



# Silenciamento Gênico e Transgênicos

Importância, mecanismos e modelos do silenciamento gênico

**Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo**  
MSc, Melhoria Genética Vegetal.  
Professora de Genética/UFPR - Campus Palotina  
vendruscolo.1@osu.edu;  
egvendru@vn.com.br

## Introdução

A estrutura genômica de plantas pode ser alterada por transformação genética durante o processo de transferência gênica utilizando-se *Agrobacterium tumefaciens*, biobalística e outras técnicas que integram parte de um genoma (gene exógeno) em um outro genoma (no caso, vegetal). A transgenia tem sido usada com o propósito de integrar seqüências gênicas de interesse com conseqüente alteração da expressão gênica. A expressão desse transgene nem sempre pode ser predita. Desse modo, o estudo das conseqüências dessas transformações tem-se tornado relevante nos últimos anos (VOINNET & BAULCOMBE, 1997; WATERHOUSE **et al.**, 1998; VAUCHERET **et al.**, 2001).

Vários termos podem ser encontrados na literatura para descrever o silenciamento gênico. Esses incluem cossupressão, RNAi (RNA de interferência) e quelling (interrupção da seqüência gênica) em leveduras. A cossupressão seria o termo aplicado ao silenciamento gênico do gene endógeno pela ação do RNA do transgene. Aqui ambos os genes, exógeno e endógeno, são coordenadamente suprimidos. Quelling é um termo de cossupressão usado em *Neurospora crassa*, e o RNAi é aplicado ao silenciamento gênico em animais, quando esse acontece pela ação de uma fita dupla de RNA, causando a não transcrição nem a tradução de determinado gene (BAULCOMBE, 2002).

Em vários experimentos, foram obtidas evidências do silenciamento gênico em plantas, que levariam à conclusão que, ao aumentar o número de cópias de um gene de interesse em particular, poderia reduzir a sua expressão (MAZTKE & MAZTKE, 1995; DEPICKER & VAN MONTAGU, 1997). WEI **et al.** (2001) comentam sobre uma correlação positiva entre o número de insertos com pobre expressão gênica. Vários transgenes inseridos podem ser silenciados após uma (relativamente) longa fase de expressão e podem, às vezes, silenciar a expressão (parcialmente) de genes homólogos localizados em posições ectópicas no genoma (FAGARD & VAUCHERET, 2000). Em alguns casos, o silenciamento gênico de transgenes pode desencadear a resistência a vírus e, em outros casos, a infecção viral pode silenciar a expressão de genes endógenos nas plantas (BAULCOMBE, 1996).

## Mecanismos de silenciamento gênico

O silenciamento gênico, como processo, corresponde a uma interação entre seqüências homólogas de DNA ou RNA. Até hoje, sabe-se que o RNA está envolvido em 2 tipos de silenciamento gênico dependente de homologia (SGDH): 1) SGPTS (silenciamento gênico pós-transcricional), onde a degradação de RNAs homólogos no citoplasma levaria a não tradução e 2) SGT (silenciamento gênico transcricional), que está

relacionado com o bloqueio na transcrição induzido por um RNA anti-senso derivado do próprio DNA, que promoveria uma metilação na região promotora, a nível nuclear, e a homologia para a metilação dirigida ocorreria nas regiões transcritas (WASSENEGGER, 2000; FAGARD & VAUCHERET, 2000; VAUCHERET *et al.*, 2001).

Embora os genes que interagem podem estar muito próximos no mesmo cromossomo e iniciar a inativação em *cis*, muitos sistemas estudados envolvem a interação de seqüências localizadas em diferentes cromossomos ou a *trans*-inativação. Ambos os tipos de SGDH estão freqüentemente associados com metilações *de novo* em seqüências-específicas do DNA nuclear (KOOTER *et al.*, 1999; WASSENEGGER, 2000).

O mecanismo de silenciamento gênico transcricional (SGT) estaria associado a metilações *de novo* na região do promotor do transgene, que poderiam ser meioticamente herdáveis (KOOTER *et al.*, 1999). Essa metilação seria induzida por pareamento de regiões homólogas de DNA ou ainda DNA-RNA. Esse pareamento constitui o passo inicial para a iniciação do SGPT (WASSENEGGER & PÉLISSIER, 1998). O pareamento induziria a uma metilação dentro da região codificante do transgene, que levaria a uma prematura interrupção de sua transcrição. Como resultado dessa síntese irregular de mRNA, um RNA aberrante (abrRNA) seria formado (WASSENEGGER & PÉLISSIER, 1998; HAMILTON & BAULCOMBE, 1999; MATZKE *et al.*, 2001).

