTATCGCCGGCCCGTCCGCTACCGCTTCGCGCATG
GTCGCTGTTCGCGTTTTCTGCGACCCGCTTGTGAAAAGCCTGGGTATTGAGAGTGAGCAGAACCCTGAA
AGAGCTTGTGCGGTATGCCTECTATGCCTATTTGCGTCAGGACAGCCACCATTGATGCTTGAAGTGAATC
TTGGTGCCTTCCCATGGAATGCCGGAACAATGGGACGACACGCTTTATAACGAGCCTTTCAGTAATTCA
ATTAAGGTCGCGGGTTTGGTATAGACAACTCGCGCATAGGCAAGTCGTCAGGCAGCGGCTCAAAGTC
ATGA

```

>Sequência codificadora de HopY1:

ATGAACATTACGCCGCTCACGTCAGCCGCGGGCAAGGGCTCGTCCGCACAAGGCACAGACAAAATTTCCAT
 TCCCAACTCCACGCGCATGATCAATGCCGCTTCAATCAAGTGGTTGAATAAGGTGCGTAGCGCCATCAGTG
 ACCACATCCGCACCAGCATCGAGAAAGGAAACTGTTCCGAGCTCGCCTCCTGGGCAGCAACATGTTCCGGT
 GTCCCGGCTCTTTTCAGCGCGCCCTCGACCTCCAACCTGTGTTGGCGTTTGGGCTGACCCCAATCAGGA
 CCTGAACCTTGTTCAGGGTCTATATGCAGGACAGCGCCGGAAGCTCAC TCCCTGGGACCCGACGCCCAACG
 CGGTACAGCAGCAGCTCGAATCCATCAGAGCCTGATGCGCAGAGCGATACGGCTTCGTTCATCATTACCTCGG
 CGGCCTCCCGCAGGCTCGGTGCTGAGTTTGTGCGGATTGCGCTGGATCACGCGCAACGCCACAGTCCCTCG
 CGCGGACAGGTCTGCCAAGGGACGACCTGCCCGAGAGGAGAGGAACGGGGCAAGGTTCAATGCCAAGCAAA
 CAAAGCCGACAGAGGTGAAGCCTACGGTGATCATCAGACACCCAATCCTGATTTGCACAGGCAAAAAGAG
 ACAGCTCAACGCGTTGCTGAAAGCATCAACAGCATGCGAGAGCAGCAAAATGGAATGCAACGCGCCGAAGG
 GCTTCTCAGAGCCAAAGAAGCGTTGCAAGCTCGGGAAGCCGCGCGCAAGCAGCTTCTGGACGTGCTCGAGG
 CCATCCAGGCTGGCCGTGAAGACTCCACCGACAAGAAGATCAGCGCCACTGAAAAGAAGCCACGGGCATC
 AACTACCAGTGA

As sequências de aminoácidos das proteínas Bss que interferem com a função de RISC^{miRNA} são as seguintes:

>Sequência de aminoácidos de HopT1-1:

MMKTVSNHSIPSTNLVVDAGTETSQAQKSQFVCSSEIQRNSKIEKAVIEHIAADHPAAKMTI SALVDTLTDVFN
 RAHGEVKGWAEIVQAVSRPHDSNRHSGVLSRPFVDMGSGVGNAAAIRATSRVGTLEKGLTFNLMLSN
 FKHLKRVVNDPALQQKLDGGLDLNLYLKACEGDLYVMSGWAARASESREIQIKARYETASNLSQTLISARE
 LAEHRHNPVNHPSAQTKVGFDKGLPEE3DLQVLRGHGSSVWSVKPGSDFAKRAEVSGKPI IAGPSGTASRM
 VAVARFLAPACLKSLGIESEQNLKELVRYACYAYFGQD SHHSMLEVNLGVA3HGMPEQWDDTLYNEPFSNS
 IKGREGIDNLAHRQVVRQAAQKS

5 >Sequência de aminoácidos de HopY1:

MNITPLTSAAGKGSQAQGTDKISIPNSTRMINAASIKWLNKVRSAISDHRTSIEKGLFELASLGSNMFG
 VPALSARPSTLQPVLAFAEADPNHDLNLVRVYMQDSAGKLTDPWPTPNAVTTTNSPSEPDAQSDTASSSLPR
 RPPAGSVLSLLGIALDHAQRHSPRADRSKGRPGREERNGARFNAKQTKPTEAEAYGDHQTNPNDLHRQKE
 TAQRVAESINSMREQQNGMQRAEGLLRAKEALQAREAARKQLLDVLEAIQAGREDSTDKKISATEKNATGI
 NYQ

Exemplo 7

Identificação de Proteínas que Suprimem a Inibição Traducional de miRNA

Foi investigado finalmente se proteínas efetoras bacterianas poderiam suprimir a inibição traducional dirigida por miRNA, um fenômeno bem-caracterizado em animais mas também eficaz em plantas. Para esse propósito, foi liberado transitoriamente o mesmo conjunto de efetores de Pst DC3000 nas folhas mutantes *efr1* e foram rastreados os efetores que poderiam intensificar a acumulação de proteína de alvos de miRNA sem um impacto significativo nem sobre os níveis de alvo de mRNA nem sobre os níveis de miRNA maduro. Entre o subconjunto de efetores testados, a mono-ADP ribosiltransferase HopU1 preencheu esses critérios já que ela induz níveis elevados de proteína alvo de miR398: Superóxido dismutase 1 (CDS1) e 2 (CDS2), sem efeito significativo sobre a acumulação dos níveis de mRNA de CDS1/2 ou dos níveis de miR398 (dados não mostrados). Além disso,

a liberação de HopU1 no mutante *efr1* que expressa o construto sensor de miR171 restaurou uma grande acumulação de proteína GFP mas não alterou os níveis de miRNA de GFP, indicando que HopU1 interfere de fato com a inibição traducional dirigida por miRNA (figura 13A/B e dados não mostrados). A Figura 13A mostra que a superexpressão de HopU1, mas não da versão mutante HopU1DD, restaura a expressão de GFP em plantas *efr1* que expressam os construtos sensores de miR171. Plantas com Sensor (*efr1*) de miR171 foram Agroinfiltradas (OD=0,4) com os construtos 35S::GUSintron, 35S::HopU1 e 35S::HopU1DD e os níveis de GFP analisados visualmente sob UV. A Figura 13B mostra a análise Western usando anticorpo anti-GFP. Significativamente, nenhum resgate de expressão de GFP nem do alvo CSD2 de miR398 endógeno foi observado quando foi liberada transitoriamente uma versão mutante de HopU1 que abole a atividade da ADP-ribosiltransferase. Isso indica que a atividade de ADP-ribosiltransferase é necessária para a supressão de silenciamento de RNA ativada por HopU1.

Para adicionalmente investigar se HopU1 interfere na inibição traducional dirigida por um siRNA putativo, o construto 35S::HopU1 foi transformado na linhagem de referencia SUC-SUL e selecionamos linhagens transgênicas T2 que expressam níveis elevados de proteínas hopU1. A expressão de HopU1 nessas linhagens transgênicas estáveis diminuiu discretamente os níveis de 21-24 SUL siRNA, mas não afetou os níveis de mRNA de SUL. Figura 13C mostra plantas SUC-SUL que expressam HopU1. Figura 13 D mostra a análise LMW Northern. Entretanto, uma redução significativa no fenótipo da nervura clorótica foi observada, o que é diagnóstico de níveis elevados de proteína SUL. A análise Western usando um anticorpo anti-CSD2 sugere que HopU1 interfere adicionalmente com a inibição da tradução dirigida por siRNA. Figura 13E mostra qRT-PCR de SUL mRNA.

