



— ENJOY THE SILENCING —

RNA-*silencing*-basierte Methoden zum Schutz von Pflanzen vor viralen Infektionen

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I

(Biowissenschaften)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Frau Marie Knoblich

öffentlich verteidigt am 03.08.2023

Gutachter: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

Prof. Dr. Gary Sawers

Prof. Dr. Norbert Tautz

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	1
1.1	Herausforderungen für eine nachhaltige Landwirtschaft	1
1.2	RNA-Interferenz	2
1.2.1	Antivirales RNA- <i>silencing</i> in Pflanzen.....	2
1.2.2	<i>Dicer-like</i> -Ribonukleasen (DCLs): Ausgangspunkt des antiviralen RNA- <i>silencing</i>	3
1.2.3	ARGONAUTE-Proteine: Kernkomponenten des RNA- <i>induced silencing complex</i>	5
1.2.4	Potential und Limitationen der RNAi-Technologie für die Landwirtschaft.....	7
1.3	Das <i>Cucumber mosaic virus</i> (Gurkenmosaikvirus)	9
1.3.1	Verbreitung und Relevanz des <i>Cucumber mosaic virus</i>	9
1.3.2	Klassifizierung von CMV-Isolaten und Aufbau des Genoms	10
1.3.3	CMV-Lebenszyklus	11
1.3.4	Konventionelle <i>Disease-Management-Programme</i>	13
1.3.5	RNAi-basierte Strategien zum Schutz von Pflanzen vor CMV-Infektionen	13
1.4	Motivation und Zielstellung der Arbeit	14
II.	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	16
2.2	Arbeiten mit prokaryotischen Zellen, Pflanzenzellen, Pflanzenzellextrakten und <i>Nicotiana benthamiana</i>-Pflanzen	16
2.2.1	Prokaryotische Zellen.....	16
2.2.1.1	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	16
2.2.1.2	Transformation prokaryotischer Zellen.....	16
2.2.2	Pflanzliche Zellen und Pflanzenmaterial	17
2.2.2.1	Kultivierung von BY-2-Suspensionskulturen	17
2.2.2.2	Herstellung von BY-2-Lysat (BYL)	17
2.2.2.3	<i>Micrococcus</i> -Nuklease-Behandlung	19
2.2.2.4	<i>In-vitro</i> -Translation.....	19
2.2.2.5	DCL-Assay	19
2.2.2.6	<i>Slicer</i> -Assay	20
2.2.2.7	Kompetitiver <i>Slicer</i> -Assay	21
2.2.2.8	DCL/ <i>Slicer</i> -Assay	21
2.2.2.9	Infektionsexperimente an Tabakpflanzen (<i>N. benthamiana</i>)	21
2.3	Molekularbiologische Arbeiten mit DNA	22
2.3.1	Plasmid-Minipräparation	22
2.3.2	Plasmid-Midipräparation	23
2.3.3	DNA-Restriktionsverdau	23
2.3.4	Reinigung und Präzipitation von DNA.....	23
2.3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.3.6	Konzentrationsbestimmung von DNA	25
2.3.7	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	25
2.3.8	Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden.....	25
2.3.9	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA.....	25
2.3.10	Ligation von DNA-Fragmenten.....	26
2.3.11	Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten	26

2.4 Molekularbiologische Arbeiten mit RNA	26
2.4.1 <i>In-vitro</i> -Transkription	26
2.4.2 <i>In-vitro</i> -Transkription mit 5'- <i>cap</i> -Analogon	27
2.4.3 <i>In-vitro</i> -Transkription zur Generierung radioaktiv markierter RNA	27
2.4.4 Reinigung und Präzipitation von RNA	28
2.4.5 Konzentrationsbestimmung von RNA	28
2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese von RNA	28
2.4.7 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.4.8 Autoradiographie	29
2.4.9 Isolation von Nukleinsäuren aus Pflanzenmaterial	29
2.4.10 DNase-Verdau von RNA	30
2.4.11 Reverse Transkription	30
2.4.12 Generierung doppelsträngiger RNAs	31
2.4.13 RNase A/T1-Verdau	31
2.4.14 Silberfärbung von Nukleinsäuren nach Blum <i>et al.</i> (1987)	31
2.4.15 RNA-Sequenzierung (<i>next generation sequencing</i>)	32
2.5 Proteinbiochemische Methoden	33
2.5.1 AGO-Immunpräzipitation	33
2.5.2 Diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..	34
2.5.3 Western <i>blotting</i>	35
III. ERGEBNISSE	36
3.1 Etablierung experimenteller Rahmenbedingungen im Umgang mit CMV	36
3.1.1 Synthese genomischer CMV-RNAs	36
3.1.2 Etablierung von CMV-Infektionsexperimenten in <i>Nicotiana benthamiana</i>	37
3.2 Identifizierung und Charakterisierung effizienter siRNAs gegen CMV	38
3.2.1 DCL-vermittelte Generierung von vsiRNAs des CMV	39
3.2.2 Identifizierung AGO-gebundener vsiRNAs	41
3.2.3 Charakterisierung AGO-gebundener vsiRNAs <i>in vitro</i>	46
3.2.4 Charakterisierung AGO1- und AGO2-affiner vsiRNAs <i>in planta</i>	49
3.2.4.1 Schutz von <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen vor einer CMV-Infektion durch <i>in vitro</i>	
identifizierte esiRNAs	49
3.2.4.2 Vergleich der AGO-Bindungsaffinität und vermittelten <i>Slicer</i> -Aktivität RNA 2- und	
RNA 3-spezifischer esiRNAs	53
3.2.4.3 Vergleich 21 nt langer esiRNAs mit entsprechenden 22 nt-Varianten	56
3.3 Design doppelsträngiger RNAs auf Basis identifizierter esiRNAs	59
3.3.1 Design effizienter, CMV-spezifischer dsRNAs	59
3.3.2 Charakterisierung verschiedener CMV-spezifischer dsRNA-Designs <i>in vitro</i>	61
3.3.2.1 Effiziente Vermittlung des CMV-RNA 2-Abbaus durch spezifisch designte dsRNAs	61
3.3.2.2 Prozessierung einer edsRNA durch DCL-Proteine im BYL	64
3.3.3 NGS-Analyse der DCL-vermittelten Prozessierung von edsRNAs im BYL	65
3.3.3.1 Größenverteilung der siRNAs nach Prozessierung von edsRNAs durch DCLs im BYL ...	66
3.3.3.2 Anteil der CMV-esiRNAs nach Prozessierung von edsRNAs durch DCLs im BYL	66
3.3.4 Charakterisierung der antiviralen Wirkung der edsRNAs <i>in planta</i>	69
3.3.4.1 Schutz vor einer CMV-Infektion <i>in planta</i> durch dsCMV6si21-Ü	69
3.3.4.2 Einzelstrang-RNA vermittelt keinen Schutz vor einer CMV-Infektion	71
3.3.4.3 Beitrag von AGO1 und AGO2 zum Schutz vor einer CMV-Infektion <i>in planta</i>	72

IV. DISKUSSION.....	76
4.1 Systematische Identifizierung und Charakterisierung antiviraler esiRNA-Wirkstoffe in einem pflanzlichen <i>in-vitro</i>-System	76
4.2 Einfluss verschiedener Parameter auf die Effizienz identifizierter siRNAs.....	78
4.3 Rolle verschiedener Kernkomponenten des antiviralen RNA-silencing in <i>N. benthamiana</i>.....	84
4.3.1 <i>Nicotiana benthamiana</i> als Modellpflanze für die Pflanzenvirologie.....	84
4.3.2 Die Rolle von AGO1 und AGO2 in der CMV-Abwehr in <i>N. benthamiana</i>	85
4.3.3 Unterschiedliche Wirksamkeit 21 nt bzw. 22 nt langer siRNAs in der CMV-Abwehr	86
4.4 Einsatz längerer edsRNAs und deren Potential als biologische Pflanzenschutzmittel ...	88
4.4.1 Vorteile des individuellen dsRNA-Designs für den antiviralen Pflanzenschutz	89
4.4.2 Hinweise auf die Aktivität von DCL4 sowie Erkenntnisse für das effiziente Design antiviraler dsRNAs	91
4.5 Transfer von RNA an ihren Wirkungsort	94
4.6 Risiken, Regulation und Akzeptanz RNA-basierter Biopestizide.....	96
4.7 Ausblick.....	100
V. ZUSAMMENFASSUNG	102
VI. LITERATURVERZEICHNIS.....	104
VII. ANHANG	111
7.1 Kommerziell erhältliche sowie im Rahmen der Arbeit konstruierte Plasmide.....	111
7.2 Plasmidkarten.....	113
7.2.1 Plasmidkarte: p-dsRNA- <i>backbone</i>	113
7.2.2 Plasmidkarte: p-dsbb-CMV168con	114
7.2.3 Plasmidkarte: p-dsbb-GFP168con.....	115
7.2.4 Plasmidkarte: p-dsbbCMV21nt	116
7.2.5 Plasmidkarte: p-dsbbCMV22nt	117
7.2.6 Plasmidkarte: p-dsbbCMV21nt-5'U	118
7.2.7 Plasmidkarte: p-dsbbCMV21nt-5'A	119
7.3 DNA-Oligonukleotide	120
7.4 RNA-Oligonukleotide	122
7.5 Chemikalien.....	124
7.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien	126
Abbildungsverzeichnis	128
Tabellenverzeichnis	130
Danksagung.....	131
Lebenslauf.....	133
Publikationsliste	134
Eidesstattliche Erklärung	135

Abkürzungsverzeichnis

3'-CITE	engl. <i>3' cap-independent translational enhancer</i>
AGO	ARGONAUTE-Nuklease
amiR	engl. <i>artificial microRNA</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>A. thaliana</i>	lat. <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	lat. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
bp	Basenpaar
BY-2	engl. <i>bright yellow-2</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
CPK	Creatinphosphatkinase
DCL	engl. <i>Dicer-like protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpi	engl. <i>days post inoculation</i>
DRB	dsRNA-Bindeprotein
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
DUF283	engl. <i>domain of unknown function 283</i>
<i>E. coli</i>	lat. <i>Escherichia coli</i>
edsRNA	engl. <i>efficient double-stranded RNA</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
esiRNA	engl. <i>efficient small interfering RNA</i>
<i>et al.</i>	und andere
g	Erdbeschleunigung
gs	engl. <i>guide strand</i>
h	Stunden
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<i>in planta</i>	in der Pflanze
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
LDH	engl. <i>layered double hydroxide</i>
m ⁷ G	7-Methylguanosin
MID	engl. <i>middle domain</i>

miRNA, miR	engl. <i>microRNA</i>
mM	millimolar
μM	micromolar
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
<i>N. benthamiana</i>	lat. <i>Nicotiana benthamiana</i>
nf	Nuklease-frei
NGS	engl. <i>next generation sequencing</i>
<i>N. tabacum</i>	lat. <i>Nicotiana tabacum</i>
nt	Nukleotid
oligo-dT	oligo-Desoxythymidin
ORF	engl. <i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAZ	Piwi-Argonaut-Zwille
PBS	engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIWI	engl. <i>P-element-induced wimpy testis</i>
PPP	engl. <i>plant protection product</i>
ps	engl. <i>passenger strand</i>
RdRp, RDR	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RISC	engl. <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i>
RT	reverse Transkription bzw. reverse Transkriptase
s	Sekunden
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
sgRNA	subgenomische RNA
siRNA, siR	engl. <i>small interfering RNA</i>
sRNA	engl. <i>small RNA</i>
ss	einzelsträngig
T7-RNAP	T7-RNA-Polymerase
TEMED	Tetramethylethyldiamin
U	engl. <i>unit</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
vsRNA	engl. <i>viral small interfering RNA</i>
VSR	engl. <i>viral suppressor of RNA silencing</i>
v/v	engl. <i>volume per volume</i>
w/v	engl. <i>weight per volume</i>

Englische Schreibweise: Anglizismen sind durch Kursivschrift kenntlich gemacht.

Small interfering RNAs (siRNAs, siRs): Die Benennung von siRNAs erfolgt numerisch. SiRNAs, die von der viralen Minusstrang-RNA abgeleitet sind, werden mit einem kleinen „m“ gekennzeichnet (Beispiel: siR1020m). Da in dieser Arbeit ausschließlich Minusstrang-siRNAs charakterisiert wurden, wird nachfolgend auf diese Ergänzung verzichtet (Beispiel: siR1020). Minusstrang-siRNAs sind gegen die virale Plusstrang-RNA gerichtet. Die Nummer bezeichnet die Position der viralen Plusstrang-RNA, zu der das 5'-Nukleotid (nt) des siRNA-*guide*-Stranges (gs) komplementär ist.

I. EINLEITUNG

1.1 Herausforderungen für eine nachhaltige Landwirtschaft

Im Jahr 2020 betrug die Weltbevölkerung 7,7 Milliarden Menschen [1, 2]. Zugleich litten 769 Millionen Menschen weltweit an Unterernährung [3]. Mit zunehmenden Bevölkerungszahlen steigt der Bedarf an Nahrungsmitteln [1, 4]. Bei der Befriedigung der weiter steigenden Nachfrage stellen zunehmende Klimaextreme nur eine der Herausforderungen unserer Zeit dar und ziehen weitere Probleme für den landwirtschaftlichen Sektor nach sich. Klimatische Stressoren verursachen nicht nur direkte Schäden durch den Verlust landwirtschaftlicher Erträge, sondern Veränderungen der Niederschlagsmengen, Hitzewellen oder andere Wetterextreme wirken sich auch indirekt aus. Beispiele hierfür sind die gesteigerte Häufigkeit und Verbreitung von Schädlingen oder Krankheitserregern wie Bakterien, Pilzen und Viren [5]. Durch virale Infektionen von Pflanzen werden weltweit erhebliche Schäden in der Nutzpflanzenproduktion verursacht, die lediglich von Schäden durch Pilzinfektionen übertroffen werden [5-8]. Dies geschieht direkt, durch Ernteverluste oder Ernteauffälle, aber auch indirekt. Die indirekten Schäden entstehen durch Kosten infolge von Hygienemaßnahmen zur Kontrolle der Überträger der Infektionskrankheiten (Vektoren), durch den Erwerb zertifizierten, virusfreien Samenmaterials sowie infolge von Quarantänemaßnahmen, Inspektionen und im Rahmen der weiteren Erforschung des Virus [7]. Der finanzielle Schaden, den Pflanzenviren jährlich an der Landwirtschaft verursachen, wird auf ca. 30 Milliarden US-Dollar geschätzt [5]. Auch die Globalisierung birgt Risiken für den Nahrungsmittel produzierenden Sektor. Sie trägt durch weltweiten Handel bzw. Warentransport ebenfalls zur Verbreitung standortfremder Krankheitserreger und deren Vektoren bei [9]. Doch nicht nur diese externen Faktoren können die landwirtschaftliche Produktion beeinträchtigen. Hinzu kommen eigene Bestrebungen, die eine Landwirtschaft basierend auf ressourcenschonenden und umweltverträglichen Prinzipien zum Ziel hat. Diese Prinzipien orientieren sich z. B. am europäischen *Green Deal* sowie an der Nachhaltigkeitsstrategie (*Sustainable Development Goals*) der Vereinten Nationen. Die EU-Biodiversitätsstrategie „*From Farm to Fork*“ (dt. „Vom Hof zum Teller“) soll beispielsweise den Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel bis zum Jahr 2030 um 50 % reduzieren und die Flächen für ökologischen Landbau auf 25 % erweitern [10, 11]. Eine Reduktion der chemischen Pflanzenschutzmittel bei steigender Belastung der Landwirtschaft durch Schädlinge und Viren macht den Zwiespalt deutlich, der die moderne Landwirtschaft vor große Herausforderungen stellt. Um diesen steigenden Anforderungen gerecht zu werden, braucht es neue, innovative Technologien [12]. In den letzten Jahren haben sich vor allem Technologien auf Basis der RNA-Interferenz (RNAi, auch *RNA-silencing*) als besonders vielversprechend hervorgehoben. Die vorliegende Arbeit soll neue Einblicke in *RNA-silencing*-basierte Methoden geben und Impulse für deren Einsatz zum Schutz von Pflanzen gegen Virusinfektionen liefern.

1.2 RNA-Interferenz

Im Jahr 2006 wurde der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin zu gleichen Teilen an die Genetiker Andrew Fire und Craig Mello für ihre Entdeckung der RNA-Interferenz verliehen [13]. RNAi ist ein sequenzspezifischer Prozess des Gen-*silencing* auf transkriptioneller sowie posttranskriptioneller Ebene, der durch doppelsträngige RNAs (dsRNAs) vermittelt wird und in den meisten Eukaryoten evolutionär konserviert ist [14]. Die Funktion dieses Mechanismus liegt in der Abwehr von Viren, Transposons und Transgenen sowie der Genregulation im Rahmen der Entwicklung und Stressantwort. Die Regulation kann sowohl durch *messenger*-RNA-Abbau (mRNA-Abbau), Inhibition der Translation oder Chromatin-Veränderungen erfolgen [1, 4, 14]. Dabei spielen vor allem microRNAs (miRNA, miR) und *small interfering* RNAs (siRNA, siR) eine Rolle. Da der Fokus dieser Arbeit auf dem Schutz von Pflanzen vor viralen Infektionen liegt, soll vor allem das antivirale RNA-*silencing* nachfolgend näher erläutert werden.

1.2.1 Antivirales RNA-*silencing* in Pflanzen

RNA-*silencing* ist einer der am höchsten konservierten pflanzlichen Abwehrmechanismen gegen Viren [15]. Dabei wird zunächst virale doppelsträngige RNA, in Form von doppelsträngigen Bereichen viraler genomischer RNAs oder viraler Replikationsintermediate, von Ribonuklease III-Enzymen (RNase III), den *Dicer-like*-Proteinen (DCLs), erkannt. Vor allem DCL4 und DCL2 spielen in der antiviralen Immunantwort eine Rolle und generieren virale siRNAs (vsiRNAs) von 21 bzw. 22 Nukleotiden (nt) Länge [16]. VsiRNAs bestehen aus einem *guide* (gs)- sowie einem *passenger*-Strang (ps). Die beiden Stränge bilden einen Duplex, der durch 5'-Monophosphate sowie 3'-Überhänge mit einer Länge von zwei Nukleotiden gekennzeichnet ist [17]. Im Anschluss an ihre Generierung erfolgt die Assoziation der vsiRNAs mit ARGONAUTE-Proteinen (AGOs), wobei vor allem AGO1 und AGO2 von Bedeutung sind [18]. Dabei bleibt der siRNA-*guide*-Strang gebunden und der *passenger*-Strang wird entfernt und abgebaut. Der Effektor-Komplex aus AGO-Protein, vsiRNA und weiteren, bisher nur unvollständig charakterisierten Faktoren wird als *RNA-induced silencing complex* (RISC) bezeichnet. Basierend auf der Komplementarität zwischen gebundenem siRNA-*guide*-Strang und *target*-RNA kann diese durch RISC gebunden und durch endonukleolytische Hydrolyse abgebaut werden [17, 19-21]. Die 22 nt langen, durch DCL2 prozessierten primären siRNAs sind darüber hinaus notwendig, um die Produktion sekundärer siRNAs auszulösen [22]. Sekundäre siRNAs dienen der Amplifizierung des *silencing*-Signals und somit der Verstärkung der antiviralen Immunantwort der Pflanze. Sie sind biochemisch nicht von primären siRNAs zu unterscheiden, da sie ebenfalls von DCLs aus langen dsRNAs prozessiert werden. Diese dsRNAs werden durch RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRp, RDR) aus den *targets* der primären siRNAs synthetisiert [20-23]. Als effiziente Maßnahme gegen die antivirale Immunantwort der Pflanze haben Viren sogenannte Suppressoren des RNA-*silencing* (*viral suppressors of RNA*

silencing, VSRs) entwickelt. Diese können die antivirale Abwehr der Pflanze auf vielfältige Weise behindern, z. B. durch Inhibierung der DCL-Aktivität, Bindung von AGO-Proteinen oder Sequestrierung von siRNAs, wodurch die effektive Programmierung des RISC verhindert wird [17, 24, 25]. Abbildung 1 zeigt ein zusammenfassendes Schema des antiviralen RNA-*silencing* in Pflanzen.

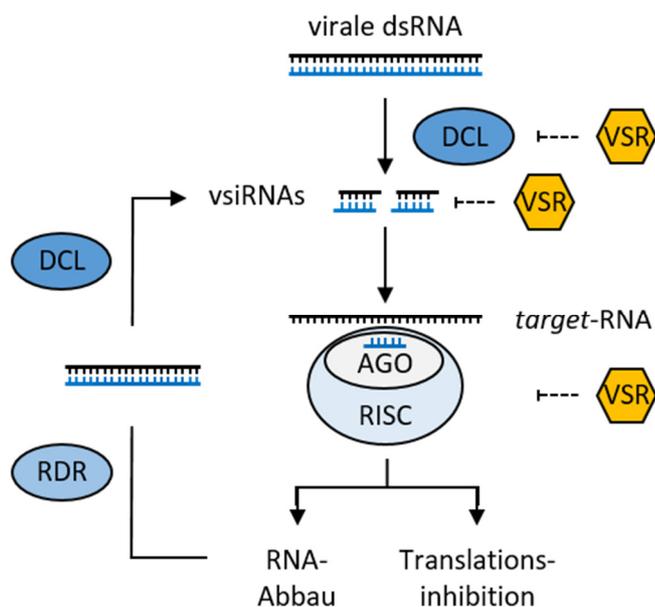


Abbildung 1 Vereinfachtes Schema des antiviralen RNA-*silencing* in Pflanzen. Virale dsRNA wird durch *Dicer-like*-Enzyme (DCLs) zu 21 nt bis 24 nt langen, viralen *small interfering* RNAs (vsiRNAs) prozessiert. Die vsiRNAs werden in sogenannte *RNA-induced silencing complexes* (RISCs) eingebaut. Dabei wird der Doppelstrang entwunden, der *passenger*-Strang der vsiRNA entfernt und der *guide*-Strang kann an komplementäre Sequenzen der *target*-RNA binden. Infolgedessen wird die *target*-RNA mittels endonukleolytischer Hydrolyse durch die Kernkomponente des RISC, das ARGONAUTE-Protein (AGO), abgebaut oder deren Translation inhibiert. Aus den *targets* der primären siRNAs kann mittels RNA-abhängiger RNA-Polymerasen (RDRs) erneut dsRNA generiert werden. Aus dieser erfolgt wiederum die Biogenese sekundärer vsiRNAs und somit die Amplifizierung des *silencing*-Signals. Virale Suppressoren des RNA-*silencing* (VSRs) können mit verschiedenen Komponenten der antiviralen Immunantwort, wie DCLs, siRNAs oder AGOs, interagieren und somit deren antiviralen Effekt beeinträchtigen. Abbildung modifiziert nach [20].

Nachfolgend werden Komponenten des antiviralen RNA-*silencing*-Mechanismus näher erläutert, die im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse waren.

1.2.2 *Dicer-like*-Ribonukleasen (DCLs): Ausgangspunkt des antiviralen RNA-*silencing*

Dicer-like-Proteine sind Endoribonuklease III-Enzyme mit Funktionen in der Erkennung von Virus-spezifischen dsRNAs und deren Prozessierung in 21 nt bis 24 nt lange siRNAs. Darüber hinaus spielen sie eine Rolle bei der Erkennung von *hairpin*-Strukturen (Haarnadel-Strukturen durch intramolekulare Basenpaarung) in miRNA-Transkripten und deren Prozessierung in reife miRNAs sowie in der Erkennung und Prozessierung anderer endogener dsRNAs, z. B. zu ta-siRNAs und nat-siRNAs [26, 27].

Sie agieren zum einen als Immunrezeptor, zum anderen bestimmen sie die Spezifität der RNAi-Antwort durch Generierung von miRNAs sowie von siRNAs verschiedener Längen. Anders als Menschen, die nur ein *Dicer*-Protein besitzen, sind Pflanzen mit mindestens vier DCLs (DCL1-4) ausgestattet.

Wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt, ist allen das Vorhandensein bestimmter Protein-Domänen gemeinsam: der N-terminalen Helikase-Domänen, einer Piwi-Argonaute-Zwille-Domäne (PAZ), zweier RNase III-Domänen sowie einer oder zweier C-terminaler dsRNA-Bindedomänen [26, 28].

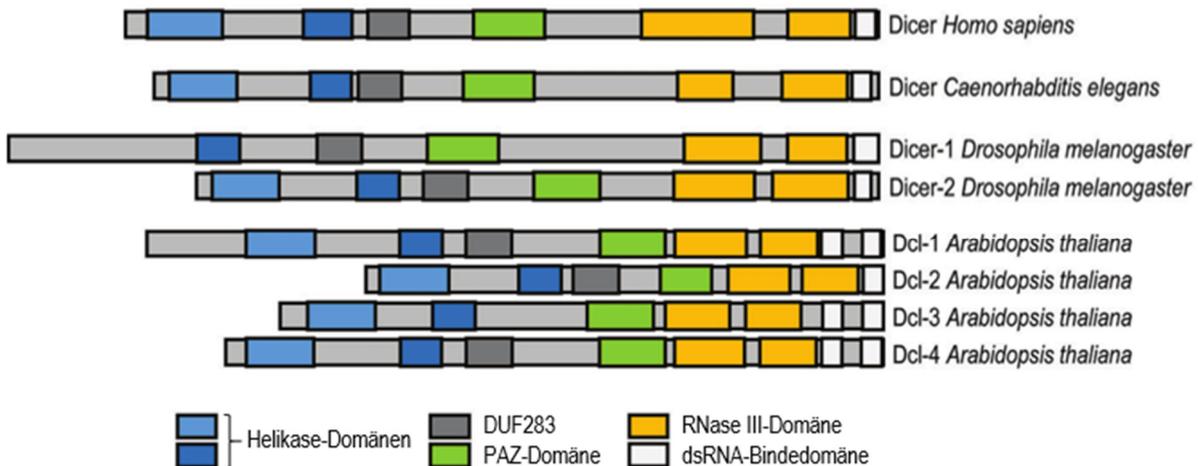


Abbildung 2 Schematischer Aufbau von *Dicer*- und *Dicer-like*-Proteinen verschiedener Modellorganismen. Modifiziert nach [28].

Die verschiedenen DCLs besitzen jeweils spezifische Funktionen, wobei die drei siRNA generierenden DCLs (DCL2-4) eine gewisse funktionelle Redundanz aufweisen [26].

DCL1 katalysiert die Prozessierung 21 nt oder 22 nt langer miRNAs aus *hairpin*-Strukturen einzelsträngiger RNAs. DCL4 katalysiert hauptsächlich die Prozessierung 21 nt langer vsiRNAs aus längeren viralen dsRNAs. In Pflanzen, die mit (+)-RNA-Viren infiziert sind, sind die durch DCL4 generierten 21 nt langen siRNAs zumeist die vorherrschende vsiRNA-Spezies. Außerdem konnte gezeigt werden, dass DCL4 eine Präferenz für längere dsRNAs besitzt und dsRNAs mit weniger als 50 Nukleotiden weniger effizient zu siRNAs prozessiert [26]. Des Weiteren konnte das dsRNA-Bindeprotein 4 (DRB4) als essentieller Cofaktor für die dsRNA-Prozessierung durch DCL4 identifiziert werden [29]. DCL2 generiert 22 nt lange siRNAs aus dsRNAs und kann den Verlust von DCL4 kompensieren. DCL2 und DCL4 sind enger miteinander verwandt als mit den anderen pflanzlichen DCLs. Durch ihre phylogenetische Nähe ist es naheliegend, dass die Funktionen von DCL2 und DCL4 teilweise redundant sind [16]. Außerdem spielt DCL2 eine wichtige Rolle bei der Bildung sekundärer siRNAs [16]. DCL4 und DCL2 sind im Rahmen der antiviralen Immunantwort der Pflanze von besonderer Bedeutung [16, 30]. In Experimenten mit *Arabidopsis*-Pflanzen wurde bestätigt, dass Mutationen sowohl in DCL2 als auch in DCL4 für die vollständige Aufhebung des RNA-*silencing* erforderlich sind

[16]. Dies verdeutlicht deren redundante Wirkung. DCL3 generiert 24 nt lange siRNAs und spielt vor allem eine Rolle im transkriptionellen Gen-*silencing* (TGS) durch RNA-abhängige DNA-Methylierung. Die Prozessierung von siRNAs durch DCL3 erfolgt nach der für das humane *Dicer* postulierten „5′ counting rule“ [31, 32]. Dabei ist nicht nur das 3′-Ende, sondern auch das 5′-Ende des Substrats im *Dicer*-Protein verankert und die Substratspaltung erfolgt in Abhängigkeit der Distanz vom 5′-Ende [31]. Die genauen Mechanismen der Substraterkennung und Spaltung durch die individuellen DCLs sind jedoch weiterhin ungeklärt. Daher, das soll an dieser Stelle vorweggenommen werden, erfolgten viele in dieser Arbeit durchgeführte Experimente zum Einfluss von DCLs auf die dsRNA-Prozessierung durch systematische Herangehensweisen.

1.2.3 ARGONAUTE-Proteine: Kernkomponenten des *RNA-induced silencing complex*

Unabhängig von ihrer Biogenese durch verschiedene DCLs haben *small interfering RNAs* eines gemeinsam: Sie assoziieren im Rahmen des *RNA-silencing* mit einem Protein der ARGONAUTE-Familie, um den Kern des *RNA-induced silencing complex* zu bilden. Eukaryotische AGOs werden in zwei phylogenetische Gruppen unterteilt: die AGO- und die PIWI-Unterfamilie. In Pflanzen sind jedoch nur Proteine der AGO-Unterfamilie vorhanden [33]. Ihren Namen erhielt die AGO-Familie aufgrund des Aussehens der AGO1-Mutanten von *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), die durch ihre schlauchförmigen Blätter an kleine Tintenfische (*Argonauta spec.*) erinnerten [33, 34]. AGO-Proteine kommen in Archaeen, Bakterien und Eukaryoten vor. Die Anzahl der AGO-Proteine in verschiedenen Spezies kann jedoch sehr unterschiedlich sein. Die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* besitzt bspw. lediglich ein AGO-Protein, die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* fünf, Menschen acht und der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* 27 AGO-Proteine. In Pflanzen hat die Anzahl der AGO-Proteine im Verlauf der Evolution zugenommen. So besitzt die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* drei AGOs, während Blütenpflanzen wie *A. thaliana* oder Reis (*Oryza sativa*) zehn bzw. 19 AGO-Proteine besitzen [33]. AGO-Proteine können ihre genregulatorischen Funktionen entweder auf posttranskriptionellem Level durch endonukleolytische Spaltung oder Translationsinhibition ausführen oder auf transkriptionellem Level durch DNA-Methylierung. Für das antivirale *RNA-silencing* durch den Abbau viraler RNAs sind vor allem AGO1 und AGO2 von Bedeutung [18].

Kristallstrukturen vollständiger pflanzlicher AGO-Proteine liegen, im Gegensatz zu Kristallstrukturen einzelner AGO-Proteindomänen, bisher nicht vor. Basierend auf Strukturen anderer eukaryotischer AGO-Proteine ist jedoch bekannt, dass AGOs vier Domänen besitzen (s. Abbildung 3): eine N-terminale Domäne, eine konservierte PAZ-Domäne, eine *middle*-Domäne (MID) sowie eine *P-element-induced wimpy testis*-Domäne (PIWI) [33]. Die N-terminale Domäne besitzt vermutlich Funktionen im Entwinden des sRNA-Duplex, in der korrekten Positionierung des *guide/target*-Komplexes für die *target*-Spaltung sowie im Entwinden des sRNA/*target*-RNA-Duplex nach erfolgter Spaltung [35-37]. Die

PAZ-Domäne dient dem Entwinden des sRNA-Duplex zur Entfernung des *passenger*-Stranges und somit der Bildung eines funktionalen RISC [38]. Außerdem bindet sie mittels einer spezifischen Bindetasche das 3'-Ende des *guide*-Stranges [39]. Ein spezifischer *loop* innerhalb der MID-Domäne ist für die Bindungspräferenzen der verschiedenen AGO-Proteine hinsichtlich spezifischer sRNA 5'-Nukleotide verantwortlich [40]. Die Bindung des 5'-Phosphates der sRNA erfolgt wiederum in einer Bindetasche zwischen MID- und PIWI-Domäne [41, 42]. Es wurde in entsprechenden Experimenten bereits mehrfach gezeigt, dass die beiden wichtigsten antiviralen AGO-Proteine AGO1 und AGO2 eine Präferenz für die 5'-terminalen Nukleotide basierend auf den Nucleobasen Uracil bzw. Adenin besitzen [43-46]. Die PIWI-Domäne mit ihrer RNase H-ähnlichen Faltung ermöglicht die endonukleolytische Hydrolyse der *target*-RNA durch einige, jedoch nicht alle, AGOs. AGO1, AGO2, AGO3, AGO4, AGO5, AGO7 und AGO10 gehören zu den AGOs mit nachgewiesener *Slicer*-Aktivität [33, 44].

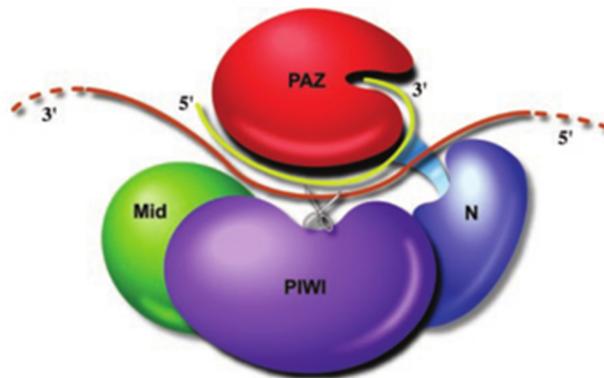


Abbildung 3 Schematische Darstellung des AGO-basierten mRNA-Abbaus. Das 3'-Ende der sRNA (gelb) wird in einer Bindetasche der PAZ-Domäne gebunden. Die mRNA (braun) wird durch das aktive Zentrum der PIWI-Domäne (als Schere dargestellt) endonukleolytisch gespalten. Entnommen aus [47].

Diese *Slicer*-Aktivität wird durch das aktive Zentrum vermittelt, das eine katalytische Tetrade (DEDX) aufweist [48, 49]. Am Beispiel der siRNA-vermittelten Spaltung einer *target*-RNA läuft der Mechanismus wie folgt ab: Die Basen an Position zwei bis vier (g2-g4) des siRNA *guide*-Stranges liegen, bezogen auf die Struktur des AGOs, exponiert vor und sind wichtig für die Erkennung der *target*-RNA [41, 49]. Deren Abbau erfolgt durch die Spaltung der Phosphodiesterbindung, die sich gegenüber der Nucleotide g10 und g11 des siRNA-*guide*-Stranges befindet [50]. Allerdings kann nicht jede in AGO eingebaute siRNA einen effizienten *silencing*-Effekt vermitteln.

Die Effizienz einer siRNA ist in hohem Maße abhängig von ihrer Affinität zu AGO-Proteinen, im antiviralen RNA-*silencing* vor allem zu AGO1 und AGO2. Diese Affinität wird zum einen durch die Identität des 5'-terminalen Nucleotids des siRNA-*guide*-Stranges, aber vermutlich auch durch weitere, bisher unbekannte siRNA-Charakteristika bestimmt [43-46]. Des Weiteren hängt die Effizienz einer siRNA erheblich von der Zugänglichkeit der entsprechenden *target site* für eine Spaltung durch den

RISC ab [43, 44, 51-56]. Darüber hinaus können manche der in AGO effizient eingebauten siRNAs, die jedoch keine effiziente *slicing*-Aktivität vermitteln (sogenannte *decoy*-siRNAs), zur Sättigung der RISCs führen. Die ineffiziente Vermittlung der *target*-Spaltung durch *decoy*-siRNAs sowie die damit einhergehende verringerte Beladung von RISCs mit siRNAs, die eine effiziente *target*-Spaltung vermitteln, kann die Vermehrung des Virus begünstigen [57, 58]. Andere vsiRNAs wiederum können spezifische mRNAs der Wirtspflanze beeinflussen [52, 59]. Es konnte z. B. gezeigt werden, dass eine Untergruppe hoch abundanter vsiRNAs, die aus dem *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) stammen, potentiell auf eine ganze Reihe von Wirtsgenen abzielen, die an grundlegenden zellulären Aktivitäten beteiligt sind, darunter Gene von Enzymen, Transkriptionsfaktoren, Membrantransportern und Zytoskelettproteinen [59]. Diese vsiRNAs könnten einen negativen Effekt auf die Immunantwort der Pflanze und somit ebenfalls einen positiven Effekt auf die Vermehrung des Virus haben.

Auch wenn die Struktur von AGO-Proteinen sowie die Funktionen einzelner Domänen bereits gut erforscht sind, gibt es immer noch offene Fragen. Im Rahmen dieser Arbeit ist unter anderem die Affinität der antiviralen Proteine AGO1 und AGO2 zu bestimmten vsiRNAs sowie die Spaltungseffizienz der programmierten AGO/RISCs in Abhängigkeit individueller siRNAs und verschiedener viraler *targets* von Interesse.

1.2.4 Potential und Limitationen der RNAi-Technologie für die Landwirtschaft

Bisherige, konventionelle Maßnahmen zum Schutz von Pflanzen vor Pathogenen und Schädlingen beruhen größtenteils auf dem massiven Einsatz von Pestiziden. Diese können sowohl gesundheitsschädlich als auch umweltgefährdend sein. Deshalb soll deren Einsatz in Zukunft drastisch verringert werden [10]. Vor allem bei der Bekämpfung pflanzenpathogener Viren könnte der Einsatz transgener Pflanzen Abhilfe schaffen [60, 61]. Transgene Pflanzen werden durch Insertion heterologer DNA-Sequenzen erzeugt. Diese Transgene exprimieren bspw. *artificial* miRNAs (amiRs), *hairpin* RNAs oder längere dsRNAs. Die Sequenzen der *hairpin* RNAs bzw. längeren dsRNAs sind häufig von den Genen des *coat*-Proteins, der RNA-abhängigen RNA-Polymerase oder des *movement*-Proteins des jeweiligen Virus abgeleitet. Die entsprechenden Transkripte bilden doppelsträngige RNAs, die in der Pflanze durch DCLs zu siRNAs prozessiert werden. Die so generierten siRNAs führen nach Einbau in RISCs zum Abbau viraler RNAs und erzielen somit einen antiviralen Effekt [61-63]. Dass bei einer Infektion mit dem entsprechenden Virus dann bereits antiviral wirksame RISCs in den Pflanzenteilen vorliegen, verschafft der Pflanze somit einen „Vorsprung“ gegenüber dem Virus.

Die ersten kommerziell erhältlichen, virusresistenten Nutzpflanzen dieser Art waren gegen das *Watermelon mosaic virus* (WMV) sowie das *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) resistente Kürbisse, welche die Gene des jeweiligen *coat*-Proteins exprimierten. Auch transgene Papaya-Pflanzen mit einer Resistenz gegen das *Papaya ringspot virus* (PRSV) sind in den USA bereits seit 1997 kommerziell

erhältlich. Auch hier basiert die Resistenz auf der Expression des Gens für das PRSV-*coat*-Protein. Weitere virusresistente, transgene Pflanzen sind in China (Paprika, Tomate, Papaya), Kanada (Kartoffel), Brasilien (Bohne), Japan (Papaya) und Kenia (Cassava) zugelassen und entsprechende Feldversuche werden auch in anderen Ländern wie bspw. Südamerika und Afrika durchgeführt [63]. Zu den Auswirkungen der Verwendung transgener Pflanzen liegen jedoch noch keine ausreichend belastbaren Informationen vor. Darüber hinaus sind transgene Pflanzen in den Augen der Öffentlichkeit mit teils erheblichen Bedenken in Hinblick auf deren Sicherheit behaftet (nähere Erläuterung s. Abschnitt 1.3.5) [64]. Des Weiteren gibt es in vielen Ländern Gesetze, die den Einsatz genetisch modifizierter Organismen einschränken [60, 65].

Die RNAi-Technologie auf Basis äußerlich applizierter dsRNAs stellt eine alternative Strategie zum Einsatz transgener Pflanzen dar. In Form von siRNAs oder dsRNAs kann der RNAi-Mechanismus in der Pflanzenzelle gezielt ausgelöst werden [66-68]. Die RNAs können *in vitro* oder chemisch synthetisiert oder mit Hilfe von Bakterien hergestellt und in Form von langen dsRNAs, *hairpin*-RNAs oder siRNAs angewendet werden. Dabei wird das Genom der Pflanze im Gegensatz zu transgenen Methoden nicht verändert. Eine Hürde stellt jedoch der Transfer der RNA-Moleküle in die Pflanzenzelle dar. In bisherigen Versuchen wurden entsprechende RNAs mittels *high-pressure spraying*, mechanischer Inokulation, unter Zuhilfenahme von Nanopartikeln oder Carrier-Proteinen oder mittels Pipetten oder Bürsten auf die Blattoberflächen aufgetragen [69]. Informationen über die Stabilität der exogen applizierten dsRNAs sind jedoch ebenso limitiert wie der exakte Mechanismus, durch den diese in die Pflanzenzellen gelangen [70-72]. Trotzdem wird anhand vieler Publikationen das enorme Potential der externen dsRNA-Applikation zum Schutz vor Pflanzenviren, aber auch vor Insekten und Pilzen, deutlich. Konakalla *et al.* erzielten bspw. in Tabakpflanzen durch mechanische Inokulation von dsRNAs gegen die codierenden RNAs des *coat*-Proteins bzw. des *silencing*-Suppressors p126 in 50 % bzw. 65 % der Pflanzen einen Schutz vor den Symptomen der Tabakmosaikvirus-Infektion [73]. Ähnliche protektive Effekte konnten auch in anderen Wirtspflanzen wie Tomate, Papaya, Mais, Paprika, Gurke, Wassermelone und Kürbis gegen verschiedenste andere Pflanzenviren wie das *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) oder *Bean common mosaic virus* (BCMV) nachgewiesen werden [69]. Diese Beispiele sprechen für das Potential der Methode. Es ist jedoch noch viel Forschungsarbeit nötig, um zugrunde liegende zelluläre Mechanismen aufzudecken, positive Effekte der RNAi-Technologie zu maximieren, Risiken abzuschätzen und Möglichkeiten der kommerziellen Anwendung zu etablieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf der Verbesserung von Spezifität und Effizienz der RNAi-Anwendungen für Pflanzen. Die Grundlage der Untersuchungen bildete das wirtschaftlich hoch relevante *Cucumber mosaic virus* (CMV).

1.3 Das *Cucumber mosaic virus* (Gurkenmosaikvirus)

Das Internationale Komitee für die Taxonomie von Viren (ICTV) beschreibt die Existenz von über 900 Pflanzenvirenspezies. Studien legen nahe, dass in Zukunft noch viele weitere hinzukommen werden [6]. Ein prominenter Vertreter, der enorme wirtschaftliche Schäden verursacht, ist das *Cucumber mosaic virus* (s. Abbildung 4). CMV wurde von Pflanzenvirologen auf Platz vier der Pflanzenviren in Hinblick auf deren wissenschaftliche bzw. wirtschaftliche Bedeutung gewählt [74, 75]. CMV wurde 1916 zum ersten Mal beschrieben. Über die Jahre wurden verschiedene CMV-Stämme aufgrund der Vielfalt der verursachten Symptome und des breiten Wirtsspektrums mehrfach irrtümlich für ein neues Virus gehalten, weshalb mindestens 43 Alternativnamen für CMV bekannt sind [74].

1.3.1 Verbreitung und Relevanz des *Cucumber mosaic virus*

Das *Cucumber mosaic virus* gehört zur Gattung *Cucumovirus* der Familie der *Bromoviridae*. Weitere bekannte Vertreter dieser Familie sind z. B. das *Alfalfa mosaic virus* oder das *Brome mosaic virus* [76]. Im Gegensatz zu anderen Vertretern der *Bromoviridae*-Familie besitzt CMV ein breites Wirtspflanzenspektrum von über 1 200 Pflanzenarten aus über 100 Familien und somit das größte Wirtsspektrum bisher bekannter Pflanzenviren.