Estudos recentes têm encontrado presença de um RNA de, aproximadamente, 25 nt em sense e antisense, com homologia ao RNA alvo, em plantas que apresentam cossupressão e resistência a vírus, mas que não são encontradas em plantas usadas como controle. Tal fato contribui para evidenciar que existem diferentes formas de silenciamento, porém todas agindo num mesmo mecanismo (HAMILTON & BAULCOMBE, 1999).

A resistência a vírus seria explicada pelo fato de estes abrRNA serem o molde para que as RNA polimerases dependentes de RNA (RPdR) do hospedeiro (vegetal) possam sintetizar pequenas moléculas de RNA anti-sense (METTE *et al.*, 1999; MATZKE *et al.*, 2001; MLOTSHWA *et al.*, 2002). Esses pequenos RNA antisense agiriam *in trans*, em seqüências de RNA complementares (RNA viral), levando à formação de RNA fita dupla (dfrRNA). Um complexo de RNases específicas para esses dfrRNAs (conhecidas como Complexo DICER ou RNases tipo III, específicas para as dfrRNAs), levariam a degradação dessas moléculas híbridas e, em consequência, tornariam a planta resistente ao vírus (METZLAFF *et al.*, 1997; CERUTTI, 2003).

No caso das integrações múltiplas, como as cópias do transgene, o silenciamento se iniciaria por um pareamento não recíproco entre o transgene e o gene endógeno, ou entre os transgenes e, como consequência desse pareamento, o locus receptor seria metilado, levando a uma terminação prematura da transcrição (ENGLISH & BAULCOMBE, 1996; WASSENEGGER, 2000).

A posição de integração do transgene também parece ser importante para o silenciamento pelo fato de o loci silenciador usualmente consistir de múltiplas cópias do transgene ligadas. Outro modelo que explica o silenciamento de transgenes em cópias múltiplas e invertidas é a formação de um RNA em alça (alrRNA), que, posteriormente, se transformaria em dfrRNA pela ação de RNA nucleases causando o efeito do silenciamento conforme foi descrito acima (WATERHOUSE *et al.*, 2001). De modo similar, o dfrRNA poderia também ser usado como molde para algumas RNA polimerases que transcreveriam moléculas de RNA anti-senso, homólogos aos mRNAs, formando os dfrRNAs e continuando o ciclo de silenciamento por indução do SGT e SGPT (KOOTER *et al.*, 1999; FAGARD & VAUCHERET, 2000).

## Modelos para explicar o silenciamento gênico

Vários autores têm sugerido modelos para os mecanismos moleculares envolvidos no silenciamento gênico, que não são eventos mutuamente exclusivos, mas que podem ser usados individualmente ou em conjunto para explicar o silenciamento gênico.

### 1. Silenciamento mediado pelo pareamento DNA-DNA

Esse modelo tem sido proposto para explicar certos tipos de cossupressão (JORGENSEN, 1990; MEYER & SAEDLER, 1996); a *trans*-inativação (MATZKE & MATZKE, 1990; CHANDLER & VAUCHERET, 2001) e a paramutação (MEYER *et al.*, 1993; CHANDLER & VAUCHERET, 2001).

O pareamento de regiões homólogas do DNA, devido à interação entre duas seqüências homólogas numa interfase da meiose, levaria à formação de estruturas em alças, que seria o precursor da difusão de metilações no DNA, induzindo o SGT (ENGLISH & BAULCOMBE, 1996).

Os transgenes diferem muito em sua capacidade de *trans*-inativar cópias homólogas, o que parece estar associado à capacidade de procurar outras posições cromossômicas com homologia. A presença de genes silenciadores muito próximos ao telômero sugere que regiões teloméricas são sítios favoráveis para a interação com seqüências homólogas (MEYER & SAEDLER, 2001).