A sequência de nucleotídeos que codifica a proteína Bss que interfere com a inibição traducional mediada por miRNA é a seguinte:

>Sequência codificadora de HopU1:

```
ATGAATATAAATCGACAACCTGCCTGTATCAGGCTCGGAGCGATTGTTGACTCCCGACGTGGGCGTATCTCG
CCAGGCTTGTICCGAAAGGCATTATCTACTGGACAGGATCGGCATGATTTTTACCGTTTTGCTGCCAGGC
TACATGTGGATGCGCAGTGTTTTGGTCTGTCAATAGACGATTGATGGATAAGTTTTCTGACAAGCACTTC
AGGGCTGAGCATCCTGAATACAGGGATGTCTATCCGGAGGAAATGTTCTGCCATTTATATGCATACCGCTCA
AGACTATTCTAGTCACCTCGTAAGGGGGGAAATAGGAACGCCCTGTACCGAGAGGTCATAAATTATCTTC
GACTTCAACATGAGAATTCTGGGCGAGAAGCTGAAATTGATAATCACGACGAAAAGCTATCGCCTCACATA
AAAATGCTTTCATCTGCGCTTAATCGTTTAAATGGATGTCCGCCCTTTTAGAGGAACGGTTTATAGAGGCAT
TCGCGGTGATTTAGATACCAATTGCTCGGCTCTACCATCTATTCGATACGGGCGGCCGTACGTAGAGCCCG
CTTTCATGAGTACAACCTCGAATAAAGGACAGTGCCAGGTGTTGAGCCAGGCACGCCAAACAACATAGCT
TTCCAGATAAGCCTAAAAAGAGGCGCCGACATTTCCGGATCTTCCAAGCGCCCTCAGAGGAAGAAATCAT
GCTACCCATGATGAGTGAGTTCGTCATTGAACATGCATCCGCTCTTTCCGAAGGAAAGCATTATTTGTAT
TAAGTCAGATTTGA
```

A sequência de aminoácidos da proteína Bss que interfere com a inibição traducional mediada por miRNA é a seguinte:

>Sequência de aminoácidos de HopU1:

```
MNINRQLPVSGSERLLTPDVGVSQRQACSERHYSTGQDRHDFYRFAARLHVDAQCFGLSIDDLMDFKSDKHF
RAEHPEYRDVYPEECSA IYMHTAQDYSSHLVRGEIGTPLYREVNNYLRLQHENS GREAEIDNHDEKLSPHI
KMLSALNRLMDVAAFRGTVYRGRIGDLDIT IARLYHLEFDTGGRYVEPAFMSTTRIKD SAQVFEPGTPNNIA
FQISLKR GADISGSSQAPSEEEIIMLPMMSEFVIEHASALSSEKHLFVLSQI
```

- 5 Proteínas Bss mutadas em resíduos-chave que não perturbam a supressão do silenciamento de RNA serão particularmente úteis já que elas não são reconhecidas pelas proteínas de resistência (R) da planta e, portanto, não devem induzir a morte celular programada clássica mediada por R (que é geralmente prejudicial a planta). Exemplos incluem versões de
- 10 HopN1 que são mutadas nas tríades catalíticas preditas de cisteína protease e que ainda retém sua habilidade de suprimir o silenciamento de RNA (figura 10C). Essas versões mutantes podem estar comprometidas no reconhecimento do gene R e ainda suprimir o silenciamento de RNA em diferentes espécies de planta. O método descrito aqui permite, assim, a geração de
- 15 versões mutadas de proteínas Bss a fim de desacoplar a supressão de silenciamento de RNA do reconhecimento do gene R.

- Bss identificadas de acordo com essa invenção também são proteínas úteis para identificar componentes de planta e de animal envolvidos na biogênese e/ou atividade de miRNA. Como um exemplo, a mono-
- 20 ADP-ribosiltransferase HopU1 discutida acima foi mostrada, recentemente, interagir diretamente com as proteínas que se ligam a RNA ricas em glicina, AtGRP7 e AtGRP8. A ADP-ribosilação de GRP7 por HopU1 ocorre sobre dois resíduos conservados de arginina localizados no domínio de reconhe-

cimento de RNA de GRP7 e provavelmente perturba sua habilidade de se ligar a RNA. Como a atividade de HopU1 ADP-ribosiltransferase é necessária para sua atividade de supressão de silenciamento de RNA, foi antecipado que AtGRP7 e AtGRP8 são novos fatores envolvidos na inibição traducional dirigida por miRNA e siRNA. A Figura 13 mostra que a superexpressão de HopU1, mas não da versão mutante HopU1DD, restaura a expressão de GFP em plantas efr1 que expressam construtos sensores de miR171. Outras proteínas Bss também interagirão diretamente e perturbarão componentes do hospedeiro envolvidos no silenciamento de RNA e podem, portanto, ser usadas como sondas moleculares para identificar fatores que silenciam RNA ou seus reguladores, em ambos os sistemas de planta e de animal.

As sequências codificadoras dos novos componentes putativos de silenciamento de RNA de *Arabidopsis thaliana* são as seguintes:

>Sequência codificadora de AtGRP7 (At2g21660)

ATGGCGTCCGGTGATGTTGAGTATCGGTGCTTCGTTGGAGGTCTAGCATGGGCCACTGATGACAGAGCTCT
TGAGACTGCCTTCGCTCAATACGGCGACGTTATTGATTCCAAGATCATTAAACGATCGTGAGACTGGAAGAT
CAAGGGGATTCGGATTTCGTCACCTTCAAGGATGAGAAAGCCATGAAGGATGCGATTGAGGGAATGAACGGA
CAAGATCTCGATGGCCGTAGCATCACCTGTTAACGAGGCTCAGTCACGAGGAAGCGGTGGCGCGGAGGCCA
CCGTGGAGGTGGTGGCCGTGGATACCGCAGCGCGGTGGTGGAGGTTACTCCGGTGGAGGTGGTAGCTACG
GAGGTGGCGCGGTAGACCGAGGGTGGAGGAGGATACAGCGCGCGCGCGCGGTTACTCCTCAAGAGGT
GGTGGTGGCGGAAGCTACGGTGGTGAAGACGTGAGGGAGGAGGATACGGTGGTGGTGAAGGAGGAGG
TTACGGAGGAAGCGGTGGTGGTGGAGGATGGTAA

15 >Sequência codificadora de AtGRP8 (At4g39260)

ATGCTGAAGTTGAGTACCGGTGCTTTGTCGGCGGCCTTGCTGGGCCACCAATGATGAAGATCTTCAAAG
GACGTTCTCACAGTTTCGGCGACGTTATCGATTCTAAGATCATTAAACGACCGCGAGAGTGAAGATCAAGGG
GATTCGGATTCGTCACCTTCAAGGACGAGAAAGCCATGACGGATGCGATTGAAGAGATGAACCGTAAAGAG
CTCGATGGACGTGTCATCACCGTGAACGAGGCTCAGTCGAGAGGTAGCGCGCGGTGGCGGAGGAGGCCGTGG
TGGAAAGCGGTGGTGGTTACCGCAGCGGAGGCGGTGGTGGATACTCAGGAGGCGGTGGCGCGGGA TACTCAG
GAGGAGGCGGTGGTGGTTACGAGAGACGTAGCGGAGGTACGGATCTGGTGGAGGCGGTGGTGGCCGAGGA
TACCGTGGTGGTGGACCGCGTGGAGGAGGTGGCTACGGAGGCGGTGATGGTGAAGTTACCGAGGCGGTGG
TGGCGCTGGTAA

As sequências de aminoácidos dos novos componentes putativos de silenciamento de RNA de *Arabidopsis* são as seguintes:

>Sequência de aminoácidos de AtGRP7

MASGDVEYRCFVGGGLAWATDDRALETAFQAQYGDVIDSKIINDRETGRSRGFVTFVKDEKAMKDAIEGMNG
QDLDRSITVNEAQSRSRSGGGGGHRGGGGGYRSGGGGYSGGGGSYGGGGRRREGGGGYSGGGGYYSR
GGGGSYGGRRREGGGGYGGGEGGGYGGSGGGGGW

>Sequência de aminoácidos de AtGRP8

MSEVEYRCFVGGGLAWATNDEDLQRTFSQFGDVIDSKIINDRESGRSRGFVTFVKDEKAMRDAIEEMNGKE
LDGRVITVNEAQSRSRSGGGGGRRGGSGGGYRSGGGGYSGGGGGYSGGGGGYERRSGGYSGGGGGGRG
YGGGGRRREGGYGGDGGSYGGGGGGW

- possíveis de AtGRP8 em seres humanos, sugerindo que um ou vários desses ortólogos podem estar envolvidos na execução ou regulação de funções dirigidas por miRNA em animais. Portanto, Bss de planta e de animal também são ferramentas valiosas para descobrir novos componentes de silenciamento de RNA em uma ampla faixa de organismos.