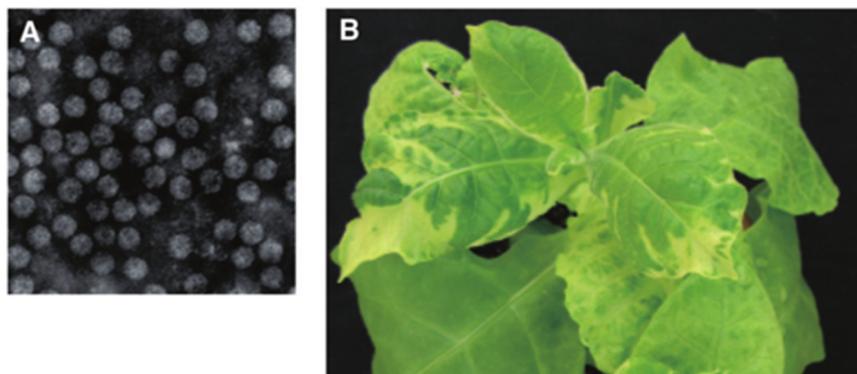


Abbildung 4 *Cucumber mosaic virus*. (A) Isolierte Virionen des *Cucumber mosaic virus* unter dem Elektronenmikroskop. (B) Mosaik-Symptome CMV-infizierter Tabakpflanzen. Modifiziert nach [76].

Darunter befinden sich Pflanzenfamilien wie Hülsenfrüchtler (*Fabaceae*), Kürbisgewächse (*Cucurbitaceae*), Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) sowie Windengewächse (*Convolvulaceae*) [76, 77]. Das breite Wirtsspektrum, das sich sowohl über Obstkulturen, Gemüse als auch Gräser erstreckt, verdeutlicht die besondere wirtschaftliche Relevanz von CMV [74, 78, 79]. Einige bedeutende Wirtspflanzen sind z. B. Gurke (*Cucumis sativus*), Tomate (*Solanum lycopersicum*), Kürbis (*Cucurbita pepo*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*) [78]. CMV ist weltweit, sowohl in gemäßigten als

auch in tropischen Regionen, verbreitet. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich durch über 80 Blattlausarten. CMV kann sich jedoch teilweise auch über asymptomatische, überwinterte Unkräuter bzw. Gräser oder Setzlinge infizierter Samen verbreiten [74, 78]. Am Beispiel des Mittelmeerraumes wird die Relevanz des *Cucumber mosaic virus* besonders deutlich: Wiederkehrende CMV-Infektionen in den Hauptanbaugebieten für Tomaten sorgen bspw. in Italien und Spanien für beachtliche wirtschaftliche Schäden durch Zerstörung von bis zu 100 % der Ernten. Auch im Anbau von Melonen und Paprika kommt es neuerdings zu Inzidenzen von 30-100 % [8]. Darüber hinaus werden jährlich neue Wirtspflanzen bekannt und auch die Verbreitung von Blattläusen in nördlichere, gemäßigte Regionen nimmt weiter zu, wodurch zukünftig mit weiteren CMV-Epidemien gerechnet werden muss [74]. Darüber hinaus tritt CMV auch in Mischinfektionen bspw. mit Vertretern der Gattungen Potyvirus und Tobamovirus sowie mit dem *Potato virus X* (PVX) auf [8, 74, 79]. Die Art und Ausprägung der Symptome einer CMV-Infektion ist sowohl von der Wirtspflanze als auch vom Virus-Stamm abhängig. Charakteristische Symptome sind hellgrün-dunkelgrüne Mosaiken, Chlorosen, die sich über die komplette Pflanze erstrecken können, aber auch lokale chlorotische oder nekrotische Läsionen sowie Deformationen und gehemmtes Wachstum von Blättern und Früchten bzw. der kompletten Pflanze [78-80].

1.3.2 Klassifizierung von CMV-Isolaten und Aufbau des Genoms

CMV-Isolate werden auf Basis biologischer, serologischer und physischer Kriterien in die Untergruppen I und II eingeteilt. Innerhalb der Untergruppe I wird wiederum in Abhängigkeit der Sequenzunterschiede der 5'-untranslatierten Region (UTR) der RNA 3 zwischen der Untergruppe IA und IB unterschieden [76, 78, 79, 81]. Während innerhalb einer Untergruppe die Sequenzähnlichkeiten groß sind (Untergruppe I: > 88 %; Untergruppe II: > 96 %), betragen sie zwischen den Untergruppen nur 70 % bis 75 %. Die meisten Isolate werden Untergruppe I zugeordnet. Isolate der Untergruppe IA, zu der auch der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Fny-Stamm zählt, sowie Untergruppe II sind weltweit verbreitet. Die meisten Isolate der Untergruppe IB stammen aus Ostasien [82]. Die CMV-RNAs sind in ikosaedrischen Viruspartikeln von 29 nm Durchmesser verpackt. Das Genom besteht aus drei einzelsträngigen RNAs positiver Polarität (RNA 1, 2 und 3) sowie zwei subgenomischen RNAs (sgRNAs; RNA 4 und RNA 4A), die für insgesamt fünf Gene codieren [8, 74, 78, 79]. Alle RNAs besitzen eine *Cap*-Struktur am 5'-Ende sowie eine *tRNA-like*-Struktur am 3'-Ende. Ca. 150 Nukleotide an den 3'-Enden der RNAs sind innerhalb desselben Stammes hoch konserviert [79]. Die genomischen RNAs werden jeweils in separate Viruspartikel verpackt und nur bei Vorliegen aller drei genomischen RNAs innerhalb derselben Zelle kann eine Infektion erfolgen [8, 78, 83]. RNA 1 codiert für das große 1a-Protein, das vermutlich eine Methyltransferase- sowie RNA-Helikase-Aktivität besitzt.

RNA 2 codiert für die RNA-abhängige RNA-Polymerase 2a sowie für das 2b-Protein, das von der subgenomischen RNA 4A translatiert wird und als Suppressor des RNA-*silencing* fungiert. Auf RNA 3 sind das *movement*-Protein 3a (MP) sowie das *coat*-Protein (CP) codiert, welches wiederum von der subgenomischen RNA 4 translatiert wird. Eine Übersicht des CMV-Genoms ist in Abbildung 5 dargestellt [8, 74, 78, 79].

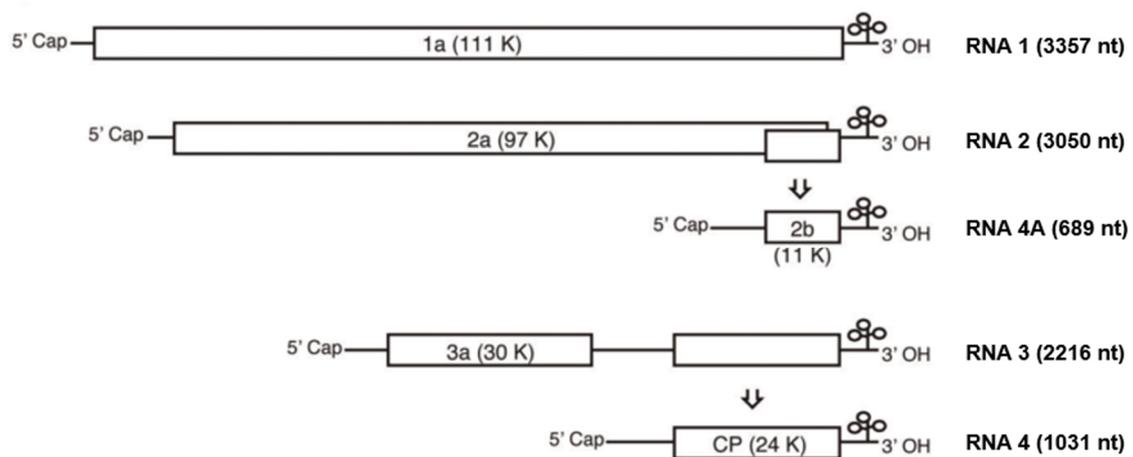


Abbildung 5 Genomorganisation von CMV (Fny). RNA 1, 2 und 3 sind genomische RNAs, RNA 4 und 4A subgenomische RNAs. Alle RNAs besitzen ein 5'-Cap sowie eine 3'-tRNA-like-Struktur. Modifiziert nach [76, 84].

Manche CMV-Stämme verfügen darüber hinaus über sogenannte *satellite RNAs* (satRNA), die weder funktionale *open reading frames* (ORFs) besitzen, noch essentielle Funktionen für das Virus haben und für ihre Verbreitung und Replikation abhängig vom viralen Genom sind. Diese satRNAs sind 335-405 nt lang und bewirken meist die Abschwächung oder Verstärkung der Symptome, die durch CMV-Infektionen in Pflanzen verursacht werden [8, 85].

1.3.3 CMV-Lebenszyklus

Nachdem die Viruspartikel in die Zelle gelangt sind, werden die genomischen RNAs aus den Viruspartikeln freigesetzt und zur Herstellung viraler Proteine translatiert. Protein 1a (Methyltransferase-, Helikase-Aktivität) und Protein 2a (RdRp-Aktivität) bilden dabei gemeinsam mit Wirtsproteinen den Replikationskomplex. Die Replikation erfolgt am Tonoplast und beruht auf dem Modell des Brommosaikvirus, das zu derselben Familie gehört wie CMV [79]. Zunächst wird das 1a-Protein, dann das 2a-Protein an den Tonoplast rekrutiert, wobei vermutlich auch eine Interaktion der beiden Proteine erfolgt. Diese Assoziation wird durch die Phosphorylierung des 2a-Proteins verhindert, wodurch es für Funktionen zur Verfügung steht, die unabhängig von 1a erfolgen. Im ersten Schritt der

Replikation wird nach Bindung der Replikase an die *tRNA-like*-Struktur am 3'-Ende der Plusstrang-CMV-RNAs Minusstrang-RNA synthetisiert. Diese dient wiederum zur Herstellung neuer Plusstrang-RNA.

Die Minusstränge der RNA 2 und RNA 3 dienen auch als *templates* für die Synthese der beiden subgenomischen Plusstrang-RNAs 4 und 4A. Deren Transkription erfolgt durch Erkennung der subgenomischen Promotoren, die auf den Minusstrang-RNAs vorhanden sind. Die subgenomischen RNAs werden nicht repliziert [78]. Die Plusstrang-RNA fungiert als mRNA für die Translation viraler Proteine, als *template* für die Transkription und zur Produktion neuer Virionen. Während der Replikation kommt es zur Akkumulation doppelsträngiger RNAs innerhalb der infizierten Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass für die Minusstrang-Synthese sowohl die Proteine 1a als auch 2a essentiell sind, während das 2a-Protein allein ausreichend für die Synthese neuer Plusstrang-RNA von Minusstrang-*templates* ist [86]. Die Replikation verläuft asymmetrisch, wobei das Level an Plusstrang-RNA das 100-fache des Levels an Minusstrang-RNA betragen kann [79].

Nach der Replikation gelangen die viralen RNAs über Plasmodesmata in benachbarte Zellen, wobei das *movement*-Protein 3a eine besondere Rolle spielt. MP und virale RNAs können Ribonukleokomplexe bilden. Die viralen RNAs müssen jedoch nicht zwangsläufig mit dem MP assoziiert sein, um via Plasmodesmata verbreitet zu werden. Trotz der Tatsache, dass CMV sich nicht in Form von Virionen von Zelle zu Zelle verbreitet, wird das *coat*-Protein für diesen Prozess benötigt. Es wird angenommen, dass das CP Einfluss auf die Konformation des MP hat und sich somit indirekt auf dessen Assoziation mit den viralen RNAs auswirkt. Über die systemische Bewegung des Virus innerhalb der Wirtspflanze liegen bisher nur wenige Informationen vor. Sie erfolgt über das Phloem. Vor allem das CP ist für einen effizienten Transport über längere Strecken essentiell. Es wird vermutet, dass die virale RNA in Form von Ribonukleokomplexen mit dem MP in die Siebelemente gelangt und dort die Verpackung in Viruspartikel erfolgt [79].

Die Verbreitung von CMV in der Natur erfolgt hauptsächlich über 80 verschiedene Blattlausarten. Diese nehmen die Viruspartikel innerhalb weniger Sekunden bis Minuten über ihr Stilet, das Mundwerkzeug, auf, während sie Pflanzen zur Nahrungsaufnahme anstechen. Die Blattläuse können das Virus dann innerhalb eines kurzen Zeitfensters auf weitere Wirtspflanzen übertragen [79]. Darüber hinaus ist auch eine Übertragung durch infizierte Samen möglich, wie bspw. für Bohnen, Spinat, Linsen, Lupine und Paprika gezeigt werden konnte [79, 87, 88]. Die Übertragungsraten sind meist niedrig, jedoch ausreichend, um eine Epidemie auszulösen. Eine weitere wichtige Rolle in der Übertragung von CMV kommt wildwachsenden Pflanzen sowie Unkräutern zu. In diesen Wirten tritt die CMV-Infektion meist latent auf, verursacht keine Symptome und sorgt dafür, dass das Virus saisonübergreifend weiterverbreitet wird. Zudem dienen wildwachsende Pflanzen als Virusreservoirs für Blattläuse [79]. Um die Verbreitung von CMV zu kontrollieren oder bestenfalls zu unterbinden, müssen entsprechende Maßnahmen getroffen werden, die nachfolgend näher erläutert werden.

1.3.4 Konventionelle *Disease-Management-Programme*

Zur Eindämmung eines Virus gibt es sogenannte „*disease-management-Programme*“. Bisher gibt es kein wirksames Mittel zur Behandlung einer bestehenden CMV-Infektion bzw. der durch diese verursachten Symptome. Daher beschränken sich die Programme auf prophylaktische Maßnahmen. Dazu gehört, wie bereits angedeutet, die Auswahl virusfreier Samen für die Aussaat. Weiterhin wird darauf geachtet, dass sich die Wachstumsphasen der Kulturpflanzen nicht mit Zeiten überschneiden, in denen Blattläuse besonders häufig auftreten, da diese als Vektoren des Virus dienen. Außerdem können CMV-resistente Sorten, z. B. aus konventioneller Züchtung oder durch gentechnisches Einführen viraler Gene, angepflanzt werden. Nachteile dieser Sorten liegen jedoch darin, dass sie entweder nur gegen wenige CMV-Isolate resistent sind oder die Resistenzgene nur in bestimmten Wachstumsstadien exprimiert werden. Eine entscheidende Rolle kommt der Entfernung von Unkraut zu, um Virusreservoirs zu entfernen. Auch infizierte Kulturpflanzen müssen während der Anbausaison konsequent aus dem Bestand entfernt werden. Zudem werden Pestizide eingesetzt, um Blattlaus-Populationen zu reduzieren [5, 8, 78]. Die Bekämpfung der Blattläuse hat jedoch aufgrund der nicht-persistenten Virusübertragung keinen entscheidenden Einfluss auf dessen Ausbreitung, da die Übertragung des Virus durch die Blattlaus schneller erfolgt als der Effekt des Pestizids auf die Blattlaus. Eine andere Möglichkeit der Vektorkontrolle stellt die Anzucht der Keimlinge in Gewächshäusern dar. Durch doppelte Türen, insektendichte Netze und Klebefallen kann ein Befall der Pflanzen mit Blattläusen verhindert werden [8]. Alles in allem kann jedoch auch durch diese Prophylaxe das Auftreten von CMV-Infektionen nicht sicher verhindert werden. Einmal vorhanden, lässt sich die Ausbreitung von CMV kaum mehr verhindern. Die Nachfrage nach neuen, innovativen Mitteln zur CMV-Kontrolle ist demnach sehr hoch. Auch aus diesem Grund gewinnen RNAi-basierte Methoden des Pflanzenschutzes mehr und mehr Aufmerksamkeit.

1.3.5 RNAi-basierte Strategien zum Schutz von Pflanzen vor CMV-Infektionen

RNA-Interferenz stellt eine der effektivsten Methoden zum Schutz von Pflanzen vor viralen Infektionen dar. Auch zur Kontrolle des *Cucumber Mosaic Virus* wurden bereits mehrfach RNAi-Ansätze durch die Generierung transgener Pflanzen sowie über äußerliche Anwendung von dsRNAs, die sogenannte „dsRNA-Vakzinierung“, verfolgt [81].

Lin *et al.* stellten transgene Wassermelonen mittels *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) her, die eine Resistenz gegen das *Cucumber mosaic virus* sowie das *Watermelon mosaic virus* zeigten. Dazu nutzten sie ein chimäres Transgen-Konstrukt, das auf den Sequenzen von *coat*-Protein-Fragmenten beider Viren basiert [89]. Hu *et al.* konnten Resistenzen gegen *Cucumber mosaic virus* und *Tobacco mosaic virus* (TMV) in transgenen Tabakpflanzen erzielen, indem sie mittels *A. tumefaciens* ein *hairpin*-Konstrukt, bestehend aus Teilen des CMV-Replikase-Gens und des Gens des TMV-*movement*-Proteins,

exprimierten [90]. Ähnliche Effekte konnten in Tabakpflanzen erzielt werden, die Konstrukte basierend auf der Sequenz des CMV *coat*-Proteins exprimierten [91]. Die Nutzung transgener Pflanzen bietet einige Vorteile. So kann mittels transgener Pflanzen z. B. der Ertrag erhöht, der Einsatz von Pestiziden verringert und die Pflanze an veränderte Umweltbedingungen angepasst werden [92, 93]. Aber auch die Risiken der Technologie müssen in Betracht gezogen werden. Hierzu zählen die mögliche Toxizität oder das Potential, Allergien auszulösen. Außerdem sind gegenteilige Effekte auf *non-target*-Organismen, die Entwicklung von Resistenzen in Unkräutern und Insekten sowie potentielle Umweltrisiken u. a. Ursachen für Bedenken gegenüber genetisch modifizierten Organismen bzw. Pflanzen [94]. Daraus ergibt sich ein weiterer Nachteil der Methode: Im Rahmen der Kommerzialisierung entstehen durch aufwendige Sicherheitsbewertungen und Zulassungsverfahren hohe Kosten. Darüber hinaus wird angenommen, dass vom Start eines Projekts zur Entwicklung einer transgenen Pflanze bis zu deren kommerzieller Einführung bis zu 13 Jahre vergehen können [94]. Besonders aufgrund der geringen Akzeptanz durch die Konsumenten rücken somit biotechnologische Verfahren in den Vordergrund, die zwar Einfluss auf das Immunsystem der Pflanze nehmen, jedoch keine dauerhaften Veränderungen im Genom der Pflanze hervorrufen. Dies kann durch die äußerliche Anwendung von RNAi-induzierenden Molekülen wie siRNAs oder längeren dsRNAs erreicht werden. Ein positives Beispiel dafür wurde durch Namgial *et. al* publiziert. Durch exogene Applikation von dsRNA bestehend aus Sequenzen des *Tomato leaf curl virus* sowie des *Cucumber mosaic virus* konnte in *N. tabacum* ein Schutz von 33 % der Pflanzen gegen CMV erreicht werden. Eine dsRNA basierend auf der codierenden Sequenz des viralen RNA-*silencing*-Suppressorproteins 2b bewirkte einen Schutz von 40 % der Pflanzen [77]. Auch Mitter *et al.* konnten durch den Einsatz von dsRNAs in Kombination mit *BioClay* - lehmartigen Nanopartikeln - bereits einen systemischen Schutz von Kuhbohnen sowie Tabakpflanzen gegen CMV nachweisen [12].

1.4 Motivation und Zielstellung der Arbeit

Die grundlegenden Prinzipien der antiviralen Immunantwort in Pflanzen sind bekannt und wurden bspw. mittels transgener Pflanzen bereits praktisch angewendet. Bisherige Verfahren haben jedoch unter anderem zwei grundlegende Nachteile: Sie generieren zu viele unwirksame bzw. ineffiziente vsRNAs, deren Effekte schwer abzuschätzen sind. Darüber hinaus mangelt es häufig an Informationen über die Zugänglichkeit der *target sites* generierter siRNAs. Solche Verfahren sind daher ineffizient.

In der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Biotechnologie“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurde anhand des Modellvirus *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) ein neuartiges *screening*-Verfahren etabliert. Dieses ermöglicht *in vitro* eine schnelle Identifizierung effizienter antiviraler siRNAs.

Diese effizienten antiviralen siRNAs erzielten in transienten Anwendungen einen nahezu vollständigen Schutz von *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*)-Pflanzen vor einer TBSV-Infektion [43].

Diese Methode sollte nun von TBSV, einem Pflanzenvirus mit einzelsträngigem RNA-Genom positiver Polarität, auf das *Cucumber mosaic virus* (CMV), ein Virus mit segmentiertem und deutlich variablerem Genom, übertragen werden. Das *Cucumber mosaic virus* ist zudem ein Vertreter der Pflanzenviren mit besonderer wirtschaftlicher Relevanz. Die Durchführung basierte auf einem pflanzlichen *in-vitro*-System, dem BYL. Dabei handelt es sich um einen zytoplasmatischen Extrakt entvakuolisierter *Nicotiana tabacum bright yellow-2* (BY-2)-Protoplasten, welcher die Rekonstitution wichtiger Elemente der antiviralen Immunantwort der Pflanze ermöglicht [43, 44, 95, 96]. Das BYL besitzt endogene DCL-Aktivität, was die Untersuchung der Prozessierung viraler RNAs *in vitro* ermöglicht. Darüber hinaus kann nach *in-vitro*-Translation von AGO-mRNA auch die RISC-Aktivität rekonstituiert werden. Dies kann sowohl mit exogenen siRNAs als auch mit im BYL erzeugten siRNA-Pools nach Zugabe viraler dsRNAs erfolgen. Auf der Basis dieses *in-vitro*-Systems sollten auch weitere Erkenntnisse über verschiedene Aspekte des pflanzlichen RNAi-Mechanismus wie bspw. die Prozessierung von dsRNAs durch DCLs, die AGO-Affinität in Hinblick auf unterschiedliche siRNAs oder die Effizienz der *target*-Spaltung durch verschiedene AGO/RISCs gewonnen werden. Aufbauend auf den *in vitro* gewonnenen Erkenntnissen sollten diese auf ihre Gültigkeit für die Anwendung *in planta* überprüft werden. Dazu sollten Infektionsexperimente mit der Modellpflanze *N. benthamiana* durchgeführt werden.

Alles in allem soll diese Arbeit zur Optimierung effizienter und gleichzeitig durch die Öffentlichkeit akzeptierter Anwendungsmöglichkeiten von RNAi zum Schutz von Pflanzen vor viralen Infektionen beitragen.

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind dem Anhang (Abschnitt 7.5 und 7.6) zu entnehmen.

2.2 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen, Pflanzenzellen, Pflanzenzellextrakten und *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen

2.2.1 Prokaryotische Zellen

2.2.1.1 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Zunächst wurden *E. coli*-Zellen aus einer Stock-Lösung (s. Tabelle 1) mit einer sterilen Impföse auf eine LB-Agar-Platte [1 % (w/v) Bacto-Trypton; 0,5 % (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt; 1 % (w/v) NaCl; 1 mM NaOH; 1,5 % (w/v) Bacto-Agar] ohne Antibiotikum überführt (Verdünnungsausstrich) und die Platte über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einem Einzelklon wurden 3 ml LB-Flüssigkultur [1 % (w/v) Bacto-Trypton; 0,5 % (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt; 1 % (w/v) NaCl; 1 mM NaOH] angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Je 1 ml der Übernachtskultur wurde zum Animpfen von 100 ml LB-Medium verwendet. Nach zwei bis drei Stunden Inkubation bei 37 °C im Schüttler wurde die optische Dichte gemessen. Bei einer OD600 zwischen 0,4 und 0,55 wurde die Bakteriensuspension auf Eis abgekühlt und anschließend zehn Minuten bei 3 000 g und 4 °C zentrifugiert (Rotina 380 R). Das Pellet wurde in 45 ml TFBI [30 mM KOAc; 50 mM MnCl₂; 10 mM CaCl₂; 100 mM RbCl; 15 % (v/v) Glycerol; pH 5,8] resuspendiert und zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 2 ml TFBII [10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl; 15 % (v/v) Glycerol; pH 6,5] resuspendiert. Die *E. coli*-Suspension wurde zu je 50 µl, 100 µl und 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 1 Verwendete prokaryotische Zellen (Thermo Scientific)

Bakterienstamm	Top10 (<i>Escherichia coli</i>)
Genotyp	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG

2.2.1.2 Transformation prokaryotischer Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Top10-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Je 3 µl eines Ligationsansatzes bzw. 0,5-1 µl Plasmid-DNA (Retransformation) wurden zu 50 µl *E. coli*-Zellen gegeben.

Die Zellen wurden für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C durchgeführt. Danach wurden 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikum zugegeben und die Zellsuspension für 20-90 min bei 37 °C inkubiert. Je 20 µl (Plasmid-DNA) bzw. 200 µl (Ligationsansatz) der Zellsuspension wurden auf eine LB-Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.2.2 Pflanzliche Zellen und Pflanzenmaterial

2.2.2.1 Kultivierung von BY-2-Suspensionskulturen

Die *Nicotiana tabacum*-BY-2-Zellen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. Hause (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle), wurden in 250 ml Erlenmeyer-Weithalskolben bei 23 °C im Dunkeln bei 120 rpm auf einem Schüttler (Infors Multitron) kultiviert. Dazu wurden jeweils ca. 2-3 ml einer sieben Tage alten BY-2-Suspensionskultur unter sterilen Bedingungen zu 47 ml BY-2-Flüssigmedium [Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (Duchefa Biochemie); 3 % (w/v) Saccharose; 1 µg/ml Thiamin-HCl; 0,2 µg/ml 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure; 100 µg/ml Myo-Inositol; 200 µg/ml KH₂PO₄; pH 5,8] gegeben. Dieser Vorgang wurde wöchentlich wiederholt.

2.2.2.2 Herstellung von BY-2-Lysat (BYL)

Das BYL ist ein zytoplasmatischer Extrakt aus entvakuolisierten *Nicotiana tabacum* BY-2-Protoplasten [96]. Es bildete im Rahmen dieser Arbeit die Grundlage vieler *in-vitro*-Experimente. Zur Herstellung wurden ca. 3,5 ml einer sieben Tage alten Zellsuspension zu 47 ml frischem BY-2-Flüssigmedium in einen 250 ml Erlenmeyer-Weithalskolben gegeben (insgesamt drei Kolben) und für fünf Tage bei 23 °C im Dunkeln bei 120 rpm auf einem Schüttler (Infors Multitron) kultiviert. Jeweils ca. 35 ml der BY-2-Zellsuspension wurden in vier 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, für eine Minute bei 23 °C und 87 g zentrifugiert (Rotina 38R, Beschleunigung 3, Bremse 0) und der Überstand entfernt. Das Volumen der pelletierten Zellen sollte insgesamt ca. 50-55 ml betragen. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 100 ml Protoplastierlösung [0,312 % (w/v) Cellulase ONOZUKA RS (Duchefa Biochemie); 0,1 % (w/v) Pectolyase Y23 (Duchefa Biochemie)] in Protoplasten-Waschpuffer [12,5 mM NaOAc; 5 mM CaCl₂; 0,37 M Mannitol; pH 5,8] resuspendiert. Die Zellen wurden zur Protoplastierung bei 26 °C und 100 rpm (New Brunswick Schüttler) geschüttelt. Das Voranschreiten der Protoplastierung wurde nach 1,5-2 h unter einem Lichtmikroskop überprüft. In der Zwischenzeit wurden Percoll-Gradienten vorbereitet. Dafür wurden zunächst eine 0 %- und eine 70 %-Percoll-Lösung [0 % oder 70 % Percoll (v/v), GE Healthcare; 0,7 M Mannitol; 20 mM MgCl₂; 5 mM PIPES-KOH (pH 7,0)] hergestellt. Hierfür wurde eine Stammlösung aus 100 mM MgCl₂ und 25 mM PIPES-KOH verwendet. Das Mannitol wurde jeweils frisch abgewogen. Durch Mischen der 0 %- und 70 %-Percoll-Lösungen wurden eine 30 %- und eine 40 %-

Percoll-Lösung hergestellt. Die Herstellung der Percoll-Gradienten erfolgte mittels eines Gradientenmischers (Hoefer). Zunächst wurden beide Kammern sowie der zugehörige Schlauch mit der entsprechenden Percoll-Lösungen gespült. Anschließend wurden jeweils 3,15 ml der 0 %-Percoll-Lösung in die vordere Kammer sowie 3,15 ml der 30 %-Percoll-Lösung in die hintere Kammer gegeben und unter stetigem Rühren mittels Magnetrührer (IKA) der kontinuierliche Teil des Gradienten in 14 ml Zentrifugenröhrchen *ultra-clear* (Beckman Coulter GmbH) generiert. Anschließend wurden die Gradienten mittels einer 230 mm langen Pasteur-Pipette mit 2,1 ml der 40 %- sowie 1,9 ml der 70 %-Percoll-Lösung unterschichtet. Nach erfolgter Protoplastierung wurden die Protoplasten dreimal mit Protoplasten-Waschpuffer gewaschen. Dafür wurden diese vorsichtig in vier 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugation bei 87 g für fünf Minuten bei 23 °C gesammelt (Rotina 38R, Beschleunigung 3, Bremse 0), der Überstand entfernt und die Protoplasten in 30 ml frischem Protoplasten-Waschpuffer resuspendiert. Nach der vierten Zentrifugation wurden die Protoplasten in einem kleinen Volumen Protoplasten-Waschpuffer resuspendiert, sodass ein Gesamtvolumen von ca. 15 ml nicht überschritten wurde. Die Protoplasten-Suspension wurde mittels einer 1 ml Pipette mit abgeschnittener Pipettenspitze auf die Percoll-Gradienten geladen und bei 10 000 g und 23 °C für eine Stunde zentrifugiert (Ultrazentrifuge L8-M, SW40Ti-Rotor, Beschleunigung 1, Bremse 0). Die entvakuolisierten Protoplasten wurden aus der Grenzschicht zwischen der 40 %- und 70 %-Percoll-Lösung mittels einer 150 mm langen Pasteur-Pipette isoliert und in zwei 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurden mindestens zwei Volumen Protoplasten-Waschpuffer zugegeben (je nach Präparation ca. 9 ml), vorsichtig gemischt und fünf Minuten bei 87 g und 23 °C zentrifugiert (Rotina 38R, Beschleunigung 3, Bremse 0). Die Mini-Protoplasten wurden anschließend zweimal mit jeweils 10 ml Protoplasten-Waschpuffer versetzt und vorsichtig durch Invertieren des Zentrifugenröhrchens resuspendiert. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Pellets in vier Volumen (relativ zum pelletierten Zellvolumen) TR-Puffer [30 mM Hepes/KOH pH 7,4; 80 mM KOAc; 1,8 mM Mg(OAc)₂; 2 mM DTT] resuspendiert und in einen 7 ml *tight-fitting Dounce homogenizer* (auf Eis vorgekühlt) überführt. Die Mini-Protoplasten wurden durch 70 – 80 Stöße homogenisiert, wobei jeweils Pausen nach zehn Stößen durchgeführt wurden, um ein zu starkes Erwärmen der Suspension zu verhindern. Das Lysat wurde in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 845 g (Zentrifuge 5424 R) und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und erneut für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation stellt das BYL dar. Das BYL wurde zu je 500 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Es ist in gefrorenem Zustand für mindestens ein Jahr stabil. Die Proteinkonzentration im BYL sollte nach Messung mittels Bradford-Methode unter Verwendung von BSA als Standard ca. 10 mg/ml betragen.

2.2.2.3 *Micrococcus*-Nuklease-Behandlung

Die *Micrococcus*-Nuklease-Behandlung des BYL dient dem Abbau endogener mRNAs. Dies erhöht die Effizienz der *in-vitro*-Translation exogener mRNAs wie beispielsweise der AGO-mRNA, die im Rahmen von *Slicer*-Assays im BYL translatiert wird. Für die *Micrococcus*-Nuklease (MN)-Behandlung wurden 500 µl BYL bei Raumtemperatur aufgetaut, mit 2,5 µl 100 mM CaCl₂ und 2,5 µl *Micrococcus*-Nuklease (15 U/µl) versetzt und für 15 min bei 20 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 15 µl 100 mM EGTA zugegeben, die Ansätze aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.2.4 *In-vitro*-Translation

Die *in-vitro*-Translation von AGO-mRNA erfolgte in *Micrococcus*-Nuklease behandeltem BYL für 2,5 h bei 25 °C. Der Reaktionsansatz setzte sich aus den in Tabelle 2 genannten Komponenten zusammen.

Tabelle 2 Komponenten einer *in-vitro*-Translation

Komponenten	
BYL (MN-behandelt)	10 µl
10× TM-Puffer	2 µl
4× TR-Puffer	2 µl
Kreatinphosphatkinase (10 mg/ml)	0,4 µl
AGO-mRNA	0,5 pmol
H ₂ O _{nf}	ad 20 µl

Die Zusammensetzung der translationsspezifischen Puffer ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3 Zusammensetzung der Puffer für die *in-vitro*-Translation

10× TM-Puffer	4× TR-Puffer
7,5 mM ATP	120 mM Hepes/KOH, pH 7,4
1 mM GTP	400 mM KOAc
250 mM Kreatinphosphat	7,2 mM Mg(OAc) ₂
0,8 mM Spermin	2 mM DTT
	4× Protease-Inhibitor (Roche, <i>cOmplete</i> , EDTA-free)

Der Nachweis translatierter Proteine erfolgte durch SDS-PAGE (s. Abschnitt 2.5.2) und Western-blotting (s. Abschnitt 2.5.3).

2.2.2.5 DCL-Assay

Der DCL-Assay wurde zur Generierung von siRNA-Pools aus einer definierten Substrat-RNA durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit handelt es sich bei der Substrat-RNA um die

genomischen RNAs 2 und 3 des *Cucumber Mosaic Virus*. Um die entstehenden siRNA-Spezies zu visualisieren, wurde der DCL-Assay zunächst unter Verwendung einer radioaktiv markierten Substrat-RNA (s. Abschnitt 2.4.3) in einem 20 µl Ansatz unter Translationsbedingungen (s. Tabelle 2, ohne AGO-mRNA) durchgeführt. Die *in vitro* generierten siRNAs wurden mittels denaturierender Harnstoff-PAGE (s. Abschnitt 2.4.7) und Autoradiographie (s. Abschnitt 2.4.8) detektiert. Zur Generierung der Proben für das *next generation sequencing* (NGS) erfolgte der DCL-Assay unter Zugabe unmarkierter Substrat-RNA. Dazu wurden 2,5 µg der doppelsträngigen CMV-RNA 2 bzw. 3 für zwei Stunden bei 25 °C in einem 100 µl Ansatz unter Translationsbedingungen inkubiert. Für einen DCL-Assay wurden jeweils drei Reaktionen in drei verschiedenen BYL-Präparationen durchgeführt. Nach der zweistündigen Inkubation wurden 0,5 % SDS (w/v) und 6 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Gesamt-RNA mittels Chloroform-Extraktion gereinigt. Dafür wurden die Reaktionsansätze mit RNase-freiem Wasser (H₂O_{nf}) auf 120 µl aufgefüllt und mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 15 871 g wurden die Überstände in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde daraufhin mit 30 µg Hefe-tRNA, 0,1 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,2) und 2,9 Volumen Ethanol über Nacht (oder für mindestens eine Stunde) bei -20 °C präzipitiert. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 4 °C und 15 871 g (Zentrifuge 5415 R) wurden die Überstände entfernt und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für zehn Minuten bei 4 °C und 15 871 g wurde das Pellet getrocknet, in H₂O_{nf} gelöst.

Für nachfolgende NGS-Analysen von DCL-Assay-Proben wurden jeweils drei gleiche Reaktionsansätze vereinigt und erneut gereinigt. Die vereinigten Proben wurden dazu mit 20 mg Glykogen, 0,1 Volumen 3 M NaOAc und 2,9 Volumen Ethanol versetzt, mindesten 1 h bei -20 °C inkubiert und daraufhin für 30 min bei 4 °C und 15 871 g zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen durch Zugabe von je 500 µl 70 % Ethanol und je 30-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 15 871 g wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in 25 µl H₂O_{nf} gelöst.

2.2.2.6 Slicer-Assay

Anhand des *Slicer*-Assays lässt sich *in vitro* die endonukleolytische Hydrolyse einer *target*-RNA durch einen spezifisch programmierten AGO/RISC untersuchen. Zunächst wurden 0,5 pmol AGO-mRNA in Gegenwart von 0,1 µM einer synthetischen siRNA *in vitro* translatiert (s. Tabelle 2). Nach einer Inkubationszeit von 2,5 h bei 25 °C wurden pro Ansatz 2 µg einer Luciferase-mRNA als Kompetitor-RNA sowie 20 000 cpm (ca. 10 fmol) einer radioaktiv markierten *target*-RNA zugegeben und die Reaktionsansätze erneut für 15 min bei 25 °C inkubiert. Während dieser Inkubation kann die Spaltung der *target*-RNA durch den AGO/RISC erfolgen. Die Reinigung der Gesamt-RNA wurde wie in Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben durchgeführt. Die Visualisierung der *target*-RNA sowie der Spaltprodukte erfolgte

aufgrund der Größe der genomischen CMV-RNAs mittels 1,5 % denaturierender Agarose-Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.4.6).

Für die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese wurden die RNA-Pellets in 10 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{nf}}$ gelöst und jeweils 2,5 μl der Probe mit 2,5 μl 2 \times RNA-Ladepuffer [95 % (v/v) Formamid; 0,025 % (w/v) SDS; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau; 0,025 % (w/v) Xylencyanol; 0,025 % (w/v) Ethidiumbromid; 0,5 mM EDTA] versetzt. Die Proben wurden vor der Auftragung für fünf Minuten bei 75 °C denaturiert.

2.2.2.7 Kompetitiver *Slicer*-Assay

Zum Vergleich der Effizienz individueller siRNA-Kandidaten wurden kompetitive *Slicer*-Assays analog zu Abschnitt 2.2.2.6 durchgeführt, wobei die Translation der AGO-mRNA in Gegenwart von 10 nM der synthetischen, zu charakterisierenden siRNA (siCMV) sowie 0,1 μM (10-facher Überschuss) einer Kompetitor-siRNA (gf698) erfolgte.

2.2.2.8 DCL/*Slicer*-Assay

Der DCL/*Slicer*-Assay ist eine Kombination aus DCL-Assay und *Slicer*-Assay. Hierbei wird im Gegensatz zum *Slicer*-Assay keine spezifische siRNA zum Reaktionsansatz zugegeben. Stattdessen wird in einem vorangestellten Schritt zunächst dsRNA durch die endogenen DCL-Proteine des BYL zu einem Pool verschiedenster siRNAs prozessiert. Diese siRNAs können wiederum in AGO-Proteine eingebaut werden und somit die Spaltung einer *target*-RNA vermitteln. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der allgemeine Reaktionsablauf sind Tabelle 2 sowie Abschnitt 2.2.2.6 zu entnehmen. Es wurden zwischen 2 ng und 200 ng der jeweiligen, spezifischen dsRNA zugegeben.

2.2.2.9 Infektionsexperimente an Tabakpflanzen (*N. benthamiana*)

Die Infektionsexperimente wurden zu verschiedenen Zwecken durchgeführt. Zunächst wurden die minimalen Mengen der genomischen CMV-RNAs für eine reproduzierbare, zuverlässige Infektion von Tabakpflanzen (*N. benthamiana*) bestimmt. Darauf aufbauend wurden die protektiven Effekte individueller vsiRNAs sowie längerer dsRNAs charakterisiert. Die verwendeten vier bis fünf Wochen alten Tabakpflanzen wurden freundlicherweise durch das Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle (IPB) zur Verfügung gestellt. Für die Dauer der Infektionsexperimente wurden die Tabakpflanzen in Pflanzenanzuchtkammern (Percival, CLF Plant Climatics; Lichtperiode: 14 h, 23 °C, Lichteinstrahlung 90-100 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$; Dunkelperiode: 10 h, 21 °C) kultiviert.

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Infektionsexperimente erfolgten mittels mechanischer Co-Inokulation. Für die Etablierung der minimalen CMV-RNA-Mengen für eine 100%ige Infektion aller inokulierten Tabakpflanzen wurden mittels Carborundum (Siliciumcarbid, Sigma Aldrich) und einer Pipettenspitze zwei Stellen pro Blatt und zwei Blätter pro Pflanze mit einem Mastermix (10 μl)

bestehend aus Inokulationspuffer [15 mM KH_2PO_4 , pH 9,2; 25 mM Glycin] und verschiedenen Mengen der genomischen CMV-RNAs (je 1-500 fmol) mechanisch (durch Aufreiben) inokuliert. Nach der Aufnahme des Inokulums durch die Blätter wurden die Blattoberflächen zur Entfernung des Carborundums mit destilliertem Wasser abgespült und mit Zellstofftüchern vorsichtig getrocknet. Anschließend wurden die Tabakpflanzen, wie oben genannt, in einer Pflanzenanzuchtkammer inkubiert und täglich auf das Auftreten charakteristischer Symptome einer CMV-Infektion überprüft. Zum Test des protektiven Effekts verschiedener siRNAs bzw. dsRNAs wurden die Tabakpflanzen mit einem Mix aus Inokulationspuffer, jeweils 20 fmol der genomischen CMV-RNAs sowie 150 pmol der zu testenden siRNA bzw. variierenden Mengen dsRNA, wie zuvor beschrieben, mechanisch mittels Carborundum inokuliert, über einen Zeitraum von 28 bzw. 35 Tagen in einer Pflanzenanzuchtkammer inkubiert und täglich auf das Auftreten von CMV-spezifischen Symptomen untersucht. Nach dem Ende der Experimente wurden Pflanzenproben in Form von Blattscheiben mittels eines Korkbohrers entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und für weitere Analysen bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Pflanzen wurden fachgerecht autoklaviert und entsorgt.

2.3 Molekularbiologische Arbeiten mit DNA

2.3.1 Plasmid-Minipräparation

Transformierte *E. coli*-Zellen wurden über Nacht in 3 ml flüssigem LB-Medium unter Zusatz des entsprechenden selektiven Antibiotikums (s. Tabelle 4) unter aeroben Bedingungen schüttelnd bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

Tabelle 4 Antibiotika-Konzentrationen

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	0,1 mg/ml
Kanamycin	50 mg/ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	0,05 mg/ml

Um Plasmid-DNA zu isolieren, wurde die Bakterienkultur in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, eine Minute bei $15\ 871\text{ g}$ zentrifugiert (Zentrifuge 5424) und der Überstand entfernt. Anschließend wurden 100 μl Lösung I [25 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A] zugegeben und das Bakterienpellet im Schüttler resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μl Lösung II [0,2 M NaOH; 1 % SDS] und mehrmaligem Invertieren wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt. Nach Lyse der Zellen wurden 150 μl Lösung III [3 M KOAc; 2 M Essigsäure] zugegeben, gründlich gemischt und der Ansatz für drei bis fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei $15\ 871\text{ g}$ wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt,

fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 15 871 g zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde abschließend mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 15 871 g und Entfernen des Überstandes wurde das Pellet getrocknet, in 30 µl H₂O_{nr} gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

Alternativ wurde die Plasmid-Minipräparation mittels *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.2 Plasmid-Midipräparation

Zur Herstellung größerer DNA-Mengen wurde eine Plasmid-Midipräparation durchgeführt. Dazu wurden 100 ml LB-Medium inklusive des entsprechenden selektiven Antibiotikums mit transformierten *E. coli*-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte anschließend mit Hilfe des *PureYield™ Plasmid Midiprep Systems* (Promega) laut Herstellerangaben.

2.3.3 DNA-Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau von DNA wurde durchgeführt, um spezifische DNA-Enden (*blunt ends* oder Überhänge) für die Ligation von DNA-Fragmenten zu generieren, den Erfolg einer Klonierung zu überprüfen (Test-Verdau) oder um *templates* für eine *in-vitro*-Transkription zu linearisieren. Für die Linearisierung von *templates* wurden 15-30 µg Plasmid in einem Gesamtvolumen von 200 µl verdaut. Test-Verdaus wurden mit 1-2 µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden je nach Herstellerangaben der entsprechenden Enzyme gewählt. Die DNA wurde nach Restriktionsverdau je nach Größe der zu erwartenden Fragmente auf 1-2%igen Agarose-Gelen analysiert.

2.3.4 Reinigung und Präzipitation von DNA

Die Reinigung von DNA erfolgte hauptsächlich mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion. Diese Methode beruht auf der Phasentrennung von wässrigen und organischen Lösungen sowie der unterschiedlichen Löslichkeit von Proteinen, Lipiden und DNA darin. Proteine werden durch Phenol und Chloroform und Lipide mittels Chloroform denaturiert, während die hydrophile, polare DNA in der wässrigen Phase verbleibt. Isoamylalkohol verhindert das Schäumen und führt durch eine bessere Phasentrennung zu einer höheren Reinheit der DNA. Die Reaktionsansätze wurden zunächst mit einem Volumen (200 µl) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, eine Minute gemischt und drei Minuten bei 16 060 g und Raumtemperatur zentrifugiert (Mikro 200). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform extrahiert. Die obere,

wässrige Phase wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 µl Glykogen (20 mg/ml), 0,1 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol (> 96 %) versetzt. Durch Zugabe des Ethanols wird die Lösung weniger polar, wodurch die Löslichkeit der DNA herabgesetzt wird und sie ausfällt. Zusätzlich erhöht das in Ethanol unlösliche Glykogen die Fällungseffizienz. Der Reaktionsansatz wurde für zehn Minuten bei Raumtemperatur und zehn Minuten auf Eis inkubiert und 15 min bei 15 871 g und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge 5424 R). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und zehn Minuten bei 4 °C und 15 871 g zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in H₂O_{nf} gelöst.