### 2. Degradação de RNA em excesso

Em transgênicos, é comum o uso de promotores fortes para se conseguir a alta expressão do transgene. Como consequência, para a detecção de planta com o inserto, são esperados níveis altos do mRNA do transgene. Nesse modelo, os abrRNA seriam produzidos devido a uma alta taxa de transcrição do DNA, com isso, os altos níveis de mRNA. Se essa taxa de mRNA exceder a taxa de tradução, pode ocorrer, além da de-

gradação parcial desses mRNA, a terminação abrupta da transcrição, o processamento irregular, originando abRNAs e induzindo ao SGPT (WASSENEGGER & PÉLISSIER, 1998).

Outrossim, o excesso de produção de uma determinada proteína pode transmitir um sinal para a maquinaria de tradução a fim de induzir a terminação de sua própria transcrição. As proteínas em excesso seriam marcadas por ubiquitinas, por fosforilação ou por outras modificações pós-transcricionais (HOCHSTRASSER, 1996; WASSENEGGER & PÉLISSIER, 1998).

### 3. Híbridos DNA-RNA

A observação de que o pareamento DNA-RNA pode induzir padrões de metilação sugere mudanças no estado epigenético caracterizado por um estado específico de metilação do DNA ou da estrutura da cromatina, durante o período pré-meiótico ou de hibridização somática (MEYER & SAEDLER, 2001). Estudos indicaram que fragmentos de RNA poderiam induzir uma hipermetilação em seqüências homólogas (pareamento DNA-RNA), causando as mudanças epigenéticas. Tal fenômeno foi comprovado em estudos com plantas transgênicas que continham o cDNA dos virioides do PSTV da batata. A metilação no genoma do viróide foi observada mesmo sem que a replicação do seu RNA tivesse ocorrido (WASSENEGGER *et al.*, 1994; WASSENEGGER, 2000).

Os transcritos poderiam induzir a metilação em regiões homólogas de DNA, que seria comum em transformantes, os quais acumulariam grandes concentrações dos transcritos no núcleo, devido às altas taxas de tradução e do processamento irregular desses RNAs. Como consequência dessa marcação, a proteína e seus produtos, após degradação, poderiam reconhecer seqüências homólogas surgindo nos ribossomos, e levando ao término prematuro da transcrição, além de uma deadenilação na posição 3' e, com isso, ao surgimento dos abRNAs e a indução do SGPT (JONES *et al.*, 1999).

### 4. Modelo mediado por RNA antisense

O RNA antisense parece ser fundamental nos mecanismos de cossupressão. As fitas duplas de RNA seriam alvos gerados pelos promotores presentes no DNA do transgene e pela ação de RNA polimerases dependente de RNA (RPdR) (LINDBO *et al.*, 1993).

WASSENEGGER & PÉLISSIER (1998) ainda propõem que esse RNA poderia surgir devido à posição da seqüência de DNA produtora do RNA antisense, próximo a um promotor localizado adjacente a uma cópia de T-DNA integrado e em anti-senso.

A produção de RNA antisense pelas RPdR dependeria de níveis específicos do RNA senso e do acúmulo de intermediários de RNA (durante o processamento ou transporte). Essa hipótese se baseia no fato de que as RPdR reconheceriam os transcritos aberrantes, que seriam derivados de transcrição, transporte ou tradução incorreta do transgene. A produção de abRNA poderia induzir as mudanças epigenéticas do gene que influenciaria o seu processamento (MEYER & SAEDLER, 1996; WASSENEGGER, 2000).

Certos transgenes somente podem silenciar ou cossuprimir seqüências caso contenham um final 3' homólogo, enquanto certos transgenes com regiões 5' homólogas não são afetadas (ENGLISH *et al.*, 1996). Essas observações sugerem que os transcritos antisense são feitos preferencialmente nas regiões 3' do transgene (WASSENEGGER & PÉLISSIER, 1998).

#### O papel da metilação e da estrutura da cromatina no silenciamento gênico

Em recentes estudos sobre silenciamento em plantas, a ocorrência de pareamento entre seqüências homólogas parece ser condição importante para o silenciamento (BAULCOMBE & ENGLISH, 1996; VOINET *et al.*, 1998). O silencia-

mento em *trans* seria quando uma região metilada teria homologia com a região promotora de um determinado gene, dirigindo uma metilação *de novo* nessa região, para induzir o SGT. Tal fenômeno é conhecido como metilação do DNA dirigida por DNA (MDdD) (JONES *et al.*, 1999; METTE *et al.*, 1999; WASSENEGGER, 2000).