As várias proteínas humanas com homologia com AtGRP8 estão listadas abaixo:

>HsCIRBP gi|4502847|ref|NP_001271.1|proteína de ligação a RNA induzível pelo frio [Homo sapiens]

MASDEGKLEFVGGLSFDTNEQSLEQVF SKYQI SEVVVVKDRETQSRGFGFVIFENIDDAKDAMMAMNGKS
VDGRQIRVDQAGKSSDNRSRGRGGSAGGRGFFRGGRRGRGRGFSRGGDRGYGGRNREESRSGGYGSRDYY
SSRSQSGGYSRDSGGSYRDSYDSYATHNE

10 >HsCIRP CDS:

ATGGCATCAGATGAAGGCAAACCTTTTGTGGAGGGCTGAGTTTTGACACCAATGAGCAGTCGCTGGAGCA
GGTCTTCTCAAAGTACGGACAGATCTCTGAAGTGGTGGTTGTGAAAGACAGGGAGACCCAGAGATCTCGGG
GATTTGGGTTTGTACCTTTGAGAACATTGACGACGCTAAGGATGCCATGATGGCCATGAATGGGAAGTCT
GTAGATGGACGGCAGATCCGAGTAGACCAGGCAGGCAAGTCGTCAGACAACCGATCCCGTGGGTACCGTGG
TGGCTCTGCCGGGGGCCGGGGCTTCTTCCGTGGGGGCCGAGGACGGGGCCGTGGGTTCTCTAGAGGAGGAG
GGGACCGAGGCTATGGGGGAACCGGTTCGAGTCCAGGAGTGGGGGCTACGGAGGCTCCAGAGACTACTAT
AGCAGCCGGAGTCAGAGTGGTGGCTACAGTGACCCGGAGCTCGGGCGGGTCTACAGAGACAGTTACGACAG
TTACGGCTACACACAACGAGTAA

>HsRBP3 gi|5803137|ref|NP_006734.1|proteína 3 do motivo de ligação a RNA [Homo sapiens]

MSSEEGKLFVGGLNFNNTDEQALEDHF SSGFP I SEVVVVKDRETQSRGFGF I TFINPEHASVAMRAMNGES
LDGRQIRVDHAGKSARGTRGGGFGAHRGRS YSRGGDQYGSGRYYD SRPGGYGYGRSRDYNGRNQGG
YDRYSGGNYRDNYDN

>HsRBP3 CDS:

ATGTCTCTGAAGAAGGAAAGCTCTTCGTGGGAGGGCTCAACTTTAACACCGACGAGCAGGCCTGGAAGA
CCACTTCAGCAGTTTCGGACCTATCTCTGAGGTGGTCTGTGCAAGGACCGGGAGACTCAGCGGTCCAGGG
GTTTTGGTTTCATCACCTTCACCAACCCAGAGCATGCTTCAGTTGCCATGAGAGCCATGAACGGAGAGTCT
CTGGATGGTCTGATCCGTTGTGGATCATGCAGGCAAGTCTGCTCGGGGAACCCAGAGGAGGTGGCTTTGG
GGCCCATGGGCGTGCTCCGAGCTACTCTAGAGGTGGTGGGGACCAGGGCTATGGGAGTGGCAGGTAATTATC
ACAGTCGACCTGGAGGGTATGGATATGGATATGGACGTTCCAGAGACTATAATGGCAGAAACCCAGGGTGGT
TATGACCGCTACTCAGGAGGAAATTACAGAGACAATTATGACAACCTGA

>HsRBPX gi|89059830|ref|XP_933552.1|PREDITA:similar a proteína do motivo de ligação a RNA, ligada a X [Homo sapiens]

MGEADRLGKFFIGGLNTEINKKALEAVFGKYQIVEVHLMKDCEINKSRGFAF I TFERPADAKDAARMNG
KSLDGLKAIKVEQATKPSFESGRRGPPPPPSRGRPPRVLRGGGGSGGTREPPSRGGHMDDWIFHEF

>HsRBPX CDS:

ATGGGTGAAGCAGATCGCCTAGGAAAAGTTTTTCATTGGTGGGCTTAATACGGAAACAAATAAGAAAAGCTCT
TGAAGCAGTATTTGGCAAATATGGACAAATAGTGGAAAGTACACTTGATGAAAGACTGTGAAACCAACAAAT
CAAGAGGATTTGCTTTTATCACCTTTGAAAGACCAGCAGACGCTAAGGATGCAGCCAGAGACATGAATGGA
AAGTCATTAGATGGAAAAGCCATCAAGGTGGAACAAGCCACCAACCGTCATTGAAAGTGGTAGACGTGG
ACCGCCTCCACCTCCAAGAAGTAGAGGCCCTCCAAGAGTTCTTAGAGGTGGAAGAGGAGGAAGTGGAGGAA
CCAGGGAACCTCCCTCACGGGGAGGACACATGGATGACTGGTGGATATTCATGAATTTTAA

REIVINDICAÇÕES

1. Método para modular a via de miRNA em plantas e animais, cujo método compreende:

5 - introduzir em uma planta ou animal um construto de ácido nucleico que compreende um promotor responsivo constitutivo ou de patógeno operativamente ligado a uma sequência de miRNA primário (pri-miRNA) responsivo a um padrão molecular associado a um patógeno (PAMP) ou uma sequência que codifique uma proteína envolvida na biogênese ou atividade de miRNA.

10 2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o dito pri-miRNA ou a dita proteína envolvida na biogênese ou atividade de miRNA aumenta a resistência ao patógeno após a expressão na dita planta ou animal.

15 3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o dito pri-miRNA é selecionado a partir daqueles da Tabela 2.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o dito pri-miRNA é diferente de miR393.

20 5. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a dita proteína envolvida na biogênese ou atividade de miRNA é selecionada do conjunto que consiste em DCL1, AGO1, SERRATE e HEN1.

6. Planta ou animal não-humano preparado pelo método como definido em quaisquer das reivindicações 1 a 5.

7. Construto de ácido nucleico como definido em quaisquer das reivindicações 1 a 5.

25 8. Método para identificar compostos úteis na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais, cujo método compreende:

30 - expor a planta ou animal ou células de uma planta ou animal que tenham sido modificados para conter um sistema de expressão que compreende sequências de controle para expressão de um componente da via de miRNA operativamente ligado a uma sequência repórter em que a dita planta, animal ou células contenham opcionalmente também um desencadeador da expressão do componente da dita via de miRNA a um candidato a

composto, e

- detectar a presença ou ausência de expressão da sequência repórter,

através do que um composto que efetue a expressão da sequência repórter é identificado como um composto útil na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais.

9. Método para identificar um gene útil na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais, cujo método compreende:

- mutagenizar uma planta ou animal ou células de uma planta ou animal que tenham sido modificados para conter um sistema de expressão compreendendo sequências de controle associadas com a expressão de um componente da via de miRNA operativamente ligado a uma sequência repórter, em que a dita planta, animal ou células contenham também, opcionalmente, um desencadeador da dita expressão de componente da via de miRNA, e

- detectar o nível de expressão da sequência repórter, através do que um mutante que efetue a expressão aumentada da sequência repórter é identificado como contendo uma mutação de gene útil na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais, identificando o gene mutante.

10. Método para identificar compostos úteis na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais, cujo método compreende:

- expor uma planta ou animal ou células de uma planta ou um animal que tenham sido modificados para conter um sistema de expressão constitutivo para uma sequência repórter que pode ser silenciada por um miRNA, em que a dita planta, animal ou células contenham também, opcionalmente, um desencadeador da expressão do componente da dita via de miRNA para um candidato a composto e,

- detectar o nível de expressão da sequência repórter, através do que um composto que diminua o nível de expressão da sequência repórter é identificado como um composto útil na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais.

11. Método para identificar um gene útil na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais, cujo método compreende:

- mutagenizar uma planta ou animal ou células de uma planta ou animal que tenham sido modificados para conter uma expressão constitutiva para uma sequência repórter que pode ser silenciada pelo miRNA, em que a dita planta, animal ou células contenham também, opcionalmente, um desencadeador da dita expressão do componente da via de miRNA a um candidato a composto, e

- detectar o nível de expressão da sequência repórter, através do que um composto que diminua o nível de expressão da sequência repórter é identificado como um composto útil na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais.

12. Método para identificar precursores de miRNA (pri-miRNA) responsivos a PAMP, cujo método compreende:

- isolar o RNA total do dito hospedeiro, e
- selecionar o RNA do RNA total isolado de um hospedeiro modificado para conter uma proteína que induza uma resposta de PAMP que é expressa em níveis elevados no dito hospedeiro quando comparado com um hospedeiro que não tenha sido exposto à dita proteína e que hibridiza com complementos de sequências a montante das estruturas "stem loop" no genoma.

13. Pri-miRNA isolado responsivo a PAMP identificado de acordo com o método como definido na reivindicação 12.

14. Pri-miRNA isolado responsivo a PAMP de acordo com a reivindicação 13, que está descrito na Tabela 2.

15. Pri-miRNA isolado responsivo a PAMP da reivindicação 14 que é diferente de miR393.

16. Método para conferir resistência aumentada a patógeno em uma planta ou animal ou célula de planta ou animal, que compreende modificar a dita planta ou animal ou célula de planta ou animal para efetuar a expressão do pri-miRNA responsivo a PAMP como definido em quaisquer das reivindicações 12 a 15.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o dito pri-miRNA é expresso sob o controle operativo de um promotor que é ativado pela exposição de uma planta ou animal ou célula de planta ou animal a um patógeno.

5 18. Método de acordo com a reivindicação 17, em que o dito promotor é selecionado entre o promotor WRKY6 e o promotor PR1 ou outro promotor responsivo a patógeno incluindo o promotor de miRNA responsivo a PAMP.

10 19. Método de acordo com a reivindicação 18, em que um ou mais elementos reguladores cis-atuantes estão dispostos a montante, ou incorporados dentro, do dito promotor e da sequência que expressa miRNA.

