

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.05.21	(73) Titular(es): JAPAN TOBACCO INC. 2-1, TORANOMON 2-CHOME, MINATO-KU TOKYO 105-8422	JP
(30) Prioridade(s): 2002.05.22 JP 2002147888		
(43) Data de publicação do pedido: 2005.02.16	(72) Inventor(es): KEISUKE KASAOKA YASUHITO SAITO SHIGERU KUWATA	JP JP JP
(45) Data e BPI da concessão: 2009.11.18 016/2010	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **VECTOR PARA O SILENCIAMENTO DO GENE E PROCESSO DO SILENCIAMENTO DO GENE UTILIZANDO O MESMO**

(57) Resumo:

Descrição

"Vector para o silenciamento do gene e processo do silenciamento do gene utilizando o mesmo"

Campo técnico

A presente invenção refere-se à utilização de um vector de vírus para provocar o silenciamento do gene (designado na presente como vector de silenciamento do gene) e a um processo de silenciamento de gene utilizando o vector. Mais particularmente, a presente invenção refere-se a um processo de silenciamento do gene do tipo induzido por vírus que exhibe uma elevada probabilidade de ocorrência de silenciamento do gene, sendo isto herdado de acordo com a lei de Mendel.

Técnica anterior

A supressão da expressão de um gene alvo específico é uma técnica promissora não somente para um aspecto de investigação com o objectivo de análise das funções dos genes mas também para estimulação genético de plantas. Como um meio para este objectivo, é conhecido um processo anti-sentido, que introduz um ADN anti-sentido, que apresenta uma sequência base cuja direcção é oposta à direcção do gene alvo, dentro de uma célula para inibir a tradução do gene alvo. Contudo, o processo anti-sentido apresenta o problema de ser difícil a inibição completa da produção da proteína.

Para resolver o problema acima descrito envolvido no processo anti-sentido, têm-se multiplicado recentemente

estudos de silenciamento de genes. Os silenciamentos do gene são classificados num que actua ao nível da transcrição de um gene (*Transcriptional Gene Silencing; TGS*) e um que actua após a transcrição (*Post Transcriptional Gene Silencing; PTGS*). Ambos diferem do processo anti-sentido em que na maioria dos casos, a supressão da expressão endógena do gene ocorre frequentemente numa gama de 100%. Recentemente têm havido muitos relatórios de pesquisa sobre PTGS; o fenómeno da decomposição rápida do mRNA transcrito foi reportado em mamíferos, plantas e microrganismos (SCIENCE vol. 288, 1370-1372; NATURE vol. 404, 804-808; etc.) Embora o mecanismo de PTGS ainda seja desconhecido no presente, o fenómeno é conhecido como cosupressão no campo da biotecnologia das plantas.

Contudo, o problema tem sido assinalado que a cosupressão exhibe uma baixa probabilidade de ocorrência de PTGS, e que é frequentemente observado que a indução de PTGS ocorre somente num troço do tecido.

Adicionalmente, é conhecido o silenciamento de genes induzido por vírus (VIGS) que utiliza um vector de vírus de modo a induzir PTGS eficientemente. Contudo, VIGS apresenta os problemas de envolver a utilização de vírus em si como um vector e de o silenciamento de genes não ser herdado.

Os inventores da presente invenção descreveram previamente na JP 6-133783 A, um vector para proporcionar células de batata com resistência à estirpe da necrose Y do

vírus da batata (PVY-N). Estudos posteriores conduziram à descoberta que o vector pode ser utilizado para o silenciamento do gene e realização da presente invenção. Quer dizer, a presente invenção proporciona a utilização de um vector de silenciamento de gene que suprime a expressão de gene alvo específico num hospedeiro.

Descrição da invenção

Um vector de silenciamento de gene utilizado de acordo com a presente invenção é um vector recombinante que compreende uma sequência de estimulação a jusante de um promotor e um codificador de gene um revestimento de proteína de origem potivirus (na presente ocasionalmente designado como "gene de codificação CP") a jusante do gene de codificação CP, em que um alvo específico construído que compreende um promotor, uma sequência do gene alvo e um terminador é inserido a jusante do terminador do vector.

Adicionalmente, o processo de silenciamento do gene de acordo com a presente invenção compreende transformar uma planta hospedeira com um elemento de gene obtido inserindo o gene alvo no vector, suprimindo deste modo a expressão do gene alvo na planta hospedeira.

O vector de silenciamento de gene de acordo com a presente invenção ou o processo de silenciamento de gene de acordo com a presente invenção provoca tais efeitos inesperados tais como:

(1) poder ser obtida uma elevada probabilidade de ocorrência de silenciamento do gene mesmo que exista somente uma cópia do gene alvo;

(2) podem ser disponibilizados indivíduos nos quais a expressão do gene alvo é controlada a vários níveis (suprimida numa gama de vários % a 100%) na geração actual;

(3) o silenciamento do gene pode ser herdado na descendência; e

(4) podem ser facilmente obtidas variedades em que a expressão do gene alvo é suprimida numa gama de vários % a 100% cruzando com uma variedade fixa, porque o silenciamento do gene é herdado de acordo com as leis de Mendel.

Breve descrição dos desenhos

Figura 1 diagrama ilustrando a construção de um vector PVY-T/CPW.

Figura 2 diagrama ilustrando a construção de um vector pYS415.

Figura 3 diagrama ilustrando a construção de um vector pYS412.

Figura 4 diagrama ilustrando a construção de um vector pYS436.

Figuras 5A

e 5B diagramas ilustrando a construção de um vector pYS465.

Figura 6 diagrama ilustrando a construção de um vector pYS466.

Nestes diagramas, os símbolos dentro dos mesmos são tal como se segue:

NPT = neomicina fosfotransferase, BR = margem direita, BL = margem esquerda, 35s-pro = promotor 35s do vírus do mosaico da couve-flor, NOS-ter = finalizador de nopalina sintétase, Amp = gene resistente à ampicilina, PVY-CP = gene de proteína de revestimento de PVY-T, GFP = gene GFP, GUS = gene β -glucuronidase, e PsDof1 = factores de transcrição do dedo de zinco da ervilha.

Forma de realização preferida da invenção

A seguir, a invenção será pormenorizadamente descrita.

Os inventores da presente invenção notaram que, num vector GS-PVY (JP 6-133783 A) desenvolvido de modo a tornar a batata resistente à linha de necrose Y do vírus da batata, um gene incorporado em redor de uma proteína de revestimento PVY-T ao longo de uma direcção de sentido é induzido a provocar o silenciamento de gene num hospedeiro, e verificaram que um gene estimulador de codificação e um gene que codifica a proteína do revestimento de origem virosa em que ambos existem a jusante de um promotor relacionam-se profundamente a PTGS.

O vector GS-PVY é um vector recombinante que apresenta uma sequência líder do mosaico do pepino (CMV) RNA4 a jusante de um promotor e um gene que codifica uma proteína de

revestimento da estirpe de necrose Y do vírus da batata (PVY-N) a jusante da sequência líder.

O promotor utilizado no vector de silenciamento do gene não se encontra particularmente limitado mas pode ser um desde que possa iniciar a transcrição da proteína de revestimento do vírus de origem. Por exemplo, podem ser utilizados o promotor 35S, promotor PAL e promotor PAL BOX.

A sequência líder do RNA 4 em CMV é apresentada em *Nitta et al., Japanese Journal of Phytopathology* 54: 516-522 (1988). Adicionalmente, é do conhecimento que a sequência líder de uma proteína estrutural de um vírus de uma planta geralmente tem o efeito de estimular a expressão das proteínas (*D.E. Sleat and T.M.A. Wilson, 1992, Plant Virus Genomes as Source of Novel functions for Genetic Engineering, In Genetic Engineering with Plant Viruses, T.M.A. Wilson and J.W. edição Davies, CRC Press, páginas 55-113*).

Por isso, no vector de silenciamento do gene, a sequência líder do RNA4 de CMV localizado a jusante do promotor do vector GS-PVY não se encontra limitada, mas pode ser qualquer sequência de estimulação desde que possa activar a transcrição da expressão da proteína; por exemplo podem ser utilizados um estimulador no promotor 35S (uma zona de -90 a -440) ou uma sequência de estimulação tal como uma sequência TMV- Ω .