Alternativ erfolgte die Reinigung von DNA mittels des *GeneJET PCR Purification Kits* (Thermo Scientific) oder durch Extraktion aus Agarose-Gelen mit Hilfe des *GeneJET Gel Extraction Kits* (Thermo Scientific) laut den Angaben des Herstellers.

2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der spezifischen Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels einer DNA-Polymerase und sequenzspezifischer Primer. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR für Klonierungen, zur Generierung von *templates* für die *in-vitro*-Transkription sowie zum Nachweis viraler Sequenzen mittels cDNAs verwendet. Nachfolgend sind sowohl die Reaktionsbedingungen als auch die Reaktionsansätze in Abhängigkeit von der verwendeten DNA-Polymerase (*DreamTaq* bzw. *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase, Thermo Scientific) dargestellt (s. Tabelle 5 und Tabelle 6).

Tabelle 5 Zusammensetzung einer *DreamTaq*- sowie einer *Phusion*-PCR-Reaktion

Komponenten	<i>DreamTaq</i> DNA-Polymerase	<i>Phusion High-Fidelity</i> DNA-Polymerase
Reaktionspuffer	1×	1×
10 mM dNTP-Mix	200 µM	200 µM
<i>forward</i> -Primer	0,5 µM	0,5 µM
<i>reverse</i> -Primer	0,5 µM	0,5 µM
<i>template</i> -DNA	10 pg - 1 µg	1 pg - 10 ng
DNA-Polymerase	0,03 U/µl	0,02 U/µl
H ₂ O _{nf}	ad 25 µl	ad 50 µl

Tabelle 6 Reaktionsbedingungen der *DreamTaq*- bzw. der *Phusion*-PCR-Reaktion

	<i>DreamTaq</i> DNA-Polymerase		<i>Phusion High-Fidelity</i> DNA-Polymerase	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	98 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	30 s	98 °C	10 s
Primer- <i>annealing</i>	T _m der Primer - 5 °C	30 s	T _m der Primer + 3 °C	20 s
Elongation	72 °C	1 min/kb	72 °C	15-30 s/kb
Finale Elongation	72 °C	5 min	72 °C	5 min

Die eingesetzten Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) wurden von der Firma Jena Bioscience (Jena, D) bezogen. Die PCRs wurden im *FlexCycler²* Thermocycler (Analytik Jena) durchgeführt.

2.3.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Proben wurde mittels des *NanoDrop One* Spektralphotometers (Thermo Scientific) laut Herstellerangaben bestimmt.

2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden mittels 1-2%iger Agarose-Gele entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Dazu wurden 1-2 % Agarose ((w/v), Agarose *low EEO*, AppliChem) in 1× TAE-Puffer [40 mM Tris/HCl; 5 mM NaOAc; 1 mM EDTA; pH 8,3] durch Aufkochen gelöst und anschließend mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Als Ladepuffer diente der *DNA-loading dye* [1,67 mM Tris/HCl; pH 7,4; 10 % (v/v) Glycerol; 10 mM EDTA; 0,005 % (w/v) Bromphenolblau; 0,005 % (w/v) Xylencyanol FF; 10 mM EDTA]. Die Elektrophorese erfolgte bei 120-130 V in TAE-Puffer. Die DNA-Banden wurden mittels des Geldokumentationssystems UVP UVsolo *touch* (Analytik Jena) unter UV-Anregung detektiert.

2.3.8 Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden

Im Rahmen von Klonierungen war es teils notwendig, synthetische DNA-Einzelstränge zu doppelsträngigen Molekülen zu hybridisieren. Dazu wurden in einem 50 µl Reaktionsansatz je 1 nmol des *forward*- bzw. des *reverse*-Oligos in *annealing*-Puffer [10 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA] für eine Minute bei 95 °C inkubiert und anschließend im Heizblock auf 25 °C abgekühlt.

2.3.9 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA

Da DNA-Ligasen ein 5'-Monophosphat an mindestens einem von zwei zu verknüpfenden DNA-Fragmenten benötigen, müssen synthetische, unphosphorylierte DNAs häufig phosphoryliert werden. Dazu wurden 10-50 pmol eines DNA-Oligos zusammen mit 20 mM ATP und 10 U T4-Polynukleotidkinase (Thermo Scientific) im entsprechenden Reaktionspuffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 mM EDTA und Erhitzen für zehn Minuten bei 75 °C gestoppt. Umgekehrt kann es nach der Linearisierung von Vektoren durch Restriktionsenzyme nötig sein, den Vektor zu dephosphorylieren, um eine Rezirkularisierung zu verhindern. In diesen Fällen wurde der verdaute Vektor mit 2 U Alkalischer Phosphatase (FastAP, Thermo Scientific) für 30 min bei 37 °C laut Herstellerangaben inkubiert.

2.3.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationsreaktionen wurden unter Verwendung der T4 DNA-Ligase (Thermo Scientific) durchgeführt. Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige Bildung der Phosphodiesterbindung zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden doppelsträngiger DNA bzw. doppelsträngiger RNA.

Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl laut Herstellerangaben. Der restriktionsverdaute Vektor sowie die zu klonierenden DNA-Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt und die Reaktion für ein bis zwei Stunden bei 22 °C inkubiert.

2.3.11 Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten

Die Sequenzierung von DNA-Proben (gereinigtes PCR-Produkt: 1,5 ng/µl pro 100 bp; Plasmid-DNA: 40-100 ng/µl) wurde durch die Firma Microsynth SeqLab GmbH (Göttingen, D) durchgeführt.

2.4 Molekularbiologische Arbeiten mit RNA

2.4.1 *In-vitro*-Transkription

Mittels *run-off in-vitro*-Transkription wurde im Rahmen der Arbeit RNA ausgehend von linearisierten, gereinigten Plasmiden oder gereinigten PCR-Produkten generiert. Dabei wird die Transkription durch das „Herunterlaufen“ der RNA-Polymerase von der *template*-DNA terminiert. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt und bestand aus den in Tabelle 7 genannten Komponenten.

Tabelle 7 Komponenten einer *in-vitro*-Transkription

Komponenten	
5× Transkriptionspuffer (Agilent Technologies)	20 µl
rNTP-Mix (je 20 mM A, C, U, G)	10 µl
<i>template</i> -DNA	2 µg
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl, Thermo Scientific)	40 U
RNA-Polymerase	100 U
H ₂ O _{nf}	ad 100 µl

Die Ribonukleosidtriphosphate wurden von Jena Bioscience (Jena, D) bezogen. Die *in-vitro*-Transkription fand in Abhängigkeit der Promotoren der *template*-DNAs unter Verwendung der T7-RNA-Polymerase (50 U/µl, Agilent Technologies) bzw. der SP6-RNA-Polymerase (20 U/µl, Thermo Scientific) statt. Die Reaktionsansätze wurden für mindestens 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Die *template*-DNA wurde anschließend durch Zugabe von 10 U DNase I *recombinant RNase-free* (Roche

Diagnosics GmbH) und 15-minütige Inkubation bei 37 °C hydrolysiert. Die Transkripte wurden mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation gereinigt (s. Abschnitt 2.4.4).

Zur Herstellung größerer RNA-Mengen wurde die *in-vitro*-Transkription alternativ mittels *HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit* (New England BioLabs) laut Herstellerangaben für RNA-Transkripte < 0,3 kb durchgeführt.

2.4.2 *In-vitro*-Transkription mit 5'-*cap*-Analogon

Die *in-vitro*-Transkription von RNAs mit 5'-*cap*-Analogon erfolgte analog der Angaben in Tabelle 7. Statt des 20 mM rNTP-Mixes wurde ein rNTP-Mix bestehend aus je 20 mM ATP, CTP und UTP sowie 5 mM GTP verwendet und die Transkription unter Zugabe von 0,8 mM m⁷GpppG-*cap*-Analogon (Jena Bioscience) durchgeführt.

2.4.3 *In-vitro*-Transkription zur Generierung radioaktiv markierter RNA

Die Generierung radioaktiv markierter Transkripte erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl wie in Tabelle 8 angegeben. Zur Generierung radioaktiv markierter RNAs mit 5'-*cap*-Analogon wurden dem Reaktionsansatz 0,8 mM m⁷GpppG-*cap*-Analogon (Jena Bioscience) zugesetzt und die Konzentration von GTP und CTP im rNTP-Mix reduziert (10 mM A, U; 2,5 mM C, G). Die Reaktionsansätze wurden für mindestens 2,5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die DNA-*templates* durch Zugabe von 10 U DNase I *recombinant RNase-free* (Roche Diagnostics GmbH) und 15-minütige Inkubation bei 37 °C hydrolysiert. Die RNA wurde mittels des *Nucleospin RNA II Kits* (Macherey-Nagel GmbH) oder des *GeneJET RNA Purification Kits* (Thermo Scientific) laut Herstellerangaben gereinigt.

Tabelle 8 Reaktionsansatz zur Generierung radioaktiv markierter RNA

Komponenten	
5× Transkriptionspuffer (Agilent Technologies)	10 µl
rNTP-Mix (je 10 mM A, U, G; 2,5 mM C)	5 µl
<i>template</i> -DNA	1 µg
<i>RiboLock</i> RNase Inhibitor (40 U/µl, Thermo Scientific)	20 U
[α- ³² P]-CTP (3000 Ci/mmol, Hartmann Analytic)	25 µCi
RNA-Polymerase	50 U
H ₂ O _{nf}	ad 50 µl

2.4.4 Reinigung und Präzipitation von RNA

Die Isolation von RNA aus *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen erfolgte mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-Fällung. Die Durchführung erfolgte ausschließlich in RNase-freien *Safe-Lock* Eppendorf-Reaktionsgefäßen und unter Verwendung von RNase-freiem Wasser. Die Reaktionsansätze wurden zu Beginn der Extraktion mit H₂O_{nf} auf ein Volumen von 400 µl aufgefüllt, mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, eine Minute durch Vortexen gemischt und drei Minuten bei 16 060 g zentrifugiert (Mikro 200). Nach der Phasentrennung wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl Chloroform erneut extrahiert. Die wässrige Phase wurde nochmals in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit H₂O_{nf} auf 400 µl aufgefüllt und mit 72 µl 6 M Ammoniumacetat sowie 944 µl absolutem Ethanol präzipitiert. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur, erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation (Zentrifuge 5424 R) bei 20 °C und 15 871 g. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet zweimal mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und jeweils zehn Minuten bei 20 °C und 15 871 g zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand entfernt, das Pellet getrocknet, in H₂O_{nf} resuspendiert und die gelöste RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

RNA-Proben, die nicht aus *in-vitro*-Transkriptionen stammten, wurden alternativ durch die Zugabe von 0,1 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,2) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol und anschließenden Zentrifugationen bei 4 °C analog der oben beschriebenen Vorgehensweise präzipitiert und gereinigt.

2.4.5 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von RNA-Proben wurde mittels des *NanoDrop One* Spektralphotometers (Thermo Scientific) laut Herstellerangaben bestimmt.

2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Für ein denaturierendes Agarosegel wurden 1,5 g Agarose (Agarose *low EEO*, AppliChem) in 88 ml destilliertem, autoklaviertem Wasser durch Aufkochen gelöst, kurz abgekühlt und mit 10 ml 10× MOPS-Puffer [0,2 M MOPS; 50 mM NaOAc; 10 mM EDTA, pH 7,0 (NaOH)] sowie 2,7 ml 37 % Formaldehyd versetzt und die Lösung zum Abkühlen in eine Gelapparatur gegossen. RNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit einem Volumen 2× RNA-Ladepuffer [95 % (v/v) Formamid; 0,025 % (w/v) SDS; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau; 0,025 % (w/v) Xylencyanol; 0,025 % (w/v) Ethidiumbromid; 0,5 mM EDTA] versetzt und für fünf Minuten bei 75 °C erhitzt. Als Größenstandards dienten der *RiboRuler Low Range* sowie *RiboRuler High Range* RNA-Größenstandard (Thermo Scientific). Die Auftrennung erfolgte in MOPS-Puffer bei 120-130 V. Zur Analyse von Agarose-Gelen mittels Autoradiographie wurden diese auf Frischhaltefolie gelegt und unter je einer Lage DE81-

Chromatographie- und *Whatman*-Papier sowie mehreren Schichten Zellstoffpapier für mindestens drei Stunden vorgetrocknet und anschließend mittels Vakuum-Geltrockner für mindestens eine Stunde bei 60 °C getrocknet.

2.4.7 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von kleinen RNAs (siRNAs; 20-24 nt), die durch DCLs aus dsRNAs basierend auf genomischen Sequenzen von CMV prozessiert wurden, sowie von Spaltfragmenten aus den *Slicer*-Assays. Dazu wurden Gele mit 8 M Harnstoff und 5-15 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) in TBE [89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA] hergestellt. Durch die Zugabe von 0,08 % (w/v) APS und 0,17 % (v/v) TEMED wurde die Polymerisation gestartet und die Lösung zwischen zwei mit Agarose abgedichtete Glasplatten für vertikale Minigele gegossen. Die Proben wurden vor der Auftragung mit einem Volumen 2× RNA-Ladepuffer für Harnstoffgele [90 % (v/v) deionisiertes Formamid; 10 mM Tris/HCl pH 7,4; 2 mM EDTA; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 0,1 % (w/v) Xylencyanol] versetzt und für fünf Minuten bei 75 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in 0,5× TBE-Puffer bei 350 V. Anschließend wurden die Gele für mindestens 15 Minuten in 5 % Essigsäure inkubiert und daraufhin für mindestens eine Stunde bei 60 °C auf einem Vakuum-Geltrockner getrocknet. Bei 15 % Acrylamid-Gelen erfolgte vor der Trocknung zusätzlich eine 15-minütige Inkubation in einer Lösung bestehend aus 5 % Glycerol und 5 % Essigsäure.

2.4.8 Autoradiographie

Die Autoradiographie diente der Detektion mittels Gelelektrophorese aufgetrennter, radioaktiv markierter RNAs. Dazu wurden die getrockneten Gele auf einen *Storage Phosphor Screen* (GE Healthcare) aufgelegt. Die Exposition erfolgte über Nacht. Anschließend wurde der *Screen* mittels des *Typhoon Trio+ Phosphorimagers* (GE Healthcare) gescannt.

2.4.9 Isolation von Nukleinsäuren aus Pflanzenmaterial

Zur Detektion viraler RNAs nach Beendigung der Pflanzeninfektionsexperimente wurde mittels eines Korkbohrers Blattmaterial in Form von Blattscheiben entnommen, dieses in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial wurden ausschließlich RNase-freie Reaktionsgefäße und RNase-freies Wasser verwendet. Mörser und Pistill wurden in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Zunächst wurden ca. 100 mg des Blattmaterials im Mörser zerkleinert, mit 1 ml Trizol [0,8 M Guanidiniumthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 0,1 M NaOAc; 5 % (v/v) Glycerol; 38 % (v/v) Phenol, wassergesättigt, pH 4,5-5,0] versetzt und für fünf Minuten gründlich bei Raumtemperatur gemischt. Anschließend wurden die Proben mit 200 µl Chloroform versetzt und

erneut fünf Minuten gründlich bei Raumtemperatur gemischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (Zentrifuge 5424 R) für 15 min bei 15 871 g und 4 °C. Nach Überführung der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurden die Nukleinsäuren mit einem Volumen Isopropanol für 20 min bei Raumtemperatur präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in H₂O_{nf} resuspendiert.

2.4.10 DNase-Verdau von RNA

Der DNase-Verdau diente dem Abbau von *template*-DNA nach der *in-vitro*-Transkription oder dem Entfernen von DNA aus RNA-Isolationen, um nachfolgend eine cDNA-Synthese durchführen zu können. Dazu wurden 5 µg RNA mit 10 U DNase I *recombinant RNase-free* (Roche Diagnostics GmbH) für 30 min bei 37 °C in DNase-Puffer (Roche Diagnostics GmbH) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM EDTA und zehnmütige Inkubation bei 65 °C gestoppt.

2.4.11 Reverse Transkription

Mittels reverser Transkription (RT) wird RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase (hier: RevertAid Reverse Transkriptase, 200 U/µl, Thermo Scientific) in komplementäre DNA umgeschrieben. Die Methode wurde zum Nachweis viraler RNA aus Pflanzenmaterial angewendet. Zur Generierung von cDNA wurden 0,1-2 µg DNase-behandelte RNA und 20 pmol des *random hexamer* Primers (Thermo Scientific) auf ein Volumen von 13,25 µl mit H₂O_{nf} aufgefüllt, fünf Minuten bei 70 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden pro Reaktion 6,75 µl des in Tabelle 9 dargestellten Mastermixes zugegeben und der Reaktionsansatz für eine Stunde bei 42 °C und zehn Minuten bei 70 °C inkubiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C. Als Negativkontrolle diente eine Probe, in der die Reverse Transkriptase durch H₂O_{nf} ersetzt wurde (-RT).

Tabelle 9 Mastermix für die reverse Transkription von RNA

Komponente	Volumen
5× RT-Puffer	4 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2 µl
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,25 µl
RevertAid Reverse Transkriptase (200 U/µl)	0,5 µl

2.4.12 Generierung doppelsträngiger RNAs

Zur Generierung von siRNA-Duplexen wurden jeweils 20 μM der beiden Einzelstränge in *annealing*-Puffer [30 mM HEPES/KOH, pH 7,4; 100 mM KOAc; 2 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$] für eine Minute bei 90 °C erhitzt und anschließend für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Hybridisierung längerer RNA-Moleküle erfolgte in STE-Puffer [10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA] durch zweiminütiges Denaturieren bei 94 °C und anschließendes Abkühlen auf 25 °C im Heizblock. Im Anschluss wurde die doppelsträngige RNA mittels 3 M NaOAc (pH 5,2) und Ethanol gefällt, zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und in $\text{H}_2\text{O}_{\text{nf}}$ resuspendiert. Die Lagerung der gelösten RNAs erfolgte bei -80 °C.

2.4.13 RNase A/T1-Verdau

Der RNase A/T1-Verdau wurde durchgeführt, um einzelsträngige RNAs aus RNA-Präparationen zu entfernen bzw. um gezielt doppelsträngige RNA nachzuweisen. Dafür wurden 8-20 μg RNA mit 350 μl RNase-Puffer [10 mM Tris, pH 7,5; 1 M NaCl; 5 mM EDTA] 5 U RNase T1 und 3,5 μg RNase A gemischt und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Unter diesen Hochsalz-Bedingungen kann selektiv einzelsträngige RNA verdaut werden. Bei niedrigeren Salzkonzentrationen von < 100 mM NaCl spaltet RNase A laut Herstellerangaben neben Einzelstrang-RNA auch Doppelstrang-RNA sowie den RNA-Strang in RNA-DNA-Hybriden. Anschließend wurde ein Proteinase K-Verdau durchgeführt (50 μg Proteinase K, 20 μl 10 % (w/v) SDS-Lösung; 60 min, 37 °C), die doppelsträngige RNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert und mittels Ethanol-Fällung präzipitiert (s. Abschnitt 2.4.4).

2.4.14 Silberfärbung von Nukleinsäuren nach Blum *et al.* (1987)

Alle Schritte der Silberfärbung erfolgten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (Standard Orbital Shaker). Zunächst wurde das Polyacrylamid-Gel in einer Lösung bestehend aus 50 % (v/v) MeOH, 12 % (v/v) AcOH und 0,0185 % (v/v) CH_2O für mindestens eine Stunde fixiert. Nachfolgend wurde es dreimal für je 20 min in 50 % (v/v) EtOH gewaschen. Nach Vorbehandlung mit einer Lösung bestehend aus 0,02 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ wurde das Gel dreimal für 20 s mit Wasser gespült und mit einer Lösung bestehend aus 0,2 % (w/v) AgNO_3 und 0,028 % (v/v) CH_2O imprägniert. Nach zweimaligem Abspülen mit Wasser für je 20 s erfolgte die Entwicklung in einer Lösung bestehend aus 6 % (w/v) Na_2CO_3 , 0,0185 % (v/v) CH_2O und 0,0004 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ für zehn Minuten. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit Wasser für je zwei Minuten wurde die Färbungsreaktion durch eine zehnmünütige Inkubation in einer Lösung aus 50 % (v/v) MeOH und 12 % (v/v) AcOH gestoppt. Abschließend wurde das Gel für mindestens 20 min in 50 % (v/v) MeOH gewaschen. Für eine Trocknung des Gels mittels Vakuum-Geltrockner (*Unigeldryer* 3545 D) wurde das gefärbte Gel zuvor für 30 min in 30 % (v/v) MeOH-Lösung sowie für 30 min in 3 % (v/v) Glycerol-Lösung bei jeweils 4 °C unter Schütteln inkubiert.

Der Ablauf der Silberfärbung ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10 Ablauf der Silberfärbung von Nukleinsäuren in Polyacrylamid-Gelen nach Blum *et al.* [97]

Schritt	Lösung	Zeit ¹⁾
1 Fixierung	50 % (v/v) MeOH; 12 % (v/v) AcOH; 0,0185 % (v/v) CH ₂ O	min. 1 h
2 Waschen	50 % (v/v) EtOH	3 x 20 min
3 Vorbehandlung	0,02 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ * 5 H ₂ O	1 min ²⁾
4 Spülen	H ₂ O	3 x 20 s ²⁾
5 Imprägnieren	0,2 % (w/v) AgNO ₃ ; 0,028 % (v/v) CH ₂ O	20 min
6 Spülen	H ₂ O	2 x 20 s ²⁾
7 Entwickeln	6 % (w/v) Na ₂ CO ₃ ; 0,0185 % (v/v) CH ₂ O; 0,0004 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ * 5 H ₂ O	10 min
8 Waschen	H ₂ O	2 x 2 min
9 Abstoppen	50 % (v/v) MeOH, 12 % (v/v) AcOH	10 min
10 Waschen	50 % (v/v) MeOH	min. 20 min ³⁾
Vorbereitung der Trocknung	30 % (v/v) MeOH	30 min
Vorbereitung der Trocknung	3 % (v/v) Glycerol	30 min

¹⁾ Die Schritte 1 bis 10 wurden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur (20-25 °C) durchgeführt.

²⁾ Die angegebenen Zeiten sollten exakt eingehalten werden, um ein reproduzierbares Ergebnis zu erzielen.

³⁾ Nach Schritt 10 wurde das Gel für die Trocknung vorbereitet. Die folgenden Inkubationsschritte wurden bei 4 °C auf einem Schüttler durchgeführt.

2.4.15 RNA-Sequenzierung (*next generation sequencing*)

Das sogenannte *next generation sequencing* ist eine Technologie, durch deren Hilfe z. B. RNAs sehr schnell und mit hohem Durchsatz sequenziert werden können. Dafür wird zunächst RNA isoliert und mittels denaturierender PAGE eine Größenauftrennung erzielt. Die Fraktion der kleinen RNAs wird dann ausgewählt und es werden Adapter an die 5'- und 3'-Enden der RNAs ligiert. Nach reverser Transkription und Amplifikation der Sequenzen werden diese über komplementäre Sequenzen auf einer Durchflusszelle gebunden, auf der die Sequenzierung (*sequencing by synthesis*) mittels Detektion fluoreszenzmarkierter Nukleotide erfolgt (s. Illumina.com). Die Sequenzierung der siRNAs aus DCL-Assay und AGO-Immunpräzipitation erfolgte durch die *Core Unit* DNA-Technologien des IZKF Leipzig von PD Dr. Knut Krohn (Fakultät für Medizin, Universität Leipzig).

Die bioinformatische Auswertung der Daten wurde von Claus Weinholdt sowie Dr. Jan Grau (Institut für Informatik, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt. Für die RNA-Sequenzierung mittels *NEXTflex Small RNA-seq Kit v3* (Perkin Elmer) wurden 10-50 ng Gesamt-RNA eingesetzt.

Die Sequenzierung erfolgte laut Herstellerangaben unter Verwendung des *Illumina NextSeq 550* Systems. *Demultiplexing* der *reads*, *adapter trimming* und *quality filtering* wurde analog zu Stokowy *et al.* [98] vorgenommen, wobei die Adaptersequenzen des *NEXTflex Kits* verwendet wurden.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 AGO-Immunpräzipitation

Die AGO-Immunpräzipitation (AGO-IP) diente in einer systematischen Herangehensweise in Kombination mit dem DCL-Assay der Identifizierung von effizienten siRNAs aus genomischen CMV-RNAs. Im Rahmen der AGO-IP wurden FLAG-AGO-Proteine samt gebundener siRNAs mittels einer Anti-FLAG-Affinitätsmatrix präzipitiert und die gebundenen siRNAs extrahiert. Dafür wurden Translationsansätze bestehend aus den in Tabelle 11 genannten Komponenten hergestellt und für die anschließende Inkubation bei 25 °C für zwei Stunden auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt.

Tabelle 11 Komponenten der *in-vitro*-Translation für die anschließende AGO-Immunpräzipitation

Komponente	
BYL (MN-behandelt)	50 µl
Kreatinphosphatkinase (10 mg/ml)	2 µl
10× TM-Puffer	10 µl
4× TR-Puffer	10 µl
FLAG-AGO-mRNA	5 µg
dsRNA	2,5 µg
H ₂ O _{mf}	ad 100 µl

Parallel zur Translationsreaktion erfolgte die Vorbereitung der Agarose-*beads* des Anti-FLAG M2 *affinity gel* Systems (Sigma-Aldrich). Pro 100 µl Reaktionsansatz wurden 20 µl der Agarose-*bead*-Suspension verwendet. Diese wurde nach Zentrifugation (Zentrifuge 5424 R) für eine Minute bei 5 000 g und 20 °C und Entfernen des Überstandes zweimal mit je 200 µl IP150-Puffer [20 mM Hepes/KOH pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,5 % (v/v) NP-40; 1 mM DTT] gewaschen und anschließend in 100 µl IP150-Puffer resuspendiert. Nach Abschluss der Translationsreaktionen wurde der Inhalt der zwei Reaktionsgefäße vereinigt und eine Probe für *Western-blotting*-Analysen entnommen (5 µl). Das übrige Volumen der Translationsansätze wurde zu den 100 µl der resuspendierten *bead*-Suspension gegeben und über Nacht auf einem Rotations-Labormischer (F205) bei 4 °C drehend inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für eine Minute bei 5 000 g und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge 5424 R) und dreimal mit je 500 µl IP150-Puffer, einmal mit 500 µl IP300-Puffer [20 mM Hepes/KOH pH 7,6; 300 mM NaCl; 0,5 % (v/v) NP-40; 1 mM DTT] und erneut einmal mit 500 µl IP150-

Puffer gewaschen und daraufhin in 1,5 ml DNA LoBind-Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 5 000 g und 4 °C wurde der Überstand entfernt und die pelletierten *beads* in 60 µl IP150-Puffer aufgenommen. Von dieser Suspension wurden zwei Proben zu je 5 µl für *Western-blotting*- sowie Silberfärbungsanalysen abgenommen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 3 µl 10 % SDS-Lösung sowie 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) und eine Inkubation für 30 min bei 37 °C. Die Reaktionsansätze wurden mit H₂O_{nf} auf 120 µl aufgefüllt und mit 120 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Nach Zentrifugation für zehn Minuten bei 16 060 g und Raumtemperatur wurden die wässrigen Phasen in neue 1,5 ml DNA LoBind-Reaktionsgefäße überführt, erneut mit H₂O_{nf} auf 120 µl aufgefüllt und mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Erneut wurde die wässrige Phase in ein neues 1,5 ml DNA LoBind-Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 20 µg Glykogen, 0,1 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,2) und 2,9 Volumen Ethanol sowie Inkubation für mindestens eine Stunde bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 15 871 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet für ca. zehn Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl H₂O_{nf} resuspendiert. Da für jedes AGO-Protein (FLAG-AGO1, FLAG-AGO2) sowie für eine Kontrolle ohne Zugabe von FLAG-AGO-mRNA drei Translationsreaktionen in verschiedenen BYL-Präparationen durchgeführt worden sind, wurden abschließend die drei Proben für jedes AGO-Protein bzw. der Kontrolle vereinigt und erneut durch Zugabe von 20 µg Glykogen, 0,1 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,2) und 2,9 Volumen Ethanol sowie Inkubation für mindestens eine Stunde bei -20 °C gefällt und das Pellet erneut mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach abschließender Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und in 20 µl H₂O_{nf} gelöst.

2.5.2 Diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE nach Lämmli wurde zur Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht angewendet. Tabelle 12 beinhaltet die Komponenten zur Herstellung zweier denaturierender, diskontinuierlicher Gele bestehend aus einem 4 % Sammel- und einem 10 % Trenngel. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 4× SDS-Probenpuffer [20 mM Tris/HCl; 12 % (w/v) SDS; 40 % (v/v) Glycerol; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol] versetzt und fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Proben sowie 3 µl eines Größenstandards (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, 10-180 kDa, Thermo Scientific) wurden bei 20-25 mA aufgetrennt. Als Laufpuffer diente Lämmli-Puffer [25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS].

Tabelle 12 Komponenten zur Herstellung zweier SDS-Gele

4 % Sammelgel		10 % Trenngel	
Wasser	7,23 ml	Wasser	12,49 ml
4× Sammelgelpuffer [0,25 M Tris/HCl pH 6,8; 0,2 % (w/v) SDS]	3 ml	4× Trenngelpuffer [1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS]	7,5 ml
30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid	1,65 ml	30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid	10 ml
Temed	15 µl	Temed	30 µl
10 % APS	112,5 µl	10 % APS	150 µl

2.5.3 Western blotting

Das Western blotting wurde im Rahmen dieser Arbeit zum qualitativen Nachweis der FLAG-AGO-Proteine nach *in-vitro*-Translation bzw. nach AGO-IP verwendet. Zunächst wurden *Whatman*-Papier und Nitrocellulose-Membran (LI-COR Biosciences) für zwei Minuten in Transferpuffer [48 mM Tris; 39 mM Glycin; 1,3 mM SDS, 20 % (v/v) MeOH] äquilibriert. Daraufhin wurden die Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel mittels *semi-dry*-Verfahren bei 12 V für 1,5 h auf die Nitrocellulose-Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in *blocking solution* [TBST [50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween 20]; 7,5 % (w/v) Sucofin Milchpulver; 0,02 % NaN₃] inkubiert. Anschließend wurde die Membran in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit dem primären Antikörper (Anti-FLAG M2 aus Maus, Stratagene, 1:5 000 in *blocking solution* bzw. Anti-FLAG aus Kaninchen, Sigma-Aldrich, 1:1 000 in *blocking solution*) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Membran zweimal für je 15 Minuten mit TBST und einmal für 15 Minuten mit TBS [50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; pH 7,5] gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper (IRDye 800CW Anti-*mouse* bzw. Anti-*rabbit*, LI-COR, 1:10 000 in *blocking solution*) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Membran wurde erneut zweimal mit TBST und einmal mit TBS für je 15 Minuten gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels LI-COR ODYSSEY CLx (LI-COR) und die Auswertung mit Hilfe der Software *Image Studio* Version 5.2.5 (LI-COR).

III. ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit baut auf früheren Erkenntnissen auf, die durch eine systematische Herangehensweise in einem etablierten *in-vitro*-System, dem BYL (Lysat entvakuolisierter *Nicotiana tabacum*-Protoplasten), generiert wurden. Es wurden unter Nutzung des BYL-Systems virale siRNAs gegen das *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) identifiziert. Deren antiviraler Effekt im Zusammenhang mit einer TBSV-Infektion konnte anschließend *in planta* mit Hilfe der Modellpflanze *Nicotiana benthamiana* verifiziert werden [43]. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die zuvor mit TBSV etablierte Methode des *esiRNA-screenings* auf CMV als deutlich variables Virus mit segmentiertem Genom anzuwenden. Dabei sollten vsiRNAs identifiziert werden, die einen spezifischen und effizienten Schutz von *N. benthamiana* vor einer CMV-Infektion vermitteln.

3.1 Etablierung experimenteller Rahmenbedingungen im Umgang mit CMV

3.1.1 Synthese genomischer CMV-RNAs

Die für die Etablierung des CMV-Infektionsmodells, aber auch als Substrate für die *in-vitro*-Assays, benötigten CMV-RNAs wurden auf Grundlage von cDNA-Klonen generiert. Die cDNA-Klone der drei genomischen CMV-RNAs wurden freundlicherweise durch Prof. Fernando García-Arenal Rodríguez (Universidad Politécnica de Madrid) und Prof. John Carr (University of Cambridge) zur Verfügung gestellt. Die Plasmide codieren für die vollständigen Sequenzen der genomischen RNAs 1, 2 und 3 des CMV-Stammes Fny *downstream* des Promotors der T7-RNA-Polymerase (T7-RNAP) [99]. Die Transkription der genomischen RNAs erfolgte *in vitro* von PCR-generierten *templates* (s. Abbildung 6). Die *templates* der CMV-Plusstrang-RNAs beinhalten am 5'-Ende die Sequenz des Promotors für die T7-RNA-Polymerase. Diesem Promoter folgt unmittelbar das 5'-Ende der jeweiligen CMV-RNA. Die 3'-Enden der *templates* sind definiert und entsprechen dem authentischen 3'-Ende der jeweiligen CMV-RNA (3'-A). Plusstrang-RNAs, die auf Basis dieser *templates* generiert wurden, dienen zur Inokulation von Pflanzen im Rahmen von Infektionsexperimenten. Zur Identifizierung effizienter CMV-siRNAs sollten auch CMV-dsRNAs generiert werden. Dazu wurden alternative CMV-Plusstrang-RNAs transkribiert, die statt des originären 3'-A ein 3'-C besitzen. Dies ist notwendig, um die vollständige Komplementarität der CMV-dsRNAs zu gewährleisten, da die Transkription der Minusstrang-RNAs zur Verbesserung der Transkriptionseffizienz mit 5'-G startet. Die *templates* für die jeweiligen CMV-Minusstrang-RNAs beinhalten an ihren 5'-Enden ebenfalls eine Promotersequenz für die T7-RNA-Polymerase und ein definiertes 3'-Ende, welches komplementär zum 5'-Ende der jeweiligen Plusstrang-RNA ist.

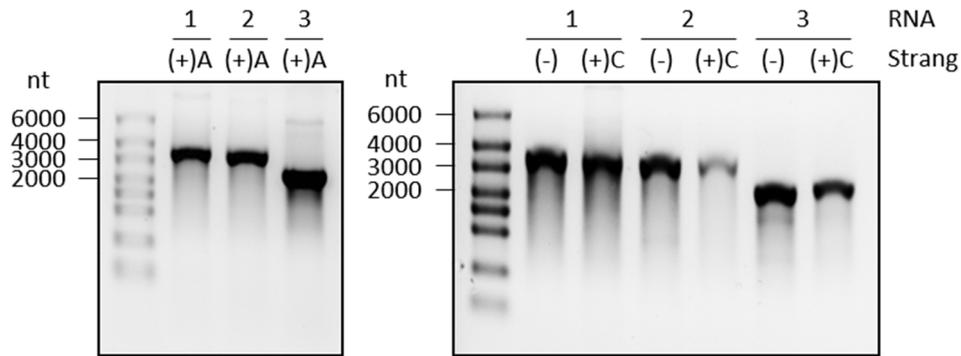


Abbildung 6 Agarose-Gelelektrophorese der CMV-RNAs. Dargestellt sind die genomischen CMV-RNAs 1, 2 und 3 in Form der Plus- und Minusstränge nach *in-vitro*-Transkription. Es wurden zwei Varianten des Plusstranges generiert, die sich ausschließlich durch das jeweilige 3'-terminale Nukleotid unterscheiden. Die Variante mit 3'-terminalem A (linke Abbildung) entspricht dem authentischen CMV-Plusstrang und wurde für die mechanische Inokulation von Pflanzen verwendet. Die modifizierte Variante mit 3'-C (rechte Abbildung) wurde erzeugt, um vollständige Komplementarität beim *annealing* der Plus- und Minusstrang-RNAs für deren Verwendung in *in-vitro*-Assays zu gewährleisten.

3.1.2 Etablierung von CMV-Infektionsexperimenten in *Nicotiana benthamiana*

Die *in vitro* hergestellten Transkripte wurden zunächst in Vorversuchen auf ihre Infektiosität in *N. benthamiana* getestet. Dazu wurden vier bis fünf Wochen alte Pflanzen mit jeweils äquimolaren Mengen der drei genomischen RNAs (1-500 fmol) mechanisch inokuliert. Anhand des Auftretens charakteristischer, optisch sichtbarer Symptome einer CMV-Infektion wie eingerollte Blätter und ein gehemmtes Wachstum wurden Aussagen über das Vorliegen einer Infektion getroffen und die Pflanzen als „asymptomatisch“ bzw. „symptomatisch“ definiert (s. Abbildung 7).

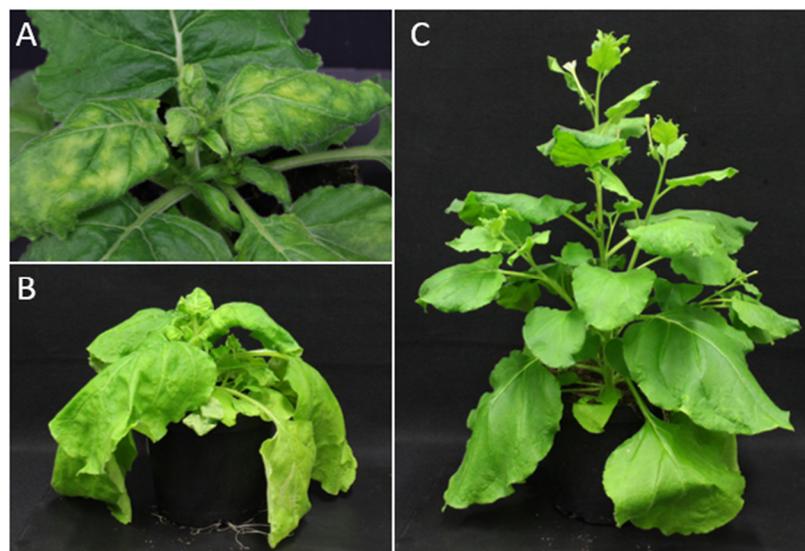


Abbildung 7 Beispiele symptomatischer und asymptomatischer *N. benthamiana*-Pflanzen. (A,B) Gezeigt sind die charakteristischen Symptome wie eingerollte Blätter mit gelben, mosaikartigen Verfärbungen sowie das verminderte Wachstum infolge einer CMV-Infektion (Fny). (C) Normal entwickelte, symptomfreie *N. benthamiana*-Pflanze (ca. 9 Wochen alt).

Es konnte gezeigt werden, dass eine minimale Stoffmenge von jeweils 20 fmol der drei genomischen RNAs pro Pflanze ausreichend für eine zuverlässige Infektion von 100 % der Pflanzen ist (s. Abbildung 8). Die auf diese Weise ermittelten experimentellen Bedingungen ermöglichten eine gezielte und reproduzierbare Infektion der CMV-Wirtspflanzen und bildeten die Basis für Untersuchungen zum Effekt einzelner siRNAs auf den Ausgang der CMV-Infektion *in planta*.

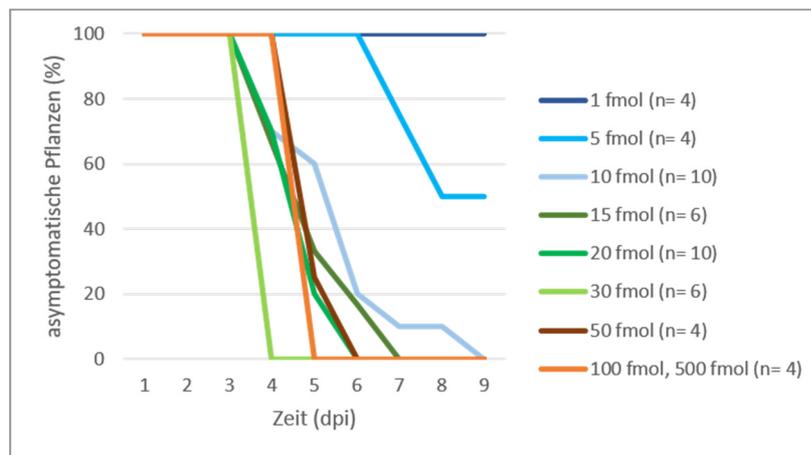


Abbildung 8 Ermittlung der minimalen CMV-RNA-Menge für eine zuverlässige Infektion von *N. benthamiana*. Vier bis fünf Wochen alte Pflanzen wurden mit jeweils 1-500 fmol der drei genomischen CMV-RNAs mechanisch inokuliert und das Auftreten CMV-charakteristischer Symptome visuell überprüft (dpi = *days post inoculation*). Mit jeweils 20 fmol der drei genomischen RNAs pro Pflanze konnte eine zuverlässige Infektion von 100 % der Pflanzen erzielt werden.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung effizienter siRNAs gegen CMV

Nachdem das *challenge*-Modell für CMV etabliert werden konnte, sollten mittels *Dicer*-Assays und AGO-Immünpräzipitationen (AGO-IP) virale siRNAs identifiziert und charakterisiert werden, die zu einer effizienten endonukleolytischen Hydrolyse (Spaltung) des CMV-Genoms führen und somit das Potential besitzen, *in planta* vor einer CMV-Infektion zu schützen. Für die entsprechenden Untersuchungen wurden aus Zeit- und Kostengründen nicht alle drei genomischen CMV-RNAs herangezogen. RNA 2 wurde als primäres *target* ausgewählt. Sie codiert zum einen für eine Untereinheit der viralen Replikase (2a) und zum anderen für den viralen Suppressor des RNA-*silencing* 2b, der von der subgenomischen RNA 4A translatiert wird. Es wurde angenommen, dass beide Transkripte (RNAs 2 und 4A) aufgrund der hohen Bedeutung der translatierten Proteine für die virale Replikation als auch für die Inhibition des RNA-*silencing*-Mechanismus geeignete *targets* für RNAi darstellen könnten. Als weiteres *target* wurde RNA 3 ausgewählt, da von RNA 3 die Translation des *movement*-Proteins erfolgt. Des Weiteren codiert RNA 3 auch für das von sgRNA 4 translatierte Kapsid-Protein. Beide Proteine haben wichtige Funktionen in der Verbreitung des Virus und stellen somit ebenfalls potentiell effektive RNAi-*targets* dar. Zusätzlich könnte sowohl für RNA 2 als auch für RNA 3

im Falle der Identifizierung von siRNAs in den entsprechenden genomischen Bereichen nicht nur die genomische, sondern *in vivo* auch die daraus transkribierte subgenomische RNA mit einer einzigen siRNA für das RNA-*silencing* anvisiert werden. RNA 1 codiert ebenfalls für eine Untereinheit des viralen Replikasekomplexes. Da eine andere Untereinheit des Replikasekomplexes (2a) aber bestenfalls bereits durch gegen RNA 2 gerichtete siRNAs abgedeckt werden könnte, spielte RNA 1 keine weitere Rolle in den folgenden Experimenten.

3.2.1 DCL-vermittelte Generierung von vsiRNAs des CMV

Zunächst wurden die vollständigen genomischen Plusstrang-RNAs sowie die komplementären Minusstrang-RNAs *in vitro* transkribiert und anschließend hybridisiert, da DCL-Proteine dsRNA-spezifische Endoribonukleasen sind [26, 32]. Die doppelsträngigen RNAs, im Folgenden als CMV-dsRNAs 2 und 3 bezeichnet, wurden daraufhin als Substrat in den DCL-Assay (s. Abschnitt 2.2.2.5) eingesetzt. Durch die endogene DCL-Aktivität des BYLs können aus den doppelsträngigen RNAs siRNAs prozessiert und diese anschließend extrahiert und mittels *next generation sequencing* (NGS) analysiert werden [43, 98]. Der schematische Ablauf des DCL-Assays ist in Abbildung 9A gezeigt. Bevor mit der Generierung der Proben für die NGS-Analyse begonnen wurde, sollte zunächst die endogene DCL-Aktivität des BYLs überprüft werden. Dafür wurden die jeweiligen, mit einem radioaktiven Isotop (^{32}P) markierten CMV-dsRNAs in das BYL gegeben und die darin prozessierten sRNAs mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Autoradiographie detektiert (s. Abbildung 9B).