15 20. Método de acordo com a reivindicação 19, em que o dito elemento regulador cis-atuante é selecionado do conjunto que consiste em uma W Box, um elemento AuxRE, um elemento RY, um elemento FIM, múltiplos desses elementos e combinações dos mesmos.

21. Supressor de silenciamento bacteriano identificado pelo método aqui descrito.

20 22. Supressor de silenciamento bacteriano de acordo com a reivindicação 21, selecionado do conjunto que consiste em AvrPtoB, AvrPto, HopN1, HopH1, HopU1, HopT1-1 e HopY1.

25 23. Método para modular seletivamente a expressão de miRNA em uma célula, o qual compreende contatar a dita célula com o supressor de silenciamento bacteriano como definido na reivindicação 21 ou 22, ou um sistema de expressão para isso.

30 24. Método para produzir uma proteína desejada em células hospedeiras recombinantes, cujo método compreende cultivar as células que tenham sido modificadas para expressar um supressor de silenciamento bacteriano (Bss) e expressar um construto de ácido nucleico para expressão de uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína desejada.

25 25. Método de acordo com a reivindicação 24, em que as células hospedeiras recombinantes são células de planta.

26. Método de acordo com a reivindicação 24 ou 25, em que Bss

e a proteína desejada são expressas como uma proteína de fusão.