É do conhecimento que a proteína de revestimento do vírus apresenta uma composição aminoácida específica de grupo

que possui uma baixa homologia com outros grupos de vírus. PVY-T é o vírus de uma planta que faz parte dos potivírus. O silenciamento do gene da presente invenção é considerado como sendo imputável à reacção protectora da planta contra a proteína de revestimento no vector de silenciamento do gene da presente invenção e estimulador do mesmo. Por isso, podem também ser utilizadas outras sequências de genes se eles codificarem proteínas de revestimento derivadas de potivirus que pertencem ao mesmo grupo que PVY-T e apresentam elevadas homologias. Os exemplos deste incluem as proteínas de revestimento derivadas de PVA, PVV, PrLV, PrMoV, TEV, TVBMV, TVMV, e TWV.

Adicionalmente, de modo a aumentar a eficiência do silenciamento de genes, a sequência de genes que codifica a proteína não é empregue individualmente, mas podem ser proporcionadas várias sequências dos mesmos ou diferentes em tandem.

O vector de silenciamento de genes de acordo com a presente invenção pode ser construído com base em vectores base disponíveis apropriados. É preferível que o vector base apresente uma origem de replicação que funciona na célula hospedeira adicionalmente ao promotor acima descrito. Além disso, é preferível que o vector base apresente um terminador e um marcador de selecção apropriado tal como resistência à droga. Por exemplo, o vector base pode ser facilmente preparado inserindo a sequência líder acima descrita de RNA4

de CMV e a codificação de sequência CP de PVY-T para dentro de um vector disponível apropriado utilizando enzimas de restrição de acordo com um processo convencional.

O processo de silenciamento do gene é caracterizado por uma planta hospedeira ser transformada com o referido vector de silenciamento do gene, em que o vector apresenta um gene adicional que é um alvo do silenciamento do gene (a seguir designado como "gene alvo") ou um gene homólogo ao gene alvo numa direcção de sentido a montante ou jusante do acima mencionado gene de proteína de revestimento de origem de potivírus.

A planta hospedeira na qual o silenciamento do gene deverá ser provocado pela aplicação da presente invenção, não se encontra particularmente limitada. Os hospedeiros apropriados compreendem, por exemplo, batata e tabaco.

Na presente invenção, o elemento do gene alvo que compreende um promotor, uma sequência do gene alvo e um terminador é inserido a jusante do terminador do vector. O gene alvo não se encontra particularmente limitado e pode ser qualquer gene que existe no hospedeiro (gene endógeno) ou gene exógeno ou um fixo. Embora os genes que codificam o comprimento total do mesmo sejam desejáveis, os genes homólogos (por exemplo, aqueles que codificam uma parte da extensão total) podem também ser utilizados. Quando é utilizado um gene que apresenta uma homologia, é mais desejável o gene que apresenta uma homologia mais elevada; a

homologia é de preferência 70% ou mais, de maior preferência 80% ou mais. Adicionalmente, no que se refere a um número de genes alvo, uma cópia do gene pode proporcionar suficientemente o efeito da presente invenção. Contudo, para obter um efeito mais fiável, podem ser utilizados vários genes, por exemplo, em tandem. Deste modo, a incorporação do gene alvo no vector de silenciamento do gene e transformação da planta hospedeira com o mesmo pode induzir à supressão do gene alvo no hospedeiro.

O processo de transformar uma planta hospedeira não se encontra particularmente limitado e pode ser seleccionado um processo apropriado dependendo do género da planta hospedeira. Quando o hospedeiro é a célula de uma planta, é preferível que *Agrobacterium tumefaciens*, que apresenta uma elevada infecciosidade nas plantas, seja primeiro transformado com o elemento do gene obtido por incorporação de um gene alvo no vector de silenciamento de gene acima descrito, sendo depois o transformante inoculado na planta hospedeira para ter lugar a infecção. O processo de transformar *Agrobacterium tumefaciens* em si é conhecido e pode ser executado por, por exemplo, um processo de congelação-descongelação (documento mencionado: G. An et al., (1988) *Binary Vectors, In Plant Molecular Biology Manual A3, Kluwer Academic, Dordrecht* páginas 1-19).

Sendo assim, o silenciamento de um gene alvo é induzido com uma elevada probabilidade.

Adicionalmente, podem ser obtidos indivíduos nos quais a expressão de um gene alvo é controlada a vários níveis (suprimida numa gama de vários % a 100%).

Ainda adicionalmente, confirma-se que o silenciamento do gene de um gene alvo induzido pelo vector de silenciamento de gene não é somente efectivo na presente geração na qual a transformação é executada, mas também é herdado na descendência auto-fertilizada de modo que a expressão do gene alvo pode ser suprimida de modo estável e consecutivo.

Ainda adicionalmente, dado que o silenciamento induzido do gene é herdado de acordo com a lei de Mendel, a expressão do gene alvo pode ser suprimida em vários níveis não somente na descendência auto-fertilizada mas também na descendência cruzada com outras estirpes e pode ser suprimida completamente (100%). Por exemplo, tal como descrito em exemplos a seguir, cerca de 30 indivíduos (cerca de 50%) de 60 indivíduos de F1 suprimiram completamente a expressão de GFP utilizada como gene marcador, sendo que os restantes 30 indivíduos (cerca de 50%) apresentaram um nível baixo a médio de supressão da expressão GFP, mostrando deste modo o efeito do silenciamento do gene.

A seguir, a presente invenção será pormenorizadamente descrita através de exemplos. Contudo, os exemplos são proporcionados com o objectivo de ilustrar a presente invenção e não deverão ser considerados como limitativos do escopo da presente invenção descrita nas reivindicações.

Exemplo 1: Ensaio utilizando gene GFP como um marcador (supressão do gene exógeno na presente geração)

<Material e processo>

I. Preparação do vector

(1) Construção do vector PVY-T/CPW: Veja figura 1

Um vector pBI121 PVY-T/CP (JP 6-133783 A) obtido incorporando PVY-T/CP num vector de expressão de planta pBI121 (fabricado por *Clontech Corporation*, E.U.A.) foi hidrolisado com enzimas de restrição HindIII e EcoRI para garantir um fragmento de ADN que contém um promotor 35S, PVY T/CP, e terminador Nos. O fragmento foi depois introduzido nos lados da enzima de restrição HindIII e EcoRI de pUC19 (fabricado por *Takara Shuzo Co., Ltd.*) para se obter pUC19-PVY-T/CP. O vector foi hidrolisado com enzimas de restrição HindIII and EcoRI para recuperar o fragmento de ADN que contém um promotor 35S, PVY T/CP, e terminador Nos. Depois, o fragmento foi munido com uma extremidade cega com polimérise de ADN T4 para garantir um primeiro fragmento ADN com extremidade cega.

Por outro lado, um outro pBI121 PVY-T/CP foi hidrolisado com enzima de restrição HindIII e depois munido com extremidade cega com T4 ADN polimérise. O fragmento de ADN previamente munido com a extremidade cega foi ligado ao pBI121 PVYT/CP linearizado utilizando ligase T4 para proporcionar PVY-CPW no qual o promotor 35S, PVY-T/CP, e terminador Nos se encontram ligados num tandem duplo.

(2) Construção do vector pYS415: Veja figura 2

Tal como se segue foi construído um vector pYS415 que corresponde ao vector pBI121 PVY-T/CP de JP 6-133783A com um gene GFP incorporado no mesmo.

Primeiro, foi obtido pYS409 clonando para dentro de pUC19 (fabricado por *Takara Shuzo Co., Ltd.*) um promotor 35S, gene GFP, e terminador Nos foi hidrolisado com enzimas de restrição HindIII e EcoRI. Fragmentos de ADN contendo o promotor 35S, gene GFP e terminador Nos foram recuperados e munidos com extremidade cega com T4 ADN polimérise para se obter fragmentos de ADN munidos com extremidade cega. Depois, foi hidrolisado pBI121 PVY-T/CP com enzima de restrição EcoRI para o tornar linear e depois munido com extremidade cega com T4 ADN polimérise. O fragmento de ADN de extremidade cega obtido previamente foi ligado ao pBI121 PVY-T/CP de extremidade cega linearizado utilizando ligase T4 para resultar num vector pYS415 no qual o promotor 35S, gene GFP, e terminador Nos foram inseridos a jusante do terminador Nos em pBI121 PVY-T/CP.