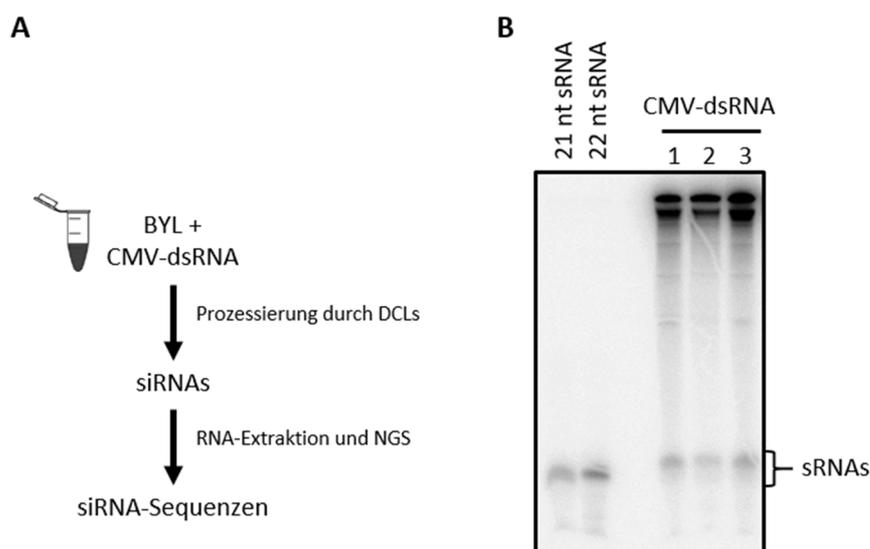


Abbildung 9 DCL-Assay mit genomischen CMV-dsRNAs. (A) Schematische Darstellung des DCL-Assays zur Generierung von siRNA-Pools für NGS-Analysen. Jeweils eine CMV-dsRNA (dsRNA 2 bzw. dsRNA 3) wurde im BYL durch endogene DCL-Proteine prozessiert. Anschließend wurde RNA extrahiert und die generierten siRNA-Sequenzen mittels *Illumina next generation sequencing* analysiert. (B) Die radioaktiv markierten dsRNAs der CMV-RNAs 1, 2 und 3 wurden im BYL durch DCLs prozessiert und die so generierten sRNAs mittels PAGE und Autoradiographie visualisiert.

Es wurden aus allen drei genomischen CMV-dsRNAs kleine RNAs mit einer Länge von 21 nt bis 24 nt generiert, wobei 24 nt lange siRNAs die dominante Spezies darstellten (vgl. mit 21 nt und 22 nt sRNA-Markern, Abbildung 9B). Dies deutet darauf hin, dass vor allem DCL3, das für die Prozessierung von dsRNA in 24 nt lange siRNAs verantwortlich ist, im BYL in größeren Mengen vorliegt bzw. besonders aktiv ist. Nachdem frühere Ergebnisse mit TBSV-dsRNAs nun auch mit CMV-dsRNAs bestätigt wurden, nämlich dass verschiedene DCLs im BYL aktiv sind und somit die Prozessierung der dsRNAs in siRNAs gegeben ist, wurde der DCL-Assay ohne den Einsatz radioaktiver Isotope mit den CMV-dsRNAs 2 und 3 analog des Schemas in Abbildung 9A wiederholt und die generierten siRNAs mittels NGS sequenziert [43]. Die Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Experimenten. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte durch Claus Weinholdt sowie Dr. Jan Grau (Institut für Informatik, MLU Halle-Wittenberg). Im BYL wurden aus den CMV-dsRNAs 2 und 3, neben sRNAs anderer Längen (z. B. 24 nt), die für die antivirale Immunantwort in Pflanzen bedeutenden siRNAs einer Länge von 21 nt und 22 nt generiert (s. Abbildung 10A und D).

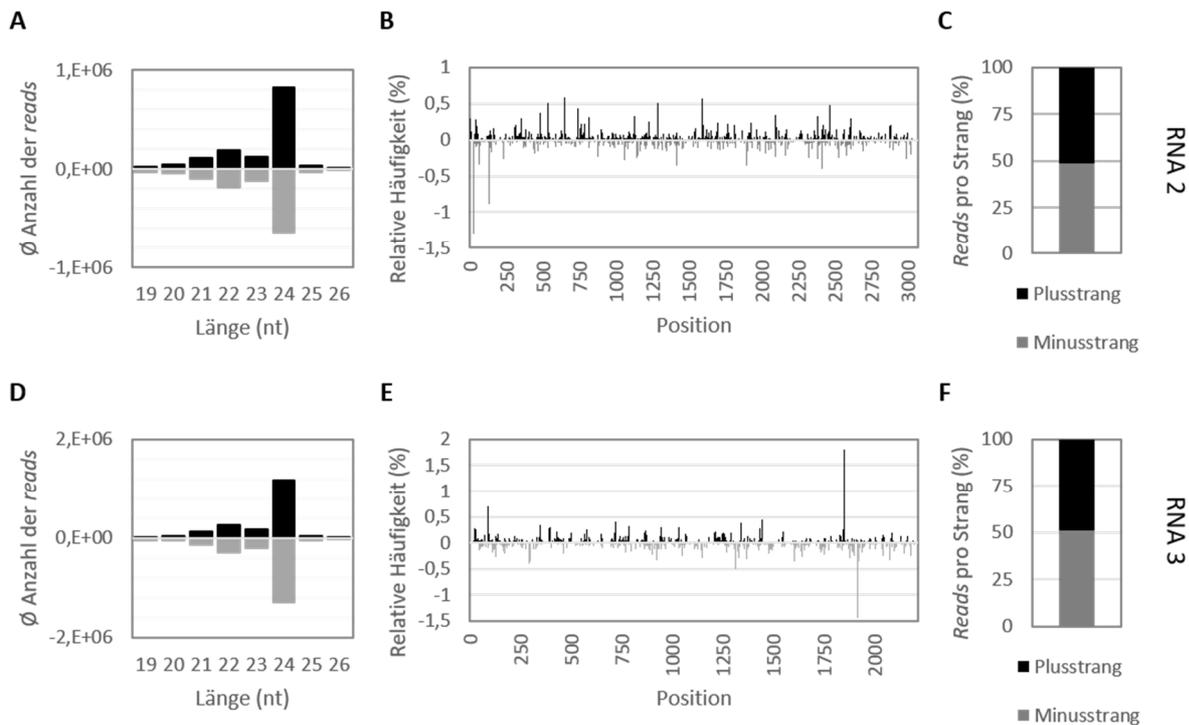


Abbildung 10 NGS-Analyse kleiner RNAs aus dem DCL-Assay mit CMV-dsRNAs 2 bzw. 3. Die CMV-dsRNAs wurden im BYL durch DCLs prozessiert, Gesamt-RNA isoliert und die Fraktion der kleinen RNAs mittels NGS analysiert. Die Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Experimenten. **(A,D)** Anzahl der *reads* für einzelne siRNA-Größen. Balken oberhalb der x-Achse repräsentieren *reads*, die von der viralen Plusstrang-RNA stammen. Balken unterhalb der x-Achse sind als Beträge zu verstehen und repräsentieren *reads*, die aus der viralen Minusstrang-RNA generiert wurden. **(B,E)** Prozentuale relative Häufigkeit der 21 nt-*reads* an spezifischen Positionen der genomischen RNAs 2 bzw. 3. Die *peaks* entsprechen der Position des 5'-Nukleotids der jeweiligen siRNA-Stränge. Werte oberhalb der x-Achse repräsentieren *reads*, die von der viralen Plusstrang-RNA stammen. Werte unterhalb der x-Achse sind als Beträge zu verstehen und repräsentieren *reads*, die aus der viralen Minusstrang-RNA generiert wurden. **(C,F)** Prozentualer Anteil der 21 nt langen Plus- und Minusstrang-*reads*.

In Analogie zu dem zuvor gezeigten Assay unter Verwendung radioaktiv markierter dsRNAs (vgl. Abbildung 9) waren auch hier in beiden Fällen 24 nt lange siRNAs die dominante Spezies. Somit konnte auch mittels NGS in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen gezeigt werden, dass DCL3 (24 nt siRNAs), DCL4 (21 nt siRNAs) und DCL2 (22 nt siRNAs) im BYL aktiv sind [43, 44]. Da im Rahmen dieser Arbeit vor allem 21 nt siRNAs von Bedeutung sind, wurde die durchschnittliche Häufigkeit, mit der eine 21 nt lange siRNA an einer bestimmten Position aus der genomischen RNA 2 bzw. RNA 3 durch DCL4 prozessiert wurde, näher analysiert (s. Abbildung 10B und E). Es ist ersichtlich, dass die Prozessierung der 21 nt langen siRNAs über die komplette Länge der genomischen RNAs stattfand. Des Weiteren wurden Plus- und Minusstrang-*reads* nahezu gleich häufig detektiert (vgl. Abbildung 10C und F). An einigen Positionen entlang der genomischen RNAs war die Häufigkeit der dort generierten siRNAs besonders hoch. Dies spricht dafür, dass DCL4 die dsRNAs an diesen Positionen bevorzugt prozessiert (vgl. z. B. RNA 2 5'-Terminus sowie RNA 3 zwischen Nukleotiden 1 800-1 900), was eine Präferenz für bestimmte Sequenzen nahelegt. Dies stimmt mit bereits publizierten Daten überein [43, 100]. Die mittels NGS identifizierten siRNA-Pools, die aus den doppelsträngigen, genomischen RNAs 2 und 3 generiert wurden, bildeten die Basis für die darauf aufbauende Identifizierung von siRNAs mit hoher Affinität zu AGO1 und AGO2.

3.2.2 Identifizierung AGO-gebundener vsiRNAs

Im zuvor beschriebenen DCL-Assay wurden vsiRNAs identifiziert, die aus den vollständigen CMV-dsRNAs 2 und 3 durch endogene DCLs im BYL prozessiert wurden. Im darauf folgenden Schritt sollten jene vsiRNAs identifiziert werden, die bevorzugt von AGO-Proteinen gebunden werden. Dafür wurden AGO1- bzw. AGO2-mRNAs, die N-terminal die codierende Sequenz für einen FLAG-*tag* besitzen, *in vitro* translatiert. Die Synthese der FLAG-AGO-Proteine erfolgte in Gegenwart der CMV-dsRNAs 2 bzw. 3. Somit konnte der FLAG-AGO/RISC mit den *in vitro* generierten vsiRNAs programmiert werden. Anschließend wurden die FLAG-AGO/RISCs samt gebundener vsiRNAs mittels einer Anti-FLAG-Affinitätsmatrix isoliert (s. Abschnitt 2.5.1), die RISC-assoziierten vsiRNAs gereinigt und daraufhin mittels NGS (s. Abschnitt 2.4.15) sequenziert. Die Durchführung der AGO-Immunpräzipitation ist in Abbildung 11A veranschaulicht.

Bevor die auf diese Weise generierten Proben einer NGS-Analyse unterzogen wurden, ist die *in vitro*-Translation der FLAG-AGO-Proteine mittels *Western-blotting* überprüft worden. Ebenso wurden Silberfärbungen von Polyacrylamid-Gelen durchgeführt, um die Prozessierung kleiner RNAs aus den CMV-dsRNAs und deren Immunpräzipitation zu beurteilen. Die Synthese der FLAG-AGO-Proteine war erfolgreich (vgl. Abbildung 11C). Auch nach der Isolation der RISCs mittels Anti-FLAG-Affinitätsmatrix konnte FLAG-AGO-Protein detektiert werden (vgl. Abbildung 11D).

Das Vorhandensein kleiner RNAs nach AGO-Immunpräzipitation ist in Abbildung 11B veranschaulicht. Neben größeren RNAs sind verglichen mit der Kontrolle (ohne FLAG-AGO) auch RNA-Banden auf Höhe von 21-24 nt zu erkennen (vgl. mit siRNAs der Spuren 1-3 in Abbildung 11B).

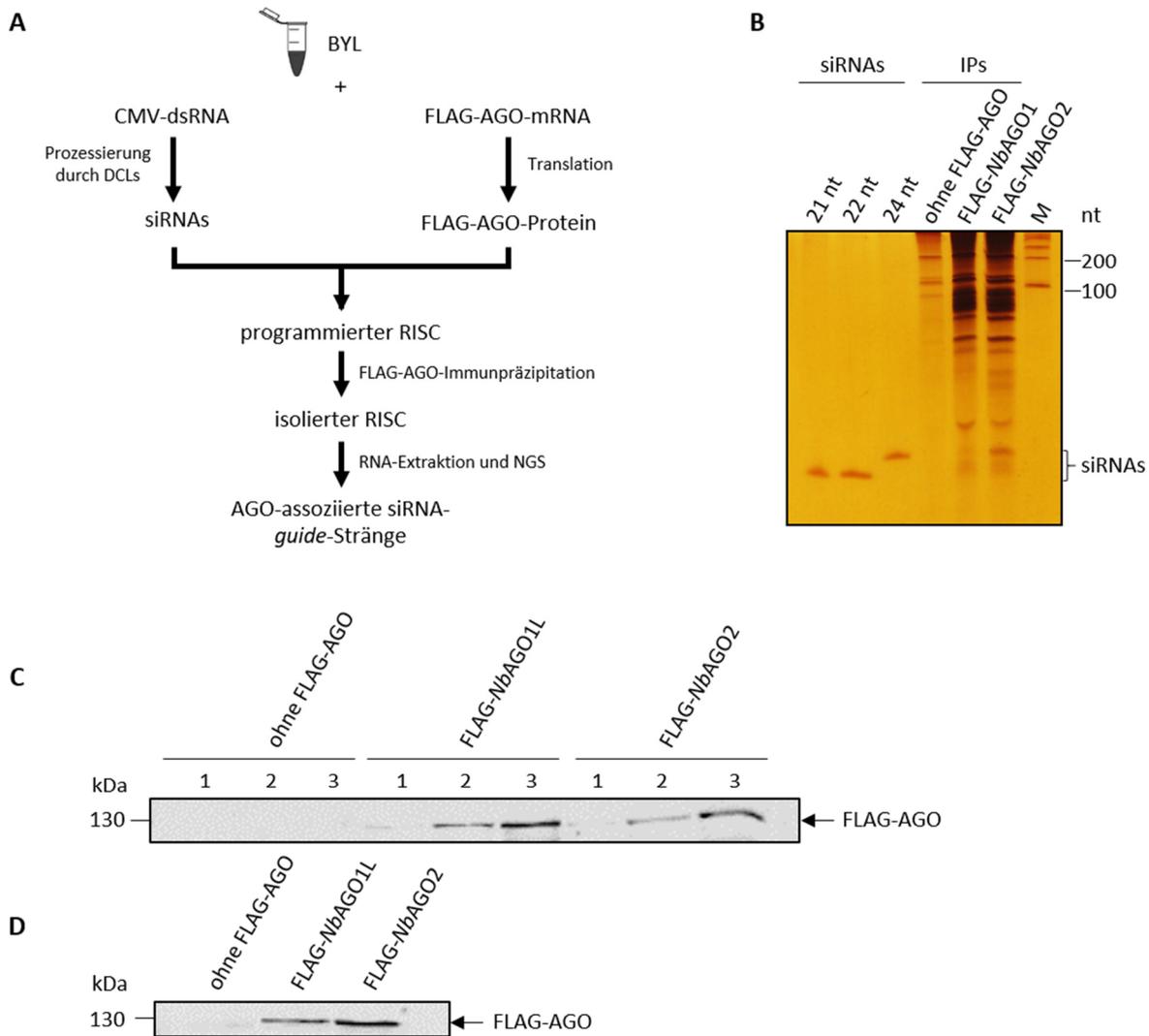


Abbildung 11 Isolierung AGO-gebundener vsRNAs. (A) Schematische Darstellung der FLAG-AGO-Immunpräzipitation zur Identifizierung AGO-gebundener vsRNAs. FLAG-AGO-mRNA wurde im BYL translatiert und mit vsRNAs beladen, die *in vitro* aus den genomischen CMV-RNAs 2 und 3 generiert wurden. Anschließend erfolgte die Präzipitation mittels einer Anti-FLAG-Affinitätsmatrix. Nach RNA-Isolation wurden die Sequenzen der siRNA-guide-Stränge mittels NGS analysiert. (B) Silberfärbung der FLAG-AGO-gebundenen RNAs. Zum Vergleich wurden synthetische, einzelsträngige siRNAs einer Länge von 21 nt, 22 nt und 24 nt aufgetragen. M = RNA-Marker (*RiboRuler Low Range RNA Ladder*, Thermo Scientific). (C,D) Western-Blot von Proben, die im Verlauf der FLAG-AGO-Immunpräzipitation entnommen wurden. Die Probenahme erfolgte direkt nach der *in-vitro*-Translation in drei verschiedenen BY2-Lysaten (1-3) (C) und nach mehreren stringenten Waschschritten der Anti-FLAG-Affinitätsmatrix samt assoziierter AGO-Proteine der drei vereinigten Translationsansätze (D).

Nachdem sowohl die FLAG-AGO-Translation als auch die Generierung von siRNAs überprüft wurde, erfolgte die Sequenzierung der Proben durch die *Core Facility* für Sequenzierung des IZKF Leipzig (Fakultät für Medizin, Universität Leipzig). Die bioinformatische Auswertung erfolgte durch Claus Weinholdt und Dr. Jan Grau (Institut für Informatik, MLU Halle-Wittenberg).

Es konnte gezeigt werden, dass siRNAs einer Länge von 21 nt und 22 nt durch die AGO-Immunpräzipitation angereichert wurden, durch AGO1 in deutlich stärkerem Ausmaß als durch AGO2 (s. Abbildung 12, vgl. Abbildung 10).

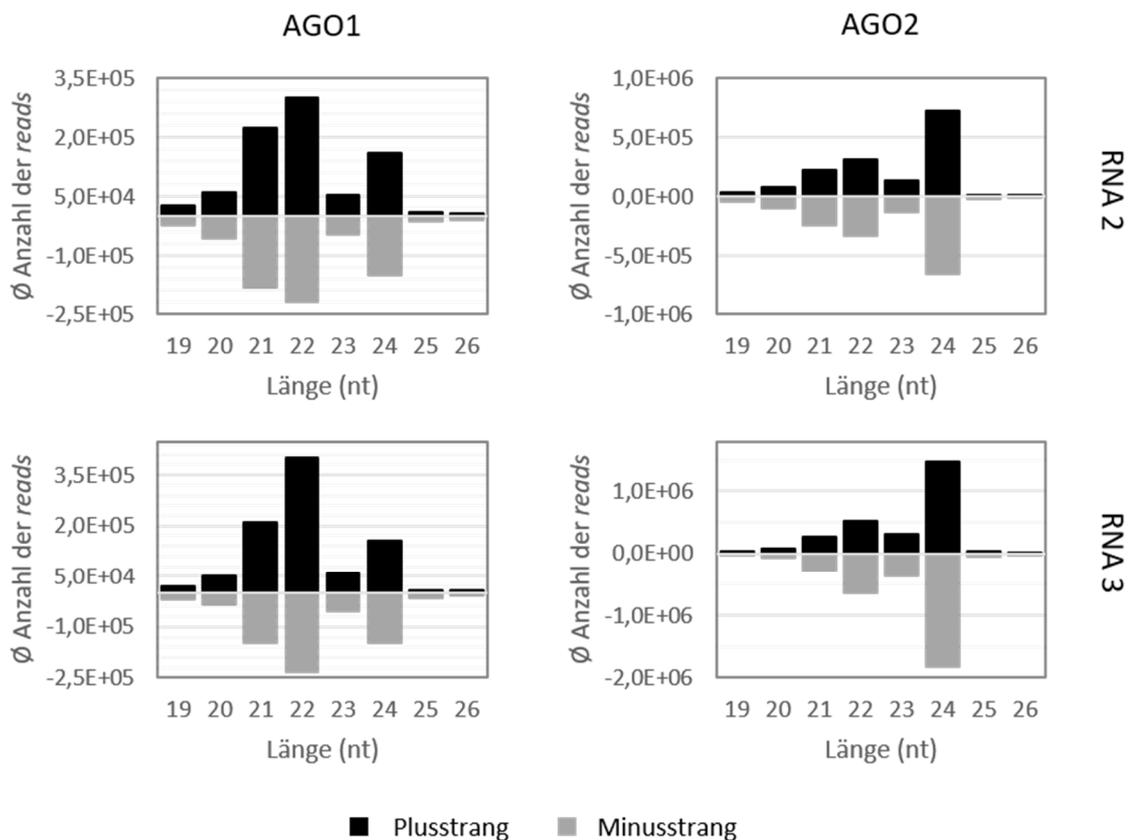


Abbildung 12 NGS-Analyse kleiner RNAs aus den AGO-Immunpräzipitationen mit den CMV-dsRNAs 2 bzw. 3. Die dsRNAs wurden im BYL durch DCLs prozessiert. Parallel wurde FLAG-AGO-mRNA *in vitro* translatiert. Die AGO-gebundenen siRNAs wurden mittels AGO-IP präzipitiert, isoliert und mittels NGS analysiert. Balken oberhalb der x-Achse repräsentieren die Anzahl von *reads*, die von der viralen Plusstrang-RNA stammen. Balken unterhalb der x-Achse sind als Beträge zu verstehen und repräsentieren die Anzahl von *reads*, die aus der viralen Minusstrang-RNA generiert wurden. Die Daten stellen Mittelwerte aus drei Experimenten dar.

Wie bereits bekannt ist, besitzen AGO-Proteine spezifische Präferenzen bezüglich des 5'-terminalen Nukleotids eingebauter siRNA-*guide*-Stränge [45]. Die Ergebnisse der hier durchgeführten NGS-Analysen stimmen mit diesen Präferenzen überein. Anhand der Sequenzierungen der vsiRNAs aus den AGO-IPs konnte gezeigt werden, dass AGO1 bevorzugt vsiRNAs mit 5'-terminalem Uridin (U) und AGO2 bevorzugt vsiRNAs mit 5'-terminalem Adenosin (A) bindet (s. Abbildung 13).

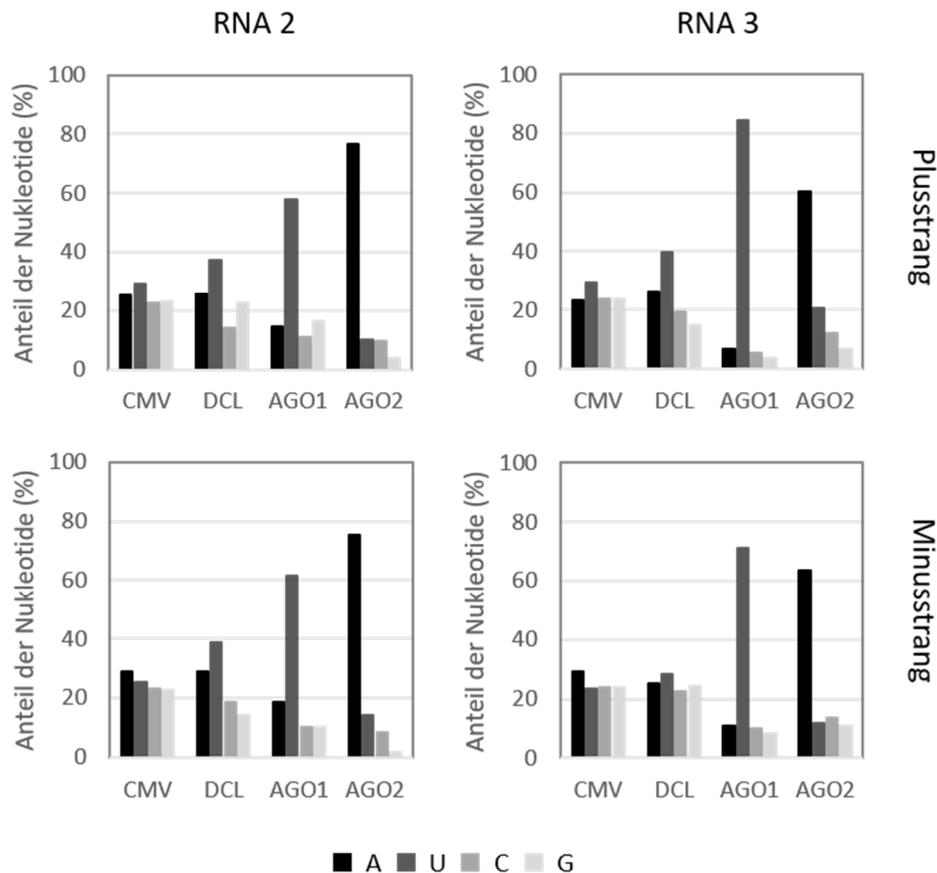


Abbildung 13 Relative Häufigkeit der entsprechenden 5'-terminalen Nukleotide der AGO1- und AGO2-gebundenen 21 nt langen siRNA-*guide*-Stränge abgeleitet vom Plus- und Minusstrang der CMV-RNAs 2 und 3. Die Häufigkeit wurde mit der Nucleotidzusammensetzung der CMV-RNAs 2 bzw. 3 (CMV) und der relativen Häufigkeit der 5'-terminalen Nukleotide aller 21 nt langen CMV-siRNAs, die im BYL durch endogene DCLs generiert wurden (DCL), verglichen.

Auf Grundlage der erhaltenen bioinformatischen Daten wurden siRNA-Kandidaten für weitere Experimente anhand bestimmter Kriterien ausgewählt. Grundsätzlich sollten die in der AGO-IP identifizierten *guide*-Stränge der viralen (-)-Strang-RNA entsprechen, also komplementär zur viralen (+)-Strang-RNA sein. Von diesen vsiRNAs mit Minusstrangpolarität wurden vor allem solche in Betracht gezogen, die eine sehr hohe Anreicherung in der AGO-IP verglichen mit der Häufigkeit ihres Auftretens im DCL-Assay aufwiesen (AGO/DCL-Kategorie), da hier eine hohe Affinität zwischen der siRNA und dem entsprechenden AGO-Protein angenommen wird. Zusätzlich wurden vsiRNAs ausgewählt, die im DCL-Assay nicht detektiert werden konnten, aber in der AGO-IP eine höhere Anzahl an *reads* zeigten als einige der angereicherten Kandidaten der AGO/DCL-Kategorie. Dass diese zusätzlichen Kandidaten im DCL-Assay nicht, in den AGO-IPs im Gegensatz dazu jedoch in großer Anzahl detektiert wurden, spricht für eine noch höhere Affinität zwischen siRNA und AGO-Protein. Die nach diesen Kriterien ausgewählten Top 10 vsiRNA-Kandidaten sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13 SiRNA-Kandidaten aus NGS-Analysen mit CMV-RNAs 2 und 3. Aufgelistet sind vsiRNAs mit der höchsten Anreicherung (*log₂-Fold change*) in der AGO-IP bezogen auf die Häufigkeit derselben vsiRNA im DCL-Assay (AGO/DCL-Kategorie). Zudem sind siRNAs aufgeführt, die im DCL-Assay nicht detektierbar waren, aber in der AGO-IP eine höhere Anzahl an *reads* zeigten als einige Kandidaten der AGO/DCL-Kategorie (kein *log₂-Fold change* berechenbar). VsiRNAs in grauer Schriftfarbe wurden nicht für nachfolgende Analysen in Betracht gezogen, da die 5'-terminalen Nukleotide nicht den beschriebenen Präferenzen der AGO-Proteine entsprachen.

RNA 2						RNA 3					
AGO1			AGO2			AGO1			AGO2		
vsiRNA	5'-nt	<i>log₂-Fold change</i>									
2441	U	8	2634	A	6,7	196	A	6,6	667	C	7,4
2562	U	6,9	1054	A	6,5	507	U	5	496	A	6,4
186	U	6,8	2041	A	6,1	34	C	4,7	592	A	5,3
1613	U	6,3	1020	A	6	33	A	4,7	593	A	5,3
1844	G	6,1	557	A	5,9	985	U	4,4	478	A	5,2
1489	U	6,1	2801	A	5,8	239	U	4,1	1569	A	4,9
149	U	6	2863	A	5,7	2061	U	3,8	1019	A	4,9
1982	U	6	2955	A	5,7	151	U	3,7	733	A	4,7
2727	U	6	1248	A	5,6	2174	U	3,7	35	A	4,5
1172	U	6	380	A	5,6	1098	U	3,7	2099	A	4,3
359	U	-	540	A	-	988	U	-	358	A	-
2740	U	-	449	A	-				1132	A	-
			407	A	-				1394	A	-
			2748	A	-						

Die Präferenz von AGO1 und AGO2 für vsiRNAs mit spezifischen 5'-terminalen Nukleotiden zeigte sich besonders in den Ergebnissen der AGO/DCL-Kategorie, da hier siRNAs mit den passenden 5'-Termini besonders stark angereichert waren (vgl. Tabelle 13). Unter den Top 10 der in den AGO-IPs angereicherten vsiRNAs waren auch vsiRNAs, deren 5'-terminales Nukleotid nicht den von AGO1 bzw. AGO2 bevorzugten, publizierten Präferenzen entsprach. Im Zusammenhang mit der Identifizierung AGO-gebundener siRNAs, die aus RNA 2 generiert wurden, war dies für lediglich eine siRNA der Fall. Es handelt sich dabei um die in der AGO1-IP detektierte siR1844 mit 5'-terminalem G. Da sich im Verlauf der weiteren Experimente herausstellte, dass diese siRNA weder *in vitro* noch *in planta* einen antiviralen Effekt bewirkte, wurden von RNA 3 abgeleitete siRNAs, deren 5'-Nukleotide nicht den AGO-spezifischen Präferenzen entsprachen, von vornherein von weiteren Analysen ausgeschlossen (vgl. Tabelle 13, siRNAs mit grauer Schrift).

3.2.3 Charakterisierung AGO-gebundener vsiRNAs *in vitro*

Die auf Basis von AGO-Immunpräzipitation und NGS identifizierten und als vielversprechende Kandidaten für eine antivirale Aktivität klassifizierten vsiRNAs sollten zunächst *in vitro* mittels sogenannter *Slicer*-Assays (s. Abschnitt 2.2.2.6) charakterisiert werden (s. Abbildung 14). Dazu wurde jeweils AGO1- bzw. AGO2-mRNA in Gegenwart der individuellen synthetischen siRNA-Duplexe im BYL translatiert. Die jeweiligen *passenger*-Stränge zu den *in vitro* identifizierten *guide*-Strängen wurden so designt, dass die entstehenden vollständig komplementären siRNA-Duplexe 2 nt 3'-Überhänge besitzen und sich diese Überhänge ebenfalls von der originären CMV-RNA-Sequenz ableiten. Nach Zugabe einer radioaktiv markierten *target*-RNA wurde überprüft, ob eine effektive endonukleolytische Hydrolyse durch AGO/RISC erzielt wurde. Als *target* diente die entsprechende CMV-RNA, aus der die siRNA ursprünglich prozessiert und identifiziert wurde, also entweder RNA 2 oder RNA 3.

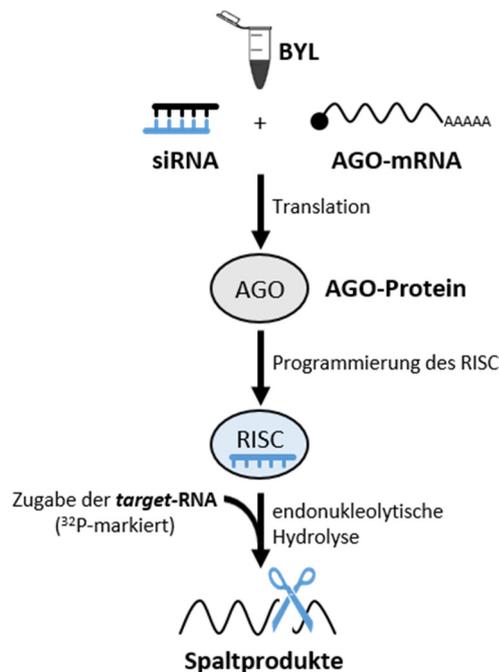


Abbildung 14 Schematische Darstellung des *Slicer*-Assays. AGO-mRNA wird *in vitro* in Gegenwart einer spezifischen, synthetischen siRNA translatiert. Die Beladung des RISC erfolgt mit der zu testenden siRNA. Anschließend wird eine radioaktiv markierte *target*-RNA zugegeben und deren endonukleolytische Hydrolyse mittels PAGE und Autoradiographie detektiert.

Die in Tabelle 13 genannten synthetischen Versionen der vsiRNAs wurden mit AGO1 oder AGO2 auf ihre *Slicer*-Aktivität überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass mit allen RNA 2-spezifischen vsiRNA-Kandidaten aus der AGO1-IP, außer siR1844 und siR2740, ein deutlicher Abbau der *target*-RNA in Kombination mit AGO1 erfolgte. Dies ist an der Abnahme der Menge intakter *target*-RNA und dem Auftreten von Spaltprodukten zu erkennen (s. Abbildung 15A, vgl. mit Negativkontrolle in Spur 1). In Kombination mit AGO2 konnten siR380, 407, 449, 540, 557, 1020, 1054, 1248 sowie 2041 aus der AGO2-IP eine Spaltung der CMV-RNA 2 bewirken. VsiRNAs, die ursprünglich aus dem 3'-terminalen

Bereich der RNA 2 prozessiert wurden (siR2634, 2748, 2801, 2863 sowie 2955), vermittelten keine *Slicer*-Aktivität in Kombination mit AGO2. Von den AGO1-präferierten vsiRNAs, die aus RNA 3 generiert wurden, vermittelten alle Kandidaten, bis auf die zwei siRNAs siR2061 und siR2174, eine *Slicer*-Aktivität (s. Abbildung 15B). Dasselbe gilt für die AGO2-präferierten siRNAs auf der RNA 3-*target*-RNA, mit Ausnahme der siR35 und siR1132. Es wird deutlich, dass die Mehrzahl der identifizierten siRNAs eine effektive Spaltung der *target*-RNA vermittelte. Dies trifft jedoch nicht auf alle siRNA-Kandidaten zu. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Affinität zwischen vsiRNA und AGO-Protein einen wichtigen Faktor bei der Identifizierung effektiver siRNAs darstellt. Doch da nicht alle siRNAs, die durch eine hohe AGO-Affinität gekennzeichnet sind, auch zum Abbau der *target*-RNA führten, scheinen weitere Faktoren einen Einfluss auf die *Slicer*-Aktivität zu haben. Dazu scheint die Zugänglichkeit der jeweiligen *target site* zu zählen. Die hier gewonnenen Daten stehen somit in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten, die ebenfalls für eine entscheidende Rolle der AGO-Affinität, aber auch der *target*-Zugänglichkeit für die vermittelte *Slicer*-Aktivität einer siRNA sprechen [43, 44].

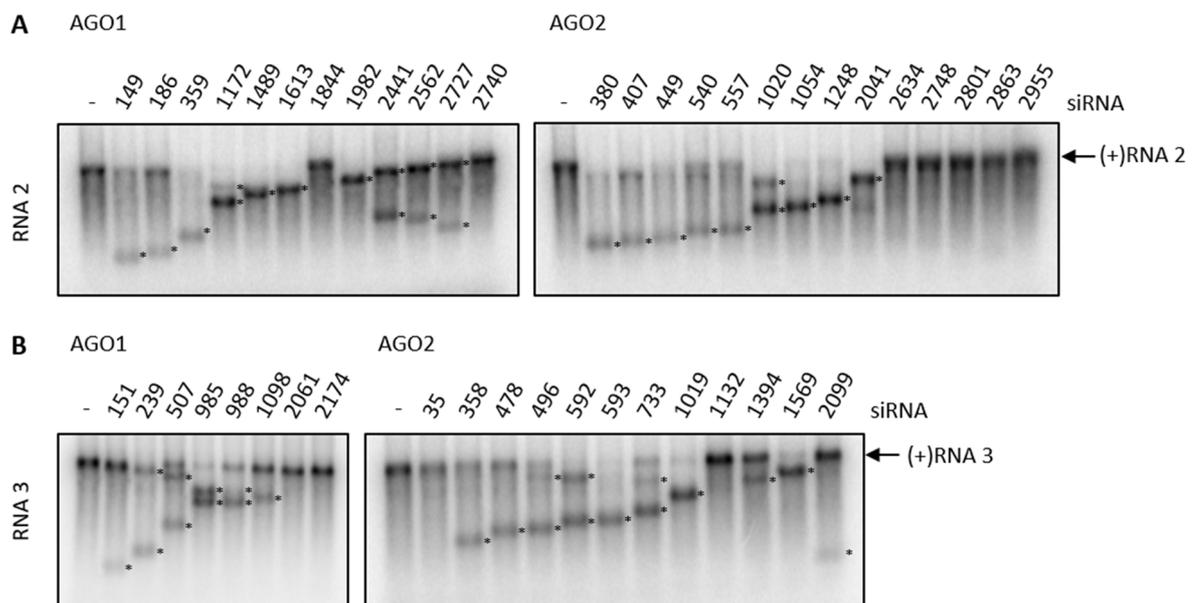


Abbildung 15 *Slicer*-Assay mit AGO1- und AGO2-präferierten vsiRNAs aus dem *screening* mit CMV-dsRNAs 2 und 3. AGO1- bzw. AGO2-mRNA wurde in Gegenwart der zu testenden vsiRNA im BYL translatiert. Die resultierenden RISCs wurden mit der zu charakterisierenden siRNA programmiert und die endonukleolytische Hydrolyse der radioaktiv markierten Plusstrang-RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese und Autoradiographie detektiert. Sternchen (*) markieren die durch *Slicer*-Aktivität der AGO/RISCs generierten Spaltprodukte. **(A)** SiRNA-Kandidaten aus dem *screening* mit dsRNA 2. **(B)** SiRNA-Kandidaten aus dem *screening* mit dsRNA 3.

Um aus den bereits identifizierten effektiven vsiRNAs jene siRNAs zu ermitteln, die zu einer besonders effizienten endonukleolytischen Hydrolyse der genomischen CMV-RNAs 2 und 3 führen, wurden *Slicer*-Assays unter kompetitiven Bedingungen durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.2.7). Dazu wurde der *Slicer*-Assay mit der zu testenden vsiRNA und einem zehnfachen molaren Überschuss einer unspezifischen siRNA wie zuvor beschrieben durchgeführt. Als unspezifische siRNA wurde die 21 nt-Variante der

gf698-siRNA (siGFP) verwendet, die keine *target site* in den genomischen CMV-RNAs besitzt und somit lediglich einen Kompetitor in Bezug auf die AGO-Bindung darstellt [101]. Da die durch eine siRNA vermittelte *Slicer*-Aktivität von mehreren Parametern abhängig ist (s. Abschnitt 4.1 und 4.2), gestaltet sich die Definition eines exakten Grenzwertes, ab dem eine siRNA als effizient zu betrachten ist, jedoch schwierig. Die siRNAs können nur im Zusammenhang mit dem spezifischen AGO-Protein und der jeweiligen *target*-RNA relativ zueinander verglichen werden. Ein absoluter Vergleich AGO1- und AGO2-präferierter siRNAs beider *target*-RNAs ist nicht sinnvoll. Aus diesem Grund wurden jeweils die drei siRNAs als besonders effizient klassifiziert, welche die beste Spaltung des jeweiligen *targets* (RNA 2 oder RNA 3) zusammen mit dem jeweiligen AGO-Protein (AGO1 oder AGO2) vermittelten.

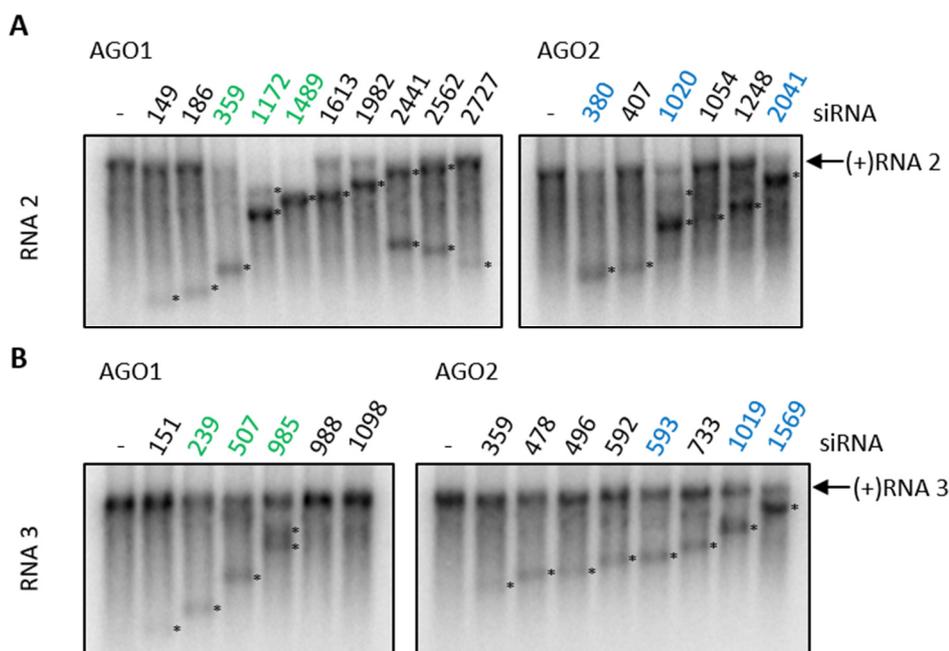


Abbildung 16 Kompetitiver *Slicer*-Assay mit AGO1- und AGO2-präferierten vsiRNAs aus dem *screening* mit CMV-dsRNAs 2 und 3. AGO1- bzw. AGO2-mRNA wurde in Gegenwart der zu testenden vsiRNA (10 nM) und eines zehnfach molaren Überschusses der gf698-siRNA (100 nM) im BYL translatiert. Der resultierende RISC wurde unter kompetitiven Bedingungen mit der zu charakterisierenden siRNA programmiert. Die *Slicer*-Effizienz wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese und Autoradiographie visualisiert. Sternchen (*) markieren durch *Slicer*-Aktivität des AGO/RISC generierte Spaltprodukte. VsiRNAs, die in Kombination mit dem jeweiligen AGO-Protein die beste Spaltung des *targets* bewirkten, sind grün (AGO1) bzw. blau (AGO2) markiert und werden als *esiRNAs* (*efficient* siRNAs) bezeichnet. **(A)** SiRNA-Kandidaten aus dem *screening* mit dsRNA 2. **(B)** SiRNA-Kandidaten aus dem *screening* mit dsRNA 3.

Je nach Affinität des AGOs für CMV-vsiRNA bzw. gf698-siRNA unterscheiden sich die individuellen vsiRNAs unter kompetitiven Bedingungen sehr deutlich im Hinblick auf die Effizienz der *target*-Spaltung, die mit dem jeweils spezifischen AGO/RISC erzielt wurde, wie Abbildung 16 zu entnehmen ist. Von den RNA 2-spezifischen siRNAs wiesen siR359, 1172 und 1489 (AGO1) sowie siR380, 1020 und 2041 (AGO2) die höchste Spaltungseffizienz auf. Der Abbau der CMV-RNA 3 erfolgte am besten durch die siRNAs 239, 507 und 985 (AGO1) sowie 593, 1019 und 1569 (AGO2). Die zuvor genannten siRNAs

werden nachfolgend aufgrund ihrer besonderen Effizienz im Abbau der viralen genomischen RNA als *esiRNAs* (*efficient siRNAs*) bezeichnet. Es lässt sich an dieser Stelle zusammenfassen, dass die systematische Herangehensweise zur Identifizierung von *vsRNAs* mittels AGO-Immünpräzipitation und NGS eine Reihe von *siRNAs* lieferte, die den Abbau viraler RNA *in vitro* vermittelten, wobei sich einige *siRNA*-Kandidaten als besonders effizient erwiesen haben. Diese Kandidaten sollten im Anschluss an ihre Charakterisierung *in vitro* auch auf ihr antivirales Potential *in planta* untersucht werden.

3.2.4 Charakterisierung AGO1- und AGO2-affiner *vsRNAs in planta*

Die im Folgenden beschriebenen Infektionsexperimente wurden in vier bis fünf Wochen alten *N. benthamiana*-Pflanzen durchgeführt. In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass eine mechanische Inokulation von *N. benthamiana* mit je 20 fmol der drei genomischen CMV-RNAs nach ca. sechs Tagen zur Infektion von hundert Prozent der behandelten Pflanzen führte (vgl. Abbildung 8). Die mechanische Inokulation unter Verwendung von Carborundum (Siliciumcarbid) erfolgte auf je zwei Blättern pro Pflanze via „*rub-in*“ des Mastermixes, bestehend aus einem Inokulationspuffer, äquimolaren Mengen der viralen, genomischen RNAs sowie den zu charakterisierenden *siRNAs*. Der Einsatz von Carborundum dient der Erzeugung kleiner Verletzungen der Blattoberfläche und ermöglicht somit die Aufnahme des Inokulums durch die Blattzellen.