Muitos genes eucarióticos e elementos transponíveis exibem uma forte correlação inversa entre densidade de metilação do DNA e atividade transcricional ou transposicional. Ao certo, não se sabe se a ação da metilação da citosina alteraria a estrutura da cromatina, mas estudos em plantas demonstram uma correlação positiva entre o número de cópias do transgene, o aumento da metilação e a diminuição da atividade transcricional (KUMPATLA *et al.*, 1997).

Em eucariontes, os resíduos de citosina do DNA genômico podem ser metilados na posição 5' da citidina. As enzimas das DNA metiltransferases que realizam essa reação têm preferências por grupos CpG ou CpNpG. Em ambos os casos, o DNA recentemente replicado, que contém grupos CpG ou CpNpG hemimetilados, são fortes substratos para a ação das DNA metiltransferases. Tal padrão asseguraria as metilações de manutenção e de padrões de metilação pré-existentes nos cromossomos filhos (ATHERLY *et al.*, 1999).

Em transgenes, esse padrão de metilação não é igual. As metilações localizadas em resíduos de citosina não estão localizadas em seqüências CpG ou CpNpGp. Os fatores que especificam esse padrão de metilação não simétrico são ainda uma incógnita, mas parece que a metilação do DNA é dirigida por um RNA. Não se sabe se esse RNA seria o sinal em todos os casos da metilação não simétrica das citosinas em plantas (FINNEGAN *et al.*, 1998). Alguns autores denominam esse fenômeno de metilação do DNA dirigida por RNA (MDdR) (WASSENEGGER, 2000; BAULCOMBE, 2002). Esse padrão também não parece ser conservado

durante a meiose, em contraste com o padrão de metilação simétrica (PARK **et al.**, 1996; LUFF **et al.**, 1999).

Estudos têm demonstrado que a metilação do DNA e a estrutura da cromatina têm um importante papel no SGT e SGPT. Nessa forma de silenciamento, a região promotora e, às vezes, a região codificante dos transgenes silenciados apresentam-se densamente metilados (KOOTER **et al.**, 1999). Plantas mutantes para o gene da proteína DDM1, que remodela a cromatina, não apresentaram o silenciamento gênico. Isso indica um possível papel da metilação do DNA e da estrutura da cromatina no estabelecimento e na manutenção de SGPT. Supõe-se que o aumento da metilação leve à heterocromatização do DNA e, com isso, ao difícil acesso às RNA polimerases, diminuindo a ação transcricional (YE **et al.**, 1996; WASSENEGGER & PÉLISSIER, 1998; WASSENEGGER **et al.**, 2000).

Embora os modelos atuais proponham que a produção de um RNA aberrante, fruto de uma metilação, seja o causador de uma finalização prematura da transcrição do mRNA, existem estudos com linhagens defeituosas de *N. crassa* para o gene da metilase da citosina (dim2) que exibiram a mesma capacidade de silenciamento que a linhagem controle (dim+) (COGONI & MACINO, 1999). Fato semelhante foi observado em estudos realizados com plantas transgênicas de fumo, onde o gene nptII (neomicina fosfotransferase) metilado teve a transcrição e o SGPT normais quando comparado com uma cópia do gene nptII não metilado e não silenciado (VAN HOUDT **et al.**, 1997). Tais fatos indicam que a metilação não parece ser condição *sine qua non* para a indução e a manutenção do SGPT (PARK **et al.**, 1996).

### **Razões para a ocorrência do silenciamento gênico**

Diversos autores têm levantado o papel do silenciamento gênico. O

silenciamento gênico parece estar envolvido com a defesa a ácidos nucléicos estranhos (COVEY, 2000; JORGENSEN, 1995; MOURAIN **et al.**, 2000), com a proteção do genoma contra a inserção de elementos transponíveis (KETTING **et al.**, 1999; BAULCOMBE, 2002) e com a regulação da expressão gênica de famílias de multigenes ou ainda genes duplicados em plantas (TANZER **et al.**, 1997; CHANDLER & VAUCHERET, 2001).

Uma outra questão poderia ser levantada, se seqüências homólogas de DNA podem parear e se tornar silenciadas, como então explicar que membros de famílias de genes poderiam escapar da inativação? MATZKE & MATZKE (1995) propõem a existência de duas maneiras de prevenir esse pareamento: ou pela divergência de seqüências encontradas em alelos (heterozigosidade) ou devido à redução do comprimento de seqüências homólogas, o que sugere um papel muito importante para os íntrons, que dividiriam a região codificante da proteína em segmentos pequenos demais para realizar um pareamento efetivo.