(3) Construção do vector pYS412: Veja figura 3

Um vector pYS412 que corresponde ao vector PVY-T/CPW construído em (1) acima dentro do qual um gene GFP foi incorporado, foi construído tal como se segue.

Primeiro, no mesmo processo que no caso do pYS415 descrito acima em (2), pY409 que corresponde a pUC19 (fabricado por *Takara Shuzo Co., Ltd.*) que apresenta um

promotor 35S, gene GFP, e terminador Nos clonado dentro do mesmo foi hidrolisado com enzimas de restrição HindIII e EcoRI. Fragmentos de ADN contendo o promotor 35S, gene GFP e terminador Nos foram recuperados e munidos com extremidade cega com T4 ADN polimérise para se obter fragmentos de ADN munidos com extremidade cega. Depois, o PVY-T/CPW obtido acima em (1) foi hidrolisado com a enzima de restrição EcoRI para o tornar linear e depois munido com extremidade cega com T4 ADN polimérise, tendo sido o fragmento de ADN de extremidade cega previamente obtido ligado ao PVY-T/CPW de extremidade cega linearizado utilizando ligase T4 para resultar num vector pYS412 no qual o promotor 35S, gene GFP e terminador Nos foram inseridos a jusante do terminador 3' Nos em PVY-T/CPW.

II. Transformação em *Agrobacterium tumefaciens*

Os vectores pYS415 e pYS412 de transformação de planta acima construídos foram introduzidos separadamente na estirpe LBA4404 (Hoekema et al., *Nature* 303; 179-180, 1983) de *Agrobacterium tumefaciens* por um processo de congelação-descongelação para executar a transformação. Subsequentemente, a selecção por resistência à canamicina deu origem a colónias alvo nas quais pYS415 ou pYS412 foram introduzidos na estirpe LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.

III. Transformação em tabaco

Folhas de tabaco recolhidas das folhas superiores da planta do tabaco (*Petit Havana SR1*) cultivada durante 1,5

meses numa estufa foram esterilizadas na superfície com 70% de álcool etílico e 1% de hipoclorito de sódio, e lavadas com água esterilizada, seguido da preparação de discos de folha que apresentavam um diâmetro de cerca de 6 mm. Os discos das folhas juntamente com cerca de 10⁸ células de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com o vector da presente invenção tal como descrito acima, foram cocultivados durante 48 horas num meio líquido Linsmaier e Skoog que consiste em sais inorgânicos e 30g/L de sacarose.

Após isso, os discos das folhas foram lavados com água esterilizada contendo 250 mg/L de cefotaxima para retirar as bactérias, e depois colocados num meio induzido de germinação Linsmaier e Skoog que contém sais orgânicos, 0,3 mg/L de ácido 3-indol-acético, 10 mg/L 2ip de purina (6-r,r-dimetilalil-amino), 100 mg/L canamicina, 250 mg/L cefotaxima, e 0.9% agar. Após cerca de 1 mês, as hastes e folhas que mostraram resistência à canamicina foram colocadas num meio que induz a raiz Linsmaier e Skoog que contém sais orgânicos, 30g/L de sacarose, 100 mg/L de canamicina, 250 mg/L de cefotaxima, e 0.9% de agar. Após o cultivo durante cerca de 1 mês, os transformantes que desenvolveram raízes foram cultivados numa estufa de sistema fechado. A técnica acima descrita foi executada de acordo com o processo de *Komari et al.* (*Ther. Appl. Genet.* 77, 547-552, 1989).

IV. Análise dos transformantes

(1) Expressão do gene GFP

A expressão do gene GFP foi analisada ao detectar fluorescência emitida pelo transformante. Para medir a fluorescência, foi utilizado o *Molecular Imager FX* fabricado por *BIO-RAD Laboratories, Inc.* e a análise executada utilizando um sistema de análise de imagem *AQUACOSMOS* fabricado por *Hamamatsu Photonics Co., Ltd.*

<Resultados>

(1) Silenciamento do gene do gene GFP

A fluorescência do GFP do tabaco transformado transfectado com o elemento do vector acima descrito pYS415 foi medida pelo processo acima descrito. Como resultado, foi seleccionada a variedade dos tabacos transformados, variando os tabacos dos indivíduos que não emitem qualquer fluorescência verde para os individuais que emitem intensivamente fluorescência verde. Adicionalmente, a inoculação de vírus PVY-T permitiu a selecção de indivíduos que não apresentavam qualquer sintoma de doença de PVYT, i.e., indivíduos imunizados de somente aqueles indivíduos que não emitiam fluorescência verde. O relacionamento entre a expressão GFP e resistência PVY-T é apresentado no quadro 1 a seguir. Os resultados indicam que no tabaco transformado que exhibe resistência a PVY-T, a expressão de GFP é suprimida por silenciamento do gene. Isto indica que o vector da presente invenção suprime a expressão do gene GFP introduzido em elevadas ocorrências.

Quadro 1: Relação entre a expressão GFP e resistência PVY-T em tabaco transformado em que o vector GS-PVY + gene GFP foi introduzido

Intensidade da fluorescência verde	Número de indivíduos de tabaco transformado	Número de indivíduos resistentes ao PVY-T
Forte	2	0 (0%)
Fraco	6	0 (0%)
Nada	8	4 (50%)
Planta de tabaco de ensaio: <i>Petit Havana SR1</i>		
Elemento de ensaio: pYS415		

Note que a resistência PVY-T do tabaco transformado foi examinada de acordo com o análise descrita no parágrafo [0027] de JP 6-133783 A. Quer dizer, partículas purificadas de vírus de PVY-T foram inoculadas em tabaco Bright Yellow nr. 4 ou Burley 21. Após confirmar o sintoma de necrose após 2 semanas, as folhas infectadas foram amostradas, diluídas com solução tampão PBS-T (0,02M de solução tampão de fosfato) 2 a 10 vezes o peso fresco das folhas e depois homogeneizadas. O material homogeneizado foi inoculado em cada transformante. O transformante sujeito ao ensaio foi aclimatizado com um cravo de 12 cm e cultivado numa estufa de sistema fechado controlado a cerca de 21°C. Após 2 a 3 semanas da aclimatização, teve lugar a inoculação artificial. A inoculação foi executada revestindo 5 folhas das folhas superiores às centrais da planta de ensaio com uma mistura de

carboneto de silício de malha 600 e uma concentração predeterminada de material homogeneizado de vírus. Após a inoculação, a presença ou ausência de sintoma de necrose foi examinada com tempo durante 1 semana a 2 meses. Além disso, a presença ou ausência de partículas de vírus foi examinada utilizando ELISA para o grau de análise da resistência.

Exemplo 2: Experiências utilizando o gene GFP como um marcador (supressão do gene endógeno cruzando com outras espécies)

Entre os tabacos transformados do exemplo 1, foram seleccionados indivíduos (GBS18, GBS19) que apresentavam resistência a PVYT e expressão suprimida completamente de GFP devido ao silenciamento do gene. Após auto-fertilizar os tabacos transformados, os indivíduos (GBS18-13, GBS19-7, GBS20-9) que apresentavam resistência a PVY-T e que exibem expressão suprimida de GFP foram seleccionados da descendência (R1) auto fertilizante. Note que o silenciamento do gene foi induzido num estágio anterior para a linha GBS19 enquanto que as linhas GBS18 e GBS20 são linhas cujo silenciamento do gene foi induzido com o envelhecimento.

De seguida, GBS18-13 e GBS19-7 seleccionados tal como descrito acima foram cruzados com tabaco transformado (GFP-7-11) obtido por introdução e fixação do gene GFP no tabaco (*Petit Havana SR1*) de modo que GFP pode ser expresso numa taxa elevada. Sementes F1 seleccionadas foram esterilizadas à superfície com 70% de álcool etílico (durante vários

segundos) e 1% de hipoclorito de sódio (5 minutos), lavadas com água esterilizada por um processo convencional e disseminadas num meio Linsmaier e Skoog, seguido pela medição da fluorescência verde de GFP com tempo utilizando *Molecular Imager Fx* fabricado por *BIO-RAD Laboratories, Inc.* As condições de cultivo foram tal como se segue.