3.2.4.1 Schutz von *N. benthamiana*-Pflanzen vor einer CMV-Infektion durch *in vitro* identifizierte *esiRNAs*

Anhand dieser Infektionsexperimente sollte ermittelt werden, ob *esiRNAs*, deren Einbau in RISCs *in vitro* zum Abbau der viralen RNA führt, auch *in planta* antivirales Potential besitzen. Dazu wurden *N. benthamiana*-Pflanzen jeweils mit einer der zuvor identifizierten *esiRNAs* zusammen mit den genomischen CMV-RNAs mechanisch inokuliert und das Auftreten CMV-spezifischer Symptome täglich über die Dauer von mindestens 28 Tagen beobachtet. Als Negativkontrolle wurden Pflanzen mit den genomischen CMV-RNAs und der *gf698-siRNA* inokuliert, die keine *target site* im CMV-Genom besitzt und somit keinen protektiven Effekt zeigen sollte. Als weitere Kontrollen dienten *siRNAs*, die *in vitro* keinen Effekt hinsichtlich der Spaltung der jeweiligen *target-RNA* gezeigt haben (RNA 2: *siR1844* (AGO1), *siR2634* (AGO2); RNA 3: *siR2061* (AGO1), *siR1132* (AGO2)). Zusätzlich wurden Pflanzen lediglich mit dem Inokulationspuffer ohne Zusatz viraler RNAs inokuliert. Diese Pflanzen sollten somit ein normales Wachstum aufweisen (Daten nicht gezeigt). Charakteristische Symptome einer CMV-Infektion äußern sich zunächst in den jungen Blättern, die sich stark kräuseln, und später in einem allgemeinen Wachstumsdefizit, woraus ein strauchartiges Aussehen der Pflanzen resultiert (vgl. auch Abbildung 7A und 7B (symptomatisch) mit Abbildung 7C (asymptomatisch)).

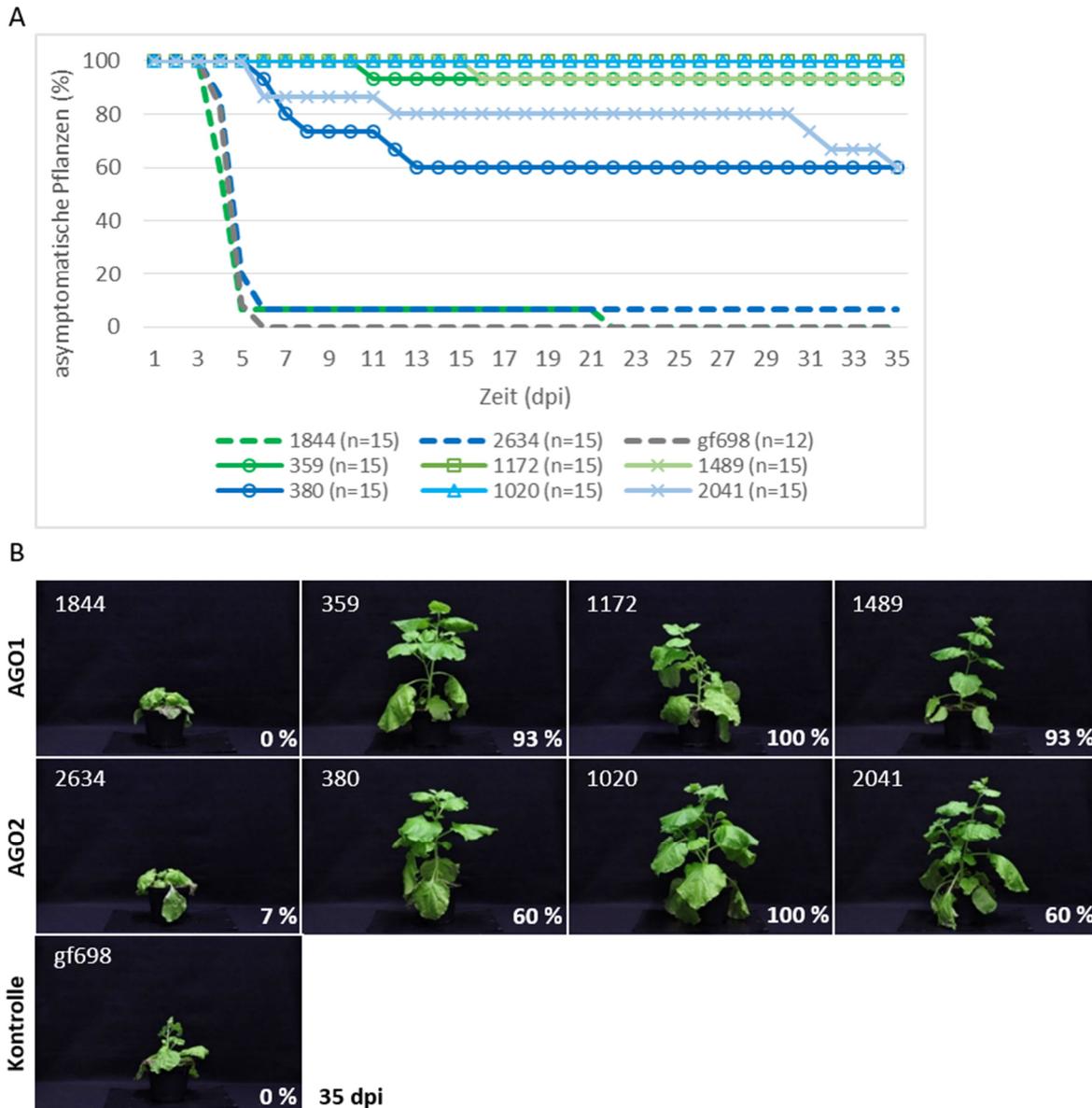


Abbildung 17 Charakterisierung RNA 2-spezifischer vsiRNAs *in planta*. Vier bis fünf Wochen alte *N. benthamiana*-Pflanzen wurden mit den genomischen CMV-RNAs sowie individuellen, synthetischen siRNA-Kandidaten mechanisch inokuliert und über eine Dauer von 35 Tagen auf das Auftreten CMV-spezifischer Symptome überprüft. **(A)** Der Graph zeigt den prozentualen Anteil asymptomatischer Pflanzen über die Dauer des Experiments. AGO1-präferierte siRNAs sind in Grün-, AGO2-präferierte siRNAs in Blautönen dargestellt. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Infektionsexperimenten. Die Anzahl der verwendeten Pflanzen ist angegeben (n=12-15). **(B)** Die repräsentativen Pflanzenbilder veranschaulichen die Unterschiede zwischen asymptomatischen und symptomatischen Pflanzen 35 Tage nach der Co-Inokulation. Der prozentuale Anteil asymptomatischer Pflanzen ist angegeben.

Wie der Abbildung 17A zu entnehmen ist, trugen esiRNAs, die aus der genomischen RNA 2 abgeleitet sind, in beträchtlichem Maße zum Schutz von *N. benthamiana* vor einer CMV-Infektion bei. Der Anteil der asymptomatischen Pflanzen betrug zwischen 60 % und 100 %, abhängig von der siRNA. Dabei zeigten vier der sechs getesteten siRNAs, siR359 und siR1489 sowie siR1020 und siR1172, einen besonders ausgeprägten protektiven Effekt von 93 % beziehungsweise 100 %. SiRNAs, die *in vitro* nicht

zum Abbau der *target*-RNA beitragen, schützten auch *in planta* nicht vor einer CMV-Infektion. Das Gleiche gilt für die unspezifische gf698-siRNA. Repräsentative Bilder der mit den entsprechenden esiRNAs inokulierten Pflanzen sind in Abbildung 17B dargestellt und veranschaulichen die offensichtlichen Unterschiede zwischen symptomatischen und asymptomatischen Pflanzen (vgl. Abbildung 7). Darüber hinaus wurde nach Abschluss der Infektionsexperimente stichprobenartig Blattmaterial von symptomatischen und asymptomatischen Pflanzen entnommen, RNA isoliert und unter Verwendung von einzelsträngigen Hexanukleotiden zufälliger Sequenz cDNA synthetisiert. Die cDNA diente anschließend als Grundlage für den Nachweis der CMV-RNAs mittels PCR. Wie in Abbildung 18 dargestellt ist, wurden PCR-Produkte nur in den Fällen erhalten, in denen die Pflanzen zuvor als symptomatisch klassifiziert worden sind.

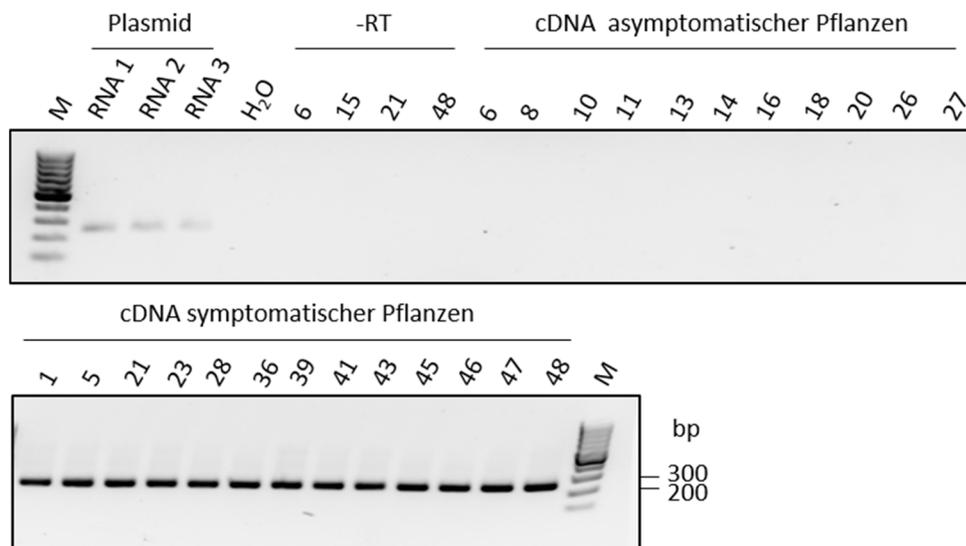


Abbildung 18 RT-PCR zum Nachweis der viralen Infektion auf RNA-Ebene. Blattscheiben asymptomatischer sowie symptomatischer Pflanzen wurden zum Zeitpunkt 35 dpi entnommen, RNA extrahiert und cDNA synthetisiert. Anschließend erfolgte die PCR zum Nachweis einer konservierten Sequenz, die in RNA 1, 2 sowie 3 des *Cucumber Mosaic Virus* vorhanden ist. Die Amplifikation der CMV-spezifischen Sequenz erfolgte von Plasmiden, welche die cDNA-Sequenz der jeweiligen, viralen RNA enthalten (Positivkontrolle). Die Ziffern entsprechen den Nummern der jeweiligen Pflanzen aus dem Infektionsexperiment. Die -RT-Reaktionen (keine Zugabe der Reversen Transkriptase während der cDNA-Synthese) sowie die Wasserkontrolle (Zugabe von Wasser statt cDNA während der PCR-Reaktion) dienten als Negativkontrollen. M = *GeneRuler* 100 bp DNA-Leiter (Thermo Scientific).

Aus cDNA, die aus dem Blattmaterial asymptomatischer Pflanzen generiert wurde, konnten keine PCR-Produkte amplifiziert werden. Somit bestätigten die Analysen auf RNA-Ebene die auf Basis visueller Einschätzungen getroffenen Klassifizierungen der Pflanzen in asymptomatisch und symptomatisch. Für die RNA 2-spezifischen esiRNAs konnte eine positive Korrelation zwischen *Slicer*-Aktivität *in vitro* und protektivem Effekt *in planta* gezeigt werden. Die zuvor beschriebene systematische Herangehensweise stellt somit ein geeignetes Mittel zur Identifizierung effizienter siRNAs zum Schutz von Pflanzen vor viralen Infektionen dar.

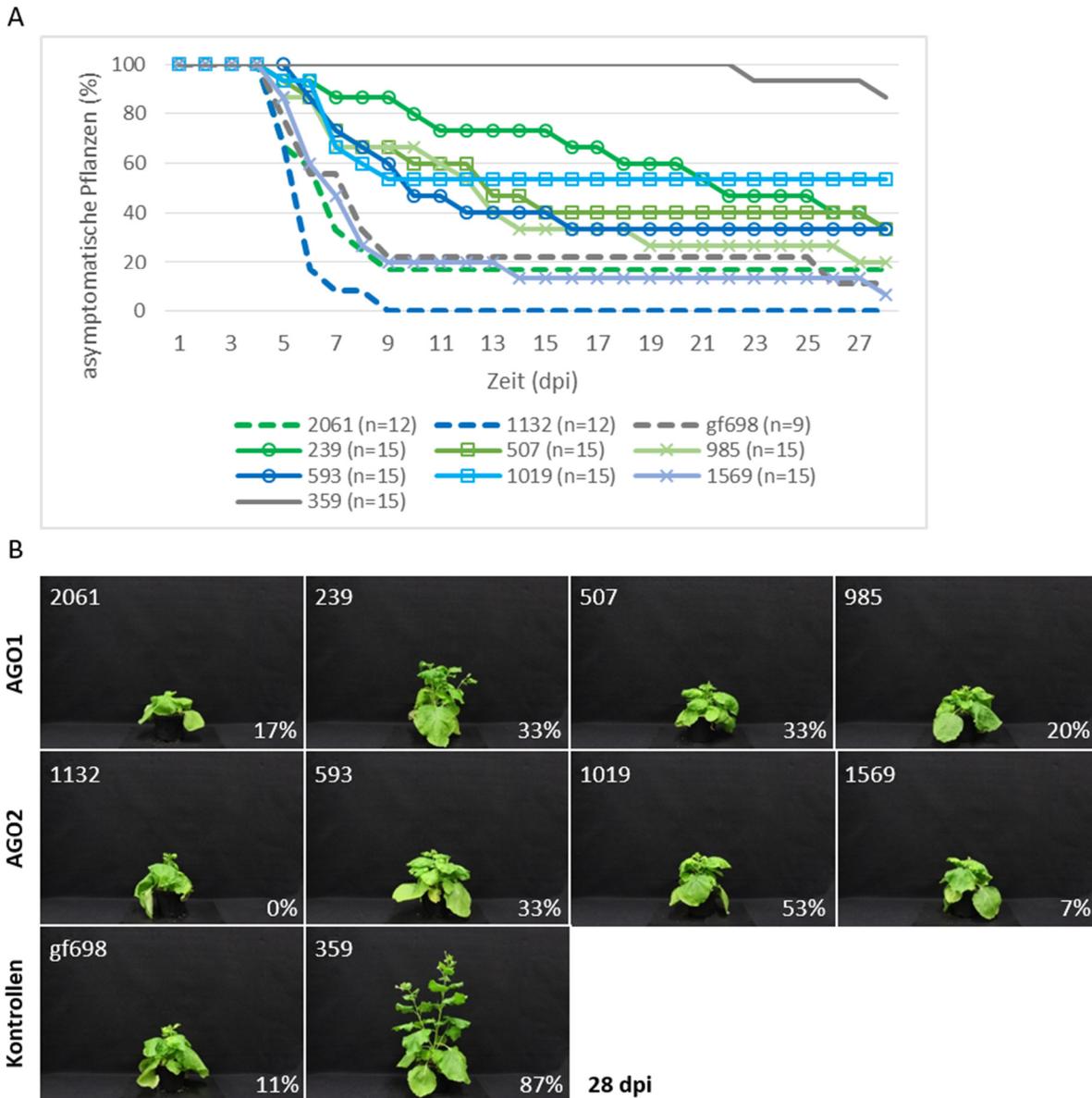


Abbildung 19 Charakterisierung RNA 3-spezifischer vsiRNAs *in planta*. Vier bis fünf Wochen alte *N. benthamiana*-Pflanzen wurden mit den genomischen CMV-RNAs sowie individuellen, synthetischen siRNA-Kandidaten mechanisch inokuliert und über eine Dauer von 28 Tagen auf das Auftreten CMV-spezifischer Symptome überprüft. **(A)** Der Graph zeigt den prozentualen Anteil asymptomatischer Pflanzen über die Dauer des Experiments. AGO1-präferierte siRNAs sind in Grün-, AGO2-präferierte siRNAs in Blautönen dargestellt. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Infektionsexperimenten. Die Anzahl der verwendeten Pflanzen ist angegeben (n=9-15). **(B)** Die repräsentativen Pflanzenbilder veranschaulichen die Unterschiede zwischen asymptomatischen und symptomatischen Pflanzen 28 Tage nach der Co-Inokulation. Der prozentuale Anteil asymptomatischer Pflanzen ist angegeben.

Die Ergebnisse der Infektionsexperimente, die mit RNA 3-abgeleiteten siRNAs erzielt wurden, sind differenziert zu betrachten. Um die Ergebnisse der Infektionsexperimente mit RNA 2- und RNA 3-spezifischen siRNAs vergleichbar zu machen, wurde in den Infektionsexperimenten der RNA 3-spezifischen siRNAs die RNA 2-spezifische siR359 als interne Kontrolle verwendet. Für siR359 konnte bereits ein protektiver Effekt von 93 % nachgewiesen werden. Auch in den unabhängig durchgeführten

Experimenten der RNA 3-spezifischen siRNAs führte siR359 in 87 % der Pflanzen zum Schutz vor einer CMV-Infektion (s. Abbildung 19A). Dies zeigt, dass die Durchführung der Infektionsexperimente mit *N. benthamiana* reproduzierbar erfolgte und die Experimente bzw. deren Ergebnisse untereinander vergleichbar sind.

Abweichend vom beachtlichen Schutz RNA 2-spezifischer siRNAs führten RNA 3-spezifische siRNAs zu einem geringen protektiven Effekt von maximal 53 %. Die Hypothese, dass esiRNAs, die *in vitro* zu einem starken Abbau der viralen *target*-RNA führen, auch einen wesentlichen protektiven Effekt *in planta* bewirken, traf im Fall der RNA 3 nur in begrenztem Maße zu. Die entsprechenden repräsentativen Pflanzenbilder sind in Abbildung 19B dargestellt.

Es kann daher an dieser Stelle schon festgestellt werden, dass neben der AGO-Affinität und der Zugänglichkeit der *target site* einer siRNA auch die Auswahl eines geeigneten *targets* kritisch für den Erfolg der in dieser Arbeit angewandten systematischen Herangehensweise zur Identifizierung effizienter siRNAs ist. Ein direkter Vergleich sowie mögliche Gründe für die Diskrepanz hinsichtlich des protektiven Effekts RNA 2- und RNA 3-spezifischer esiRNAs werden im nachfolgenden Abschnitt sowie in der Diskussion (s. Abschnitt 4.2) näher erörtert.

3.2.4.2 Vergleich der AGO-Bindungsaffinität und vermittelten *Slicer*-Aktivität RNA 2- und RNA 3-spezifischer esiRNAs

Um die Gründe für die unterschiedliche antivirale Effizienz RNA 2- und RNA 3-spezifischer esiRNAs zu verstehen, wurde zunächst ein *Slicer*-Assay unter Verwendung äquimolarer Mengen des RNA 2- und RNA 3-*targets* und identischer Konzentrationen der zu vergleichenden siRNAs durchgeführt. Dieser direkte Vergleich sollte mögliche quantitative Unterschiede der siRNA-vermittelten *Slicer*-Aktivität auf den beiden RNA-*targets* aufdecken (s. Abbildung 20). Die Quantifizierung erfolgte basierend auf der Abnahme der intakten *target*-RNA. Diese stellt ein Maß für die Effizienz der siRNA-vermittelten *Slicer*-Aktivität des AGO-Proteins (AGO1 oder AGO2) dar. Die Menge der generierten Spaltfragmente wurden im Rahmen der Quantifizierung nicht betrachtet, da diese im BYL möglicherweise unterschiedlich stabil sind.

Die siRNAs, die unter diesen Bedingungen *in vitro* die höchste *Slicer*-Aktivität vermittelten, waren die RNA 2-spezifischen siRNAs 1172 und 2041. Die geringsten *Slicer*-Aktivitäten konnten mit AGO1 und den RNA 3-spezifischen siRNAs 507 und 239 detektiert werden. Im direkten Vergleich unter identischen Reaktionsbedingungen wird somit auch numerisch ersichtlich, dass die esiRNAs aus der RNA 2-Analyse sowohl mit AGO1 als auch mit AGO2 ein effizienteres *slicing* der *target*-RNA vermittelten als esiRNAs aus der RNA 3-Analyse (vgl. Abbildung 20B). Dies korreliert mit den Ergebnissen, die *in planta* in Infektionsexperimenten unter Verwendung RNA 2-spezifischer siRNAs erhalten wurden und spricht für deren höheres antivirales Potential.

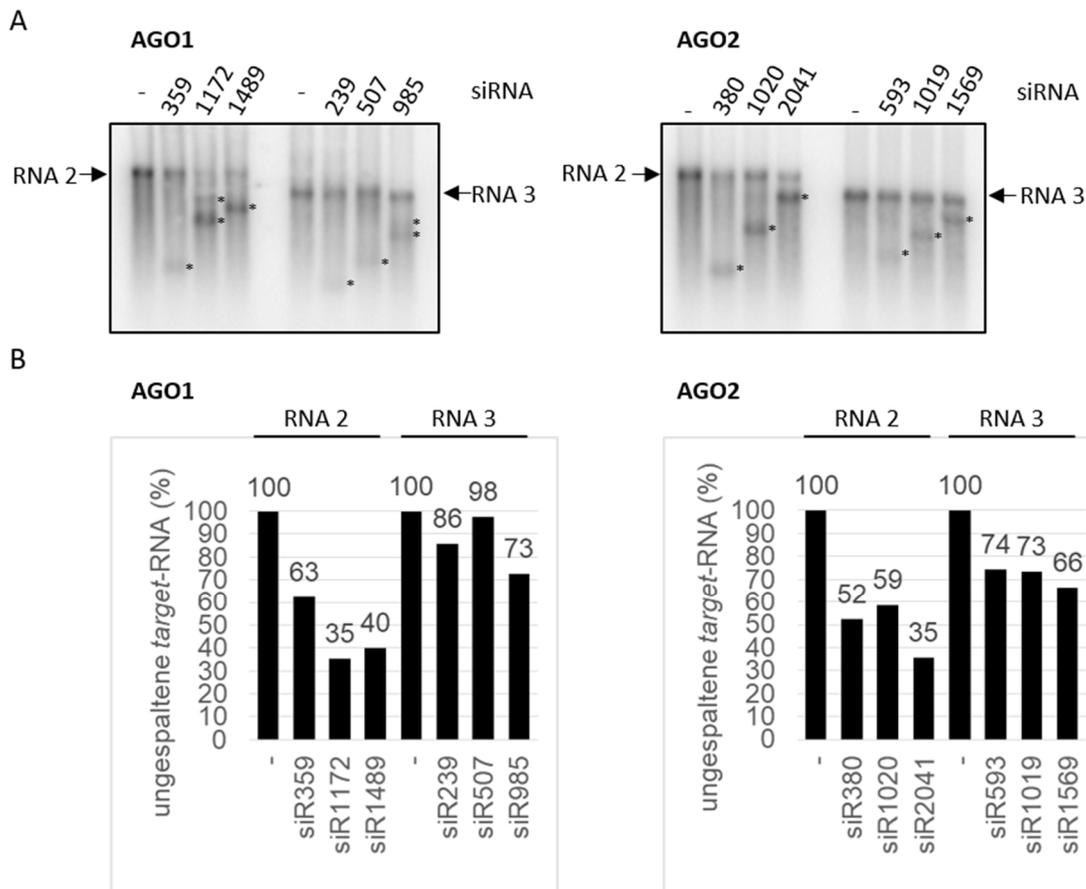


Abbildung 20 Vergleich der *Slicer*-Aktivitäten von esiRNA-Kandidaten aus der RNA 2- und RNA 3-Analyse. (A) *Slicer*-Assay mit esiRNAs aus dem RNA 2- und RNA 3-screening. Sternchen (*) markieren die durch AGO/RISC generierten Spaltprodukte. (B) Quantifizierung der Bandenintensitäten mittels ImageQuantTL. Die RNA 2-spezifischen esiRNAs vermitteln ein effizienteres *slicing*, was aus der geringeren Menge ungespaltener *target*-RNA hervorgeht.

Eine potentielle Ursache für die unterschiedlichen antiviralen Effizienzen RNA 2- bzw. 3-spezifischer siRNAs ist die AGO-Bindungsaffinität. Diese wurde im Rahmen dieser Arbeit experimentell untersucht. Dazu wurden *Slicer*-Assays in Form von Wettbewerbsassays mit einem Fragment einer GFP (*green fluorescent protein*)-mRNA als *target*-RNA sowie der gf698-siRNA (siGFP, 10 nM) in Gegenwart der individuellen, CMV-esiRNAs (100 nM) durchgeführt (s. Abbildung 21A). Die Kombination aus GFP-*target*-RNA und gf698-siRNA ist als Grundlage für *Slicer*-Assays bereits etabliert [101]. Sie hat den Vorteil, dass der unspezifische Abbau der nur ca. 430 nt langen GFP-*target*-RNA durch die endogene Ribonuklease-Aktivität des BYLs verglichen mit langen *target*-RNAs geringer ist. Zudem enthält die GFP-*target*-RNA keine *target*-sites für die zu testenden CMV-siRNAs. Die Reduktion der durch die gf698-siRNA vermittelten *target*-Spaltung stellt somit ein Maß für die Affinität der konkurrierenden CMV-siRNA zum AGO-Protein dar. Ein geringer Abbau der GFP-*target*-RNA bedeutet demnach eine hohe AGO-Affinität der CMV-esiRNA, da diese effektiv mit der GFP-siRNA um die AGO-Bindung konkurriert. Auch die Ergebnisse dieses Wettbewerbsassays wurden mittels ImageQuantTL quantifiziert (s. Abbildung 21B).

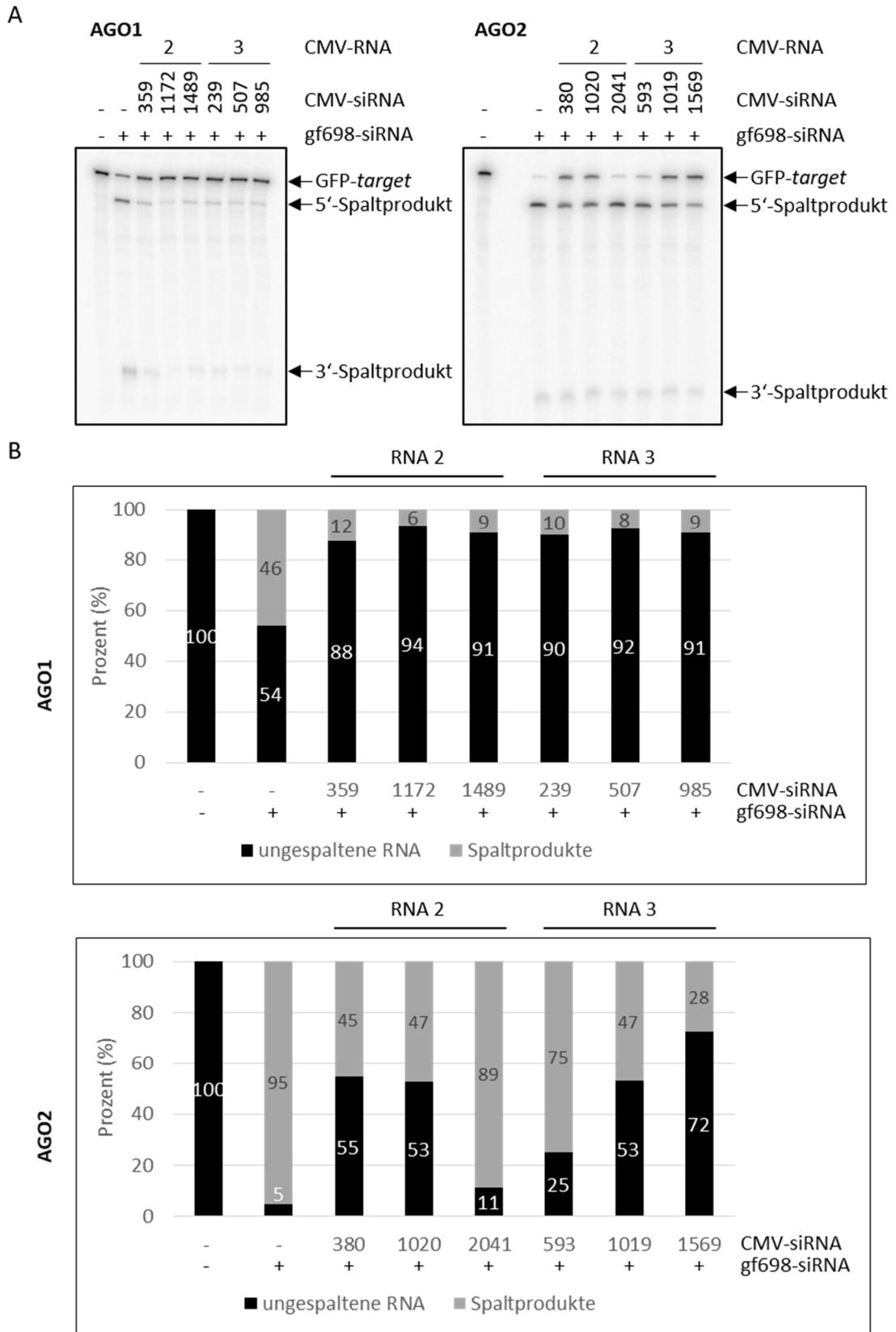


Abbildung 21 Vergleich der esiRNA-Kandidaten aus der RNA 2- und RNA 3-Analyse bzgl. ihrer AGO-Affinität. (A) Kompetitiver Slicer-Assay mit GFP-target und gf698-siRNA sowie esiRNAs aus der NGS-Analyse mit RNA 2 und RNA 3 (Kompetitor-siRNAs). (B) Quantifizierung der kompetitiven Slicer-Assays mittels ImageQuantTL.

Da im Falle dieser *slicing*-Reaktion die generierten Spaltprodukte aller Reaktionsansätze identisch und somit gleich stabil sind, wurde für die Quantifizierung jeweils die Summe aus 5'- und 3'-Spaltfragment in Relation zur ungespaltenen *target*-RNA betrachtet.

Die AGO1-präferierten CMV-siRNAs weisen in diesem Experiment im Allgemeinen eine höhere Bindungsaffinität auf als die AGO2-präferierten CMV-siRNAs. Zudem ähneln sich die prozentualen Anteile der Spaltprodukte vermittelt durch RNA 2- und RNA 3-spezifische AGO1-gebundene siRNAs stark. Die prozentualen Anteile der Spaltprodukte vermittelt durch AGO2-gebundene siRNAs unterscheiden sich verglichen mit den Spaltprodukten der durch AGO1-gebundenen siRNAs etwas stärker. Hierbei zeigen jedoch überraschenderweise sogar die RNA 3-spezifischen siRNAs, besonders siR1569, die stärkste Reduktion der durch die gf698-siRNA vermittelten *target*-Spaltung, was für eine höhere AGO-Bindungsaffinität spricht. Daher scheint eine geringere AGO-Bindungsaffinität für den geringeren protektiven Effekt der RNA 3-spezifischen siRNAs *in planta* als Ursache unwahrscheinlich.

3.2.4.3 Vergleich 21 nt langer esiRNAs mit entsprechenden 22 nt-Varianten

Nachdem die effizientesten vsiRNAs abgeleitet von CMV-RNA 2 (AGO1: siR359, 1172, 1489; AGO2: siR380, 1020, 2041) *in vitro* identifiziert und *in planta* bestätigt wurden, sollte untersucht werden, ob die ursprünglich aus dem Pool der 21 nt langen siRNAs identifizierten esiRNAs als 22 nt lange Versionen verbesserte antivirale Eigenschaften aufweisen. SiRNAs mit einer Länge von 22 nt spielen nachweislich eine entscheidende Rolle bei der Verstärkung der antiviralen Abwehr durch die Induktion sekundärer siRNAs [22, 102]. Aus diesem Grund wurden synthetische 22 nt lange siRNAs verwendet, die sich von den zuvor identifizierten 21 nt langen esiRNAs ableiteten. Hierzu wurde jeweils ein Nukleotid am 3'-Ende des *guide*-Stranges sowie ein Nukleotid am 5'-Ende des *passenger*-Stranges hinzugefügt. Die 21 nt siRNA wurde somit, entsprechend der CMV-RNA-Sequenz, aus der sie hervorgegangen ist, um ein Nukleotid verlängert. Die Spaltungseffizienz der 22 nt langen siRNA-Versionen wurde *in vitro* mit der Spaltungseffizienz der originären 21 nt langen esiRNAs verglichen (s. Abbildung 22).

Der Vergleich erfolgte mittels kompetitiver *Slicer*-Assays in Gegenwart der gf698-siRNA. Als *target*-RNA diente CMV-RNA 2. Es stellte sich heraus, dass AGO1/RISCs in Kombination mit den 21 nt langen esiRNA-Varianten eine deutlich höhere *Slicer*-Aktivität aufwiesen als mit den 22 nt-Varianten. AGO2/RISCs hingegen wiesen eine nahezu vergleichbar hohe *Slicer*-Aktivität nach Beladung mit 21 bzw. 22 nt langen siRNAs auf. Es kann vermutet werden, dass sich die Affinität von AGO2 gegenüber siRNAs mit einer Länge von 21 nt bzw. 22 nt Länge weniger stark unterscheidet und somit der Einbau beider siRNA-Spezies in ähnlichem Maße erfolgt.

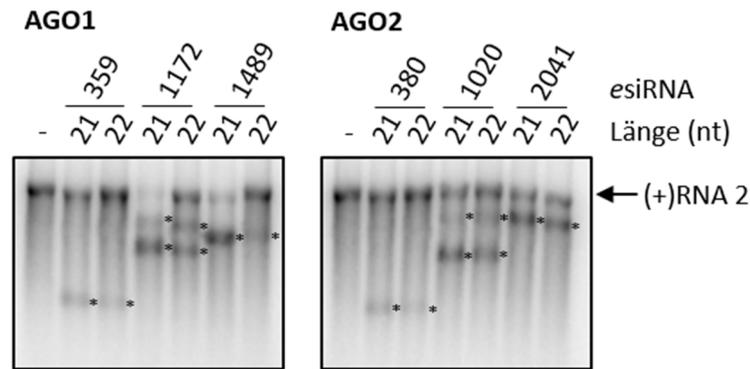


Abbildung 22 Vergleich 21 nt bzw. 22 nt langer siRNAs. Zum Vergleich der siRNAs wurde ein kompetitiver *Slicer*-Assay in Gegenwart der unspezifischen gf698-siRNA durchgeführt. Sternchen (*) markieren die durch *Slicer*-Aktivität des AGO/RISC generierten Spaltprodukte.

Die 21 nt langen siRNAs, die als Ausgangspunkt dienen, entstammen dem Pool der stark angereicherten 21 nt langen siRNAs aus den AGO-IPs. Die 22 nt langen siRNA-Versionen stammen jedoch nicht aus dem Pool der in den AGO-IPs stark angereicherten 22 nt siRNA-Kandidaten, sondern sind lediglich von den 21 nt-Versionen abgeleitet. Ein direkter Vergleich des Effektes der 21 nt langen und 22 nt langen siRNA-Versionen ist daher schwierig ist.

Es könnten also auch weitere Faktoren wie unterschiedliche Sequenzpräferenzen der AGOs bei 21 nt gegenüber 22 nt langen siRNAs oder die Stabilität der jeweiligen siRNA einen Einfluss auf deren Einbau in die AGO-Proteine und somit auf die Spaltungseffizienz der AGO/RISCs haben. Der Einfluss dieser Faktoren sollte sich allerdings aufgrund des Hinzufügens eines einzigen Nukleotids nicht grundlegend verändern. Es bleibt daher die Vermutung, dass AGO2 verglichen mit AGO1 eine höhere Flexibilität im Hinblick auf spezifische Kriterien (hier: Länge) beim Einbau von siRNAs aufweist, was auch durch die Daten in Abschnitt 3.3.4.3 unterstützt wird.

Der Vergleich der 21 nt und 22 nt langen siRNAs erfolgte nicht nur *in vitro*. Es wurden auch Infektionsexperimente in *N. benthamiana* durchgeführt. Dafür wurde jeweils eine AGO1- und eine AGO2-präferierte siRNA ausgewählt (siR359 und siR1020) und diese als 21 nt- bzw. 22 nt-Version in Gegenwart der genomischen CMV-RNAs getestet.

Da beide siRNAs als 21 nt-Version in den initialen Infektionsexperimenten bereits 93 % bzw. 100 % der Pflanzen vor einer CMV-Infektion schützten, wurde die Menge der eingesetzten siRNAs von ursprünglich 1 µg pro Pflanze auf 200 ng pro Pflanze reduziert, um eventuelle Steigerungen in der protektiven Wirkung durch 22 nt siRNAs zu erkennen. Als Kontrolle diente die siGFP-Kontrolle (siR gf698). Während siR359 (AGO1) und siR1020 (AGO2) mit einer Länge von 21 nt weiterhin 89 % der Pflanzen vor einer CMV-Infektion schützten, bot die 22 nt-Version der siR359 ebenfalls 89 % Schutz. Die 22 nt lange siR1020 konnte jedoch nur in 22 % der Fälle das Auftreten der CMV-typischen Symptome verhindern (vgl. Abbildung 23).

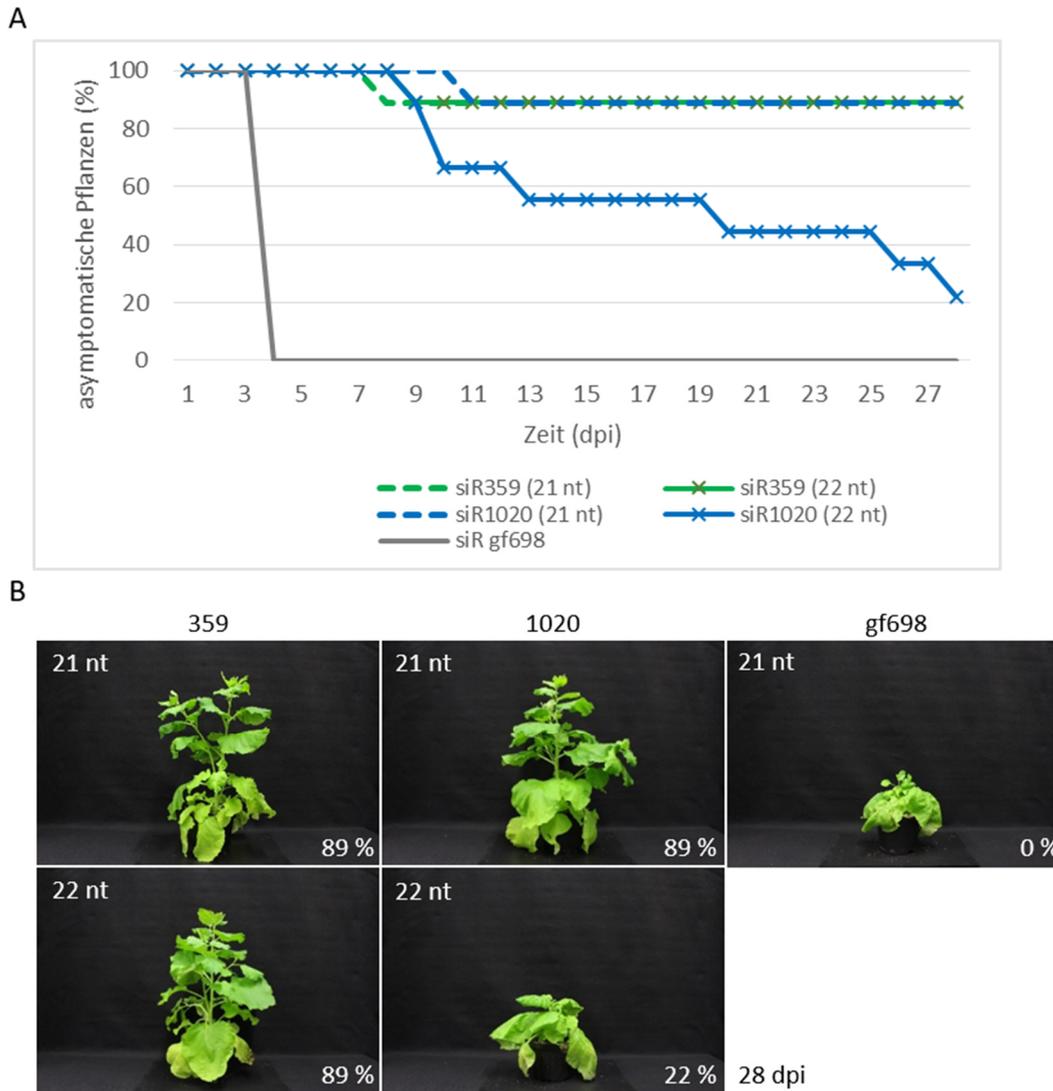


Abbildung 23 Vergleich der protektiven Wirkung 21 nt und 22 nt langer siRNAs *in planta*. Vier bis fünf Wochen alte *N. benthamiana*-Pflanzen wurden mit 21 nt bzw. 22 nt langen synthetischen siRNAs sowie den genomischen CMV-RNAs mechanisch inokuliert. **(A)** Prozentualer Anteil asymptomatischer Pflanzen. Es wurden jeweils neun Pflanzen für die CMV-spezifischen siRNAs und drei Pflanzen für die siGFP-Kontrolle eingesetzt. **(B)** Repräsentative Pflanzenbilder 28 Tage nach der mechanischen Co-Inokulation. Der prozentuale Anteil asymptomatischer Pflanzen pro siRNA ist angegeben.

Somit führte der Einsatz von bereits identifizierten 21 nt esiRNAs als 22 nt-Versionen nicht zu einer Verbesserung des protektiven Effekts. Dass die 21 nt- und 22 nt-Varianten der siRNAs jedoch nicht auf gleiche Weise identifiziert wurden und somit nicht komplett miteinander vergleichbar sind, wurde zuvor bereits erläutert und trifft hier ebenfalls zu. Die 21 nt-Varianten stammen aus den stark angereicherten Kandidaten der AGO-IPs, die 22 nt-Varianten wurden lediglich von diesen abgeleitet und entsprechen nicht zwangsläufig den stark angereicherten 22 nt siRNAs aus den AGO-IPs. Zudem konnte der Trend, der im *in-vitro*-Assay erhalten wurde, *in planta* nicht bestätigt werden.

AGO2 zeigte *in vitro* eine höhere Toleranz gegenüber 22 nt langen siRNAs als AGO1 und geringere Unterschiede in der *Slicer*-Aktivität im direkten Vergleich der beiden siRNA-Längen. *In planta* konnte jedoch mit der AGO1-präferierten 22 nt langen siR359 ein besserer protektiver Effekt erzielt werden als mit der AGO2-präferierten 22 nt langen siR1020.

3.3 Design doppelsträngiger RNAs auf Basis identifizierter esiRNAs

Der Einsatz doppelsträngiger RNAs viraler Sequenzen in Form von transgenen Pflanzen oder der äußerlichen Anwendung als „dsRNA-Vakzinierung“ stellt eine vielversprechende Methode zum Schutz von Pflanzen vor viralen Infektionen dar. Ihr Einsatz und Nutzen wurden bereits mehrfach publiziert [20, 66, 69]. Bisherige dsRNA-Designs beschränken sich jedoch lediglich auf längere, kontinuierliche Ausschnitte viraler genomischer RNAs. Der Anspruch dieser Arbeit ist es, dsRNAs auf Basis bereits identifizierter und nachweislich effizienter siRNAs aufzubauen – sogenannte *efficient double-stranded RNAs* (edsRNAs) – und somit die Spezifität und Wirksamkeit der Applikation von dsRNA als biologisches Pflanzenschutzmittel zu erhöhen. Ein genereller Vorteil dieser edsRNAs gegenüber einer einzelnen esiRNA wäre, dass *off-target*-Effekte durch das Generieren eines Pools an siRNAs reduziert werden, wobei jede einzelne esiRNA weiterhin zum spezifischen und effizienten *on-target*-Effekt beiträgt. Im Gegensatz dazu können aus einer dsRNA, die aus kontinuierlichen Fragmenten des viralen Genoms besteht, die nicht weiter selektiert bzw. charakterisiert wurden, eine Vielzahl verschiedenster siRNAs prozessiert werden, deren Effekt nicht bekannt ist. So besteht zum Beispiel die Möglichkeit, dass aus dem ausgewählten Fragment siRNAs prozessiert werden, die nur eine sehr geringe AGO-Affinität haben und damit nur einen geringen *silencing*-Effekt bewirken. Im Gegensatz dazu könnten aber auch siRNAs prozessiert werden, die eine hohe AGO-Affinität besitzen, deren *target site* im viralen Genom jedoch nur schwer oder gar nicht zugänglich ist (*decoy*-Effekt). Über die Effizienz solcher Konstrukte herrscht demnach eine gewisse Unsicherheit. Der Versuch, eine edsRNA mit einer eher absehbaren und im Allgemeinen verbesserten Wirkung zu generieren, ist nachfolgend beschrieben.