27. Sistema de expressão recombinante, o qual compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína de fusão composta por um supressor de silenciamento bacteriano (Bss) e uma proteína desejada operativamente ligada a sequências de controle que realizam sua expressão nas células hospedeiras recombinantes.

28. Sistema de expressão de acordo com a reivindicação 27, em que as ditas sequências de controle são operáveis em células de planta.

29. Sistema de expressão de acordo com a reivindicação 26 ou 27, em que a proteína desejada é uma proteína que é terapeuticamente eficaz em animais.

30. Sistema de expressão, o qual compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um supressor de silenciamento bacteriano operativamente ligado a sequências de controle heterólogas.

31. Método para conferir resistência a patógenos em uma planta, o qual compreende selecionar plantas com componentes envolvidos na biogênese ou atividade de miRNA que se tornam resistentes a ação de supressores de silenciamento.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, em que o dito supressor é um supressor bacteriano de silenciamento.

33. Planta selecionada de acordo com o método como definido na reivindicação 31 ou 32.

34. Método para manipular especificamente o acúmulo de miRNA a fim de alterar processos fisiológicos e de desenvolvimento normalmente orquestrados por aquelas moléculas, o qual compreende fundir uma sequência codificadora de supressor de silenciamento bacteriano Bss a um promotor de planta específico para tecido que direciona a expressão em raízes, folhas, caule, inflorescências, incluindo opcionalmente elementos promotores pato-miR para obter controle espacial e temporal da atividade de miRNA.