Condição de luz: Irradiado sob uma lâmpada fluorescente branca de 3.000 a 5.000 Lux durante 24 horas.

Temperatura de cultivo: 23°C a 25°C

Note que a semente de auto-fertilização e semente híbrida F1 de tabaco foram cultivadas tal como se segue. As sementes de auto-fertilização podem ser facilmente obtidas cobrindo a inflorescência do tabaco com um saco de papel de modo a impedir a mistura de pólenes. Adicionalmente, as sementes híbridas F1 podem ser obtidas emasculando indivíduos a serem hibridizados com objectivos individuais antes do cruzamento tomando o cuidado para que pólenes de outros indivíduos não se misturem, fixando pólenes de outro que tenha sido hidrolisado em estigma de um pistilo e depois cobrindo a fluorescência com um saco. Geralmente, após 4 a 5 semanas da fluorescência, as cápsulas ficam castanhas e as sementes amadurecem. Tabacos recombinantes são cultivados num sistema de estufa completamente fechado controlado de 20°C a 25°C, tendo sido depois sido feita a colheita de sementes auto-fertilizadas e sementes híbridas F1 de tabaco.

Como resultado, em todos os F1 fixos híbridos (GFP7-11 x SR1 cont.) entre o tabaco transformado (amarelo) do qual GFP é expresso numa elevada taxa e tabaco não transformado (vermelho), foi observada a expressão de GFP (laranja). Pelo contrário, ao cruzar com GBS18-13, GBS19-7 e GBS20-9, respectivamente, cerca de 30 indivíduos de 60 indivíduos de F1 (cerca de 50%) apresentavam a expressão de GFP (vermelha) completamente suprimida, sendo que os restantes 30 indivíduos (50%) mostraram resultados nos quais a expressão de GFP foi suprimida a níveis baixo e médio (laranja a vermelho). Adicionalmente, o exame da resistência a PVY-T indicou que todos os indivíduos nos quais a expressão GFP foi completamente suprimida (individuais vermelhos) apresentavam resistência ao PVY-T. No dia 8 a partir da sementeira asséptica, cerca de metade de GBS19-7xGFP7-11 (F1) foi completamente suprimida da expressão de GFP (ficar avermelhado), mostrando um tal resultado que o silenciamento do gene foi induzido como envelhecimento originado tal como a descendência de GBS18-13 e GBS20-9.

Os resultados acima indicam que o efeito de silenciamento do gene induzido no tabaco pelo vector GS-PVY é também mantido na descendência de auto-fertilização (R1) e adicionalmente sucedeu na geração de F1 obtida cruzando os mesmos com outras variedades de tabaco.

Exemplo 3: Ensaio utilizando o gene GUS como um marcador

<Material e Processo>

I. Preparação do vector

Um vector pYS436, que corresponde ao vector PVY-T/CPW construído em (1) acima do exemplo 1 e apresentando um gene β -glucuronidase (GUS) incorporado dentro do mesmo, foi construído tal como se segue.

Primeiro, pBI221 que corresponde a pUC19 (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) que apresenta um promotor 35S, gene GUS, e terminador Nos clonado dentro do mesmo foi hidrolisado com enzimas de restrição HindIII e EcoRI. Fragmentos de ADN contendo o promotor 35S, gene GUS e terminador Nos foram recuperados e munidos com extremidade cega com T4 ADN polimérise para se obter fragmentos de ADN munidos de extremidade cega. Depois, PVY-T/CPW foi hidrolisado com enzima de restrição EcoRI para os tornar linear e depois munido com extremidade cega com T4 ADN polimérise. A ligação do fragmento de ADN com extremidade cega previamente obtido foi ligado ao PVY-T/CPW de extremidade cega linearizado utilizando ligase T4 tendo resultado num vector pYS436 no qual o promotor 35S, gene GUS e terminador Nos foram inseridos a jusante do terminador 3' Nos em PVY-T/CPW (veja figura 4).

II. Transformação em *Agrobacterium tumefaciens*

O vector de transformação pYS436 de planta acima construído, foi introduzido na estirpe LBA4404 (Hoekema et al., Nature 303; 179-180, 1983) de *Agrobacterium tumefaciens*

para executar a transformação no mesmo processo que no exemplo 1. Subsequentemente, a selecção pela resistência canamicina deu origem a colónias objectivas nas quais pYS436 foi introduzido dentro da estirpe LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.

III. Transformação em tabaco

O vector obtido pYS436 foi transformado em discos de folhas da planta do tabaco (*Petit Havana SR1*) cultivada numa estufa durante 1,5 meses, no mesmo processo que no exemplo 1.

IV. Análise dos transformantes

(1) Expressão do gene GUS

Primeiro foi examinada a expressão do gene GUS em *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) no qual o gene GUS foi introduzido pelo vector pYS436. Como controlo foi utilizado o *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) transformado com o vector pBI121 (*Clontech Corporation*, E.U.A.) que apresenta um gene GUS incorporado no mesmo. Como resultado, ambos *Agrobacterium tumefaciens* no qual pYS436 foi introduzido e *Agrobacterium tumefaciens* no qual pBI121 foi introduzido apresentavam uma cor azul, que indica que no *Agrobacterium*, tanto o pYS436 como pBI121 expressam o gene GUS.

Depois, as expressões do gene GUS foram examinadas, para tabacos transformados para dentro dos quais pYS436 e pBI121 foram introduzidos utilizando o *Agrobacterium* acima descrito. Como resultado, os discos de folhas do tabaco transformado nos quais pBI121, como controlo foi introduzido

apresentavam a cor azul enquanto que os discos de folhas do tabaco transformado no qual pYS436 foi introduzido não apresentavam a cor azul. Os resultados encontram-se resumidos no quadro 2.

Quadro 2: Expressão GUS de transformantes para dentro dos quais pBI121 e pYS436 foram introduzidos, respectivamente

Transformante	Número de indivíduos ensaiados	Expressão do gene GUS
pBI121	13	13
pYS436	14	0

Os resultados acima indicam que no tabaco transformado no qual pYS436 se encontra introduzido, a expressão do gene GUS se encontra suprimido por silenciamento do gene.

Exemplo 4: Ensaaios utilizando um factor PsDof1 de transcrição de dedo de zinco da ervilha como um marcador (supressão de factor de transcrição endógena)

<Material e processo>

I. Preparação do vector:

Primeiro, um vector pYS465, que corresponde ao vector PVY-T/CPW construído em (1) acima do exemplo 1 e apresenta um promotor 35S, factor de transcrição de dedo de zinco de ervilha PsDof1 e terminador Nos incorporado no mesmo, foi construído tal como se segue.

pGEX-5X-1 tendo PsDof1 incorporado dentro do mesmo (documento citado: *Plant Biotechnology*, 19(4), 251-260 (2002)) foi hidrolisado com enzimas de restrição Sall e XhoI,

tendo sido recuperado um fragmento contendo o gene *PsDof1*. Este foi munido com extremidade cega com T4 ADN polimérise para obter fragmento de ADN de extremidade cega.

Depois, pCaMCN (fabricado por *Pharmacia AB*) foi hidrolisado com *Sall* para retirar o gene *CAT*, e munido com extremidade cega com T4 ADN polimérise. O fragmento de ADN de extremidade cega resultante foi ligado ao fragmento do gene *PsDof1* obtido previamente utilizando ligase t4 para obter um vector pCaMCN-*PsDof1* no qual o promotor 35S foi ligado a montante do fragmento do gene *PsDof1* e o terminador Nos foi ligado a jusante do mesmo.

Após isto, pCaMCN-*PsDof1* foi hidrolisado com *Xbal* e *EcoRI*, tendo sido depois recuperado um fragmento de gene no qual um promotor 35S foi ligado a montante do fragmento do gene *PsDof1* e um terminador Nos foi ligado a jusante do mesmo. Este foi munido com extremidade cega com T4 ADN polimérise para obter um fragmento de ADN de extremidade cega.