3.3.1 Design effizienter, CMV-spezifischer dsRNAs

Die Grundlage aller im Rahmen dieser Arbeit generierten dsRNAs bildeten die zuvor identifizierten effizienten AGO1-präferierten siRNAs 359, 1172 und 1489 sowie die AGO2-präferierten esiRNAs 380, 1020 und 2041. Für jede einzelne dieser siRNAs konnte bereits gezeigt werden, dass ein entsprechend beladener AGO/RISC im BYL die RNA 2 des CMV-Genoms effizient abbaut (relativer Vergleich RNA 2-spezifischer siRNAs untereinander). Ebenso konnte für alle genannten siRNAs experimentell nachgewiesen werden, dass sie *N. benthamiana*-Pflanzen in Infektionsexperimenten in erheblichem Maße (60-100 %) vor einer Infektion mit CMV schützen. Der Aufbau der dsRNA aus den genannten

siRNAs erfolgte durch Aneinanderreihung der drei AGO1- sowie der drei AGO2-präferierten esiRNAs, wobei sich die AGO1- bzw. AGO2-präferierten *guide*-Stränge auf unterschiedlichen Strängen der dsRNA befinden (s. Abbildung 24A). Dies soll bewirken, dass sich das 5'-Ende eines jeden siRNA-*guide*-Stranges möglichst nah am 5'-Ende des gesamten RNA-Konstruktes befindet. Da dieses Konstrukt aus sechs 21 nt langen CMV-spezifischen esiRNAs besteht, wird es als dsCMV6si21 bezeichnet.

Zusätzlich wurde an beiden Enden der dsRNA je eine 21 nt lange, sogenannte Pseudo-siRNA hinzugefügt. Die Bezeichnung „Pseudo-siRNA“ soll verdeutlichen, dass diese 21 nt langen Sequenzen keine siRNAs im eigentlichen Sinne darstellen. Ihre Funktion kommt auf der DNA-Ebene des Konstruktes zum Tragen und liegt in der Verbesserung der Transkriptionseffizienz. Die cDNA-Sequenzen der entsprechenden Pseudo-siRNAs enthalten die erweiterte Konsensus-Sequenz der T7-RNA-Polymerase (+1 bis +6 relativ zum Start der Transkription) und wurden vom kommerziell erhältlichen Plasmid L4440 (Addgene Plasmid # 1654; <http://n2t.net/addgene:1654>) abgeleitet, welches bereits mehrfach in Publikationen zur Herstellung von dsRNAs verwendet wurde [103]. Würden die dsRNA-Enden statt aus den Pseudo-siRNAs aus Sequenzen der CMV-siRNAs bestehen, müssten diese zur Verbesserung der Transkriptionseffizienz modifiziert werden. Durch das Anfügen der Pseudo-siRNAs können die ursprünglichen CMV-siRNA-Sequenzen jedoch beibehalten werden. Die jeweiligen RNA-Einzelstränge wurden von PCR-Produkten mittels T7-RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert und anschließend hybridisiert, um vollständig komplementäre dsRNAs zu generieren. Für die siRNA-*guide*-Stränge wurden ausschließlich deren Originalsequenzen verwendet. Da der *guide*-Strang einer siRNA auf der dsRNA jedoch mit dem 2 nt 3'-Überhang des *passenger*-Stranges der jeweils nachfolgenden siRNA überlappt, mussten an diesen Stellen teilweise Modifikationen an den zwei 3'-terminalen Nukleotiden der *passenger*-Stränge vorgenommen werden, um eine vollständige Komplementarität der dsRNA zu gewährleisten. Dies trifft auf die *passenger*-Stränge der si359, 380 sowie 2041 zu. Alle weiteren *guide*- sowie *passenger*-Stränge wurden nicht modifiziert.

Auf diese Weise wurden zwei gleichartig aufgebaute dsRNA-Konstrukte generiert, die sich lediglich in ihren Termini unterscheiden. Eines besitzt einen 2 nt langen 3'-Überhang an beiden RNA-Strängen (dsCMV6si21-Ü) und eines *blunt ends* (dsCMV6si21). Dadurch sollte der Einfluss verschiedener dsRNA-Termini auf die Prozessierung der dsRNA durch DCLs verglichen werden. Die Länge der Konstrukte ergibt sich aus der Summe der acht jeweils 21 nt langen siRNAs (sechs esiRNAs und zwei Pseudo-siRNAs; dsCMV6si21-Ü). Des Weiteren wurden zwei ebenso lange Kontroll-Konstrukte erstellt (s. Abbildung 24B). Eines der Konstrukte besteht aus einer kontinuierlichen CMV-Sequenz, die aus RNA 2 abgeleitet wurde (Nukleotidposition 501-626 entsprechend GenBank: D00355.1; dsCMV), das andere aus einem kontinuierlichen Fragment einer GFP-mRNA (Nukleotidposition 1216-1341 entsprechend pGFP-C1; dsGFP).

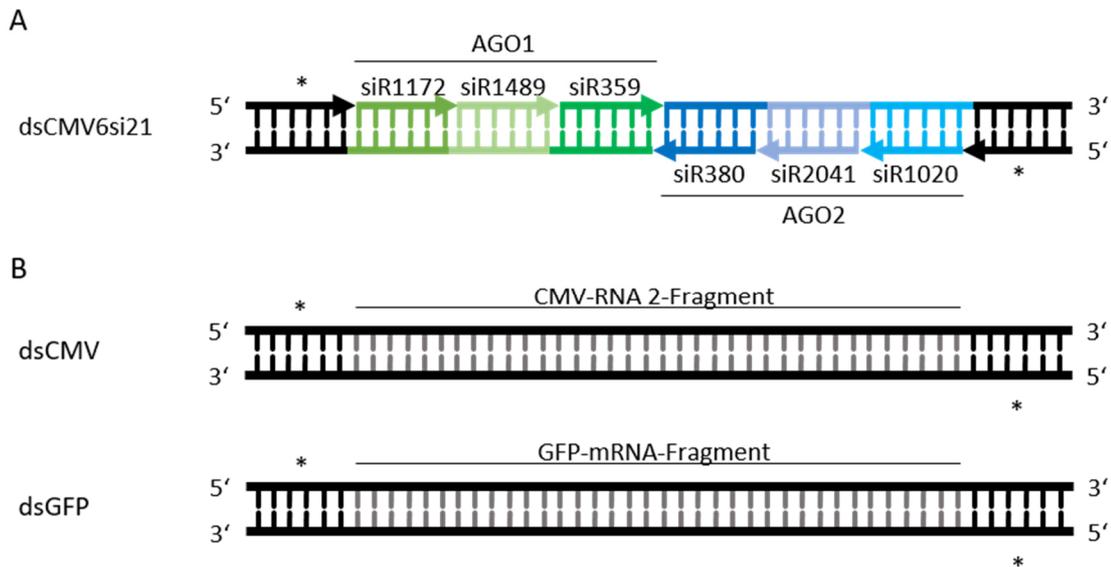


Abbildung 24 DsRNA-Design. (A) Das Konstrukt dsCMV6si21 enthält Sequenzen je einer 21 nt langen Pseudo-siRNA an beiden Enden (durch Sternchen (*) symbolisiert) sowie sechs 21 nt langer CMV-spezifischer esiRNAs (grün: AGO1; blau: AGO2). AGO1- und AGO2-präferierte *guide*-Stränge befinden sich auf verschiedenen Strängen der dsRNA. **(B)** Die Kontroll-Konstrukte bestehen ebenfalls aus Pseudo-siRNAs an den Enden der entstehenden dsRNA sowie einem 126 nt langen kontinuierlichen Fragment (entsprechend einer Länge von sechs 21 nt langen siRNAs) aus CMV-RNA 2 bzw. aus einem 126 nt langen kontinuierlichen Fragment einer GFP-mRNA (basierend auf Plasmid pGFP-C1). Die Transkription der Einzelstränge erfolgte mittels T7-RNA-Polymerase von PCR-Produkten. Anschließend wurden die Einzelstränge hybridisiert.

Die beiden Kontroll-Konstrukte sollten als Vergleichs-RNAs in Infektionsexperimenten mit *N. benthamiana* dienen und besitzen Sequenzen zur Verbesserung der Transkriptionsausbeute an beiden Enden, ähnlich wie beim Konstrukt „dsCMV6si21-Ü“. Das Konstrukt bestehend aus einem kontinuierlichen Fragment der CMV-RNA 2 repräsentiert somit das bisher übliche Design von dsRNAs aus längeren Abschnitten viraler Gene. Im Gegensatz dazu stellt die dsRNA bestehend aus den sechs effizienten CMV-siRNAs (dsCMV6si21-Ü) den in dieser Arbeit verfolgten, neuen Design-Ansatz zur Erhöhung der Wirksamkeit des antiviralen *silencing*-Effektes dar. Die dsGFP-RNA stellt eine komplett unabhängige dsRNA-Kontrolle dar.

3.3.2 Charakterisierung verschiedener CMV-spezifischer dsRNA-Designs *in vitro*

3.3.2.1 Effiziente Vermittlung des CMV-RNA 2-Abbaus durch spezifisch designte dsRNAs

Zunächst wurden die beiden auf Basis der esiRNAs designten dsRNAs mit den unterschiedlichen Termini (dsCMV6si21 und dsCMV6si21-Ü) *in vitro* in sogenannten DCL/*Slicer*-Assays verglichen. Der experimentelle Hintergrund ist in Abbildung 25 dargestellt.

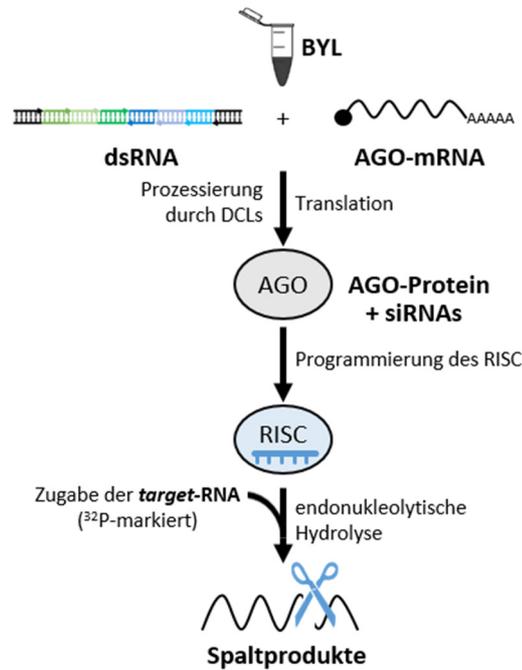


Abbildung 25 Schematische Darstellung des DCL/Slicer-Assays. AGO-mRNA wird *in vitro* in Gegenwart einer längeren doppelsträngigen RNA translatiert. Die dsRNA kann *in vitro* durch DCLs prozessiert und die generierten siRNAs in RISC eingebaut werden. Anschließend wird eine radioaktiv markierte *target*-RNA zugegeben und deren endonukleolytische Hydrolyse mittels PAGE und Autoradiographie detektiert. Als DCL-Substrat diente im Rahmen dieser Arbeit eine dsRNA bestehend aus den Sequenzen sechs effizienter 21 nt langer CMV-siRNAs. Als *target*-RNA wurde CMV-RNA 2 eingesetzt.

Die zu vergleichenden dsRNAs wurden jeweils einzeln in Gegenwart der AGO1- oder AGO2-mRNA ins BYL gegeben. Durch die im BYL enthaltenen DCL-Proteine werden die dsRNAs zu einem siRNA-Pool prozessiert, aus dem individuelle siRNAs direkt in die *in vitro* synthetisierten AGO-Proteine eingebaut werden können. Dadurch können die RISCs spezifisch mit den *in vitro* generierten CMV-esiRNAs programmiert werden. Anschließend wurde eine radioaktiv markierte *target*-RNA, in diesem Fall CMV-RNA 2, zugegeben und deren Spaltung durch den RISC mittels Agarose-Gelelektrophorese und Autoradiographie visualisiert.

Es wurden verschiedene dsRNA-Mengen von 25 ng bis 200 ng pro Reaktionsansatz getestet, um Unterschiede zwischen den Konstrukten zu untersuchen und Aussagen über die Effizienz der Spaltung in Abhängigkeit der dsRNA-Menge zu treffen.

Aus Abbildung 26A geht deutlich hervor, dass mit dsRNA-Mengen zwischen 25 ng und 200 ng ein vollständiger Abbau der *target*-RNA erfolgt (vgl. Abbildung 26A Spuren 1-4 und 6-9 mit Negativkontrolle in Spur 5).

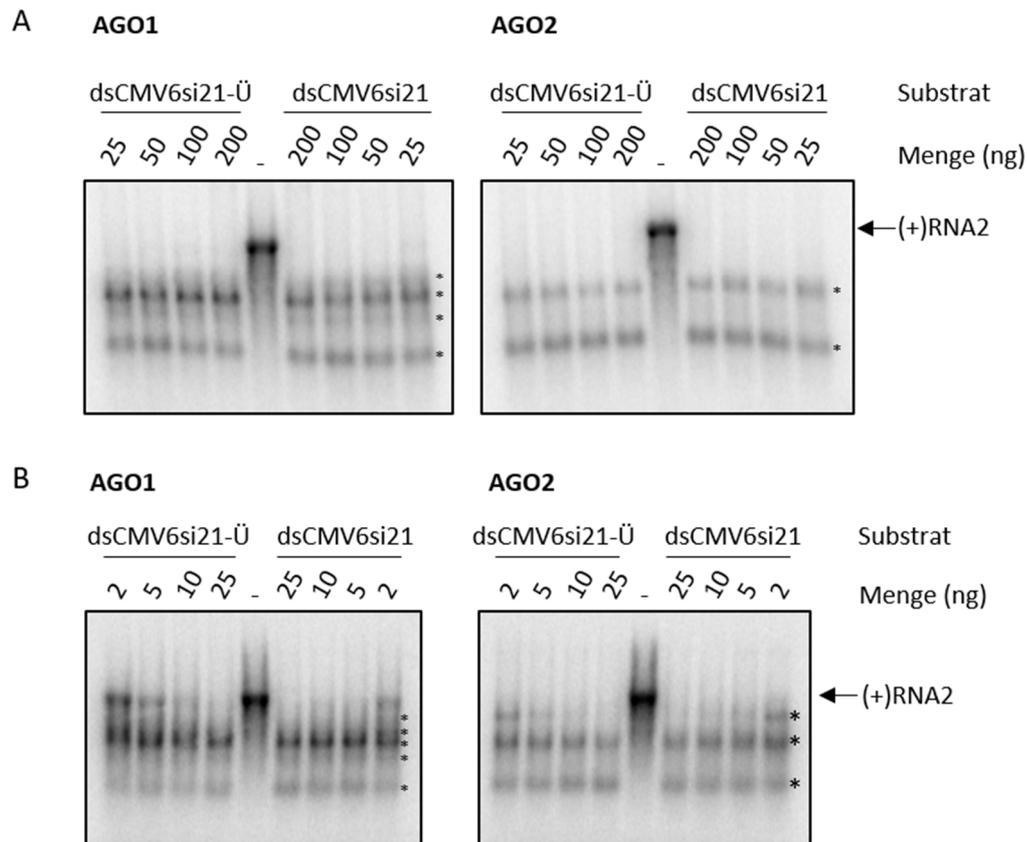


Abbildung 26 Charakterisierung des target-Abbaus in Abhängigkeit verschiedener dsRNA-Mengen und dsRNA-Termini. 2-200 ng der dsRNA wurden als DCL-Substrat in einen DCL/*Slicer*-Assay eingesetzt und der Abbau der radioaktiv markierten CMV-RNA 2 mittels Agarosegelelektrophorese und Autoradiographie visualisiert. Sternchen (*) markieren exemplarisch die durch *Slicer*-Aktivität des AGO/RISC generierten Spaltprodukte.

Dies bestätigt zum einen, dass die neu designten dsRNAs den gewünschten Effekt erzielen und *in vitro* in effiziente siRNAs prozessiert werden, die wiederum in Kombination mit den translatierten AGO-Proteinen zum Abbau der CMV-RNA 2 führen. Zum anderen gibt es einen ersten Hinweis auf die Wirksamkeit der dsRNAs, da 25 ng bereits ausreichend sind, um zu einer vollständigen endonukleolytischen Hydrolyse der *target*-RNA zu führen.

Die entstehenden Spaltprodukte unterschieden sich in Abhängigkeit davon, ob sie durch AGO1/RISC oder AGO2/RISC erzeugt wurden. Die Spaltprodukte aus den beiden Konstrukten dsCMV6si21 und dsCMV6si21-Ü unterschieden sich jedoch unter Verwendung desselben AGOs nicht. Da auch mit der Minimalmenge von 25 ng ein vollständiger Abbau des *targets* erzielt wurde, konnte die Menge der eingesetzten dsRNA weiter auf einen Bereich zwischen 2 ng und 25 ng reduziert werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26B dargestellt. Auch hier unterscheiden sich die Bandenmuster der Spaltprodukte zwischen den beiden dsRNAs in Kombination mit dem gleichen AGO-Protein nicht. Eventuell vermittelt die dsRNA mit den *blunt-end*-Termini den Abbau der *target*-RNA geringfügig effizienter. Für beide Konstrukte war der Einsatz von 10 ng im DCL/*Slicer*-Assay ausreichend, um die *target*-RNA restlos abzubauen. Somit waren ca. 175 fmol der jeweiligen dsRNA nötig, um ca. 20 fmol

des RNA 2-*targets* innerhalb von 15 min vollständig zu hydrolysieren. Da auch mit der geringsten getesteten Menge von 2 ng nur geringe Unterschiede in der Effizienz der dsRNAs in Abhängigkeit ihrer Termini festgestellt werden konnten, wurden alle weiteren Experimente unter Verwendung des Konstruktes mit den 2 nt 3'-Überhängen durchgeführt – in Analogie zu den authentischen Termini von siRNAs nach Prozessierung durch DCLs.

3.3.2.2 Prozessierung einer edsRNA durch DCL-Proteine im BYL

Die Prozessierung der dsRNAs im BYL erfolgt durch die verschiedenen endogenen *Dicer-like*-Proteine. Dies bedeutet, dass die dsRNA nicht nur durch DCL4 in die gewünschten 21 nt langen esiRNAs prozessiert wird, sondern auch in eine Reihe von siRNAs anderer Längen, z. B. 22 nt siRNAs durch DCL2 und 24 nt durch DCL3. Der genaue Mechanismus der Bindung und Prozessierung von dsRNAs durch DCLs ist bisher nicht bekannt. Das nachfolgend beschriebene Experiment sollte dennoch ermöglichen, einen ersten Einblick in die Prozessierung der edsRNA durch die DCLs *in vitro* zu gewinnen. Dafür wurde die radioaktiv markierte dsCMV6si21-Ü mittels *in-vitro*-Transkription und *annealing* generiert und als DCL-Substrat zum BYL gegeben. Anschließend wurden Proben nach verschiedenen Zeitpunkten entnommen (0 h bis 24 h) und RNA isoliert. Die so gewonnene Zeitreihe wurde mittels PAGE und Autoradiographie visualisiert und ist in Abbildung 27 dargestellt.

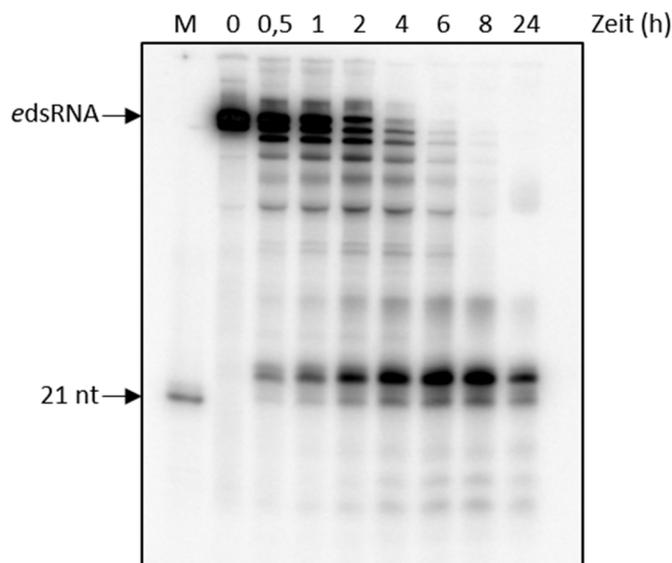


Abbildung 27 Prozessierung der dsRNA durch DCLs *in vitro*. Radioaktiv markierte dsCMV6si21-Ü wurde dem BYL hinzugefügt und deren Prozessierung über einen Zeitraum von 24 h verfolgt. Die Proben, die nach verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe der dsRNA zum BYL entnommen wurden, wurden nach Reinigung der RNA mittels PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert (M= 21 nt siRNA als Marker).

Das Autoradiogramm zeigt ein definiertes Muster von RNA-Banden einer Größe, die dem Ausgangssubstrat entsprechen, bis hin zu Banden, die RNAs mit einer Länge von nur wenigen Nukleotiden entsprechen. Durch die definierten RNA-Banden und das systematische und über alle Zeitpunkte kontinuierliche Bandenmuster ist davon auszugehen, dass der Abbau der edsRNA größtenteils spezifisch durch *Dicer-like*-Proteine und nur zu einem vernachlässigbaren Teil durch unspezifische, ebenfalls im BYL enthaltene RNasen erfolgte. Besonders auffällig sind die Banden auf einer Höhe von 21 nt sowie eine stärkere Bande, die vermutlich der Spezies der 24 nt langen siRNAs entspricht. Es konnte bereits anhand der NGS-Analysen zur Identifizierung von CMV-siRNAs aus den vollständigen CMV-RNAs 2 und 3 im BYL gezeigt werden, dass DCL3 im Lysat besonders aktiv ist und 24 nt lange siRNAs die am häufigsten generierte siRNA-Spezies sind. Dies wurde anhand dieses Assays erneut ersichtlich. Bereits innerhalb einer halben Stunde nach Zugabe der edsRNA zum BYL konnten die 21-24 nt langen siRNAs detektiert werden. Nach ca. sechs bis acht Stunden ist das 168 bp lange Ausgangssubstrat vollständig zu kleineren RNA-Intermediaten prozessiert worden. Vermutlich handelt es sich bei diesen um RNAs, die jeweils um das Vielfache von 21, 22 oder 24 nt kürzer sind als das ursprünglich eingesetzte Substrat. Um diesen visuellen Eindruck näher zu untersuchen, wurden ebenfalls NGS-Analysen durchgeführt.

3.3.3 NGS-Analyse der DCL-vermittelten Prozessierung von edsRNAs im BYL

Der zuvor beschriebene Assay (vgl. Abschnitt 3.3.2.2) lieferte erste Erkenntnisse zur Wirkungsweise der *Dicer-like*-Proteine auf dem neu designten edsRNA-Konstrukt und veranschaulichte, dass tatsächlich 21 nt lange siRNAs daraus prozessiert werden. In welchem Umfang diese siRNAs aber den originären CMV-esiRNAs entsprechen und in welchem Verhältnis diese gegenüber den ebenfalls generierten siRNAs anderer Länge stehen, konnte auf diese Weise nicht festgestellt. Nachfolgend sollte daher mittels detaillierterer Methoden wie der Sequenzierung untersucht werden, zu welchen Anteilen die esiRNAs aus den jeweiligen Konstrukten prozessiert werden.

Zu diesem Zweck wurde erneut edsRNA durch *in-vitro*-Transkription und Hybridisierung der Einzelstränge generiert und im BYL prozessiert. Zum einen wurde als DCL-Substrat die dsRNA mit *blunt ends* (dsCMV6si21) eingesetzt, zum anderen die dsRNA mit den 2 nt langen 3'-Überhängen (dsCMV6si21-Ü). Anschließend wurde die Gesamt-RNA extrahiert und mittels NGS sequenziert. Die bioinformatische Auswertung der Daten erfolgte durch Dr. Jan Grau (Institut für Informatik, MLU Halle-Wittenberg).

3.3.3.1 Größenverteilung der siRNAs nach Prozessierung von edsRNAs durch DCLs im BYL

Zunächst wurde die Größenverteilung der aus beiden dsRNA-Konstrukten generierten sRNAs betrachtet. Wie in Abbildung 28 dargestellt ist, wurden die für DCL2, 3 und 4 typischen siRNA-Spezies von 22 nt, 24 nt und 21 nt Länge gebildet. Die Größenverteilung ähnelte den bereits erhaltenen Daten der NGS-Analysen zur Identifizierung effizienter siRNAs aus den genomischen CMV-RNAs insoweit, dass auch hier die 24 nt langen siRNAs die am häufigsten detektierte siRNA-Spezies war (s. Abschnitt 3.2.1, Abbildung 10). An Position zwei folgten hier jedoch die 21 nt langen siRNAs, anstelle der 22 nt langen siRNAs bei der Prozessierung der genomischen RNAs. Zwischen den beiden dsRNAs unterschied sich die Rangfolge der siRNAs der verschiedenen Längen nicht und auch die absoluten *reads* einer bestimmten siRNA-Länge unterschieden sich nur minimal. So fiel das Verhältnis von 21 nt zu 24 nt siRNAs für die dsRNA6si21 mit 22 % zu 49 % etwas vorteilhafter aus als für dsRNA6si21-Ü mit 18 % zu 52 %, bezogen auf die Gesamtheit der siRNAs mit einer Länge von 20-25 nt. Grundsätzlich wurde die gewünschte siRNA-Spezies mit 21 nt Länge in beiden Fällen in erheblichem Maße gebildet.

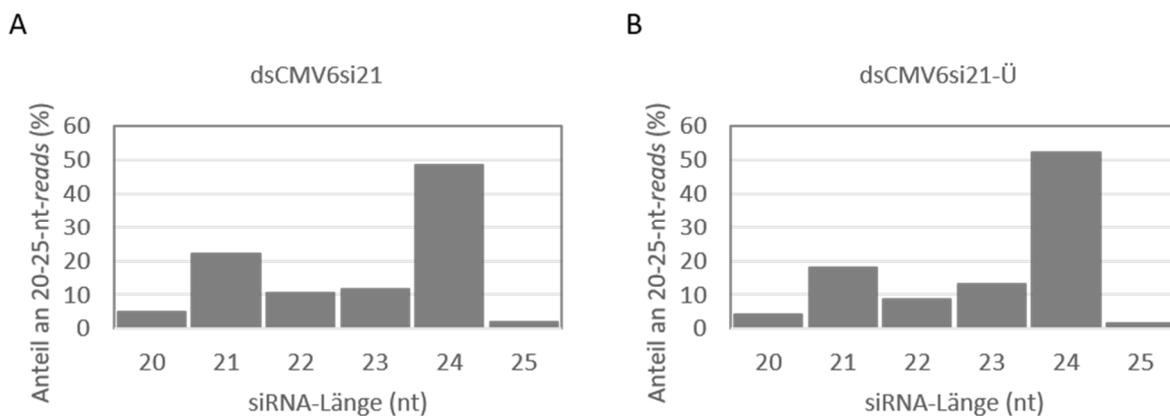


Abbildung 28 Prozentualer Anteil 20-25 nt langer *reads* prozessiert aus dsCMV6si21 und dsCMV6si21-Ü. Die Prozessierung erfolgte *in vitro* im BYL. Als DCL-Substrat wurde die dsRNA mit *blunt ends* (dsCMV6si21) bzw. die dsRNA mit 2 nt langen 3' Überhängen (dsCMV6si21-Ü) eingesetzt.

3.3.3.2 Anteil der CMV-esiRNAs nach Prozessierung von edsRNAs durch DCLs im BYL

Nachdem gezeigt werden konnte, dass 21 nt lange siRNAs aus den edsRNAs gebildet wurden, sollte der Anteil der CMV-esiRNAs an der Gesamtheit der 21 nt-*reads* ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 veranschaulicht. Dargestellt ist zum einen die prozentuale Häufigkeit der gewünschten 21 nt langen CMV-esiRNA-Stränge (blau) im Vergleich zu allen weiteren 21 nt langen siRNA-Sequenzen (orange). Dabei sind die siRNA-Einzelstränge jeweils entsprechend der Position ihres 5'-Endes auf dem dsRNA-Konstrukt abgebildet (s. Abbildung 29A; Position 1-168).

Ergänzend wurde zur besseren Übersichtlichkeit ausschließlich der prozentuale Anteil der CMV-spezifischen siRNA-*guide*- und -*passenger*-Stränge entsprechend ihrer Reihenfolge auf der dsRNA dargestellt (s. Abbildung 29B). Tabelle 14 beinhaltet die zugehörigen Zahlenwerte der einzelnen *guide*- und *passenger*-Stränge.

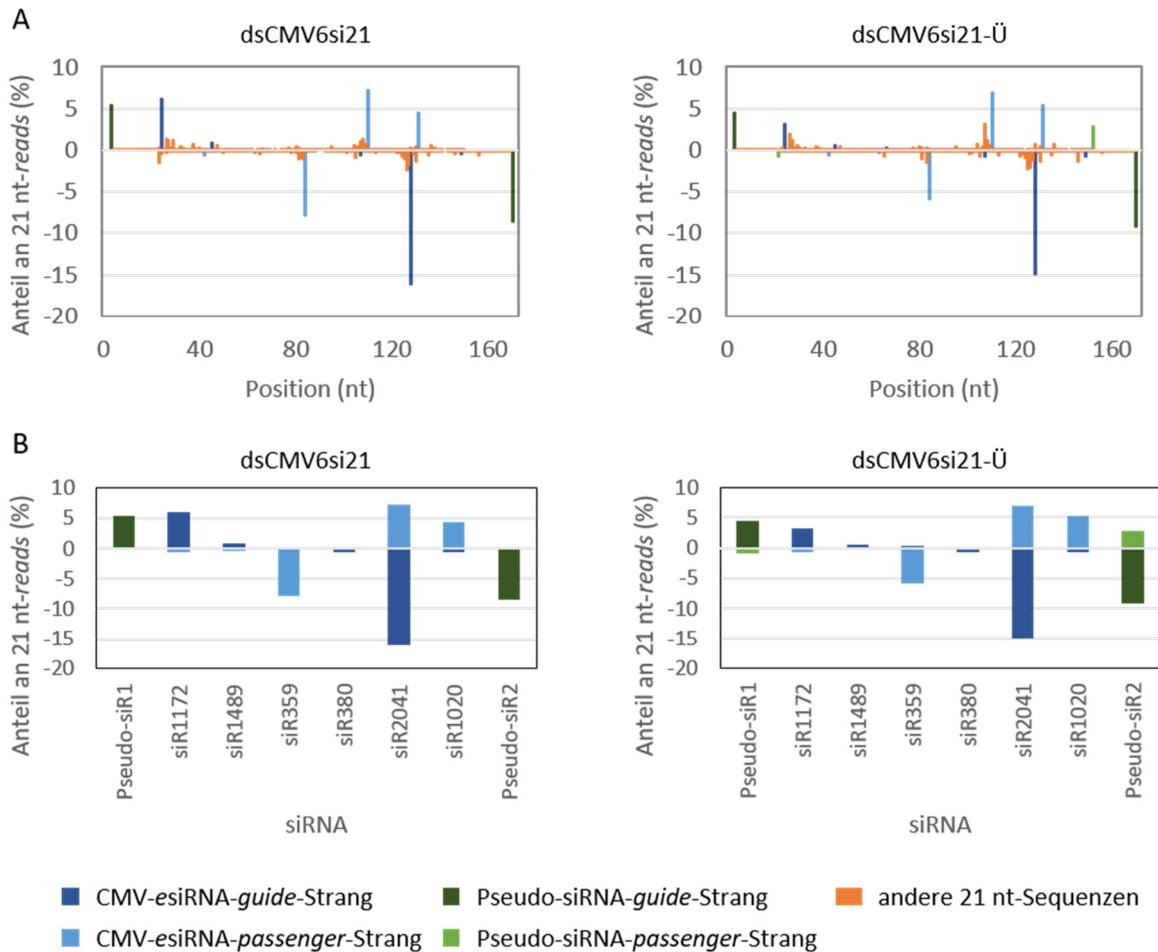


Abbildung 29 Anteil der 21 nt esiRNA-reads an der Gesamtheit aller 21 nt-reads. (A) Anteil der esiRNA-*guide*- und -*passenger*-Strang-reads basierend auf deren Position auf dem DCL-Substrat dsCMV6si21 bzw. dsCMV6si21-Ü. **(B)** Anteil der *guide*- und -*passenger*-Strang-reads pro siRNA. Werte oberhalb der x-Achse repräsentieren *reads* des einen, Werte unterhalb der x-Achse *reads* des anderen dsRNA-Stranges und sind als Beträge zu verstehen.

Im direkten Vergleich der zwei verschiedenen dsRNA-Konstrukte schien sich die Prozessierung der siRNAs kaum zu unterscheiden. Aus Abbildung 29 sowie Tabelle 14 geht hervor, dass alle CMV-esiRNAs durch DCL4 aus beiden dsRNAs prozessiert wurden. Der Anteil der prozessierten esiRNA-*guide*-Stränge betrug ca. 24 % aus dsCMV6si21 und ca. 21 % aus dsCMV6si21-Ü, bezogen auf die Gesamtheit aller 21 nt-*reads*. Die verschiedenen Termini der beiden dsRNAs schienen in diesem spezifischen Fall also keinen signifikanten Einfluss auf die Prozessierung der dsRNAs durch DCL4 auszuüben. Zudem lagen die CMV-esiRNA-*guide*- und -*passenger*-Stränge zumeist zu höheren Anteilen vor als andere 21 nt lange

Sequenzen. Unter der Annahme, dass eine zufällige, gleichmäßige Generierung aller theoretisch möglichen, 21 nt langen Sequenzen aus der 168 bp langen dsRNA erfolgen würde, könnten je nach dsRNA-Variante 148 bzw. 150 verschiedene Sequenzen pro Einzelstrang entstehen. Dies gilt für beide Einzelstränge der dsRNA, wodurch insgesamt 296 bzw. 300 verschiedene, 21 nt lange Sequenzen aus den Konstrukten prozessiert werden könnten. Jede dieser 21 nt langen Sequenzen würde somit je nach dsRNA-Variante theoretisch mit einer Häufigkeit von 0,34 % bzw. 0,33 % auftreten. Die 21 nt langen, CMV-*guide*-Stränge aus beiden edsRNAs lagen jedoch, mit Ausnahme des *guide*-Stranges der siR359, zu höheren Anteilen vor (vgl. Tabelle 14).

Tabelle 14 Prozentualer Anteil der *guide*- und *passenger*-Stränge CMV-spezifischer esiRNAs an den 21 nt-*reads*. Die Prozessierung der doppelsträngigen RNAs erfolgte durch endogene DCLs des BYL.

	dsCMV6si21		dsCMV6si21-Ü	
	<i>guide</i> -Strang (%)	<i>passenger</i> -Strang (%)	<i>guide</i> -Strang (%)	<i>passenger</i> -Strang (%)
Pseudo-siR1	5,40	-	4,46	0,82
siR1172	6,09	0,65	3,19	0,66
siR1489	0,85	0,32	0,60	0,35
siR359	0,14	7,88	0,32	5,91
siR380	0,67	0,05	0,79	0,06
siR2041	16,18	7,18	14,91	6,96
siR1020	0,54	4,45	0,74	5,36
Pseudo-siR2	8,55	-	9,22	2,91
gesamt	38,42	20,52	34,23	23,04

Weiterhin fällt auf, dass sich die Häufigkeit von *guide*- und *passenger*-Strang derselben esiRNA eines Konstruktes stark unterschieden. In der Mehrheit der Fälle war der Anteil des jeweiligen *guide*-Stranges höher als der des dazugehörigen *passenger*-Stranges. Zudem variierte die Häufigkeit der CMV-esiRNAs untereinander. Die Pseudo-siR1- und Pseudo-siR2-*passenger*-Stränge konnten basierend auf den Daten der dsCMV6si21 nicht detektiert werden, da aufgrund der *blunt ends* die zwei 3'-terminalen Nukleotide der *passenger*-Stränge fehlen und somit kein *mapping* möglich war. Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Häufigkeiten der verschiedenen esiRNA-*guide*- und -*passenger*-Stränge sowie mögliche Hinweise auf die Art der Prozessierung der dsRNAs durch DCL4 werden in Abschnitt 4.4.2 diskutiert. Zusammenfassend kann jedoch festgestellt werden, dass das Design der dsRNAs nicht nur zur Prozessierung von 21 nt langen siRNAs im Allgemeinen geführt hat, sondern dass ein erheblicher Anteil dieser 21 nt siRNAs den effizienten CMV-esiRNAs entspricht.

3.3.4 Charakterisierung der antiviralen Wirkung der edsRNAs *in planta*

Nachdem die erfolgreiche Spaltung der genomischen CMV-RNA 2 durch die spezifisch designten edsRNAs (dsCMV6si21 und dsCMV6si21-Ü) *in vitro* nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 26), sollten die dsRNAs auch *in planta* auf ihre protektive Wirkung in Bezug auf eine CMV-Infektion analysiert werden. Dazu wurde aufgrund experimenteller Limitationen (Anzahl der benötigten Pflanzen sowie benötigte Fläche in Pflanzenanzucht-Kammern) eine der beiden dsRNA-Versionen, dsCMV6si21-Ü mit den 2 nt 3'-Überhängen, für die weiteren Experimente ausgewählt. Grund hierfür war die Tatsache, dass durch die Prozessierung von dsRNAs in siRNAs durch DCLs 2 nt 3'-Überhänge generiert werden und die dsRNA mit den entsprechenden 2 nt langen 3'-Überhängen somit als authentischeres DCL-Substrat betrachtet werden könnte [104].

3.3.4.1 Schutz vor einer CMV-Infektion *in planta* durch dsCMV6si21-Ü

Zum Test der Wirksamkeit der aus den CMV-esiRNAs designten dsRNAs wurden Pflanzen-Infektionsexperimente durchgeführt. Dazu wurden vier bis fünf Wochen alte *N. benthamiana*-Pflanzen mit je 20 fmol der drei genomischen CMV-RNAs sowie 8 µg der RNA „dsCMV6si21-Ü“ in Inokulationspuffer mechanisch mittels Carborundum co-inokuliert. Die Pflanzen wurden anschließend über einen Zeitraum von 35 Tagen hinsichtlich des Auftretens CMV-spezifischer Symptome beobachtet. Zum Vergleich wurden die zwei gleich langen Kontroll-Konstrukte (dsCMV und dsGFP) verwendet, die bereits in Abschnitt 3.3.1 beschrieben wurden. Eines der Konstrukte bestand aus einer kontinuierlichen CMV-Sequenz, die aus RNA 2 abgeleitet wurde (dsCMV), das andere aus einem Fragment einer GFP-mRNA (dsGFP). Zudem wurde eine weitere Variante der dsRNA, bestehend aus CMV-siRNAs, erstellt. Bei dieser Variante besaßen alle CMV-esiRNAs eine Länge von je 22 nt (dsCMV6si22-Ü). Dazu wurden die bereits identifizierten esiRNAs des Konstruktes „dsCMV6si21-Ü“ basierend auf der Sequenz der genomischen RNA 2 um jeweils ein Nukleotid am 3'-Terminus der jeweiligen siRNA-*guide*-Stränge verlängert und die *passenger*-Stränge entsprechend komplementär angepasst. Eine Übersicht der Konstrukte ist bereits in Abbildung 24 dargestellt worden (s. Abschnitt 3.3.1).

Die Ergebnisse des Infektionsexperiments zeigt Abbildung 30A. Bereits sechs Tage nach Inokulation mit dsGFP und den genomischen CMV-RNAs zeigten 100 % der Pflanzen charakteristische Symptome einer CMV-Infektion. Bei einer Inokulation mit dsCMV und den genomischen CMV-RNAs war der Infektionsverlauf verzögert, aber auch hier wiesen nach 26 Tagen 100 % der mit dieser dsRNA inokulierten Pflanzen deutliche Symptome einer CMV-Infektion auf. Die Co-Inokulation des Konstruktes auf Basis 22 nt langer siRNAs (dsCMV6si22-Ü) mit den genomischen CMV-RNAs bewirkte zwar ebenfalls eine Verzögerung bei der Entstehung CMV-spezifischer Symptome, führte jedoch lediglich bei 30 % der Pflanzen zu einem Schutz vor einer CMV-Infektion. Einzig die dsRNA bestehend

aus bereits charakterisierten 21 nt langen effizienten CMV-siRNAs (dsCMV6si21-Ü) führte nach Co-Inokulation mit den genomischen CMV-RNAs bei 100 % der Pflanzen zu einem Schutz vor einer CMV-Infektion über die gesamte Beobachtungsdauer von 35 Tagen hinweg. Repräsentative Pflanzenfotos sind in Abbildung 30B dargestellt.

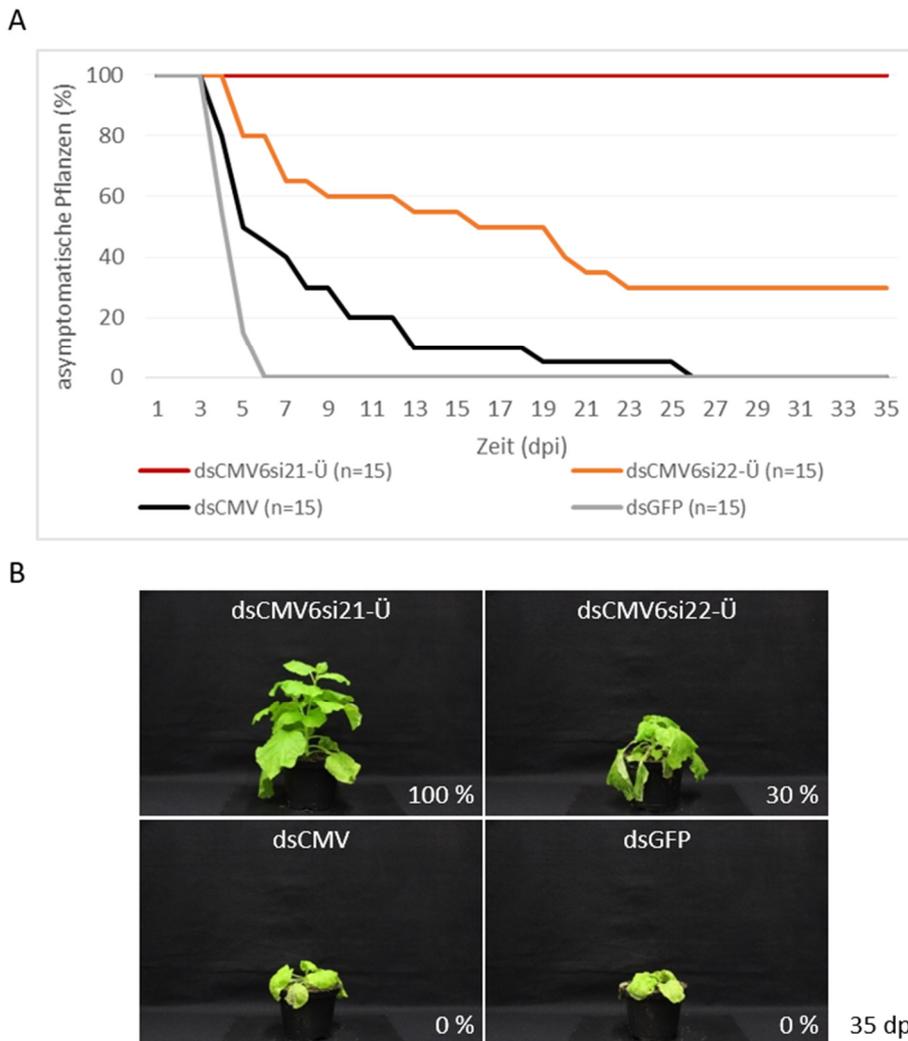


Abbildung 30 Vergleich der protektiven Wirkung verschiedener dsRNAs *in planta*. Vier bis fünf Wochen alte *N. benthamiana*-Pflanzen wurden mit verschiedenen dsRNAs sowie den genomischen CMV-RNAs mechanisch co-inokuliert. **(A)** Prozentualer Anteil asymptomatischer Pflanzen. **(B)** Repräsentative Pflanzenbilder 35 Tage nach der mechanischen Co-Inokulation. Der prozentuale Anteil asymptomatischer Pflanzen pro Behandlung mit einer der genannten dsRNAs ist angegeben.

Es ist somit ein deutlicher Unterschied zwischen der Effizienz des kontinuierlichen CMV-dsRNA-Fragments (dsCMV) und der aus mehreren esiRNAs aufgebauten dsCMV6si21-Ü erkennbar. Dies unterstreicht den klaren Vorteil, den die Methode der Identifizierung spezifischer, effizienter siRNAs mit sich bringt.