via IR-PTGS

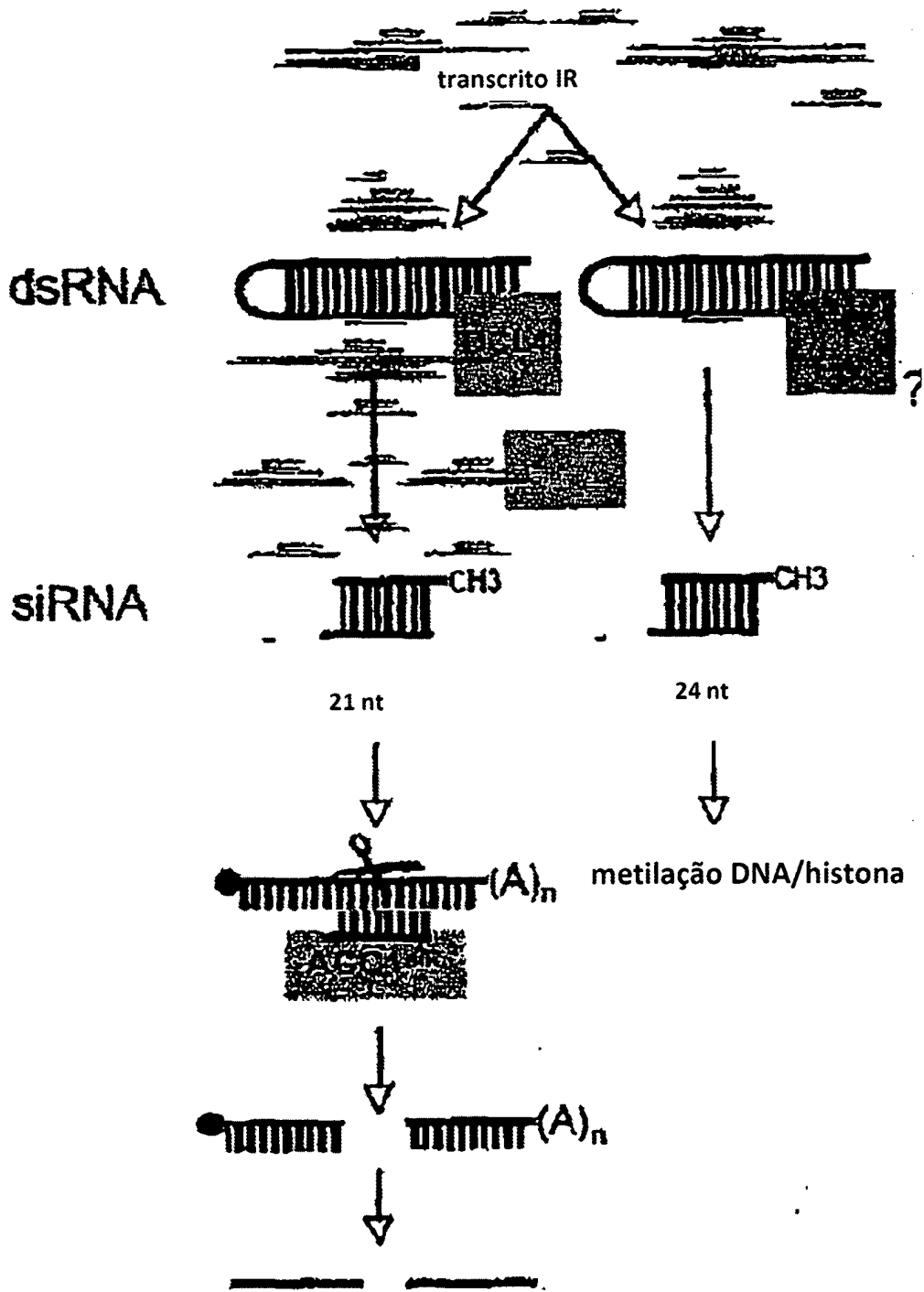


Fig. 1A

via S-PTGS

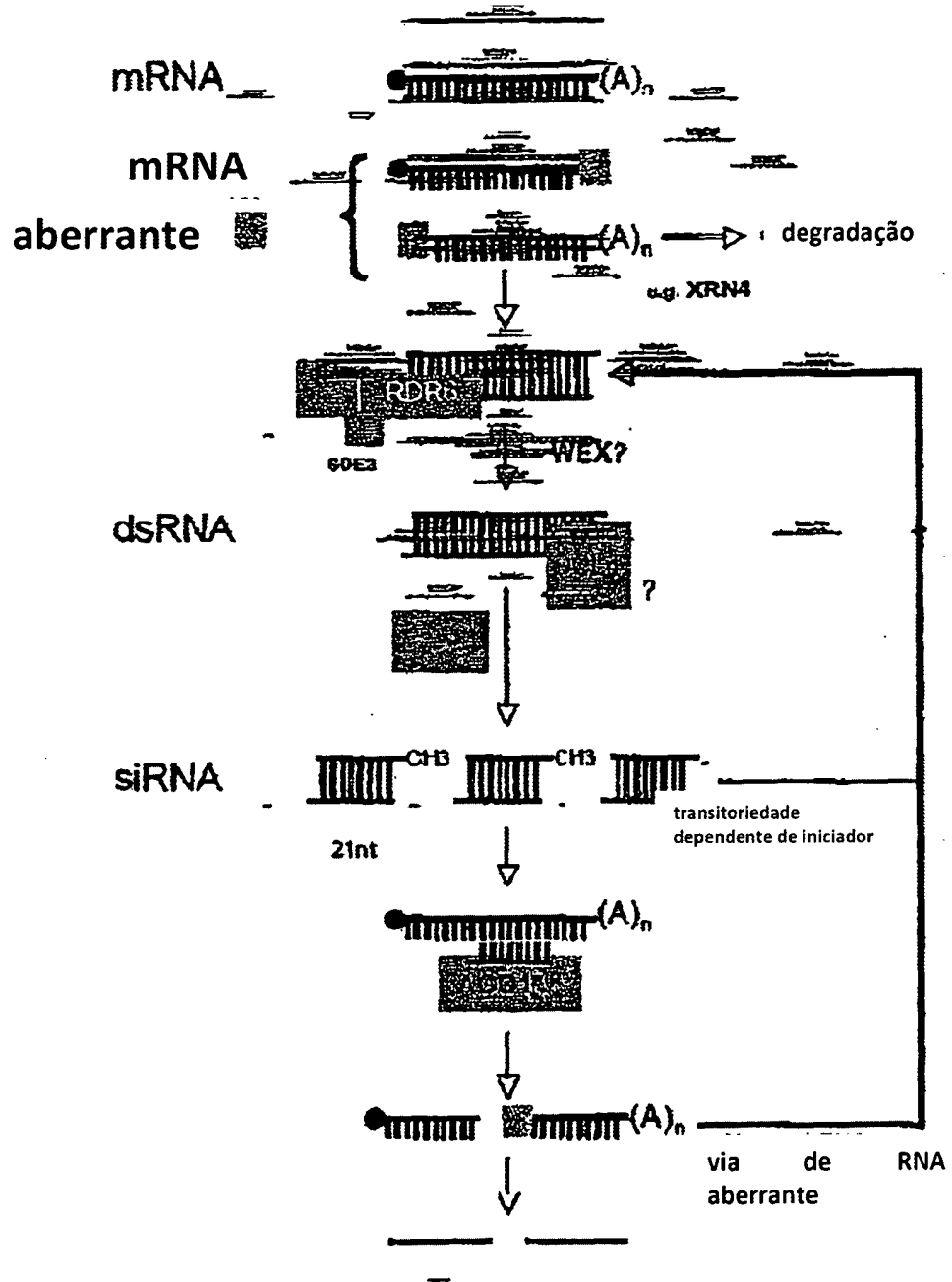


Fig. 1B

via de miRNA

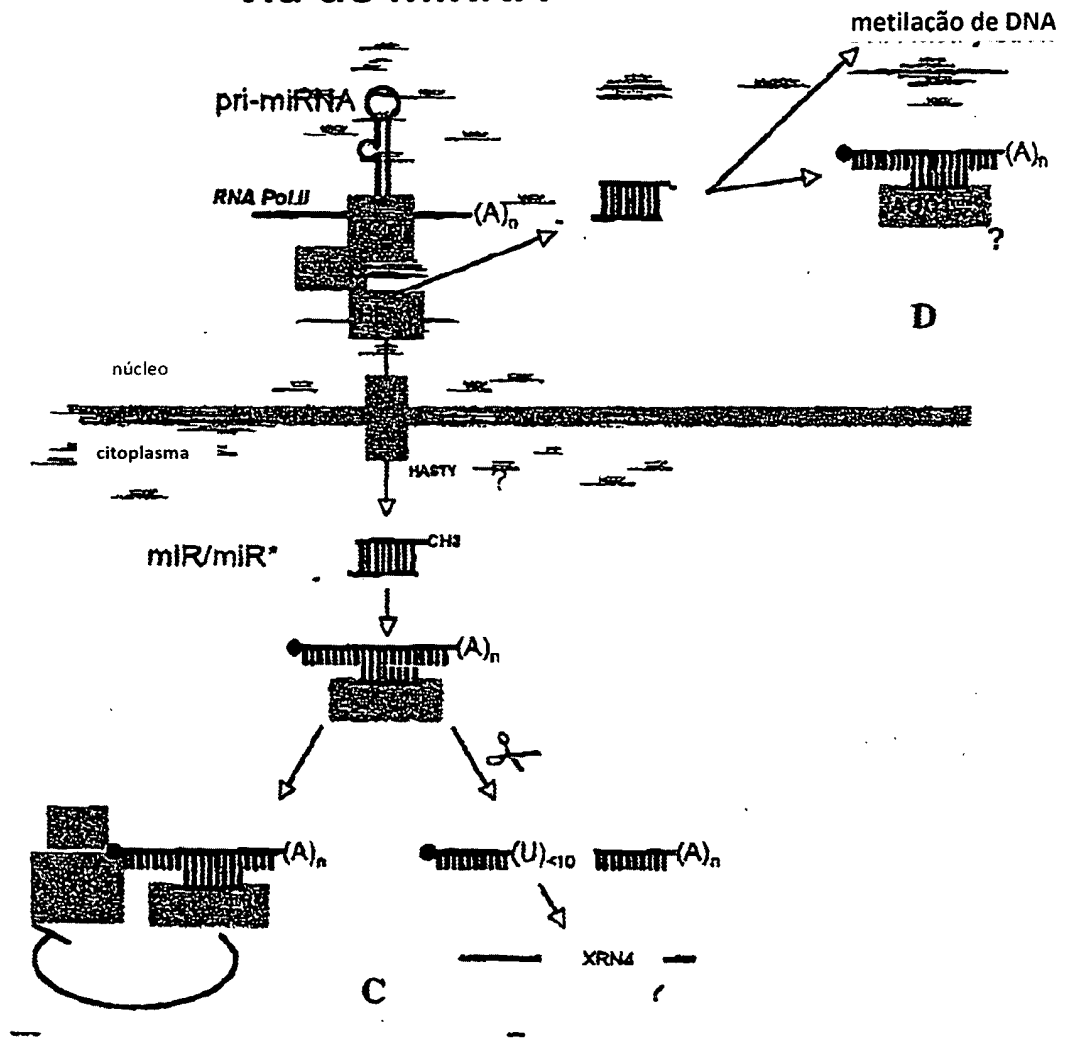


Fig. 1c

Silenciamento transitório de RNA

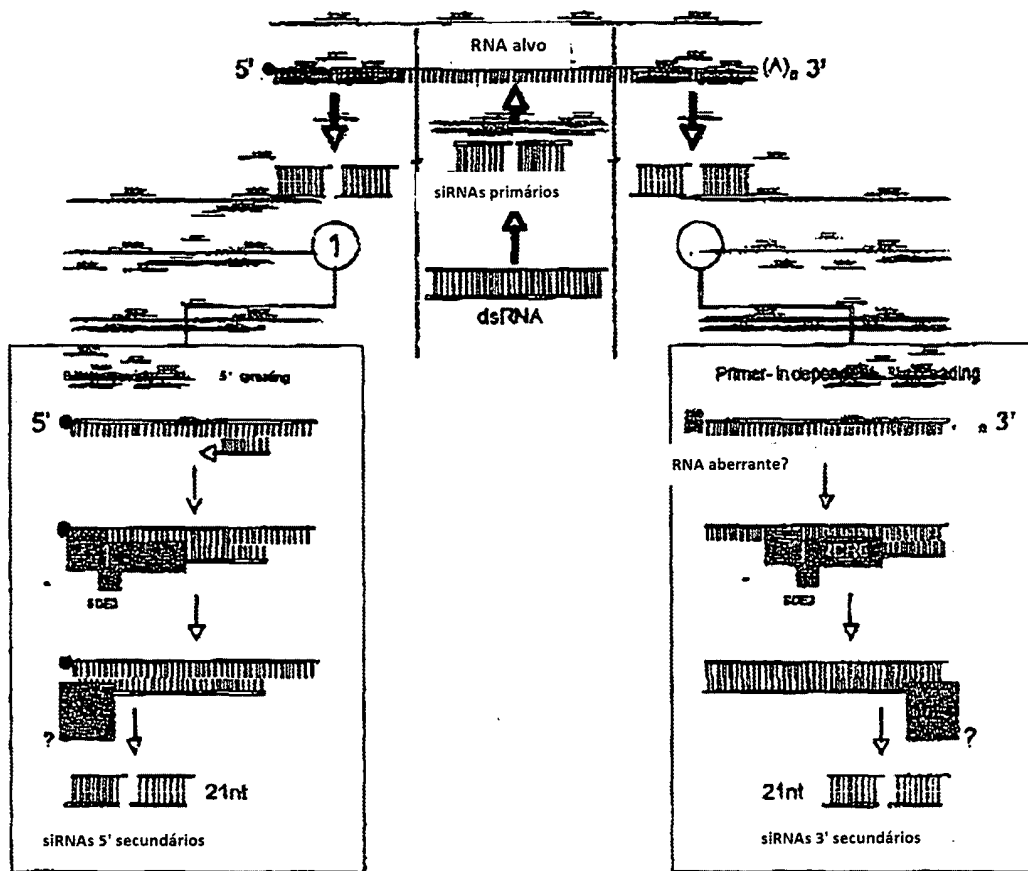


Fig. 2

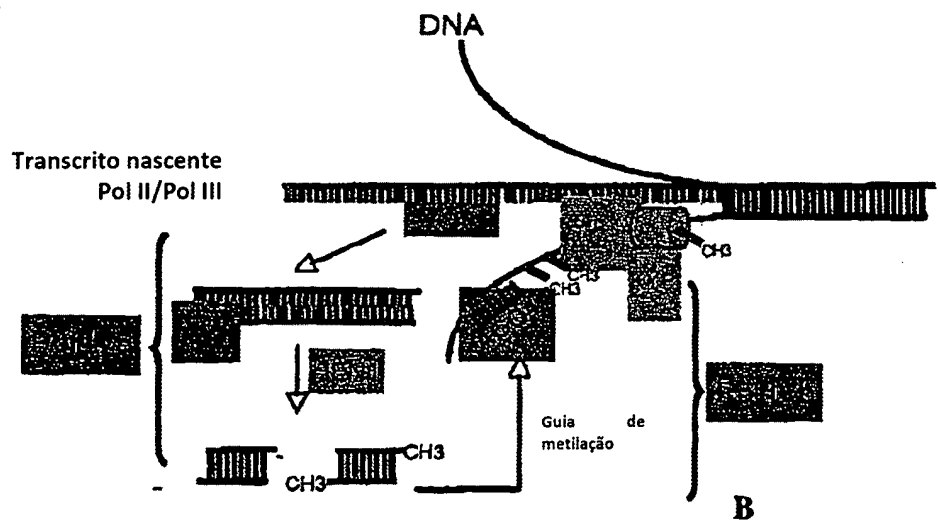
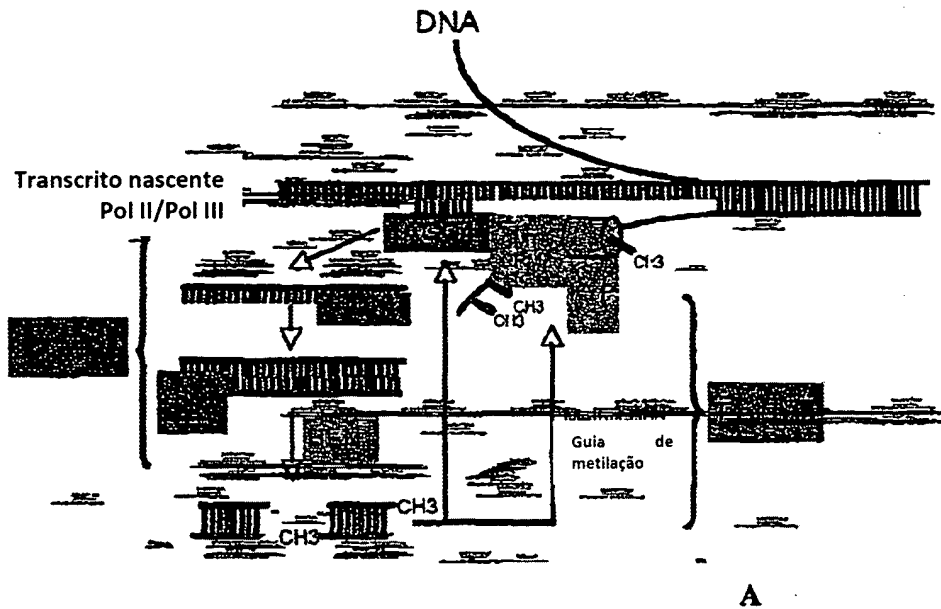


Fig.3

>Sequência à montante de AtmiR393a

CTAAATTCCTAA/AAACCTTCAATTAAGACCTTACTTTAIGTGATTTCAFCGACCATGAAACACTEACTCTCCATAG
TATTCCTACTTTCATTTCTTAAACATTCATGATTTCATAACGACTAAGTGTATTTGTAGAGTCCACTACATTTCTCCACACGCA
CATECAACCTFAACCCAAAACCAACCTGCAACCACTAATTCOCRTATCACCTTCCTTACTATTTCTTTGACTCGACA
TCCTTAATTTTCATCAGAAAGACTTCCGAARATTAATAATATATGATGAATFAAATTTAGTTGTAAATTTTGTAGAAATA
TCTTAZAAATTCCTAATTTAGGATATTAAAGATGATGCATAATCTTGLCTTAAABAAAAGAAAGCAAGCTTACATTTCTATT
TTTTTTTCTTGCATGTCRAAATTTTCAAGGAGAAAATGACCAATCATGTGATTCCTATAATTAAGCCAGCGCATTATTGA
CATGTCACATGCAAAATTTCTCCCTTTTAACAAATTCCTATTCATTAATATAAATGATGACTATAATTTACTTATATC
ATGCTACACCAAGAGATACTTTCATCCATGTATACTTAAAGAAAATTTAGTCCATCATATGACCTATTCGCTA
CCTAAATA TGTGAGAGAAAGATTTAAGCTTTCAAGTATCATTCARAAAATAAATCAAAATATCATTTGACCTTTCTTGT
ACCAATATATTCACAGTATTTCTTTTCACTATTCATAAAAATAATTTTAAATTAACAAATTTATCATTTGACCTTTCTTCT
CAATCAATGTCCTTCAACTRAAATCATATTTGAGAGCTTATAZACCAGCTTTGATCCAAAATAGAACCCGACCA