De seguida, o pBI101.2 (Toyobo) ao qual o gene *GUS* foi ligado foi hidrolisado com *Xbal* e *EcoRI* para retirar o gene *GUS*, sendo munido com extremidade cega com T4 ADN polimérise. O fragmento de ADN de extremidade cega foi ligado ao fragmento do gene obtido anteriormente no qual o promotor 35S foi ligado a montante do fragmento do gene *PsDof1*, tendo sido o terminador Nos ligado a jusante do mesmo utilizando ligase T4, obtendo deste modo um vector pBI101.2-*PsDof1*.

Depois, pBI101.2-PsDof1 foi hidrolisado com HindIII e EcoRI para recuperar o fragmento do gene no qual o promotor 35S foi ligado a montante do fragmento do gene PsDof1 e o terminador Nos foi ligado a jusante do mesmo, tendo sido este fragmento munido com uma extremidade cega com T4 ADN polimérise para obter um fragmento de ADN de extremidade cega.

De seguida, o PVY-T/CPW obtido em (1) do exemplo 1 foi hidrolisado com enzima de restrição EcoRI e munido com extremidade cega com T4 ADN polimérise. O fragmento de ADN de extremidade cega obtido previamente foi ligado com ligase T4 ao PVY-T/CPW de extremidade cega linearizado, resultando neste caso no vector pYS465 no qual o promotor 35S, gene PsDof1, e terminador Nos foram inseridos a jusante do 3' terminador Nos em PVY T/CPW.

Adicionalmente, foi construído um vector pYS466 no qual o promotor PAL, o factor de transcrição PsDof1, e terminador Nos foram incorporados dentro do vector PVY-T/CPW (veja figuras 5A e 5B).

pUC18 com promotor de repetidor BOX 5 e gene CAT incorporado dentro do mesmo (JP 2000-245463 A) foi hidrolisado com enzimas de restrição HindIII e BamHI para recuperar o fragmento de ADN do promotor PAL.

De seguida, pBI101.2-PsDof1 foi hidrolisado com HindIII e BamHI para retirar o promotor 35S, sendo que o fragmento resultante foi ligado ao promotor de PAL obtido previamente

com ligase T4, obtendo deste modo um vector pBI101.2-PALPsDof1. Além disso, o pBI101.2-PALPsDof1 foi hidrolisado com HindIII e EcoRI para recuperar um fragmento que continha o promotor PAL, gene PsDof1, e terminador Nos, tendo sido o fragmento resultante munido com uma extremidade cega com T4 ADN polimérise.

Depois, PVY-T/CPW foi hidrolisado com enzima de restrição EcoRI e depois munido com extremidade cega com T4 ADN polimérise. O PVY-T/CPW linearizado munido com a extremidade cega foi ligado com ligase T4 ao fragmento de ADN munido com extremidade cega obtido previamente, dando origem neste caso a um vector pYS466 no qual o promotor PAL, gene PsDof1, e terminador Nos foram inseridos a jusante do 3' terminador Nos em PVY-T/CPW (veja figura 6).

II. Transformação em *Agrobacterium tumefaciens*

Os vectores de transformação de planta pYS465 e pYS466 acima construídos foram introduzidos na estirpe LBA4404 (Hoekema et al., Nature 303; 179-180, 1983) de *Agrobacterium tumefaciens* para executar a transformação no mesmo processo que no exemplo 1. Subsequentemente, foi executada a selecção pela resistência canamicina, obtendo deste modo colónias alvo nas quais pYS465 ou pYS466 foram introduzidos dentro da estirpe LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.

III. Transformação em tabaco

Os vectores pYS465 e pYS466 obtidos foram transformados em discos de folhas da planta do tabaco (*Petit Havana SR1*)

cultivada numa estufa durante 1,5 meses, com o mesmo processo que no exemplo 1.

IV. Análise dos transformantes

(1) Silenciamento do gene de gene de factor de transcrição

A observação das alterações morfológicas do tabaco transformado com o vector pYS465 ou pYS466 indicou que os transformantes pYS465 apresentavam uma tendência de crescimento inicial atrasado. Por outro lado, alguns dos transformantes pYS466 apresentavam anomalia morfológica tal como formação de rugas na superfície das folhas e retracção da folha completa. Isto é considerado como sendo atribuível à ocorrência do silenciamento do gene de um factor de transcrição que apresenta uma homologia ao factor de transcrição PsDof1.

Tal como descrito acima em pormenor, de acordo com a presente invenção, podem ser obtidos efeitos extraordinários tal como alcançar o silenciamento do gene de um gene alvo específico num hospedeiro.

Lisboa, 18 de Janeiro de 2010.

Reivindicações

1. Aplicação de um vector de silenciamento de gene para silenciar um gene alvo numa planta hospedeira, compreendendo o referido vector de silenciamento de gene:
 - um vector recombinante que inclui
 - um promotor,
 - uma sequência líder de RNA4 de vírus de mosaico de pepino a jusante do promotor,
 - um gene que codifica uma proteína de revestimento de um vírus da batata e estirpe de necrose (PVY-N) que se encontra a jusante da sequência líder, e
 - um terminador que se encontra a jusante do gene, caracterizado por, de modo a provocar o silenciamento do gene do gene alvo específico numa planta hospedeira, é inserido a jusante do terminador do vector um elemento de gene que compreende um promotor, uma sequência do gene alvo e um terminador.
2. Aplicação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o referido promotor ser seleccionado do grupo que consiste no promotor 35S, promotor PAL e promotor PAL BOX.

3. Aplicação de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as proteínas de revestimento serem incorporadas para suprimir mais fortemente a expressão do gene alvo.
4. Aplicação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por a expressão do gene alvo ser suprimida, e a supressão ser estavelmente mantida não somente na presente geração de transformantes mas também na descendência autofertilizante.
5. Aplicação de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por o referido transformante ser adicionalmente cruzado com outra planta para proporcionar uma geração híbrida, sendo que o silenciamento do gene do gene alvo é mantido na geração do híbrido.
6. Aplicação de acordo com a reivindicação 1, em que a planta hospedeiro é tabaco.

Lisboa, 18 de Janeiro de 2010.

Resumo

"Vector para o silenciamento do gene e processo do silenciamento do gene utilizando o mesmo"

Um vector de silenciamento de gene de acordo com a presente invenção compreende um vector que inclui um promotor, uma sequência estimuladora a jusante do promotor, e um codificador de gene de um revestimento de proteína de origem potivirus, em que de modo a provocar o silenciamento do gene do gene alvo específico numa planta hospedeira, o vector é utilizado com um gene alvo específico ou um gene que é homólogo ao gene alvo inserido nas proximidades do gene que codifica a proteína de revestimento.