Parece bastante unânime entre vários autores que o silenciamento gênico tem como função principal prevenir a superexpressão gênica, controlando o número de cópias de determinado gene ou ainda ser um mecanismo de defesa contra a superexpressão de transgenes (WASSENEGGER & PÉLISSIER, 1998; KOOTER **et al.**, 1999; WASSENEGGER, 2000).

### **Difusão e amplificação do silenciamento gênico**

Um dos mais importantes aspectos do silenciamento gênico é que este é um mecanismo autômato, isto é, pode ser induzido localmente e pode se espalhar para distantes locais no organismo (VOINNET **et al.**, 1998; COVEY, 2000). Esse transporte sistêmico do sinal de silenciamento parece relacionar-se com um sinal móvel, não metabólico, ainda não completamente identificado. Esse si-

nal, sendo parte integral do processo de silenciamento, parece interagir com proteínas de membranas, movendo-se de célula em célula através do floema (plasmodesmata), assemelhando-se com o padrão de infecção de vírus nas plantas (PALAUQUI **et al.**, 1997; VOINNET & BAULCOMBE, 1997; VOINNET **et al.**, 1998; MLOTSHWA **et al.**, 2002).

O SGPT teria três fases: início, manutenção e difusão propriamente dita. Os transgenes, os vírus e até mesmo o DNA exógeno (proveniente da transformação) poderiam iniciar o SGPT. Alguns autores sugerem que esse sinal seja na forma de RNA, mas não é conhecido ainda qual o tipo de RNA que estaria envolvido: se abrRNA, dfrRNA ou ainda o asRNA (METTE **et al.**, 1999; KOOTER **et al.**, 1999; MATZKE **et al.**, 2001; MLOSTHWA **et al.**, 2001).

Esse conceito de difusão célula-célula e de transporte a longas distâncias não pode ser descartado, visto que o vírus tem seu genoma composto por RNA e esse RNA difunde-se para dentro da planta, podendo se mover de célula-célula através de proteínas codificadas pelo seu próprio genoma (WATERHOUSE **et al.**, 2001).

Ainda não está completamente elucidado como o sinal para o silenciamento pode se espalhar sistemicamente pela planta e ainda ter seus efeitos amplificados. O silenciamento parece ser um mecanismo de prevenção, como a vacina é para os humanos. Parece sensato estabelecer que o silenciamento nada mais é que uma mensagem enviada pelas células já infectadas pelo vírus para aquelas que ainda não o foram, mas que estejam na iminência de o ser, para que essas preparem suas defesas contra o agente invasor. Se esse sinal contiver fragmentos da seqüência viral, as células receptoras poderiam estar preparadas para degradar qualquer RNA que contivesse essas seqüências, mesmo antes de o vírus chegar (RATCLIFF **et al.**, 1997; WATERHOUSE **et al.**, 2001).

Esse modelo poderia explicar algumas observações:1) de que plantas

transgênicas com transgenes derivados de vírus podem apresentar uma recuperação, isto é, apresentar os sintomas da infecção inicial do vírus, seguida de crescimento sem os sintomas e de resistência ao vírus. 2) plantas transgênicas apresentando cossupressão tendem, inicialmente, a apresentar atividade do transgene, mas um silenciamento progressivo em tecidos em crescimento (WATERHOUSE *et al.*, 2001).

### Considerações finais

Na última década, o estudo do silenciamento gênico cresceu consideravelmente. Já existem evidências de que características específicas do DNA, como a metilação e a estrutura da cromatina, são importantes para o fenômeno do silenciamento. Todavia, o seu mecanismo molecular ainda não foi totalmente elucidado, mas, em razão de observações funcionais dos RNA anti-senso, abRNA, dfrRNA, RNA polimerases e RNA nucleases, os estudos desse assunto puderam elaborar modelos para os mecanismos de SGDH, o SGT e SGPT.

É notória a existência de algumas dificuldades para o estudo do silenciamento gênico em plantas transgênicas. Variações entre as linhas de plantas transgênicas constituem uma grande barreira para o completo estudo desses mecanismos. Duas linhas transgênicas não são similares pelo fato de o transgene em cada planta se situar em diferente domínio no cromossomo, em diferente arranjo e também devido à associação com diferentes quantidades de DNA do vetor de transformação (IGLESIAS *et al.*, 1997; STAM *et al.*, 1997).