Die so identifizierten esiRNAs können, wie hier gezeigt, in einem weiteren Schritt gezielt dazu verwendet werden, hocheffiziente dsRNAs zum Schutz von Pflanzen vor viralen Infektionen zu generieren.

Auf mögliche Ursachen des geringeren protektiven Effektes der RNA basierend auf 22 nt langen CMV-spezifischen siRNAs „dsCMV6si22-Ü“ wird in der Diskussion näher eingegangen. Das Design einer dsRNA aus zuvor *in vitro* und *in planta* charakterisierten 21 nt langen esiRNAs, wie in dieser Arbeit beschrieben, stellt jedoch eine vielversprechende Methode zum Schutz von Wirtspflanzen vor einer CMV-Infektion dar.

3.3.4.2 Einzelstrang-RNA vermittelt keinen Schutz vor einer CMV-Infektion

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, führte der Einsatz von 8 µg dsCMV6si21-Ü nach Co-Inokulation mit den viralen RNAs zum 100%igen Schutz von *N. benthamiana* vor einer CMV-Infektion. Die naheliegende Erklärung ist, dass die dsRNA *in planta* (unter anderem) durch DCL4 prozessiert wird, wodurch die zuvor charakterisierten, effizienten CMV-spezifischen siRNAs 1172, 1489, 359, 380, 2041 und 1020 generiert werden. Diese siRNAs werden anschließend hochaffin von AGO-Proteinen gebunden und vermitteln den effizienten Abbau der viralen RNA 2, wodurch die CMV-Replikation inhibiert und das Auftreten der CMV-spezifischen Symptome verhindert wird.

Denkbar wäre jedoch auch, dass die Hybridisierung der jeweiligen Einzelstränge zur Herstellung der dsRNA *in vitro* unter Umständen unvollständig verlief, z. B. aufgrund nicht exakt äquimolarer Mengen. Somit könnte nach der Hybridisierung weiterhin ein gewisser Anteil einzelsträngiger RNAs vorliegen. Jeweils 21 nt lange Abschnitte dieser Einzelstränge, den einzelnen siRNAs entsprechend, könnten direkt an ihre komplementären Sequenzen innerhalb der viralen RNA 2 binden und somit beispielsweise zum direkten Abbau der resultierenden doppelsträngigen Bereiche durch DCLs oder zur sterischen Hinderung der Translation führen, wodurch ebenfalls ein antiviraler Effekt erzielt werden könnte. Um zu untersuchen, welche der beiden Möglichkeiten als Auslöser des antiviralen Effektes der dsCMV6si21-Ü infrage kommt, wurde folgendes Infektionsexperiment durchgeführt: Vier bis fünf Wochen alte *N. benthamiana*-Pflanzen wurden mit 8 µg der jeweiligen dsRNA bzw. 4 µg der entsprechenden RNA-Einzelstränge zusammen mit je 20 fmol der drei genomischen CMV-RNAs mechanisch co-inokuliert. Im Rahmen dieses Experiments wurde lediglich die bereits als effizient charakterisierte dsCMV6si21-Ü und als Kontrolle die ineffektive dsCMV bzw. deren jeweilige Einzelstränge verwendet. Es wurden jeweils fünf Pflanzen pro Gruppe inokuliert. Abbildung 31 veranschaulicht den Anteil asymptomatischer Pflanzen bis 35 Tage nach der Inokulation. 80% der Pflanzen, die mit der dsCMV6si21-Ü, bestehend aus mehreren CMV-esiRNAs, inokuliert wurden, waren auch 35 Tage nach der Inokulation asymptomatisch.

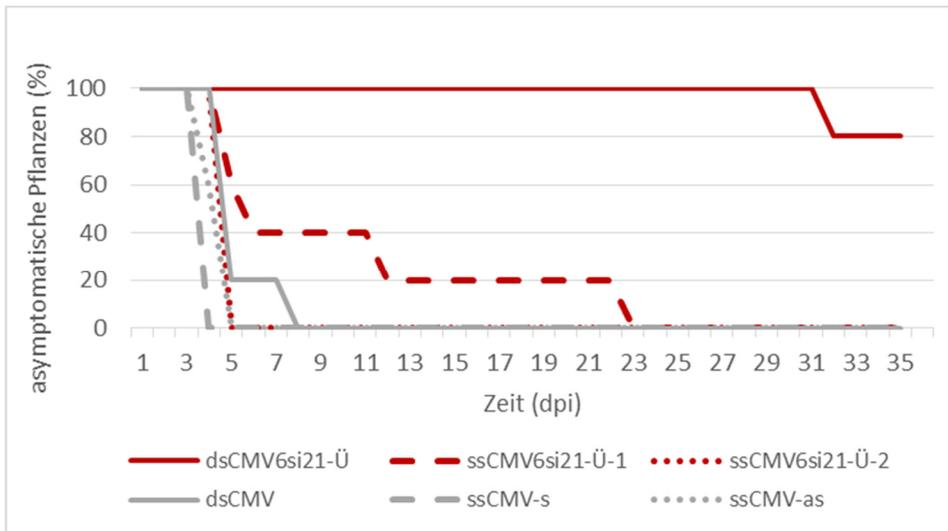


Abbildung 31 Vergleich der protektiven Wirkung doppel- sowie einzelsträngiger RNA *in planta*. Dargestellt ist der prozentuale Anteil asymptomatischer *N. benthamiana*-Pflanzen über einen Zeitraum von 35 Tagen nach mechanischer Inokulation verschiedener dsRNAs bzw. deren jeweiliger Einzelstränge zusammen mit den genomischen CMV-RNAs. Der RNA-Einzelstrang, der die AGO1-präferierten *esiRNA-guide*-Stränge beinhaltet, wurde mit „1“, der RNA-Strang mit den AGO2-präferierten *esiRNA-guide*-Strängen mit „2“ bezeichnet (ssCMV6si21-Ü-1 bzw. ssCMV6si21-Ü-2). Die Einzelstränge, aus denen die Kontroll-RNA dsCMV besteht, wurden basierend auf ihrer Orientierung auf der genomischen CMV-RNA 2 mit „s“ (*sense*, (+)-Strang) bzw. „as“ (*antisense*, (-)Strang) bezeichnet. Pro Behandlung wurden je fünf Pflanzen verwendet (n=5).

Alle Pflanzen, die mit einzelsträngigen RNAs inokuliert wurden, unabhängig davon, ob diese aus einem kontinuierlichen CMV-Fragment oder effizienten *esiRNA*-Sequenzen bestanden, zeigten die charakteristischen Symptome einer CMV-Infektion. Somit konnte belegt werden, dass der protektive Effekt, der durch dsCMV6si21-Ü hervorgerufen wird, auf der Prozessierung durch DCLs in *esiRNAs* und deren hochaffine Bindung durch AGO-Proteine beruht. Die eigens designte *edsRNA* kann somit eine sehr effektive und spezifische *RNA-silencing*-Antwort zur Abwehr von CMV auslösen.

3.3.4.3 Beitrag von AGO1 und AGO2 zum Schutz vor einer CMV-Infektion *in planta*

Der Einbau von siRNAs in AGO-Proteine erfolgt nach gewissen Präferenzen hinsichtlich des 5'-terminalen Nukleotids der siRNA. Von AGO1/RISC werden beispielsweise bevorzugt siRNAs mit 5'U, von AGO2/RISC bevorzugt siRNAs mit 5'A gebunden [45]. In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass das „*sorting*“ einer bestimmten siRNA durch Modifizierung des 5'-terminalen Nukleotids zugunsten des Einbaus in ein anderes AGO-Protein verändert werden kann [43, 45]. Aufgrund dieses Erkenntnis wurde die Nukleotidsequenz der bereits charakterisierten dsCMV6si21-Ü, die aus drei AGO1- sowie drei AGO2-spezifischen siRNAs aufgebaut ist, so modifiziert, dass alle *esiRNA-guide*-Stränge ein 5'-terminales U besitzen (dsCMV6si21-Ü-5'U). Somit sollten sie vorrangig in AGO1 eingebaut werden. In einer zweiten Version der dsCMV6si21-Ü starteten alle *esiRNA-guide*-Stränge mit einem 5'-terminalen A, wodurch sie bevorzugt in AGO2 eingebaut werden sollten

(dsCMV6si21-Ü-5'A). Die jeweiligen *passenger*-Stränge wurden so angepasst, dass eine vollständige Komplementarität der dsRNA gewährleistet wurde. Die gezielte Modifizierung der 5'-Termini der siRNA-*guide*-Stränge und der damit verbundene Einbau der esiRNAs in ein spezifisches AGO sollte Aufschluss darüber geben, welches AGO-Protein, AGO1 oder AGO2, einen größeren Beitrag zur protektiven Wirkung der dsRNA hat.

Zuerst wurden die dsRNAs mit den ursprünglichen sowie den modifizierten 5'-Termini der *guide*-Stränge als DCL-Substrate in den DCL/*Slicer*-Assay eingesetzt und deren Spaltungseffizienz auf dem CMV-RNA 2-*target in vitro* verglichen (s. Abbildung 32).

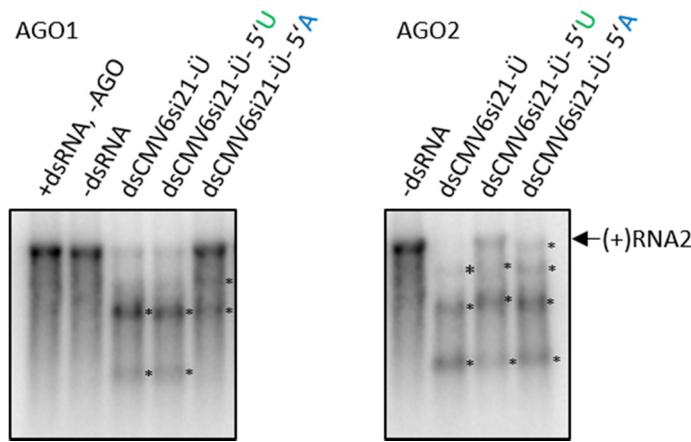


Abbildung 32 Vergleich AGO1- und AGO2-spezifischer dsRNAs *in vitro*. DCL/*Slicer*-Assay mit dsCMV6si21-Ü sowie modifizierten Varianten (5'U bzw. 5'A) als DCL-Substrate und CMV-RNA 2 als *target*-RNA. Die aus drei AGO1- sowie drei AGO2-spezifischen siRNAs bestehende dsCMV6si21-Ü wurde so modifiziert, dass alle esiRNA-*guide*-Stränge ein 5' terminales U besitzen (dsCMV6si21-Ü-5'U) und somit vorrangig in AGO1 eingebaut werden sollten, bzw. so, dass alle esiRNA-*guide*-Stränge ein 5' terminales A besitzen (dsCMV6si21-Ü-5'A) und somit vorrangig in AGO2 eingebaut werden sollten. Sternchen (*) markieren die durch *Slicer*-Aktivität des AGO/RISC generierten Spaltprodukte.

Dabei wurde deutlich, dass AGO1 in Kombination mit der zugunsten von AGO1 modifizierten dsRNA (siRNAs mit 5'U) zu einem deutlich effizienteren Abbau der *target*-RNA führte als mit der zugunsten von AGO2 modifizierten dsRNA (siRNAs mit 5'A). Der Abbau des *targets* unter Verwendung der AGO1-spezifischen dsRNA war vergleichbar mit dem Abbau durch das Originalkonstrukt dsCMV6si21-Ü, sowohl hinsichtlich der Reduktion der *target*-RNA-Menge als auch des erzeugten Spaltfragmente-Musters. Mit der dsRNA bestehend aus siRNAs mit 5'-terminalem A erfolgte nur eine sehr ineffiziente Spaltung des *targets*. Im Falle von AGO2 konnte sowohl mit der AGO2- (5'A) als auch mit der AGO1-spezifischen (5'U) dsRNA ein effizienter Abbau der CMV-RNA 2 erzielt werden, wenn auch etwas besser mit der AGO2-spezifischen dsRNA. Dies legt nahe, dass AGO2 weniger selektiv hinsichtlich des 5'-terminalen Nukleotids ist. Ein nicht präferiertes 5'-terminales Nukleotid hatte in den hier durchgeführten Experimenten einen größeren nachteiligen Effekt auf die *Slicer*-Aktivität von AGO1 als von AGO2. In Wildtyp *N. benthamiana*-Pflanzen kann der Einfluss von AGO1- und AGO2-Proteinen auf

das RNA-silencing nicht wie im BYL unabhängig voneinander betrachtet werden, da beide AGOs vorliegen. Da *in vitro* jedoch gezeigt werden konnte, dass die modifizierten dsRNAs in Kombination mit AGO1 und AGO2 unterschiedlich starke *Slicer*-Aktivitäten hervorrufen, lassen sich dennoch einige Rückschlüsse ziehen.

In Pflanzeninfektionsexperimenten mit lediglich 200 ng des ursprünglichen Konstruktes „dsCMV6si21-Ü“ bzw. je 200 ng der modifizierten dsRNAs (5'U bzw. 5'A) in Gegenwart von je 20 fmol der genomischen CMV-RNAs zeigte sich, dass 100 % der Pflanzen, die mit dsCMV6si21-Ü inokuliert wurden, auch nach 28 Tagen keine Symptome einer CMV-Infektion aufwiesen. Von den Pflanzen, die mit dsCMV6si21-Ü-5'U zusammen mit den genomischen CMV-RNAs inokuliert wurden, zeigten nach 28 Tagen 83 % der Pflanzen keine Symptome. Bei Behandlung mit dsCMV6si21-Ü-5'A in Gegenwart der genomischen CMV-RNAs waren jedoch nur 33 % der Pflanzen vor einer CMV-Infektion geschützt. Die mit dsGFP und den genomischen CMV-RNAs inokulierten Pflanzen zeigten bereits nach sechs Tagen zu 100 % die für eine CMV-Infektion charakteristischen Symptome (s. Abbildung 33).

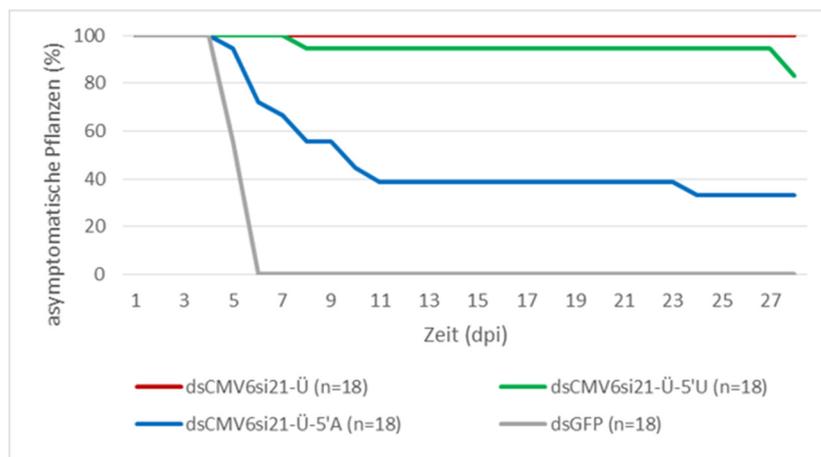


Abbildung 33 Vergleich AGO1- und AGO2-spezifischer dsRNAs *in planta*. Dargestellt ist der prozentuale Anteil asymptomatischer *N. benthamiana*-Pflanzen über einen Zeitraum von 28 Tagen nach mechanischer Inokulation der dsCMV6si21-Ü bzw. modifizierter dsRNA-Varianten (5'U bzw. 5'A) zusammen mit den genomischen CMV-RNAs.

Es sind somit deutliche Unterschiede in der Effizienz der modifizierten dsRNAs erkennbar. Die aus esiRNAs mit 5'-terminalem U aufgebaute dsRNA vermittelte einen deutlich effizienteren Schutz vor einer CMV-Infektion als die dsRNA mit den siRNAs mit 5'-terminalem A. Der protektive Effekt der dsCMV6si21-Ü-5'U ist ähnlich zu dem der ursprünglichen dsRNA, bestehend aus AGO1- und AGO2-präferierten esiRNAs. Da *in vitro* zuvor gezeigt werden konnte, dass die dsRNA mit den 5'U-siRNAs nicht nur mit AGO1, sondern auch mit AGO2 sehr effizient zum Abbau der CMV-RNA 2 führt, kann aus den Ergebnissen dieses Infektionsexperiments nicht direkt geschlossen werden, dass AGO1 allein ausreichend für einen sehr effizienten Schutz von *N. benthamiana* vor einer CMV-Infektion ist. Es

konnte jedoch gezeigt werden, dass AGO2-präferierte siRNAs allein nicht den gleichen effizienten Schutz vermitteln können wie AGO1-präferierte siRNAs. Somit ist naheliegend, dass AGO1 eine wichtige Rolle im antiviralen RNA-*silencing* spielt bzw. dass AGO2 allein für die beobachtete Schutzwirkung vor einer CMV-Infektion nicht ausreichend ist. Ob die Kombination von AGO1 und AGO2 eine stärkere antivirale Wirkung erzielen würde als AGO1 allein, lässt sich anhand der durchgeführten Experimente allerdings nicht beantworten. Die hier gewonnenen Daten liefern jedoch einen Hinweis darauf, dass AGO1 und AGO1-präferierte siRNAs im Schutz gegen eine CMV-Infektion in *N. benthamiana* einen ausgeprägteren Effekt erzielen.

IV. DISKUSSION

Pflanzenviren sorgen weltweit für ökonomische Schäden erheblichen Ausmaßes und werden bisher noch größtenteils durch konventionelle Methoden wie den massiven Einsatz von Pestiziden bekämpft [91]. In den letzten Jahren haben jedoch neue, innovative Methoden zum Pflanzenschutz, basierend auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz, zunehmend an Bedeutung gewonnen [66, 69]. Die meisten zugrundeliegenden zellulären Abläufe des antiviralen RNA-*silencing* in Pflanzen und essentielle Kernkomponenten der RNA-*silencing*-Maschinerie sind bekannt und lassen sich anhand eines pflanzlichen *in-vitro*-Systems, des BYLs, rekonstituieren [44, 95, 96]. Auf dieser Grundlage wurden in der vorliegenden Arbeit siRNAs gegen das *Cucumber mosaic virus* identifiziert und charakterisiert. Die individuellen siRNAs (esiRNAs) mit der höchsten Effizienz in *Slicer*-Assays und dem deutlichsten protektiven Effekt in Pflanzeninfektionsexperimenten bildeten den Ausgangspunkt für das Design längerer, effizienter dsRNAs (*edsRNAs*).

4.1 Systematische Identifizierung und Charakterisierung antiviraler esiRNA-Wirkstoffe in einem pflanzlichen *in-vitro*-System

Im Rahmen des natürlichen, antiviralen RNA-*silencing* wird in Pflanzenzellen ein Pool aus diversen siRNAs gebildet, die sich von den viralen genomischen RNAs ableiten. Dieser Pool besteht aus siRNAs verschiedenster Sequenzen, wobei die individuellen siRNAs unterschiedlich häufig auftreten und sich darüber hinaus in ihrem antiviralen Potential stark unterscheiden können. Nur sehr wenige der generierten siRNAs vermitteln tatsächlich eine effektive antivirale Immunantwort [43, 44, 51-53, 105, 106]. Ineffektive siRNAs könnten z. B. als *decoy* („Köder“) agieren und die *silencing*-Maschinerie sättigen [57, 58]. Infolgedessen können sie RISCs zu unzugänglichen *target sites* leiten, die kein *slicing* der viralen RNA durch AGO ermöglichen, wodurch die entsprechenden siRNAs keine Gefahr für das Pathogen darstellen. Dass im Rahmen der RNA-*silencing*-Reaktion der Pflanze vsiRNAs entstehen, denen gegenüber das Pflanzenvirus weniger vulnerabel zu sein scheint, ist aufgrund der Koevolution von Viren und deren Wirtspflanzen naheliegend. Des Weiteren können einige der generierten siRNAs auch zelluläre mRNAs des Wirts beeinflussen, die bspw. für Proteine mit Beteiligung an der pflanzlichen Immunreaktion codieren [52, 59, 107]. Außerdem ist bisher nicht geklärt, welche Eigenschaften besonders effektive siRNAs charakterisieren bzw. wie die Unterscheidung effektiver von ineffektiven siRNAs erfolgen kann. Es gibt Ansätze, effektive siRNAs mittels *in-silico*-Methoden vorherzusagen. Dabei werden vor allem konservierte Bereiche der RNA sowie potentiell zugängliche RNA-Sequenzen der *targets* herangezogen. Doch durch die bisher geringe Zuverlässigkeit dieser *in-silico*-Methoden sind zusätzliche empirische Studien zur Testung der identifizierten Kandidaten unumgänglich [108]. Bei einer anderen Methode ist die Herangehensweise umgekehrt. Hier wird virale RNA aus infizierten

Pflanzen isoliert und mittels Identifizierung von RISC-generierten Spaltfragmenten auf die entsprechenden siRNAs rückgeschlossen. Diese Methode ist jedoch zum einen technisch aufwendig, zum anderen besitzt sie inhärente Einschränkungen. SiRNAs, die in der Pflanzenzelle nur in geringen Mengen vorliegen, sowie siRNAs, die möglicherweise durch Bindung an VSRs inaktiviert wurden, werden bei dieser Vorgehensweise nicht berücksichtigt [51-53, 105].

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Kombination aus AGO-Immunpräzipitation, NGS und *Slicer*-Assay konnten jedoch gleich mehrere effektive siRNAs gegen CMV identifiziert werden. Wie anhand von *Slicer*-Assays gezeigt werden konnte, vermittelte die Mehrheit der identifizierten siRNAs *in vitro* eine deutlich erkennbare *Slicer*-Aktivität in Kombination mit AGO1 bzw. AGO2 und zeigte darüber hinaus einen ausgeprägten protektiven Effekt gegenüber einer CMV-Infektion in Infektionsexperimenten mit *N. benthamiana*. Die positive Korrelation zwischen *in-vitro*-Aktivität und *in-planta*-Effekt einer siRNA spricht für den enormen Nutzen dieser Herangehensweise sowie deren Zuverlässigkeit verglichen mit bisherigen *in-silico*-Methoden. Die erhaltenen Daten stimmen ebenfalls mit Ergebnissen zur *in-vitro*-Identifizierung effizienter siRNAs gegen das *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) überein, wofür dieselbe Methode genutzt wurde. Auch hier gab es eine Korrelation zwischen *in-vitro*-Daten und protektivem Effekt einer siRNA in Infektionsexperimenten in *N. benthamiana* [43]. Dass jedoch nicht alle identifizierten siRNA-Kandidaten zu dem gewünschten antiviralen Effekt führten, deutet ebenfalls auf Limitationen dieses Verfahrens hin bzw. auf die Komplexität der Faktoren, die für die Effizienz einer siRNA entscheidend sind. Darum kann die Effizienz einer siRNA unter den im Rahmen dieser Arbeit gewählten Reaktionsbedingungen auch nicht absolut bestimmt werden. Diese ist u. a. abhängig von der BYL-Charge. Aufgrund der Anzahl durchgeführter Experimente wurden mehrere BYL-Chargen benötigt, die unter anderem in Faktoren wie dem RNase- und Protease-Gehalt, der Translationseffizienz und der Chaperon-Aktivität variieren können. Dies kann sich wiederum z. B. auf die Rekonstitution des RISC auswirken.

Die Vorteile der Methode liegen jedoch klar auf der Hand. Die *in-vitro*-basierte Methode zur systematischen Identifizierung sowie zur funktionellen Charakterisierung von esiRNAs eines gewünschten Pathogens, in diesem Fall von CMV, kann reproduzierbar und zügig durchgeführt werden. Der Machbarkeitsnachweis (*proof-of-principle*) wurde bereits anhand des Schutzes von *N. benthamiana* vor einer TBSV-Infektion erbracht [43]. Zudem muss nur der finale Schritt in Pflanzen durchgeführt werden. Alle vorherigen Schritte erfolgen ausschließlich *in vitro*. Hierbei ist das genutzte System auf Basis eines zytoplasmatischen Extrakts lysierter, entvakuolisierter *N. tabacum bright-yellow-2*-Protoplasten (BYL) der pflanzlichen antiviralen Immunantwort sehr ähnlich. Es bildet sowohl die Prozessierung von dsRNAs durch DCLs als auch die gezielte Programmierung von definierten AGO/RISCs mit siRNA-Pools oder konkreten siRNA-Kandidaten und deren Effekt auf eine ausgewählte *target*-RNA authentisch und spezifisch nach. Die Einschränkungen des Systems beruhen auf der

Komplexität der Faktoren, die die Effizienz einer siRNA beeinflussen können (s. Abschnitt 4.2). Das Hauptaugenmerk bei der Identifizierung von siRNAs mittels dieser *in-vitro*-Prozedur liegt auf der Affinität der siRNAs zum entsprechenden AGO-Protein. Die Bindungsaffinität eines siRNA-Duplex oder eines siRNA-Einzelstranges zu einem AGO-Protein ist ein wesentlicher, jedoch nicht der alleinige Grund für dessen antiviralen Effekt. Das antivirale Potential einer siRNA ist auch abhängig von der Zugänglichkeit der *target site* für die Spaltung durch den RISC [43, 44, 54-56]. Doch die Ermittlung der Strukturen langer RNAs *in silico* ist nach wie vor schwierig. Der im Rahmen der zuvor beschriebenen *in-vitro*-Methode angewandte *Slicer*-Assay stellt somit ein nützliches Tool zur Bestimmung zugänglicher Bereiche der *target*-RNA für die RISC-vermittelte Spaltung dar. Es kann zwar anhand der ermittelten siRNAs mit hoher AGO-Affinität keine Vorhersage über die Zugänglichkeit jeder individuellen *target site* gemacht werden, diese jedoch mittels *Slicer*-Assay empirisch und unkompliziert ermittelt werden. Trotz dieser Tatsache wurden, nach einer siRNA-Analyse für CMV-RNA 3, siRNAs identifiziert, die *in vitro* eine *Slicer*-Aktivität auf der *target*-RNA zeigten, *in planta* jedoch keinen ausgeprägten protektiven Effekt erzielten (s. Abschnitt 3.2.4.1). Aufgrund der zuvor mehrfach festgestellten positiven Korrelation zwischen *Slicer*-Aktivität *in vitro* und protektivem Effekt *in planta* (vgl. Ergebnisse mit RNA 2-spezifischen esiRNAs; siehe auch [43]) entsprachen diese Ergebnisse nicht den Erwartungen. Die bisherige Hypothese, dass von der Effizienz einer identifizierten siRNA *in vitro* auch Rückschlüsse auf deren protektives Potential *in planta* gezogen werden können, wird durch die unerwarteten Ergebnisse im Hinblick auf die RNA 3-spezifischen siRNAs jedoch nicht grundlegend in Frage gestellt. Um die Diskrepanz bezüglich der *in-vitro/in-planta*-Korrelation gegenüber vorherigen Ergebnissen mit TBSV-siRNAs bzw. mit RNA 2-spezifischen siRNAs aus CMV zu untersuchen, wurden die RNA 2- und RNA 3-spezifischen esiRNA-Kandidaten einem direkten Vergleich unterzogen.

4.2 Einfluss verschiedener Parameter auf die Effizienz identifizierter siRNAs

Im direkten Vergleich RNA 2- und RNA 3-spezifischer esiRNAs in *Slicer*-Assays konnte quantitativ nachgewiesen werden, dass die getesteten RNA 2-spezifischen esiRNAs die höhere *slicing*-Aktivität mit AGO1 sowie AGO2 vermitteln (vgl. Abbildung 20). Die Ursachen für die beobachteten Unterschiede in *Slicer*-Assays und Infektionsexperimenten sind spekulativ und könnten durch folgende Faktoren hervorgerufen werden: Unterschiede in AGO-Bindungsaffinitäten, unterschiedliche Stabilität und/oder unterschiedliche Menge der *target*-RNAs oder Einfluss RNA-bindender Proteine *in vitro* und *in planta*. Da in kompetitiven *Slicer*-Assays jedoch gezeigt werden konnte, dass einige RNA 3-spezifische esiRNAs vor allem durch AGO2 mit einer höheren Affinität gebunden wurden als einige der RNA 2-spezifischen esiRNAs, scheinen unterschiedliche AGO-Bindungsaffinitäten der RNA 2-

bzw. 3-spezifischen esiRNAs nicht der Grund für das geringere protektive Potential RNA 3-spezifischer esiRNAs *in planta* zu sein (vgl. Abbildung 21).

Eine weitere Erklärung könnten Unterschiede in der Stabilität der *target*-RNAs sowie deren Zugänglichkeit sein. Bisher wurden keine Modelle zur Sekundärstruktur der genomischen CMV-RNAs publiziert und *in-silico*-Prognosen zur Faltung längerer RNAs sind oft ungenau, weshalb über den Einfluss dieses Faktors ohne weitere experimentelle Daten keine Aussage getroffen werden kann. Anhand der ähnlichen Zugänglichkeit von siRNA-*target sites* in den *in-vitro*- und *in-planta*-Assays, scheint es jedoch naheliegend, dass unter den gegebenen *in-vitro*-Bedingungen die Faltung der *target*-RNA ähnlich zur Faltung unter *in-vivo*-Bedingungen erfolgt. Über die Sekundär- und Tertiärstruktur der RNAs hinaus könnten auch RNA-bindende Proteine eine Rolle spielen. Diese könnten die verschiedenen *target*-RNAs in unterschiedlichem Maße binden und stabilisieren bzw. die Zugänglichkeit für RISCs erschweren und die RNAs somit vor der endonukleolytischen Hydrolyse schützen. Es ist bspw. bekannt, dass die Expressionslevel der Replikase-Proteine 1a und 2a verglichen mit denen des *movement*- (3a) und des *coat*-Proteins (3b) sehr niedrig sind [83]. Es könnte daher spekuliert werden, dass RNA 3 in größerem Maße translatiert wird und somit stärker von Proteinen der Translationsmaschinerie besetzt ist. Dies könnte die Zugänglichkeit für RIS-Komplexe erschweren und indirekt zu einer Stabilisierung von RNA 3 gegenüber RNA 2 bzw. RNA 1 führen.

Zudem besitzen die zwei ausgewählten *target*-RNAs in der Zelle eine unterschiedliche Abundanz, wobei RNA 3 und 4, die für das CP codieren, häufiger vorliegen als RNA 2 [80]. Der protektive Effekt einer siRNA könnte daher auch vom Level der *target*-RNA abhängig sein. Das bedeutet, die Anforderungen an die Effizienz einer siRNA, um eine systemische Ausbreitung der Infektion zu unterdrücken, könnten für weniger abundante *target*-RNAs geringer sein. Dies könnte ein weiterer Grund dafür sein, dass die im Zusammenhang mit RNA 2 identifizierten esiRNAs *in planta* einen besseren protektiven Effekt erzielen als die aus RNA 3 stammenden esiRNAs. Zusätzlich hat eine aus dem *screening* mit RNA 3 identifizierte siRNA, siR1569, auch RNA 4 als *target*. Dies könnte sich *in planta* negativ auf den protektiven Effekt auswirken, weil dann möglicherweise weniger RNA 3 gespalten wird.

Auch die Funktion des Proteins, das von der jeweiligen *target*-RNA codiert wird, könnte den protektiven Effekt beeinflussen [80]. RNA 2 könnte daher *in planta* im Allgemeinen das effektivere *target* darstellen, da durch dessen Abbau die Translation des 2a-Proteins, der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase, inhibiert wird. Die RdRp ist für die Minusstrang-Synthese sowie die erneute Plusstrang-Synthese ausgehend von Minusstrang-RNA verantwortlich und somit für die CMV-Replikation essentiell [86].

Außerhalb des Labors, unter natürlichen Bedingungen, können zusätzlich noch weitere Virus-spezifische Faktoren die antivirale Effizienz einer siRNA beeinflussen. Dazu zählt die Sequenzvariabilität

der RNA-Sequenz, speziell im Hinblick auf die siRNA-*target sites*. Die Replikation von RNA-Viren ist durch das Fehlen einer *proofreading*-Exonuklease-Aktivität der RdRp fehleranfällig [109, 110]. Zusammen mit einer kurzen Generationsdauer führt dies zu einer hohen Evolutionsrate und somit zu schnellen Veränderungen der Virulenz, was dem Erhalt der Infektiosität zugutekommt. Zudem erhöht die weitverbreitete Nutzung resistenter Kultursorten signifikant den Selektionsdruck, wodurch sich regelmäßig Viren entwickeln, die diese Resistenzen brechen können [111]. In *N. benthamiana* konnte gezeigt werden, dass miRNAs, die in ihrer 3'-Region bis zu drei *mismatches* zur *target*-Sequenz aufweisen, häufig genauso effektiv sind wie miRNAs mit vollständiger Komplementarität zur *target site* [112]. Im Gegensatz dazu führte ein einziges *mismatch* am 5'-Ende der miRNA zu einer starken Reduktion der miR-vermittelten Repression des *targets*. Zwei oder mehr *mismatches* am 5'-Ende, einzelne *mismatches* an den Positionen 9 oder 10 sowie Kombinationen von *mismatches* an den Positionen 9, 10 und 11 der miRNA verhinderten die *target*-Repression komplett [112]. Diese Anforderungen an die miR-*target*-Komplementarität sollten auch auf siRNAs und ihre *targets* übertragbar sein. Somit können Veränderungen in der genetischen Zusammensetzung einer Viruspopulation die Effizienz von „*disease-control*-Strategien“ erheblich beeinträchtigen [82].

Dass CMV weltweit verbreitet ist und das umfangreichste Wirtsspektrum bisher bekannter Pflanzenviren besitzt, spricht für seine große evolutionäre Kapazität und damit für die Fähigkeit, sich an neue Wirte und Umgebungen schnell anzupassen [111].

Viren sind obligatorische Parasiten, die im Zuge ihres Infektionszyklus verschiedene Wirtsfaktoren benötigen. Dadurch ist die Evolution viraler Proteine auch in gewissem Maße abhängig von ihrer Interaktion mit Wirtsfaktoren bzw. unterliegt demnach gewissen Restriktionen [111]. Im Fall von CMV sind die evolutionären Einschränkungen für die Proteine 1a (Methyltransferase, RNA-Helikase), 3a (MP) und 3b (CP) größer als die für 2b (Suppressor des RNA-*silencing*) und 2a (virale Replikase) [82]. RNA 1 unterliegt stärkeren evolutionären Einschränkungen als die beiden anderen genomischen RNAs [79]. Es wird vermutet, dass die Evolution des 1a-Proteins sehr stark von der nötigen Kompatibilität mit Wirtspoteinen abhängig ist, mit denen es während der viralen Replikation interagiert [111]. Das *alignment* mehrerer 2b-Sequenzen hingegen zeigte, dass 2b (codiert von RNA 2 bzw. RNA 4A) das Protein des CMV-Genoms mit der größten genetischen Variabilität ist, obwohl die C-terminale Sequenz, bestehend aus ca. 17 Aminosäuren, sehr konserviert ist [79, 82]. Analysen von CMV-Infektionen in Sojabohnen legten nahe, dass das *movement*-Protein (3a, codiert von RNA 3), welches für die Bewegung innerhalb des Wirts zuständig ist, aufgrund seiner Interaktion mit der Wirtspflanze höheren Limitationen unterliegt [83, 111]. Das *coat*-Protein (3b, codiert von RNA 3 bzw. RNA 4) interagiert hauptsächlich mit der viralen RNA oder sich selbst und kaum mit dem Wirt [83]. Auch die Interaktionen mit Faktoren des Blattlausvektors werden als gering angesehen und sind eher unspezifisch, da CMV durch mehr als 85 Blattlausarten übertragen werden kann [83].

Weitere konservierte Bereiche des CMV-Genoms befinden sich an den 3'-Enden der genomischen RNAs. Diese enthalten die Promotoren für die virale Replikation der Plus- und Minusstränge und interagieren mit den Proteinen der Replikase, 1a und 2a. Der Minusstrang-Promotor ist klar definiert und stark konserviert [83]. Aufgrund der Konservierung könnten sich die 3'-Enden der CMV-RNAs als *target* anbieten. Es gibt jedoch auch Argumente, die dagegen sprechen. Das CMV-Genom weist an den 3'-Enden tRNA-artige Strukturen (*tRNA-like structure*, TLS) auf. Für das *Brome mosaic virus* (BMV), einen Verwandten des CMV, ist bekannt, dass die 3'-Region der genomischen RNAs mit ihrer tRNA-artigen Struktur auch in die Regulation der Translation involviert ist und eine zentrale Rolle im BMV-Lebenszyklus innehat [113]. Nachdem das Virus in die Wirtszelle gelangt ist, müssen im ersten Schritt des Infektionszyklus die viralen Enzyme für die RNA-Replikation synthetisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die BMV-TLS eine entscheidende Rolle bei der Translation dieser Enzyme spielt. Darüber hinaus liegen in der 3'-TLS auch die Signale für den Start der Minusstrang-Synthese [113]. Die ausgeprägte Sekundärstruktur der RNAs im Bereich der TLS sowie die Bindung durch Proteine der Translationsmaschinerie sowie des Replikasekomplexes könnten sich negativ auf die Zugänglichkeit dieser RNA-Bereiche für RISC auswirken und würden somit gegen eine Eignung dieser RNA-Bereiche als RNAi-*targets* sprechen. Damit übereinstimmend konnten im Rahmen dieser Arbeit keine effizienten siRNAs aus dem 3'-Bereich der CMV-RNAs 2 und 3 identifiziert werden.

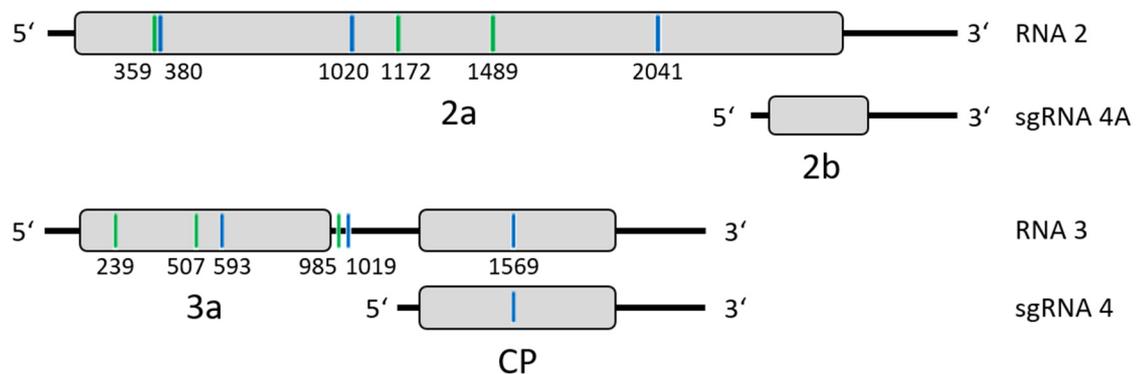


Abbildung 34 Schematische Darstellung der target sites effizienter siRNAs aus RNA 2 und RNA 3. Die Positionen der individuellen target sites sind in Form von Strichen innerhalb der gekennzeichneten ORFs (graue Boxen) dargestellt und mit der Nummer der zugehörigen siRNA bezeichnet. Bindestellen AGO1-präferierter esiRNAs sind grün und Bindestellen AGO2-präferierter esiRNAs blau dargestellt.

Die in dieser Arbeit identifizierten siRNAs, die *in vitro* den höchsten antiviralen Effekt vermittelten, stammen aus dem ORF des 2a-Gens der RNA 2. RNA 3-spezifische esiRNAs stammen vor allem aus dem ORF des *movement*-Proteins 3a, aber auch aus dem ORF des *coat*-Proteins (3b) sowie aus dem untranslatierten Bereich zwischen beiden ORFs (s. Abbildung 34). Da die esiRNAs aus RNA 3 sich *in planta* als weniger effizient erwiesen, ist das target mit dem höchsten antiviralen Potential anhand der

in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der ORF des 2a-Gens, das für die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase codiert.

In Hinblick auf den Grad der Konservierung der verschiedenen ORFs des segmentierten CMV-Genoms könnte spekuliert werden, dass es im 2a-ORF aufgrund dessen erhöhter genetischer Variabilität früher oder später zu Mutationen in Bereichen kommen könnte, die mit *esiRNAs* adressiert werden sollen. In der Konsequenz könnte dies bei einer möglichen Anwendung zu Problemen wie z. B. der Immunevasion führen. Aufgrund der signifikanten Bedeutung des 2a-Proteins im Rahmen der CMV-Replikation stellt es jedoch, wie bereits zuvor argumentiert, trotzdem ein vielversprechendes antivirales *target* dar.

Darüber hinaus ist es im Rahmen der hier angewandten *esiRNA-screening*-Methode möglich, einzelne Nukleotide bereits identifizierter *esiRNAs* auf veränderte *target*-RNAs anzupassen und somit zügig auf die potentielle Variabilität der RNA-Sequenz zu reagieren. Ein weiterer, entscheidender Vorteil der Methode ist zudem, dass eine Vielzahl effizienter *siRNAs* identifiziert werden kann und somit auch bei entsprechendem *antigenic drift* oder *shift* des Virus ein zuverlässiger antiviraler Schutz gegeben sein sollte. Dieser *antigenic drift* bzw. *shift* wird durch Veränderungen des RNA-Genoms im Zuge der Replikation bzw. durch Reassortierung des segmentierten Genoms bei Co-Infektion einer Pflanzenzelle mit verschiedenen Viren hervorgerufen. Durch den Einsatz einer Kombination verschiedener *esiRNAs* mit *targets* auf unterschiedlichen Abschnitten des viralen Genoms könnte eine Art Breitbandschutz erreicht und ein *viral escape* verhindert werden.

Abgesehen von den Sequenzveränderungen eines CMV-Stammes im Zuge der Virusevolution gibt es noch eine Vielzahl weiterer CMV-Stämme mit unterschiedlichen RNA-Sequenzen. Vor diesem Hintergrund wurden erste vergleichende Analysen bzgl. der potentiellen Wirksamkeit der in dieser Arbeit identifizierten *esiRNA* gegenüber anderen CMV-Stämmen durchgeführt. Dazu wurden *target sites* CMV (Fny)-spezifischer *siRNAs* mit RNA-Sequenzen anderer CMV-Stämme verglichen.

Tabelle 15 beinhaltet *siRNAs* aus CMV (Fny), die eine deutliche Spaltung der CMV *target*-RNAs vermitteln (vgl. Abbildung 15), deren *target sites* vollständig mit den bekannten Sequenzen zufällig ausgewählter CMV-Stämme der Untergruppe 1A oder 1B übereinstimmen. Von den 19 RNA 2-spezifischen *siRNAs* weisen 16-18 eine vollständig komplementäre *target site* in den genannten CMV-Stämmen der Untergruppe 1A (O, Y, Kor, I17F) auf. Dies trifft ebenfalls auf 10-14 der 16 RNA 3-spezifischen *siRNAs* zu. Bei Vergleichen mit RNA-Sequenzen von CMV-Stämmen der Untergruppe 1B (RB, Nt9) gibt es bereits deutlich weniger Übereinstimmungen (RNA 2: 5-15/19; RNA 3: 5-10/16). Mit zwei ausgewählten Stämmen der Untergruppe 2 (Trk7, Ls) gibt es gar keine vollständigen Übereinstimmungen mit den *target sites* CMV (Fny)-spezifischer *siRNAs*, weshalb sie in Tabelle 15 nicht erwähnt wurden. CMV-Stämme der Untergruppe 1A und 2 sind weltweit verbreitet, Stämme der Untergruppe 1B kommen hauptsächlich in Ostasien vor.

Tabelle 15 Vergleich der *target sites* CMV (Fny)-spezifischer siRNAs mit RNA-Sequenzen weiterer CMV-Stämme. Die Tabelle beinhaltet siRNAs, die aus CMV (Fny) identifiziert wurden und deren *target sites* vollständig mit den Sequenzen ausgewählter CMV-Stämme der Untergruppe 1A und 1B übereinstimmen.