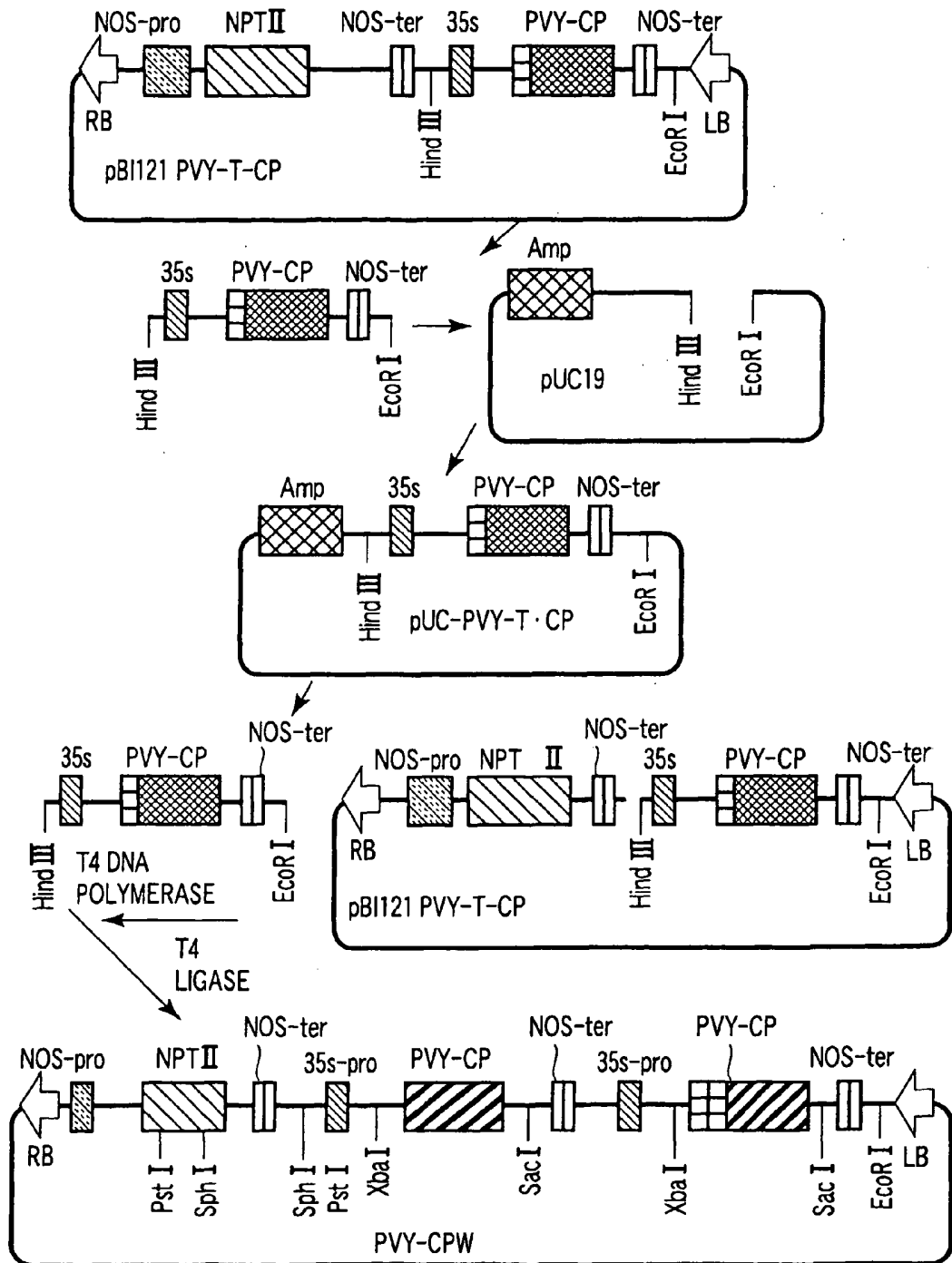


FIG. 1

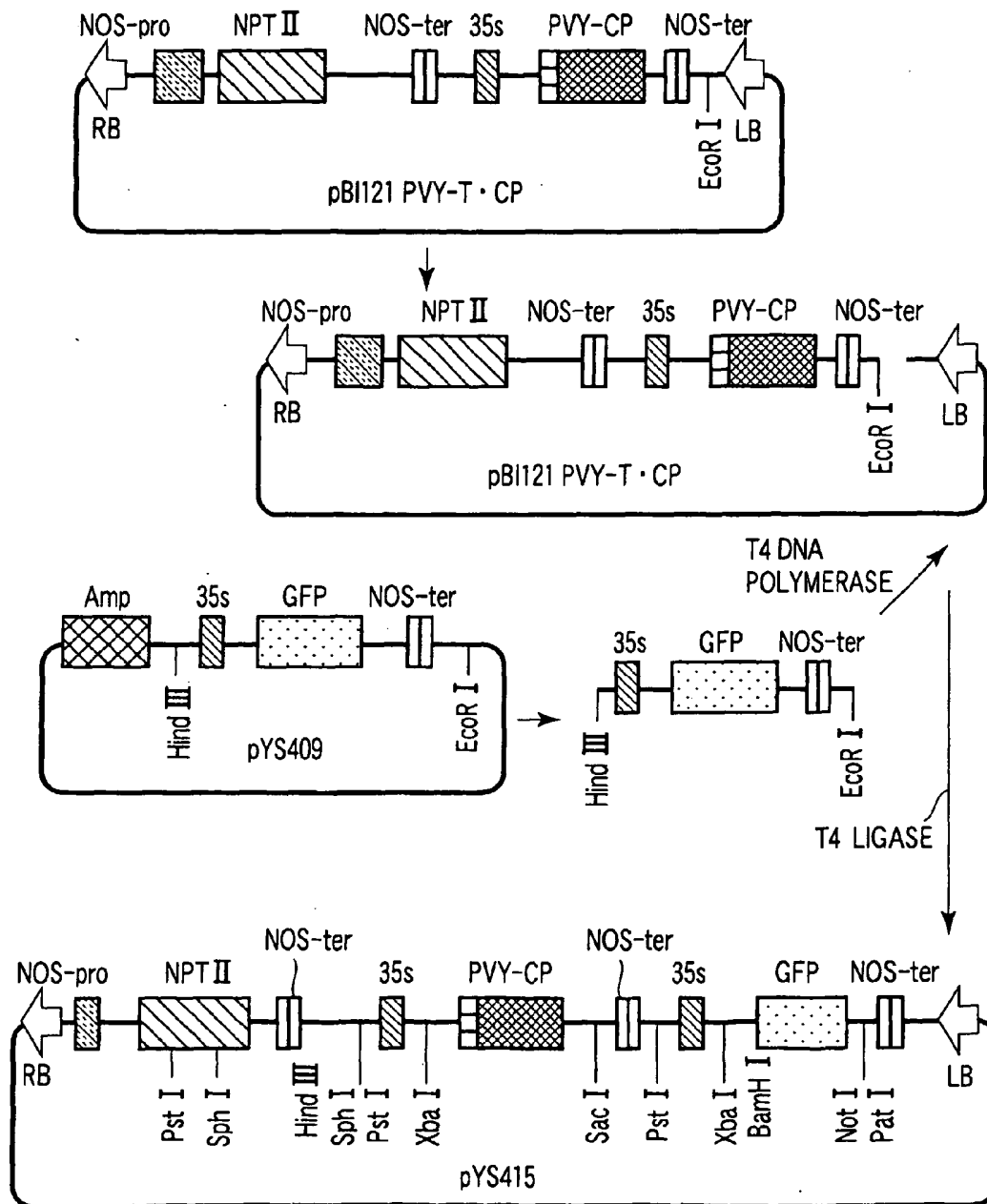


FIG. 2