Apesar das dificuldades, vislumbram-se para essa área da ciência grandes e importantes descobertas: o completo entendimento da regulação gênica, a identificação dos fatores que podem afetar a expressão gênica e dos transgenes (talvez se discuta no futuro algumas propriedades dessa tecnologia) e, ainda mais, a compreensão dos mecanismos evolutivos.

### Agradecimentos

Aos pesquisadores Ivan Schuster (Coodetec) e Maria Júlia Corazza Nunes (UEM/PR) pelas correções e sugestões dadas. Agradeço a Deus por tudo.

### Referências bibliográficas

- ATHERLY, A.; GIRTON, J.; MCDONALD, J. F. The molecular structure of prokaryotic and eukaryotic chromosomes. **The science of genetics**. Ed. Saunders College Publish. 1999, p.299-301.
- BAULCOMBE, D..RNA silencing. **Current Opinion in Biology**. 12(3),R82-R84,2002.
- CERUTTI, H. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? **Trends in Genetics**. 19(1),39-46,2003.
- CHANDLER, V. & VAUCHERET, O. Gene activation and gene silencing. **Plant Physiology**. 125, 145-148, 2001.
- COGONI, C. & MACINO, G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA dependent RNA polymerase. **Nature** 399, 166-169, 1999.
- COVEY, S. Silencing genes silencing genes. **Trends in Plant Science**. 5(10), .404-406,2000.
- DEPICKER, A. & VAN MONTAGU, M post-transcriptional gene silencing in plants. **Current Opinion in Cell Biology**. 9, 373-382, 1997.
- ENGLISH, J. J. & BAULCOMBE, D. C. Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology**.7:173-180,1996.
- ENGLISH, J. J.; MUELLER, E.; BAULCOMBE, D.C. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. **Plant Cell**.8,787-797,1996.
- FAGARD, M. & VAUCHERET, H. (Trans) gene silencing in plants: How many mechanisms? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 51:167-194, 2000.
- FINNEGAN, E.J. DNA methylation in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**.49,223-247,1998.
- HAMILTON, A.J. & BAULCOMBE, D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science** 286, 950-952, 1999.
- HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. **Annual Review in Genetics**. 30:405-439, 1996.
- IGLESIAS, V.A. Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. **Plant Cell**. 9:1251-1264, 1997.
- JONES, L; HAMILTON, A. J.; VOINNET, O.; THOMAS, C. L.; MAULE, A. J.; BAULCOMBE, D.C.. RNA-DNA interactions and DNA methylation in Post-transcriptional gene silencing. **Plant Cell**. 11, 2291-2301, 1999.
- JORGENSEN, R..Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. **Trends in Biotechnology**. 8:340-344, 1990.
- JORGENSEN, R..Cossuppression, flower color patterns and metastable gene expression states. **Science**. 268:886-891., 1995.
- KETTING, R F.; HAVERKAMP, T. H. A.; VAN LEUNEN, H. G.; PLASTERK A.Mut-7 of *C. elegans* required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner Syndrome helicase and RNase D. **Cell** 99:133-141, 1999.
- KOOTER, J. M.; MATZKE, M. A.; MEYER, P. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. **Trends in Plant Science**. 4(9), 340-346, 1999.
- KUMPATLA, S.; TENG, W.; BUCHLOLZ, W.; HALL, T. Epigenetic transcriptional silencing and 5-azacytidine-mediated reactivation of a complex transgene in rice. **Plant Physiology**. 115:361-373, 1997.
- LINBDO, J. A.; SILVA-ROSALES, L.; PROEBSTING, W. M.;