TGGATGACCCGACTTCTCTTCTTATTAATAAAGCCAAACAAATTTAGTAAAGACCAAATAAATTAACACTCTCAC
CCAACTTCTCCGATATATATCTAAATTTCTCTCTCAACAGCTCTCTTTCTTTGAGCTACTGATTTCTCAACTAAATC
ACTTCTTTTATAGTAAAATGAAABAACAATTTACTCTCTTTCAGCTACTACCTACCTATGATGAACACCTGCTTCAATTT
TTAAGACTCCRTTAAAGAAAATTAACAATTTTCTCTCTCACTCTATGCACTGCTCACTCCAAAATGATCAATAATTTTACTA
CCTACAGTCTCATACATATATACCACTAATCTCTTTATCTTATTAAGAGCTTATACAAAATTTCTTACAGAAAATGAG
ACCTCTCTTTTACTAGCTTCAATAAGTCAATATBAATAAGAAAACCAAAGTTTCAAAAATAATATAAATAAATAAATA
AAATTTAAGCTTCAAAAATGAAACTAAAGCATAAATCAATATTATTAAATCAACAGCAACACTTCCATTCACAAA
AAACCAATTTCTCTCAATTTTATAGAGTGAAGAGAGATAGAGACTTGAACAAAATTTCTCA

Fig. 4

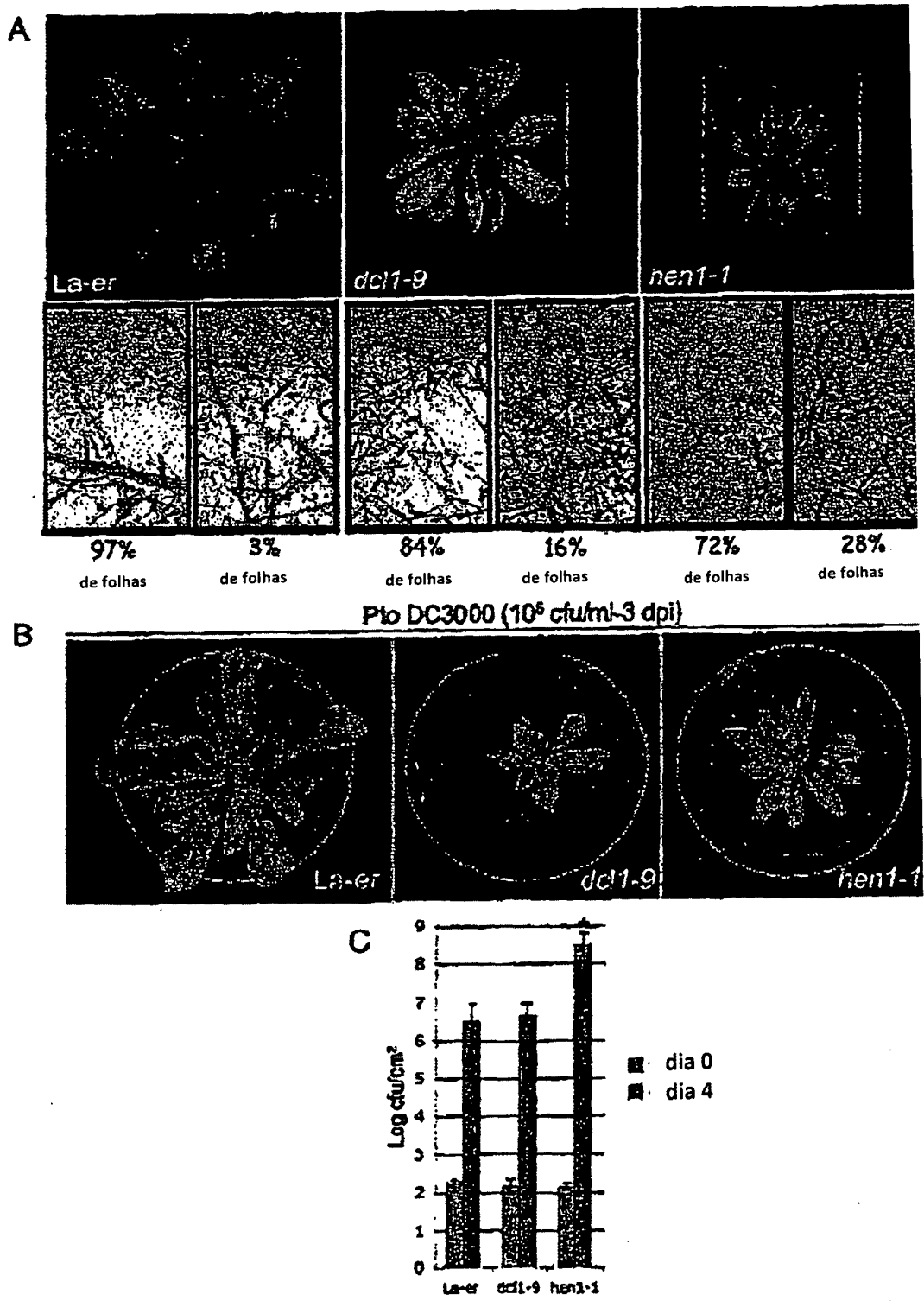
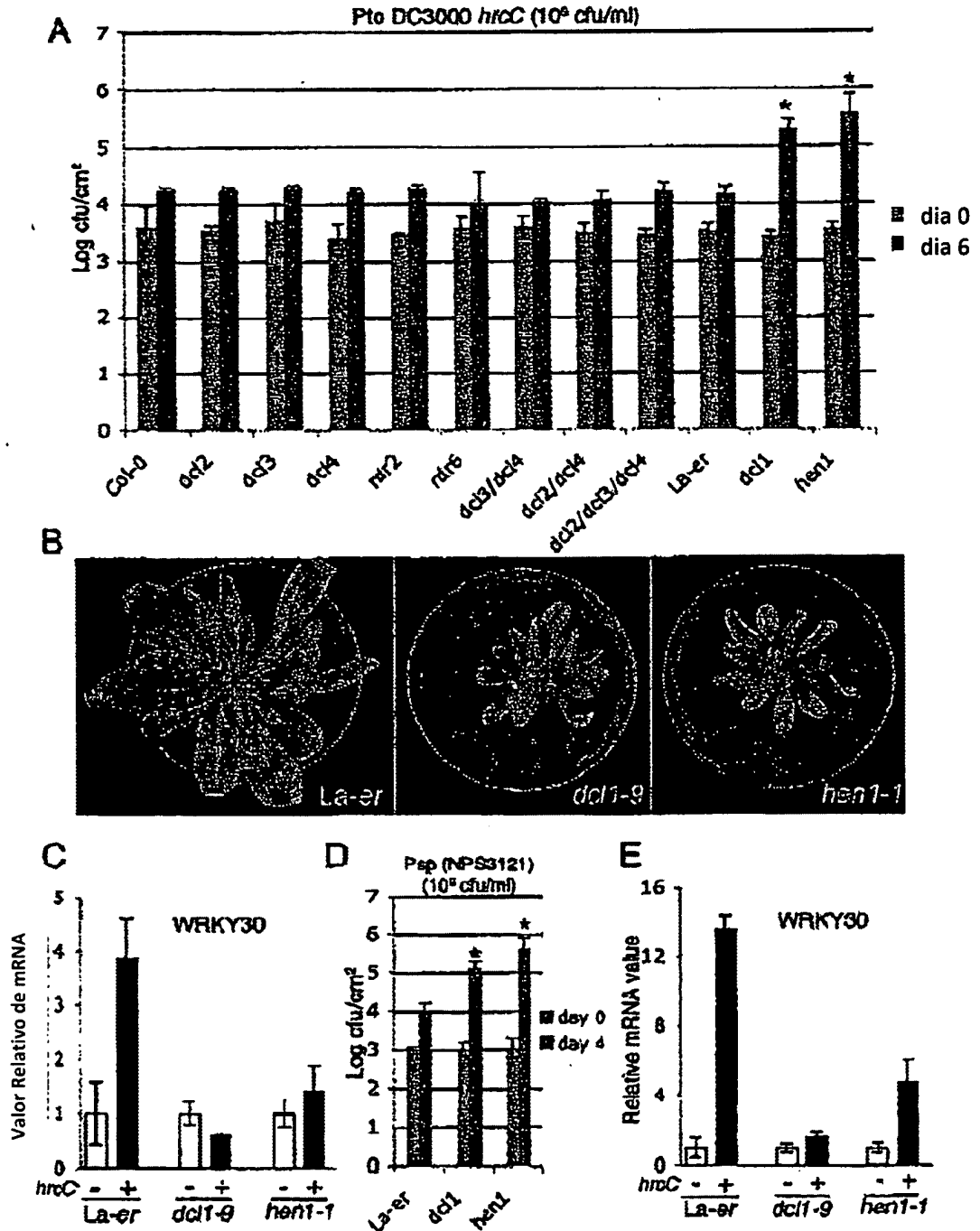


Fig. 6



Relative mRNA value - Valor relativo de mRNA

Fig. 7

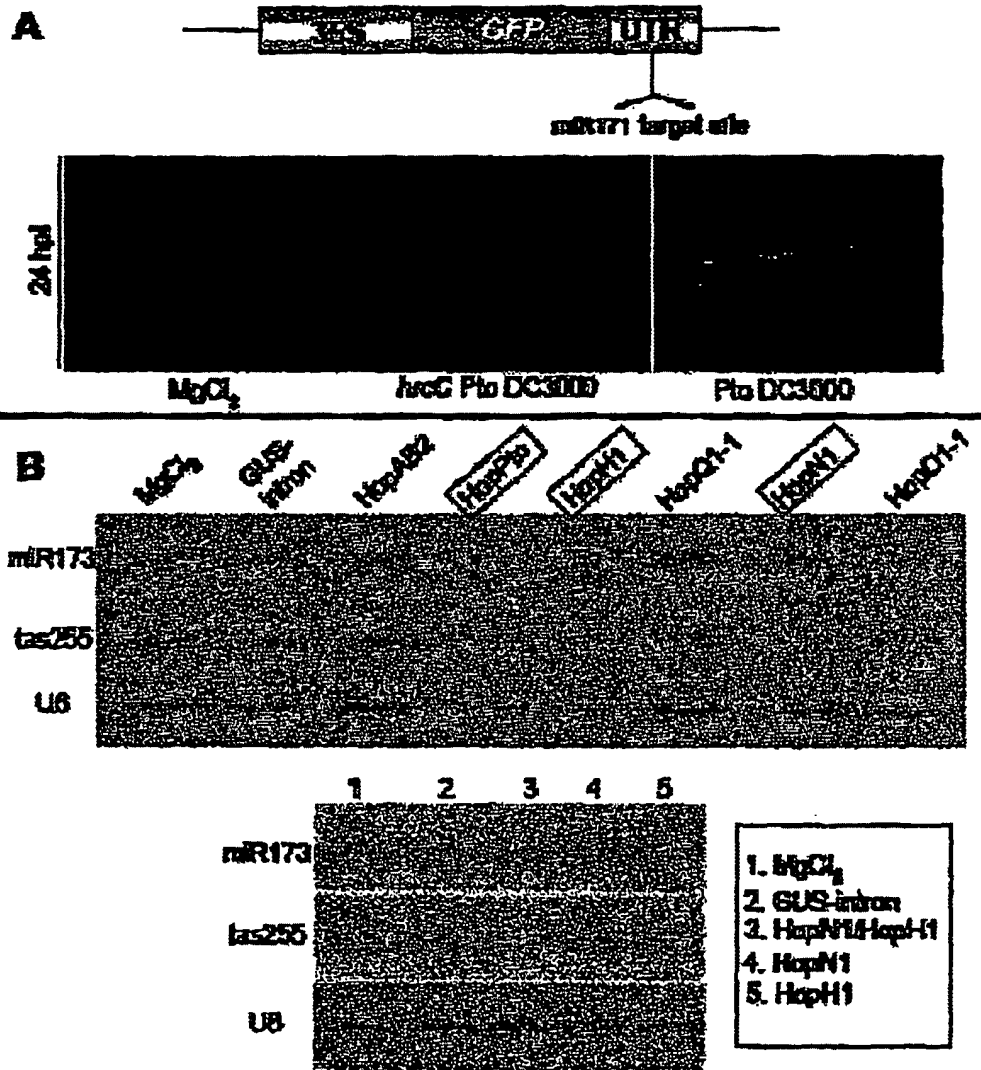


Fig. 8

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA MODULAR A VIA DE miRNA"**.

A presente invenção refere-se a um espectro específico de miRNAs de planta e animal que confere resistência aumentada a patógenos virulentos. Plantas deficientes de acúmulo de miRNA são hiper-suscetíveis a patógenos bacterianos não-virulentos e bactérias virulentas suprimem as vias de miRNA por meio de proteínas tipo III secretadas (TTS) injetadas. Métodos e composições para modular a via de miRNA em plantas e animais são descritos, através dos quais os efeitos adversos sobre o desenvolvimento da planta e animal são evitados ou minimizados.