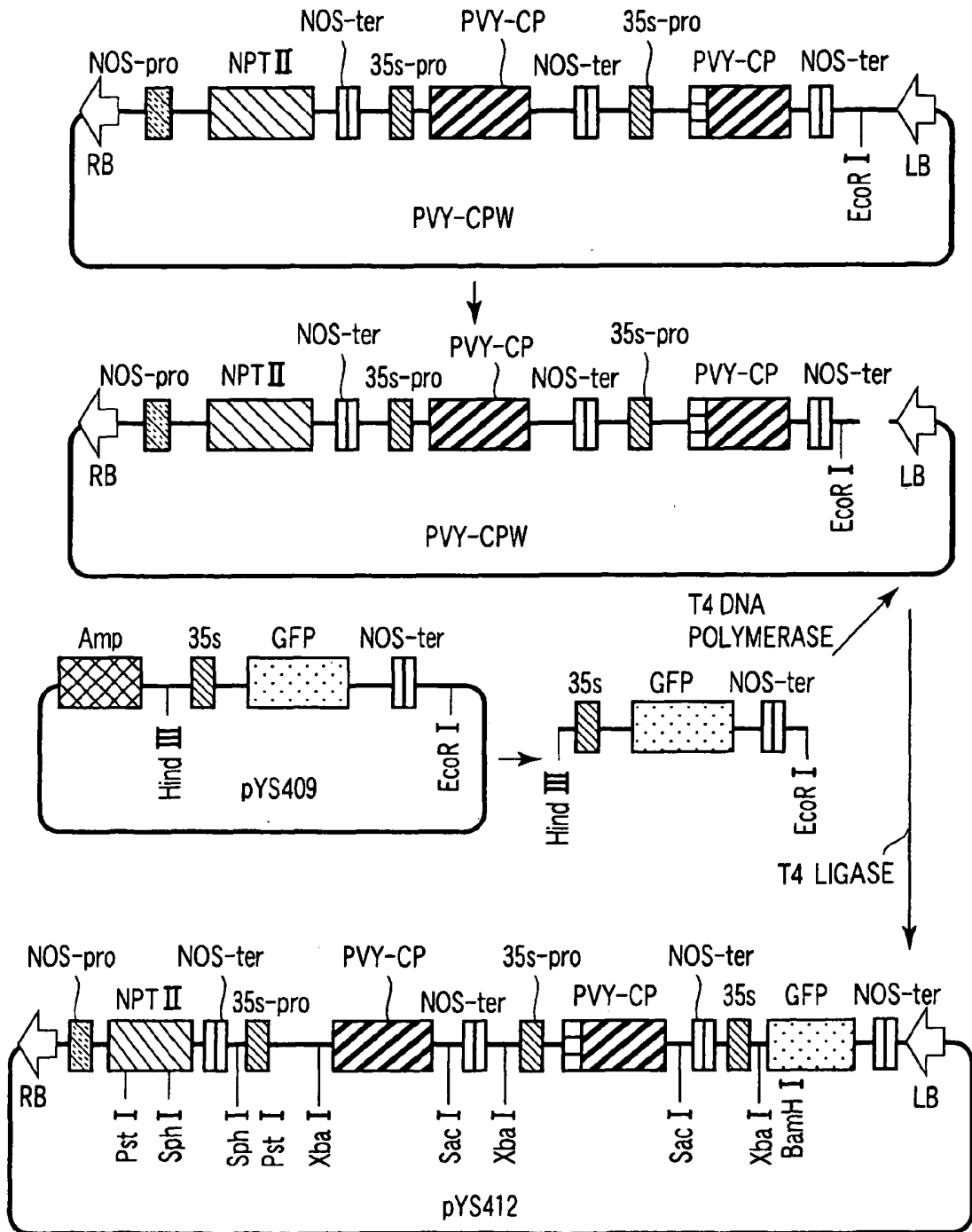


FIG. 3

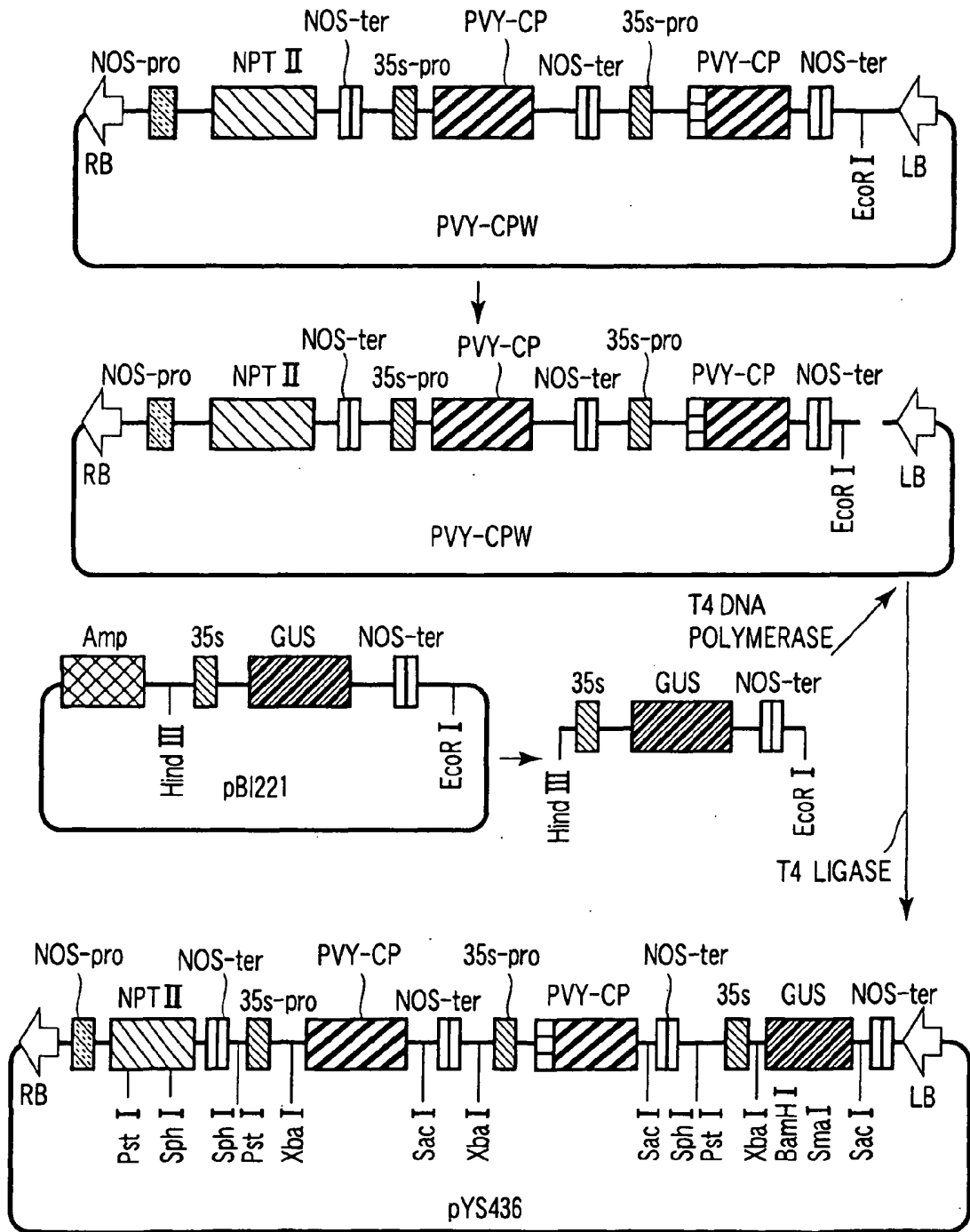


FIG. 4

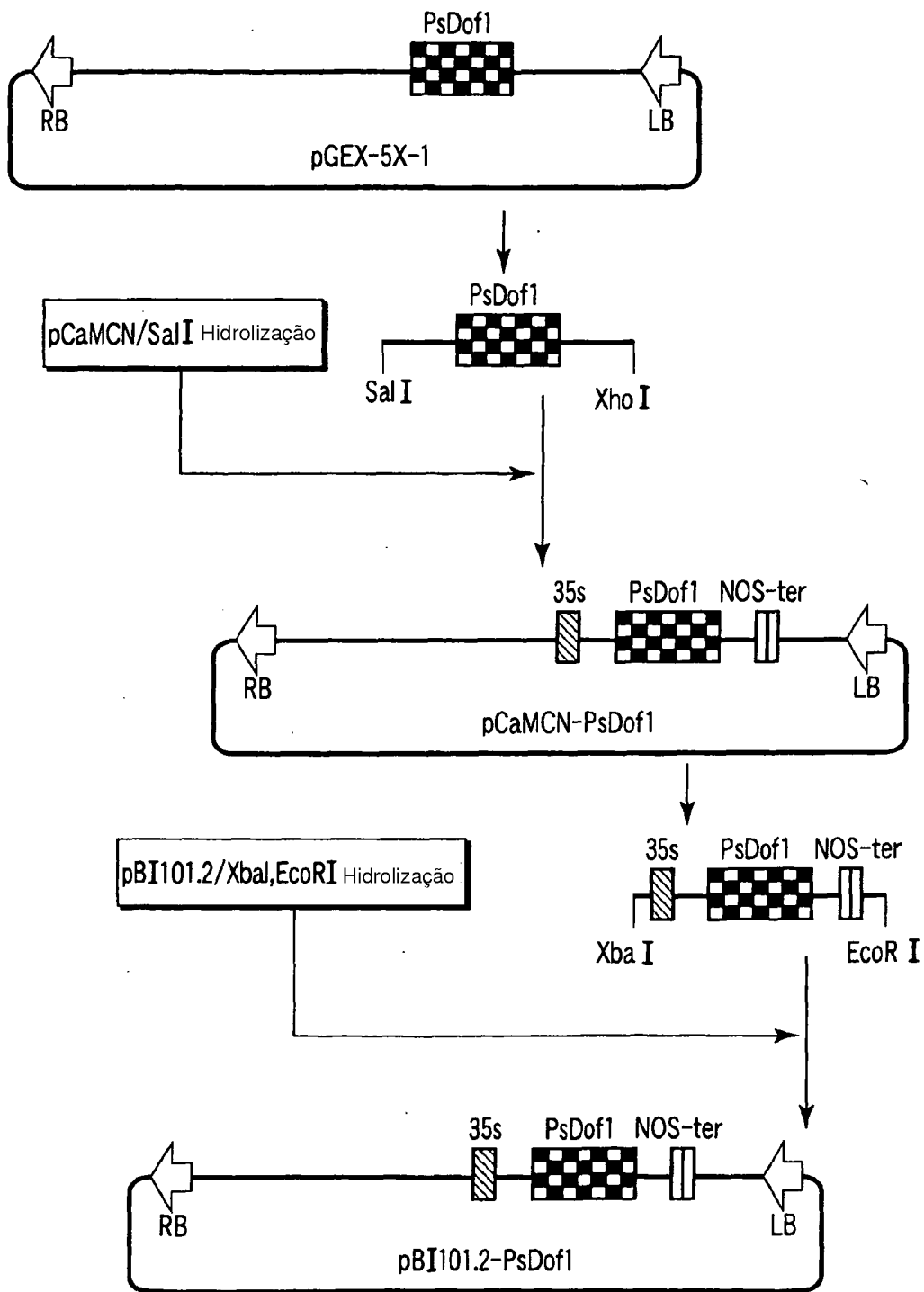