- DOUGHERTY, W.G. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. **Plant Cell**. 5:1749-1759, 1993.
- LUFF, B.; PAWLOWSKI, L.; BENDER, J. An inverted repeat triggers cytosine methylation of identical sequences in *Arabidopsis*. **Molecular Cell** 3,505-511,1999.
- MATZKE, M.; MATZKE, A. J. M. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: what does it really tell us? **Trends in Genetics**.11(1):1-3,1995.
- MATZKE, M.; MATZKE, A. J. M.; PRUSS, G.; VANCE, V. RNA-based silencing strategies in plants. **Current Opinion in Genetics and Development**. 11:221-227,2001.
- MATZKE, M. A.; MATZKE, A.J.M. Gene interactions and epigenetic variation in transgenic plants. **Developmental Genetics**.11:214-223,1990.
- METTE, M. F.; AUFATZ, W.; VAN DER WINDER, J.; MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double stranded RNA. **EMBO Journal**. 19, 5194-5201, 2000.
- METTE, M. F.; VAN DER WIDEN, J.; MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans. **EMBO Journal**.18(1):241-248,1999.
- METZLAFF, M.; O'DELL, M.; CLUSTER, P. D.; FLAVELL, R. B. RNA mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in *Petunia*. **Cell** 88,845-854,1997.
- MEYER, P & SAEDLER, H. Homology-dependent gene silencing in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**.47:23-48,1996.
- MEYER, P.; HEIDMANN, I.; NIDENHOF, I. Differences in DNA methylation are associated with a paramutation phenomenon in transgenic petunia. **Plant Journal**. 4:86-100,1993.
- MLOTSHWA, S.; VOINNET, O. METTE, M. F.; MATZKE, M.; VAUCHERET, H.; DING, S.; PRUSS, G.; VANCE, V. RNA silencing and the mobile silencing signal. **Plant Cell**. 289-301,2002.
- MOURRAIN, P.; BEELIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J.; JOUETTE, D.; LACOMBE, A.; NIKIE, S.; PICAULT, N.; REMOUE, K.; SANTAL, M.; VO, T.; VAUCHERET, H. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. **Cell**. 101, 533-542, 2000.
- PALAUQUI, J. C.; ELMAYAN, T.; POLLIN, J. M.; VAUCHERET, H. Systemic acquired silencing: transgenic specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. **EMBO Journal**.16:4738-4745,1997.
- PARK, Y. D.; PAPP, I.; MOSCONE, E. A.; IGLESIAS, V. A.; VAUCHERET, H.; MATZKE, A. J.; MATZKE, M. A. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. **Plant Journal**. 9,183-194,1996.
- RATCLIFF, F.; HARRISON, B.; BAULCOMBE, D. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. **Science**. 276,1558-1560,1997.
- STAM, M; MOL, J. N. M.; KOOTER, J. M. The silence of genes in transgenic plants. **Annals of Botany**.79:3-12,1997.
- TANZER, M. M.; THOMPSON, W. F., LAW, M. D.; WERNSMAN, E. A.; UKENES, S. Characterization of post-transcriptionally suppressed transgene expression that confers resistance to tobacco etch virus infection in tobacco. **Plant Cell**. 9,1411-1423,1997.
- VAN HOUTD, H.; INGELBRECHT, I.; VAN MONTAGU, M.; DEPICKER, A. Post-transcriptional silencing of a neomycin phosphotransferase II transgene correlates with the accumulation of unproductive RNAs and with the increase cytosine methylation of 3'flanking regions. **Plant Journal**. 12, 379-392,1997.
- VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**. 114:3083-309,2001..
- VOINNET, O & BAULCOMBE, D.C. Systemic signaling in gene silencing. **Nature**.389:553,1997.
- VOINNET, O.; VAIN, P; ANGELL, S.; BAULCOMBE, D. C. Systemic spread of sequence specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. **Cell**.95,177-187,1998.
- WASSENEGGER, M. & PELISSIER, T. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. **Plant Molecular Biology**.37,349-362,1998.
- WASSENEGGER, M..RNA-directed DNA methylation. **Plant Molecular Biology**.43:203-220,2000.
- WASSENEGGER, M.; HEIMES, S.; RIEDEL, L.; SANGER, H. L. RNA-directed *de novo* methylation of genome sequences in plants. **Cell**.76,567-576,1994.
- WATERHOUSE, P.; WANG, M.; LOUGH, T. Gene silencing as an adaptative defence against viruses. **Nature** 411,834-842,2001.
- WATERHOUSE, P. M.; GRAHAM, M. W.; WANG, M. B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proceedings of National Academy of Science USA**.95, 13959-13964,1998.
- WEI, T.; LUO, X. Y.; SANMUELS, V. Gene silencing: double stranded RNA mediated mRNA degradation and gene inactivation. **Cell Research**.11(3)181-186,2001.
- YE, F.; SIGNER, E. R. RIGS (repeat-induced gene silencing) in *Arabidopsis* is transcriptional and alters chromatin configuration. **Proceedings of National Academy of Science USA**. 93:10881-10886,1996. 