PI0806742-2

REIVINDICAÇÕES

1. Método para modular a via de miRNA em plantas e animais, cujo método compreende:
 - introduzir em uma planta ou animal um construto de ácido nucleico que compreende um promotor responsivo constitutivo ou de patógeno operativamente ligado a uma sequência de miRNA primário (pri-miRNA) responsivo a um padrão molecular associado a um patógeno (PAMP) ou uma sequência que codifique uma proteína envolvida na biogênese ou atividade de miRNA.
- 5 2. Método da reivindicação 1 em que o dito pri-miRNA ou a dita proteína envolvidos na biogênese ou atividade de miRNA aumentam a resistência ao patógeno após a expressão na dita planta ou animal.
- 10 3. Método da reivindicação 1 em que o dito pri-miRNA é selecionado a partir daqueles da Tabela 2.
- 15 4. Método da reivindicação 3 em que o dito pri-miRNA é diferente de miR393.
- 20 5. Método da reivindicação 1 ou 2 em que a dita proteína envolvida na biogênese ou atividade de miRNA é selecionada do grupo que consiste em DCL1, AGO1, SERRATE e HEN1.
- 25 6. Planta ou animal não humano preparado pelo método de quaisquer das reivindicações 1 a 5.
- 30 7. Construto de ácido nucleico como definido em quaisquer das reivindicações 1 a 5.
8. Método para identificar compostos úteis na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais, cujo método compreende
 - expor a planta ou animal ou células de uma planta ou animal que tenham sido modificados para conter um sistema de expressão que compreende sequências de controle para expressão de um componente da via de miRNA operativamente ligado a uma sequência repórter em que a dita planta, animal ou células contenham opcionalmente também um desencadeador da expressão do componente da dita via de miRNA, a um candidato a composto, e

- detectar a presença ou ausência de expressão da sequência repórter,

através do que um composto que efetue a expressão da sequência repórter é identificado como um composto útil na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais.

9. Método para identificar um gene útil na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais, cujo método compreende:

- mutagenizar uma planta ou animal ou células de uma planta ou animal que tenham sido modificados para conter um sistema de expressão compreendendo sequências de controle associadas com a expressão de um componente da via de miRNA operativamente ligado a uma sequência repórter, em que a dita planta, animal ou células contenham também, opcionalmente, um desencadeador da dita expressão de componente da via de miRNA, e

- detectar o nível de expressão da sequência repórter, através do que um mutante que efetue a expressão aumentada da sequência repórter é identificado como contendo uma mutação de gene útil na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais, identificando o gene mutante.

10. Método para identificar compostos úteis na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais, cujo método compreende:

- expor uma planta ou animal ou células de uma planta ou um animal que tenham sido modificados para conter um sistema de expressão constitutivo para uma sequência repórter que pode ser silenciada por um miRNA, em que a dita planta, animal ou células contenham também, opcionalmente, um desencadeador da expressão do componente da dita via de miRNA para um candidato a composto e,

- detectar o nível de expressão da sequência repórter, através do que um composto que diminua o nível de expressão da sequência repórter é identificado como um composto útil na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais.

11. Método para identificar um gene útil na modulação seletiva

da via de miRNA em plantas e animais, cujo método compreende:

- mutagenizar uma planta ou animal ou células de uma planta ou animal que tenham sido modificados para conter uma expressão constitutiva para uma sequência repórter que pode ser silenciada pelo miRNA, em que a dita planta, animal ou células contenham também, opcionalmente, um desencadeador da dita expressão do componente da via de miRNA a um candidato a composto, e

- detectar o nível de expressão da sequência repórter, através do que um composto que diminua o nível de expressão da sequência repórter é identificado como um composto útil na modulação seletiva da via de miRNA em plantas e animais.

12. Método para identificar precursores de miRNA (pri-miRNA) responsivos a PAMP, cujo método compreende:

- isolar o RNA total do dito hospedeiro, e
- selecionar o RNA do RNA total isolado de um hospedeiro modificado para conter uma proteína que induza uma resposta de PAMP que é expressa em níveis elevados no dito hospedeiro quando comparado com um hospedeiro que não tenha sido exposto a dita proteína e que hibridiza com complementos de sequências à montante das estruturas stem-loop no genoma.

13. Pri-miRNA isolado responsivo a PAMP identificado de acordo com o método da reivindicação 12.

14. Pri-miRNA isolado responsivo a PAMP da reivindicação 13 que está descrito na Tabela 2.

15. Pri-miRNA isolado responsivo a PAMP da reivindicação 14 que é diferente de miR393.

16. Método para conferir resistência aumentada a patógeno em uma planta ou animal ou célula de planta ou animal, que compreende modificar a dita planta ou animal ou célula de planta ou animal para efetuar a expressão do pri-miRNA responsivo a PAMP de quaisquer das reivindicações 12 a 15.

17. Método da reivindicação 16, em que o dito pri-miRNA é ex-

presso sob o controle operativo de um promotor que é ativado pela exposição de uma planta ou animal ou célula de planta ou animal a um patógeno.

18. Método da reivindicação 17, em que o dito promotor é selecionado entre o promotor WRKY6 e o promotor PR1 ou outro promotor responsivo a patógeno incluindo o promotor de miRNA responsivo a PAMP.

19. Método da reivindicação 18, em que um ou mais elementos reguladores cis-atuantes estão dispostos à montante ou incorporados dentro do dito promotor e da sequência que expressa miRNA.

20. Método da reivindicação 19, em que o dito elemento regulador cis-atuante é selecionado do grupo que consiste em uma W Box, um elemento AuxRE, um elemento RY, um elemento FIM, múltiplos desses elementos e suas combinações.

21. Supressor de silenciamento bacteriano identificado pelo método aqui descrito.

22. Supressor de silenciamento bacteriano da reivindicação 21 selecionado do grupo que consiste de AvrPtoB, AvrPto, HopN1, HopH1, HopU1, HopT1 e HopY1.

23. Método para modular seletivamente a expressão de miRNA em uma célula, que compreende contatar a dita célula com o supressor de silenciamento bacteriano da reivindicação 21 ou 22 ou um sistema de expressão para isso.

24. Método para produzir uma proteína desejada em células hospedeiras recombinantes cujo método compreende cultivar as células que tenham sido modificadas para expressar um supressor de silenciamento bacteriano (Bss) e expressas um construto de ácido nucleico para expressão de uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína desejada.

25. Método da reivindicação 24, em que as células hospedeiras recombinantes são células de planta.

26. Método da reivindicação 24 ou 25, em que Bss e a proteína desejada são expressas como uma proteína de fusão.

27. Sistema de expressão recombinante que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína de fusão composta por

um supressor de silenciamento bacteriano (Bss) e uma proteína desejada operativamente ligada a sequências de controle que realizam sua expressão nas células hospedeiras recombinantes.

5 28. Sistema de expressão da reivindicação 27, em que as ditas sequências de controle são operáveis em células de planta.

29. Sistema de expressão da reivindicação 26 ou 27 em que a proteína desejada é uma proteína que é terapeuticamente eficaz em animais.

10 30. Sistema de expressão que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um supressor de silenciamento bacteriano operativamente ligado a sequências de controle heterólogas.

15 31. Método para conferir resistência a patógenos em uma planta que compreende selecionar plantas com componentes envolvidos na biogênese ou atividade de miRNA que se tornam resistentes a ação de supressores de silenciamento.

32. Método da reivindicação 31, em que o dito supressor é um supressor bacteriano de silenciamento.

33. Planta selecionada de acordo com o método da reivindicação 31 ou 32.

20 34. Método para manipular especificamente o acúmulo de miRNA a fim de alterar processos fisiológicos e de desenvolvimento normalmente orquestrados por aquelas moléculas, que compreende fundir uma sequência codificadora de supressor de silenciamento bacteriano Bss a um promotor de planta específico para tecido que direciona a expressão em raízes, folhas, caule, inflorescências, incluindo opcionalmente elementos pro-
25 motores pato-miR para obter controle espacial e temporal da atividade de miRNA.

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA MODULAR A VIA DE miRNA".

Um espectro específico de miRNAs de planta e animal confere
5 resistência aumentada a patógenos virulentos. Plantas deficientes de acúmulo de miRNA são hiper-suscetíveis a patógenos bacterianos não virulentos e bactérias virulentas suprimem as vias de miRNA por meio de proteínas tipo III secretadas (TTS) injetadas. Métodos e composições para modular a
10 via de miRNA em plantas e animais são descritos, através dos quais os efeitos adversos sobre o desenvolvimento da planta e animal são evitados ou minimizados.