FIG. 5A

✱

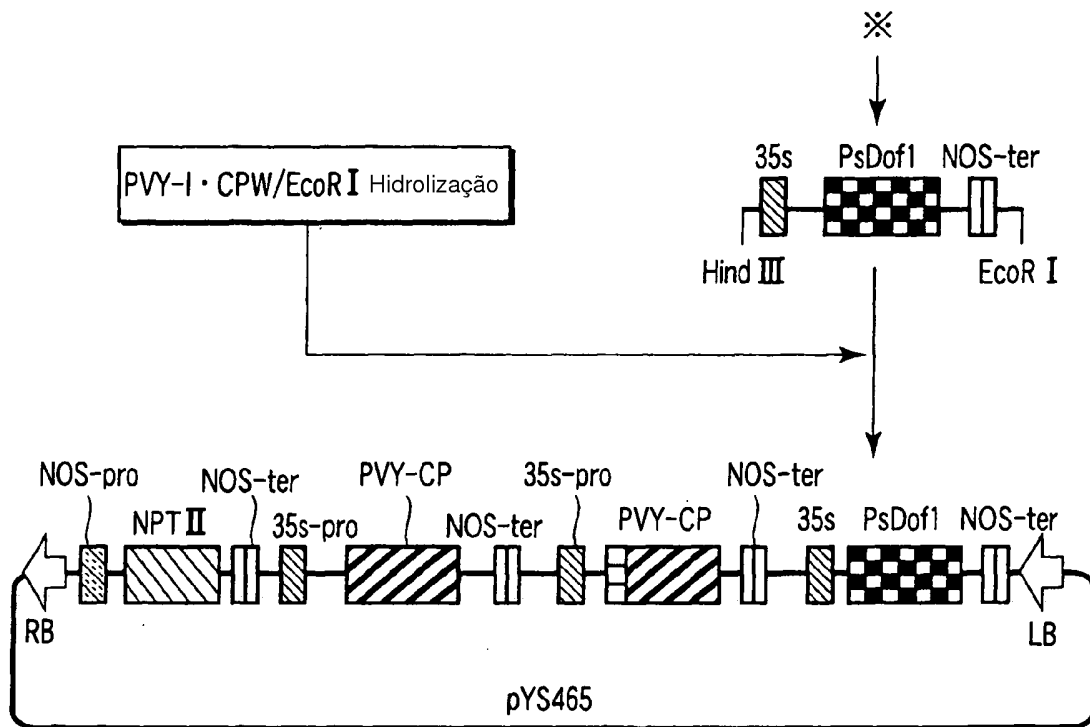


FIG. 5B

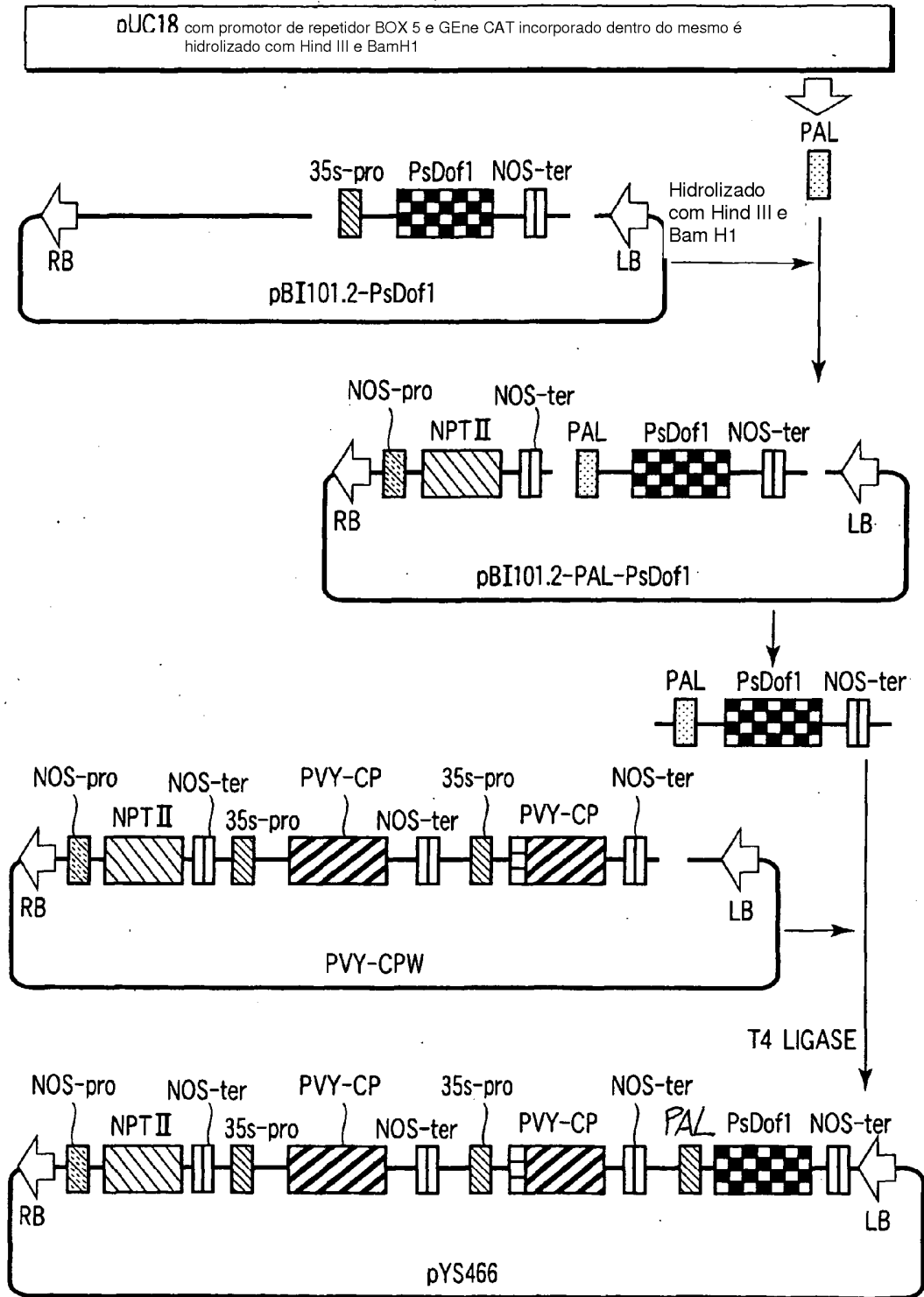


FIG. 6