CMV-Stamm	Untergruppe 1A								Untergruppe 1B			
	O		Y		Kor		I17F		Rb		Nt9	
<i>target</i> -RNA	RNA2	RNA3	RNA2	RNA3	RNA2	RNA3	RNA2	RNA3	RNA2	RNA3	RNA2	RNA3
siRNA	149	151	149	151	186	35	149	151	186	35	359	35
	186	239	186	239	359	151	186	239	359	151	540	151
	359	358	359	358	380	239	359	358	380	239	557	592
	380	496	380	592	407	358	380	496	407	358	1982	593
	407	592	407	593	449	507	407	507	449	592	2041	1019
	449	593	449	733	540	733	449	592	540	593		
	540	733	540	985	557	985	540	593	557	1019		
	557	985	557	988	1054	988	557	733	1054	1098		
	1020	988	1054	1098	1172	1019	1020	985	1172	1394		
	1172	1098	1172	1569	1248	1394	1054	988	1248	1569		
	1248	1394	1489		1489		1172	1019	1489			
	1489		1613		1613		1248	1098	1613			
	1982		1982		1982		1613	1394	2041			
	2441		2041		2041		1982	1569	2441			
	2562		2441		2441		2041		2562			
	2727		2562		2562		2441					
			2727				2562					
							2727					

Anhand Tabelle 15 wird ersichtlich, dass einige der identifizierten siRNAs aus CMV (Fny) vermutlich auch einen antiviralen Effekt auf andere CMV-Stämme, zumindest der Untergruppen 1A und 1B, haben dürften. Hierbei spielen die Anforderungen an die Komplementarität zwischen siRNA und *target site* eine wichtige Rolle. Diese Problematik wird in Abschnitt 4.4 näher erläutert (s. *off-target*-Effekte). Durch den Einsatz eines siRNAs-Mixes mit entsprechender Sequenzübereinstimmung mit den genomischen RNAs weiterer CMV-Stämme könnte, bei gegebener Zugänglichkeit der entsprechenden *target sites*, somit ein gleichzeitiger Schutz gegenüber mehreren verschiedenen CMV-Stämmen erzielt werden. Zusammenfassend konnten durch die gewählte Herangehensweise, also die Kombination aus *in-vitro*-Identifizierung und *in-planta*-Verifizierung, mehrere effiziente siRNAs gegen das *Cucumber mosaic virus* ermittelt werden. Eines der Ziele dieser Arbeit, die Steigerung der Wirksamkeit antiviraler RNAi-Ansätze, wurde somit erreicht. Die mittels eines *in-vitro*-Systems identifizierten esiRNA-Wirkstoffe bildeten nachfolgend die Grundlage zum Design effizienter dsRNA und deren Charakterisierung für eine potentielle Anwendung als biologische Pflanzenschutzmittel.

4.3 Rolle verschiedener Kernkomponenten des antiviralen RNA-silencing in *N. benthamiana*

Neben der Identifizierung gegen CMV gerichteter, effizienter siRNAs konnten durch die in dieser Arbeit durchgeführten *in-vitro*- sowie *in-planta*-Assays einige weitere Erkenntnisse über Kernkomponenten des antiviralen RNA-silencing gewonnen werden. Vor allem die Rolle der antiviralen ARGONAUTE-Proteine AGO1 und AGO2 sowie der antiviralen *Dicer-like*-Proteine DCL2 und DCL4 wurde näher betrachtet. Dabei ist zu erwähnen, dass alle erhaltenen Informationen auf Experimenten in Tabak (*in vitro*: *N. tabacum*; *in planta*: *N. benthamiana*) beruhen.

4.3.1 *Nicotiana benthamiana* als Modellpflanze für die Pflanzenvirologie

Die häufig verwendete Modellpflanze *A. thaliana* diente bereits in vielen Studien zur antiviralen Immunität von Pflanzen als experimentelle Grundlage. Sie codiert für zehn AGO-Proteine, wobei für AGO1, 2, 3, 5, 7 und 10 antivirale Rollen nachgewiesen wurden. Diese Analysen in *A. thaliana* wurden durch die große Zahl verfügbarer Mutanten erleichtert. *A. thaliana* ist für Pflanzenphysiologen ein exzellentes Modell, für die Pflanzenvirologie jedoch nicht optimal geeignet, da sie vielen Pflanzenviren nicht als Wirt dient. Demgegenüber ist *N. benthamiana* sehr anfällig für eine Vielzahl von Pflanzenpathogenen wie Viren, Bakterien und Pilzen [114, 115]. Außerdem eignet sich *A. thaliana* weniger zur Untersuchung systemischer Prozesse und wird eher selten für transiente Methoden wie Agroinfiltration oder VIGS-Experimente (Virus-induziertes Gen-Silencing, VIGS) verwendet. Im Gegensatz dazu ermöglicht *N. benthamiana* relativ einfache Experimente auf intrazellulärer Ebene sowie VIGS-Experimente. VIGS ist eine weit verbreitete, auf RNA-Interferenz basierende Technologie zur Herunterregulierung spezifischer Transkripte in einer Vielzahl von Pflanzenarten durch Verwendung modifizierter Genome von Pflanzenviren. Typischerweise werden für die Generierung von VIGS-Vektoren Viren ausgewählt, die ein breites Wirtsspektrum besitzen und nur milde Symptome verursachen [116]. In Pflanzen, die mit unmodifizierten Viren infiziert sind, richtet sich die RNAi-Antwort gegen das Virusgenom selbst. In Pflanzen, die mit genetisch modifizierten Virusgenomen infiziert sind, die Sequenzen aus Genen der Wirtspflanze enthalten, kann VIGS spezifisch gegen die entsprechende mRNA der Wirtspflanze gerichtet werden [117].

Weiterhin ist *N. benthamiana* ein Vertreter der landwirtschaftlich bedeutenden Familie der *Solanaceae*, zu der auch Paprika, Kartoffel, Tomate und Tabak zählen [118]. Das Genom von *N. benthamiana* wurde bereits sequenziert und die entsprechende Information ist frei zugänglich [114, 118]. Aus den genannten Gründen ist *N. benthamiana* als Wirt gut für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Protektionsexperimente zum RNAi-basierten Schutz vor CMV geeignet. Die Infektion mit CMV-RNAs sowie die Protektionsexperimente mit siRNAs oder dsRNAs wurden mittels mechanischer Inokulation unter Verwendung des Abrasivstoffes Carborundum durchgeführt. Dadurch

werden Mikroverletzungen der Blattoberfläche herbeigeführt, um die Aufnahme des Inokulums in die Zellen zu ermöglichen. Es handelt sich dabei zwar um eine artifizielle Methode zur Imitation der viralen Infektion, spiegelt aber eine natürliche CMV-Infektion in Form der Übertragung durch Blattläuse oder über den Kontakt zu anderen infizierten Pflanzen annähernd realistisch wieder. Denn hierbei gelangen die viralen RNAs direkt in die Pflanzenzellen. Auch aus diesem Grund wurde die Infektion nicht mittels Agroinfiltration durchgeführt. Bei dieser Methode können die viralen RNAs erst in der Pflanzenzelle exprimiert werden, nachdem ein Teil des Ti-Plasmids in das Pflanzengenom eingebaut wurde. Die Agroinfiltration ist auch aufgrund des segmentierten CMV-Genoms vermutlich anspruchsvoller. Die mechanische Inokulation hingegen ist zudem weniger zeitaufwendig und erzielte unter den gewählten Reaktionsbedingungen eine sehr hohe Reproduzierbarkeit. Diese Bedingungen wurden durch mehrere Vorversuche ermittelt und führten zur 100%igen Infektion der Kontrollpflanzen vieler unabhängiger Experimente.

4.3.2 Die Rolle von AGO1 und AGO2 in der CMV-Abwehr in *N. benthamiana*

Im Rahmen mehrerer Assays wurden die Aktivitäten von AGO1/RISC und AGO2/RISC miteinander verglichen. Es wurde untersucht, ob der Einbau verschiedener Varianten ausgewählter siRNAs zu Unterschieden in der Spaltungsaktivität führt. Hierbei wurden unterschiedliche siRNA-Längen (21 nt versus 22 nt) sowie unterschiedliche 5'-Nukleotide (5'-Uridin versus 5'-Adenosin) der siRNA-*guide*-Stränge betrachtet. Es wurde festgestellt, dass AGO2 weniger zu differenzieren scheint als AGO1. Zudem lieferten die Vergleiche AGO1- bzw. AGO2-präferierter siRNAs und dsRNAs Hinweise darauf, dass AGO1 und AGO1-präferierte siRNAs im antiviralen RNA-*silencing* einen ausgeprägteren antiviralen Effekt erzielen. Dies passt auch zu dem vorgeschlagenen Modell von Harvey *et al.* [119]. Dabei wird postuliert, dass es mehrere Ebenen der RNAi-abhängigen Abwehr zwischen der Pflanze und den entsprechenden Viren gibt. AGO1 ist Teil der ersten Ebene, AGO2 Teil der zweiten Ebene. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Expressionslevel von AGO1 in *A. thaliana* höher ist als das von AGO2 [37] und dass das AGO2-Level in Virus-infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen zunimmt [120]. Von manchen Viren, z. B. TCV oder auch CMV, kann die erste, AGO1-basierte Ebene umgangen werden, da einige virale Suppressoren wie p38 oder 2b die AGO1-Aktivität inhibieren können. Dann wird die zweite Ebene der antiviralen Abwehr inklusive AGO2 besonders wichtig, um die Virusakkumulation zu beschränken. Normalerweise wird die AGO2-Aktivität durch AGO1 in Kombination mit miR403 reprimiert. Dies geschieht posttranskriptionell durch Bindung von miR403-beladenen AGO1/RISCs an die miR403-*target-site* in der 3'-UTR der AGO2-mRNA [121]. Wird jedoch die AGO1-Aktivität durch VSRs wie p38 oder 2b blockiert, wird dessen repressiver Effekt auf AGO2 aufgehoben und das Level an AGO2-Protein erhöht. Die Aktivierung der zweiten Ebene ist somit eine direkte Konsequenz des Verlustes der ersten Ebene der Virusabwehr [119]. AGO2 dient somit als Backup im Falle des Verlustes

der hauptsächlich auf AGO1 basierenden antiviralen Abwehr gegen CMV. Eine höhere Toleranz von AGO2 bspw. gegenüber siRNAs mit AGO2-untypischem 5'-terminalem U wäre somit vorteilhaft, um auch AGO1-präferierte siRNAs binden zu können und die fehlende Aktivität von AGO1 zu kompensieren oder generell eine breitere RNAi-Antwort zu generieren.

Eine weitere mögliche Erklärung für den geringeren Effekt AGO2-assoziiierter siRNAs lieferten Ludman *et al.* Mittels CRISPR/Cas9-Technologie inaktivierten sie das AGO2-Gen in *N. benthamiana* [122]. Die *ago2*-Pflanzen wiesen unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber verschiedenen Pflanzenviren auf. AGO2 war bspw. eine kritische Komponente in der Abwehr von PVX (*Potato virus X*), TuMV (*Turnip mosaic virus*) und TCV (*Turnip crinkle virus*). Im Gegensatz dazu hatte der AGO2-Mangel keinen signifikanten Einfluss auf den Verlauf einer Tombusvirus- oder CMV-Infektion. Der mangelnde Effekt von AGO2 auf den Verlauf der CMV-Infektion ist unerwartet, da einige Studien einen positiven Effekt von AGO2-Mutanten bzw. AGO2-Inaktivierung auf die CMV-Infektion und die Ausprägung der Symptome in *A. thaliana* demonstriert hatten [18, 119, 123]. Dies deutet auf eine Virus-spezifische antivirale Rolle von AGO2 in Abhängigkeit von der Pflanzenspezies hin. Möglicherweise haben auch andere AGOs (z. B. AGO5) die Funktion von AGO2 in *N. benthamiana* teilweise übernommen [122]. Unabhängig davon zeigt der unerwartete Effekt von AGO2-Mutanten in *N. benthamiana* verglichen mit den früheren Daten aus *A. thaliana*, dass Studien in *A. thaliana* nicht ohne Weiteres auf andere Spezies übertragen werden können und der Einsatz anderer Modellorganismen wie *N. benthamiana* von großer Bedeutung ist.

4.3.3 Unterschiedliche Wirksamkeit 21 nt bzw. 22 nt langer siRNAs in der CMV-Abwehr

Ein Lysat entvakuolisierter *N. tabacum*-Protoplasten bildete die Grundlage des *in-vitro*-Systems zum esiRNA-*screening*. Durch die endogenen DCL-Proteine wurden aus den eigens designten edsRNAs vsiRNAs mit einer Länge von 21, 22 und 24 nt generiert. Hierbei stellten 24 nt siRNAs die vorherrschende Spezies dar. Dies zeigt, dass in dem verwendeten *in-vitro*-System DCL3 (24 nt), aber auch die für die antivirale Immunantwort der Pflanze besonders wichtigen Proteine DCL4 (21 nt) und DCL2 (22 nt) aktiv sind. Dies stimmt mit früheren Daten von Gago-Zachert *et al.* sowie Schuck *et al.* überein [43, 44].

Annacondia *et al.* sequenzierten siRNAs aus CMV (Fny)-infizierten *Arabidopsis*-Blättern zum Zeitpunkt 30 dpi. Von den vsiRNAs, die fast die Hälfte (43,1 %) der sequenzierten sRNAs ausmachten, stellten 21 nt siRNAs mit 70,2 % den größten Anteil dar, gefolgt von 22 nt siRNAs mit 18,1 % [124]. Dies stimmt mit der postulierten hierarchischen Wirkungsweise von DCL4 und DCL2 in der Generierung viraler siRNAs überein. Auch in Analysen von Donaire *et al.*, bei denen vsiRNAs aus mit CMV (Fny) infizierten *Arabidopsis*-Pflanzen sequenziert wurden, waren 21 nt lange siRNAs die am häufigsten vertretene Spezies, gefolgt von siRNAs mit 22 nt Länge [125]. Ähnliches wurde auch von Kakiyama *et al.* in

Protoplasten gezeigt, die aus *Arabidopsis*-Sämlingen gewonnen wurden. Auch hier fungiert DCL4 als primäres DCL-Enzym und DCL2 dient als funktionelles Backup in Abwesenheit von DCL4-Aktivität [126]. Übereinstimmende Daten wurden auch aus Experimenten in *N. benthamiana* erhalten. In CMV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen wurden durch Qiu *et al.* ebenfalls 21 nt siRNAs als vorherrschende Spezies detektiert, gefolgt von 22 nt siRNAs [127]. Das lässt darauf schließen, dass DCL4 von größerer Bedeutung für die antivirale Reaktion in Tabakpflanzen ist als DCL2. Es ist daher auch zu vermuten, dass die designten edsRNAs *in planta* zu einem größeren Anteil in 21 nt lange siRNAs prozessiert werden, als dies in dem gewählten *in-vitro*-System der Fall war, in dem 24 nt siRNAs die am häufigsten vertretene Spezies waren.

In einer 2019 erschienenen Publikation wurde zum ersten Mal die Rolle der individuellen DCLs im spezifischen Fall einer CMV-Infektion in *N. benthamiana* demonstriert. Katsarou *et al.* stellten eine Zunahme des CMV-Virustiters und der Symptome fest, wenn sowohl DCL2- als auch DCL4-Aktivität mittels RNAi-Technologie reduziert wurden. Im Gegensatz dazu zeigten Pflanzen, in denen entweder nur DCL2- oder DCL4-Aktivität herabgesetzt wurde, keine signifikanten Veränderungen im Virustiter sowie der Symptomentwicklung, was ebenfalls für eine Redundanz von DCL2 und DCL4 in der CMV-Abwehr spricht [128].

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden vergleichende Experimente unter Verwendung 21 bzw. 22 nt langer siRNAs durchgeführt. Es wurde angenommen, dass in Experimenten *in planta* der Einsatz 22 nt langer siRNAs zur Bildung sekundärer siRNAs führt [16, 22, 102], wodurch der antivirale Effekt durch Amplifizierung des *silencing*-Signals erhöht werden sollte. Doch in den Protektionsexperimenten in *N. benthamiana* wurde durch den Einsatz der 22 nt langen siRNAs die antivirale Wirkung nicht verbessert. Die 21 nt langen siRNAs zeigten teilweise eine höhere Effizienz im antiviralen *silencing in vitro* sowie *in planta*. Dies deutet in Übereinstimmung mit der Literatur darauf hin, dass DCL4 bzw. DCL4-generierte 21 nt lange siRNAs für die antivirale Reaktion auf eine CMV-Infektion von größerer Bedeutung sind. Auch der Schutz, der durch die längere dsRNA, bestehend aus sechs 22 nt langen CMV-siRNAs, erzielt wurde, fiel deutlich geringer aus als der, welcher durch die aus sechs 21 nt langen CMV-siRNAs bestehende dsRNA generiert wurde. Mögliche Erklärungen hierfür sind, dass 22 nt siRNAs in geringerem Maße als 21 nt siRNAs durch die DCLs *in planta* gebildet werden. Zum anderen, wie bereits angerissen, wurden die 22 nt Varianten der 21 nt esiRNAs lediglich durch Hinzufügen eines Nukleotids am 3'-Ende der siRNAs generiert, d. h. sie wurden nicht aus den Top10-Kandidaten der in den AGO-IPs identifizierten 22 nt langen siRNAs ausgewählt. Weiterhin konnte bereits *in vitro* in *Slicer*-Assays gezeigt werden, dass deren Effizienz meist geringer war als die der 21 nt-Versionen, wodurch sie auch *in planta* vermutlich keinen vergleichbaren Effekt hervorriefen. Um die Effizienz 21 nt und 22 nt langer siRNAs besser miteinander vergleichen zu können, müssten die jeweiligen 22 nt-esiRNAs aus den AGO-IPs auf gleiche Art identifiziert werden, wie es für die 21 nt esiRNAs erfolgte. Aus diesen

22 nt siRNAs könnten wiederum 21 nt-Varianten generiert und beide siRNA-Spezies *in vitro* und *in planta* verglichen werden. Somit könnten die *in vitro* und *in planta* erhaltenen Tendenzen überprüft werden.

Laut Literatur scheint die Generierung sekundärer siRNAs für die Abwehr einer CMV-Infektion in *N. benthamiana* keine entscheidende Rolle zu spielen. In *Arabidopsis*-Pflanzen wurde gezeigt, dass die 21 nt langen sekundären siRNAs für die antivirale Reaktion von besonderer Bedeutung sind, wohingegen 22 nt lange sekundäre siRNAs allein für die Abwehr einer CMV-Infektion nicht ausreichend sind [123, 127]. Protektionsexperimente in *N. benthamiana* gegen ein anderes Plusstrang-RNA-Virus, das *Tomato bushy stunt virus*, zeigten darüber hinaus, dass der Schutz der Pflanze durch 21 nt siRNAs, die als amiRNAs mittels *A. tumefaciens* exprimiert wurden, nicht von der RDR6-abhängigen Generierung sekundärer siRNAs abhing. *N. benthamiana*-Pflanzen, in denen die RDR6-Expression mittels RNAi (RDR6i) reduziert war, waren gegenüber einer TBSV-Infektion genauso geschützt wie Wildtyppflanzen [43]. Dies deutet ebenfalls auf eine größere Bedeutung 21 nt gegenüber 22 nt langer siRNAs bzw. auf eine untergeordnete Rolle sekundärer siRNAs hin und stimmt mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen überein.

4.4 Einsatz längerer edsRNAs und deren Potential als biologische Pflanzenschutzmittel

Die meisten eukaryotischen Organismen, die kein Antikörper-vermitteltes Immunsystem besitzen (bspw. Pilze, Insekten und Pflanzen), erkennen lange dsRNAs als Virus und aktivieren den RNAi-Signalweg zur Abwehr der viralen Infektion. Säugetiere hingegen reagieren auf lange dsRNAs mit der Aktivierung des angeborenen Immunsystems und der Interferon-Antwort [129, 130]. Darum werden für eine gezielte Induktion des RNA-*silencing* in Säugetieren bzw. Säugerzellen siRNAs von 19-21 nt Länge verwendet, in Pflanzen hingegen längere dsRNAs [131]. Mittels *Arabidopsis*-Protoplasten konnte gezeigt werden, dass dsRNAs von mehr als 130 nt Länge RNAi bis zu 400-fach stärker induzieren als 21 nt oder 37 nt lange dsRNAs [126]. Basierend auf vorangegangenen Experimenten wurden alle identifizierten esiRNAs gegen CMV zu einer längeren dsRNA kombiniert und diese mittels *in-vitro*-Transkription hergestellt. Damit sollte eine mögliche Anwendung der esiRNA-Wirkstoffe als biologisches Pflanzenschutzmittel getestet werden. Die Besonderheit der hier charakterisierten dsRNAs besteht im gezielten Aufbau aus mehreren effizienten siRNAs sowie deren spezifischer Anordnung auf dem Doppelstrang.

4.4.1 Vorteile des individuellen dsRNA-Designs für den antiviralen Pflanzenschutz

Die aktuellste und bisher vielversprechendste Methode zum Schutz von Pflanzen vor einer CMV-Infektion durch transiente dsRNA-Applikation wurde im Mai 2021 von Holeva *et al.* publiziert [80]. Mittels Co-Inokulationsexperimenten von CMV-Viruspartikeln und *in vitro* synthetisierter dsRNA, basierend auf einem Sequenzausschnitt des CMV *coat*-Proteins, konnten 10 % der *N. tabacum*-Pflanzen vor einer CMV-Infektion (G2-Stamm; ursprünglich aus Tomatenpflanzen in Griechenland isoliert) geschützt werden. Eine dsRNA, abgeleitet von einem Segment der 2b-RNA-Sequenz, schützte 35-60 % der Tabakpflanzen. Der gleichzeitige Einsatz beider *in vitro* generierter dsRNA-Konstrukte führte bei 45-55 % der co-inokulierten Pflanzen zu einem Schutz vor der CMV-Infektion. Wurden die gleichen dsRNAs *in vivo* mittels *E. coli* HT115 (DE3) produziert und Gesamt-RNA aus diesen Bakterien appliziert, konnte ein Schutz von 85 % (dsCP) bzw. 40-75 % (ds2b) der Pflanzen erzielt werden. Beide *in vivo* hergestellten RNA-Konstrukte in Kombination führten bei 80-100% der co-inokulierten Pflanzen zum Schutz gegenüber einer CMV-Infektion [80].

Die beschriebenen Effekte sind bereits vielversprechend. Aufgrund der verschiedenen experimentellen Bedingungen sind sie jedoch nicht direkt mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen vergleichbar. Holeva *et al.* setzten in ihren Experimenten bis zu 32 µg dsRNA pro Pflanze ein [80], in vorherigen Publikationen sogar bis zu 60 µg dsRNA pro Pflanze [77]. In den in dieser Arbeit durchgeführten Co-Inokulationsexperimenten mit dem deutlich kürzeren (168 nt), doppelsträngigen Konstrukt dsCMV6si21-Ü führten bereits Mengen von 200 ng dsRNA pro Pflanze zu einem reproduzierbaren 100%igen Schutz der Pflanzen vor einer CMV-Infektion. Somit konnte die Menge der eingesetzten dsRNA sowie deren Länge drastisch reduziert werden, was ebenfalls die Kosten für deren Herstellung in größerem Maßstab reduziert. Weitere Experimente mit noch geringeren RNA-Konzentrationen wurden aus Zeitgründen nicht durchgeführt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die minimal benötigte dsRNA-Menge zum Erreichen der 100%igen CMV-Protektion in *N. benthamiana* unter den hier gewählten Versuchsbedingungen noch geringer ist als bisher ermittelt. Um die Effizienz des erzielten *silencing*-Effekts in Abhängigkeit von der dsRNA-Menge jedoch direkt mit den Ergebnissen von Holeva *et al.* zu vergleichen, müssten die experimentellen Bedingungen angeglichen werden. Die Co-Inokulation mit der kürzeren dsRNA (dsCMV6si21-Ü) müsste zusammen mit Viruspartikeln oder die der längeren dsRNAs von Holeva *et al.* mit den hier verwendeten definierten CMV-RNA-Mengen in der gleichen Wirtspflanze durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch, vor allem durch das besondere, hier erstmals angewandte dsRNA-Design, signifikante Verbesserungen der CMV-Protektion verglichen mit einer längeren dsRNA mit kontinuierlicher CMV-Sequenz (dsCMV) erzielt werden. Die Vorteile der im Rahmen dieser Arbeit designten und *in vitro* sowie *in planta* getesteten dsRNA (dsCMV6si21-Ü) sind vielfältig. Bisherige Anwendungen doppelsträngiger RNAs zum Schutz von Pflanzen vor entsprechenden Pathogenen

beruhen häufig auf einem recht simplen Design. In den meisten Fällen werden kontinuierliche, längere Abschnitte viraler RNAs hergestellt. Häufig verwendete *targets* sind codierende Sequenzen des *coat*-Proteins, einer Replikase-Komponente oder viraler Suppressoren des RNA-*silencing* (VSRs), wie das CMV 2b-Protein [20]. CMV 2b inhibiert das siRNA-vermittelte lokale sowie systemische *silencing*, indem es siRNA-Duplexe sequestriert und außerdem die antivirale Aktivität von AGO1 blockiert [132]. Ein entscheidender Nachteil dieses Vorgehens ist, dass aus diesen langen dsRNAs *in planta* umfangreiche siRNA-Pools diverser Sequenzen generiert werden, von denen nur wenige siRNAs effizient antiviral wirken. Zudem können durch die große Anzahl und Vielfalt der generierten siRNAs, wie bereits erwähnt, unerwünschte Effekte auftreten. Dazu zählen bspw. die Sättigung der *silencing*-Maschinerie mit sogenannten *decoy*-siRNAs oder *off-target*-Effekte in Hinblick auf mRNAs der Wirtspflanze [52, 59]. Auch Effekte auf nicht-*target*-Organismen sind durch die Vielzahl unterschiedlicher siRNA-Sequenzen denkbar [133, 134].

Hier zeigt sich erneut das Potential der im Rahmen dieser Arbeit angewandten systematischen Methode zur Identifizierung effizienter antiviraler siRNAs. Es können nun, wie in Abschnitt 3.3.1 dargestellt, gezielt dsRNAs designt werden, die bereits validierte, effiziente siRNAs beinhalten. Die hohe Wirksamkeit dieser edsRNAs konnte bereits *in vitro* und *in planta* demonstriert werden. Sie vereinen somit die bereits genannten positiven Effekte einzelner effizienter siRNAs mit einer erhöhten Spezifität, verglichen mit bisherigen antiviralen dsRNA-Anwendungen. Auch aus der edsRNA kann prinzipiell eine Vielzahl von siRNAs mit unbekannter Wirkung entstehen, jedoch sollten die CMV-esiRNAs in größerer Menge gebildet werden – wenn im passenden Raster angeordnet – und sie sollten aufgrund ihrer höheren AGO-Affinität verglichen mit den anderen siRNAs wesentlich häufiger in RISC eingebaut werden. *Decoy*- sowie *off-target*-Effekte können somit reduziert werden.

Neben den genannten Vorteilen der in der vorliegenden Arbeit charakterisierten dsRNAs, die hauptsächlich auf deren spezielles Design zurückzuführen sind, hängt die dsRNA-Konzentration, die für den effizienten Schutz einer Pflanze vor einer viralen Infektion nötig ist, aber auch von weiteren, allgemeinen Faktoren ab. Dazu zählen das jeweilige Virus, der entsprechende Wirt sowie sein Entwicklungsstadium, weitere abiotische oder biotische Stressoren, die dsRNA-Reinheit und das Lösungsmittel zur dsRNA-Applikation. Auch RNA-Modifikationen wie z. B. Nukleotidmodifikationen oder die Konjugation mit Peptiden können einen Einfluss haben. Sie können die Effizienz der Applikation sowie die dsRNA-Stabilität und den Schutz vor RNasen erhöhen oder die Aufnahme der dsRNA in die Pflanzenzelle erleichtern (s. Abschnitt 4.5) [135, 136]. Bisherige Versuche wurden nur unter kontrollierten Bedingungen im Labormaßstab durchgeführt. Daher wären Studien unter natürlicheren Bedingungen, z. B. in einem Gewächshaus oder auf einem Feld, ein echter Härtetest für die transiente dsRNA-Applikation, um die Übertragbarkeit der hier erzielten positiven Effekte der spezifisch designten edsRNA auf die landwirtschaftliche Anwendung zu evaluieren.

4.4.2 Hinweise auf die Aktivität von DCL4 sowie Erkenntnisse für das effiziente Design antiviraler dsRNAs

Jedes DCL-Protein ist für einen oder teils auch mehrere, spezifische *silencing*-Signalwege zuständig, die siRNA-generierenden DCLs funktionieren jedoch mit einer gewissen Redundanz. Dadurch kann der Ausfall eines DCLs durch ein anderes DCL-Protein kompensiert werden. Zur spezifischen Vorgehensweise einzelner DCLs auf mechanistischer Ebene sowie zur DCL-Regulation liegen bisher jedoch nur wenige Informationen vor [26]. Bisher konnte gezeigt werden, dass *Dicer*-Proteine wirbelloser Tiere (*Drosophila*, *C. elegans*) dsRNA-Substrate in Abhängigkeit ihrer Enden prozessieren. DsRNAs (106 bp) mit glatten Enden (*blunt ends*) wurden schrittweise ATP-abhängig prozessiert, während dsRNA-Substrate mit 3'-Überhängen ATP-unabhängig und nicht prozessiv gespalten wurden, indem das Enzym mehrfach vom Substrat dissoziiert und dann erneut bindet [137, 138]. Für DCL4 aus *A. thaliana* konnte bereits gezeigt werden, dass es lange dsRNAs mit *blunt ends* sowie mit 1 nt oder 2 nt 3'-Überhängen mit ähnlicher Effizienz prozessiert [32]. Sowohl DCL3 als auch DCL4 prozessieren dsRNAs spezifisch ausgehend von deren 5'-Phosphat-Enden, wobei DCL4 auch dsRNAs mit unphosphorylierten Enden prozessieren kann. Für *Arabidopsis* DCL3 wurde zudem die sogenannte *5' counting rule* postuliert [31, 32]. Demnach ist die Position, an der DCL3 eine dsRNA spaltet, ähnlich wie für das humane *Dicer*, abhängig vom Abstand zum 5'-Ende der dsRNA. Ob diese *5'-counting rule* auch auf DCL4 zutrifft, ist bisher unbekannt. Darüber hinaus wird spekuliert, dass eine Verbindung zwischen DCL4-Prozessierung und AGO-Beladung vorliegt [126]. Es wird angenommen, dass durch DCL4 aus dsRNAs generierte siRNAs effizienter in AGOs geladen werden als siRNAs, die schon vorher produziert wurden und frei in der Zelle vorliegen.

Die DCL-Aktivität wird durch Cofaktoren und weitere Stoffe reguliert. Durch die Cofaktoren DRB1 für DCL1 und DRB4 für DCL4 wird die Ausbeute und Genauigkeit der Prozessierung signifikant erhöht, was aus Untersuchungen in *A. thaliana* hervorgeht [26]. Des Weiteren ist die Aktivität abhängig von Magnesium-Ionen sowie ATP. Auch anorganisches Phosphat, NaCl sowie KCl spielen eine wichtige Rolle, denn sie inhibieren die DCL4-Aktivität, während sie die DCL3-Aktivität erhöhen. Dies zeigt, dass die unterschiedlichen DCLs verschiedene katalytische Profile besitzen. Darüber hinaus bevorzugt DCL4 als Substrate längere dsRNA, während die Produktion 21 nt langer siRNAs aus Substraten, die kürzer als 50 bp sind, weniger effizient erfolgt [26, 32, 126]. Ein spezifisches DCL-Protein kann demnach aus einem spezifischen dsRNA-Substrat siRNAs bestimmter Längen generieren und somit gezielt eine spezifische siRNA-vermittelte *silencing*-Reaktion auslösen [32].

Durch die Sequenzierung der *in vitro* im BYL aus der *edsRNA* generierten siRNAs konnten in der vorliegenden Arbeit einige Erkenntnisse bzgl. der Prozessierung von dsRNAs gewonnen werden. Diese lassen auch einige Vermutungen über die Arbeitsweise von DCL4 zu (vgl. Abbildung 29). Die dsCMV6si21-Ü beinhaltet sechs CMV-spezifische esiRNAs, von denen jeweils drei ausgehend von

jedem Ende der dsRNA in einem 21 nt-Raster angeordnet sind. Es konnte gezeigt werden, dass aus der edsRNA *in vitro* durch DCLs ein erheblicher Anteil 21 nt langer siRNAs prozessiert wird. Zudem befanden sich darunter alle gewünschten CMV-esiRNAs. In Anbetracht der Tatsache, dass aus einer 168 nt langen dsRNA bei gleichmäßiger Prozessierung theoretisch 296 verschiedene 21 nt lange siRNA-Einzelstränge mit einer Häufigkeit von je 0,34 % generiert werden können, ist es darüber hinaus bemerkenswert, dass *reads* anderer siRNAs nur selten in höherer Anzahl als *reads* der gewünschten esiRNA-*guide*-Stränge vorkamen. Bezogen auf die dsCMV6si21 konnte der CMV-esiRNA-*guide*-Strang mit der geringsten Häufigkeit (siR359; 0,14 %) immerhin häufiger detektiert werden als 231 andere siRNAs. Für die dsRNA-Variante dsCMV6si21-Ü konnte der CMV-esiRNA-*guide*-Strang mit dem geringsten prozentualen Anteil (siR359; 0,32 %) immerhin häufiger detektiert werden als 266 andere siRNAs. Dies spricht dafür, dass aufgrund des gewählten dsRNA-Designs bevorzugt die CMV-esiRNAs gebildet werden. Dies wird ebenso deutlich beim Vergleich des protektiven Effekts der dsCMV6si21-Ü und der Kontroll-RNA dsCMV. Die dsCMV-Kontrolle besteht aus einem kontinuierlichen Fragment der CMV-RNA 2, analog zum Aufbau bisher publizierter dsRNA-Konstrukte. Innerhalb der Sequenz dieses dsRNA-Fragmentes liegen jedoch auch zwei siRNAs, die als Top10-Kandidaten aus den AGO-Immunpräzipitationen ermittelt wurden. Die in der Kontroll-RNA enthaltenen siRNAs, siR540 und siR557, vermittelten in *Slicer*-Assays (ohne kompetitive gf698-siRNA) in Kombination mit AGO2 eine deutliche *Slicer*-Aktivität auf CMV-RNA 2. Trotzdem führte der Einsatz der Kontroll-RNA dsCMV *in planta* nicht zu einem nennenswerten Schutz von *N. benthamiana* vor einer CMV-Infektion. Ein wichtiger Unterschied besteht darin, dass die potentiellen esiRNAs 540 und 557 nicht im 21 nt-Raster bezogen auf die Enden der dsRNA vorliegen, das für die edsRNAs dsCMV6si21 und dsCMV6si21-Ü berücksichtigt wurde. Dieses Raster sollte, wie bei den edsRNAs, so gewählt werden, dass analog der Vorgehensweise von DCL4, also bei einer Spaltung nach jeweils 21 nt, die gewünschten esiRNAs aus der dsRNA generiert werden. Da dies in der Kontroll-RNA dsCMV nicht gegeben ist, wurden die enthaltenen siRNAs 540 und 557 vermutlich in zu geringen Mengen generiert, um einen effektiven antiviralen Schutz zu vermitteln.

Dass manche CMV-spezifischen *guide*- und *passenger*-Stränge in geringeren Mengen vorlagen, kann mehrere Ursachen haben. Zum einen könnte es an einer geringeren Prozessierung durch die DCLs an der spezifischen Position auf dem RNA-Doppelstrang liegen, z. B. aufgrund von Sequenzpräferenzen. Zudem könnten einzelne siRNAs bzw. deren *guide*-Stränge durch den Einbau in AGOs stabilisiert worden sein. Da die endogenen AGOs im BYL jedoch bereits durch endogene siRNAs gesättigt gewesen sein dürften [101] und in diesem Versuch kein zusätzliches AGO-Protein *in vitro* translatiert wurde, ist es eher unwahrscheinlich, dass entsprechende Effekte im Rahmen der Sequenzierung sichtbar werden. Zusätzlich können aber auch andere Ursachen wie die Stabilität der generierten siRNAs oder deren Einzelstränge, z. B. gegenüber unspezifischen RNasen im BYL, eine Rolle spielen.

Dass die Häufigkeit einer konkreten esiRNA in den NGS-Daten des DCL-Assays mit RNA 2 nicht immer mit der relativen Häufigkeit korreliert, mit der dieselbe siRNA verglichen mit anderen esiRNAs aus der edsRNA prozessiert wurde, kann neben dem unterschiedlichen Raster auch am abweichenden Kontext liegen. Vermutlich begünstigen die Länge und der Aufbau der edsRNA die Prozessierung der gewünschten esiRNAs aufgrund deren Anordnung innerhalb eines 21 nt Rasters. Auch die Umgebung der einzelnen siRNAs auf der edsRNA ist eine andere als auf der ursprünglichen, doppelsträngigen genomischen RNA 2. Die Sequenzen, die die individuellen siRNAs auf der einen bzw. der anderen RNA umgeben, unterscheiden sich und können somit zu verschiedenen Bindungspräferenzen bzw. Aktivitäten durch DCLs führen. Des Weiteren mussten die Sequenzen einiger siRNA-*passenger*-Stränge auf dem dsRNA-Konstrukt an ein bis zwei Nukleotiden modifiziert werden, sodass sich eventuell die Stabilitäten der Termini der generierten siRNAs verändern, was wiederum einen Einfluss auf deren Einbau in AGOs oder die siRNA-Stabilität haben könnte.

Darüber hinaus führen die Häufigkeiten der CMV-esiRNA-*reads* zu Vermutungen über den Modus der Prozessierung der dsRNA durch DCLs. Die Anzahl und Verteilung der *reads* bezogen auf die zwei dsRNAs mit unterschiedlichen Enden (*blunt ends* versus 2 nt 3'-Überhänge) unterschied sich kaum. Dies entspricht auch den Ergebnissen, die von Nagano *et al.* mit *Arabidopsis* DCL4 erhalten wurden [32]. Jedoch wurden mehr *reads* von siRNAs detektiert, die näher am AGO2-spezifischen Teil der dsRNA liegen, als *reads* vom AGO1-spezifischen Teil der dsRNA. Darüber hinaus ist ein Trend erkennbar: Die *reads* nahmen tendenziell von den Enden der dsRNA zur Mitte der dsRNA ab. Dies lässt vermuten, dass zum einen eine gewisse Sequenzspezifität der DCLs besteht, die eine Prozessierung vom AGO2-spezifischen Terminus der dsRNA begünstigt. Eine Präferenz für GC-reiche Sequenzen durch pflanzliche DCLs wurde bereits durch Ho *et al.* sowie Gago-Zachert *et al.* beschrieben [43, 100]. Des Weiteren entsteht der Eindruck, dass die DCLs den Doppelstrang von den Termini ausgehend nicht durchweg kontinuierlich prozessieren. Bei einer höheren Prozessivität würde eine gleichmäßigere Verteilung der *reads* über die gesamte Länge der dsRNA erwartet werden. Die Anordnung der *guide*-Stränge ausgehend von den beiden 5'-Enden der dsRNA scheint somit sinnvoll zu sein.

Um diese Vermutung zu untersuchen, wäre eine systematische Charakterisierung unterschiedlich aufgebauter dsRNAs mittels Prozessierung im BYL und anschließender Sequenzierung kleiner RNAs hilfreich. Es wäre bspw. interessant, ähnliche dsRNA-Konstrukte zu generieren, in denen die Positionen der individuellen siRNAs vertauscht sind. Somit könnte überprüft werden, ob die bevorzugte Prozessierung einiger siRNAs auf einer Sequenzspezifität des DCLs beruht oder von der Position auf dem Doppelstrang abhängig ist. Zusätzlich könnte auch eine siRNA an einer bestimmten Position auf dem Doppelstrang beibehalten und die Sequenzen *up-* und *downstream* dieser siRNA, z. B. durch Einfügen mehrerer identischer Nukleotide, variiert werden, um den Einfluss spezifischer Nukleotide bzw. Sequenzen auf die DCL-Aktivität zu untersuchen. Die systematische Testung verschiedener

dsRNA-Konstrukte könnte somit zu einer weiteren Hinweismöglichkeit auf die Vorgehensweise der spezifischen DCL-Proteine geben. Zum anderen könnten neue Erkenntnisse zu Substratspezifitäten und Prozessivität der DCLs auch dazu beitragen, dsRNA-Designs gezielt zu verbessern, indem sie individuell an die Präferenzen der DCLs angepasst werden. Damit könnte die Effizienz der Prozessierung von siRNAs aus diesen Substraten erhöht werden.

Auch bezüglich der Herstellung der edsRNAs wären verschiedene Alternativen vorstellbar. Die Transkription in RNase III-defizienten Bakterienstämmen (z. B. *E. coli* HT115 (DE3)), die bereits von einigen Autoren beschrieben wurde, ist jedoch mit Blick auf die Applikation kritisch, da es sich bei den Bakterienstämmen um genetisch modifizierte Organismen handelt, deren Einsatz in der Landwirtschaft streng reguliert ist [139, 140]. Es wäre auch denkbar, esiRNAs durch Co-Expression von DCL4 und edsRNAs in speziellen Hefen herzustellen. Dies wäre auch mit genetischen Modifikationen verbunden. Der Einsatz der Backhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ist jedoch in Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit vorteilhaft, da *S. cerevisiae* über den GRAS-Status (*generally recognized as safe*) verfügt. Zudem besitzt die Hefe bspw. nicht über ein RNAi-System und somit nicht über DCL- sowie AGO-Proteine. Durch Expression der Komponenten zur Generierung von siRNAs ist es also möglich, definierte esiRNAs zu generieren. Dadurch könnten die dsRNAs in der Hefe prozessiert, die Hefen im Anschluss aufgeschlossen und die esiRNAs gereinigt werden. Auch eine direkte Applikation der siRNA produzierenden Hefen auf die Pflanzen, in Form von Extrakten oder abgetöteten Zellen, wäre denkbar. Damit könnte ein aufwendiges Reinigungsverfahren zur Isolation der esiRNAs umgangen und die Produktion und Applikation der esiRNAs kombiniert werden. Dafür spricht die schnelle und kostengünstige Kultivierung der Hefen, das Vorhandensein verschiedener Vektoren sowie Promotoren für eine flexible Genexpression sowie ihre gute Bewertung bzgl. der Lebensmittelsicherheit verglichen mit bakteriellen Expressionssystemen [141, 142].

4.5 Transfer von RNA an ihren Wirkungsort

Die transiente Anwendung pathogenspezifischer dsRNA in Form einer Oberflächenbehandlung zum antiviralen Schutz von Pflanzen stellt eine attraktive Alternative zu genetisch modifizierten Pflanzen dar. Wesentliche Einschränkungen für die praktische Nutzung von dsRNAs, bspw. als Spray, sind das bisher auf wenige Tage limitierte Zeitfenster, in dem ein effektiver antiviraler Schutz bewirkt werden kann, sowie die mangelnde Stabilität unverpackter bzw. unmodifizierter dsRNA [12]. Damit verknüpft ist auch die Aufnahme der dsRNA durch die Pflanzenzelle, die eine weitere Herausforderung darstellt [12]. Im Falle von antiviralen Anwendungen müssen die äußerlich applizierten dsRNAs in ausreichender Menge in die Pflanzenzellen gelangen, um dort den gewünschten RNAi-Effekt auszulösen. Dafür muss die dsRNA ausgehend von der Blattoberfläche durch Kutikula, Apoplast und

Plasmamembran gelangen, um von der pflanzlichen RNAi-Maschinerie erkannt zu werden. Nachdem die dsRNA ins Zellinnere gelangt ist, kann sie über Plasmodesmata in angrenzende Zellen und über das Phloem in distale Zellen transportiert werden [143].

Die Kutikula ist eine lipophile Schicht, welche die Epidermis bedeckt und die Pflanze vor dem Austrocknen schützen soll. Da dsRNA jedoch hydrophil ist, wird eine effektive Absorption durch die hydrophobe Kutikula verhindert [143]. Die Zellwand, bestehend aus Cellulose, Hemicellulose, Pektin und anderen Biopolymeren, stellt eine weitere physische Barriere für die dsRNA-Aufnahme in die Zelle dar. Sie dient der Pflanze als Schutz, zur Stabilität sowie als Filter und kann eine Dicke von 0,1 µm bis zu mehreren Mikrometern besitzen [66]. Die Porengröße innerhalb der Zellwand ist abhängig von Umweltfaktoren, der Pflanzenspezies sowie dem Zelltyp [143].

Um die genannten physischen Barrieren zu überwinden und die dsRNA ins Innere der Pflanzenzellen zu transportieren, wird im Labormaßstab z. B. die mechanische Inokulation mittels Bürsten oder Abrasivstoffen wie Carborundum sowie das *high-pressure spraying* angewendet, um Mikroverletzungen der Blattoberfläche zu erzeugen. Durch diese kann die dsRNA in die Pflanzenzellen aufgenommen werden. Die genannten Methoden sind für die Anwendung in der kommerziellen Landwirtschaft jedoch nicht praktikabel bzw. zu aufwendig [143].

Zwei weitere Methoden zur dsRNA-Applikation sind *petiole absorption* und *trunk injection*. Bei der *petiole absorption* wird die dsRNA über den Blattstiel aufgesaugt, bei der *trunk injection* direkt in den Stamm von Holzgewächsen injiziert. Bei beiden Methoden verbleibt die dsRNA jedoch im Xylem und somit im Apoplast und löst keine RNAi-Antwort aus. Während diese Methoden für antivirale RNAi ungeeignet sind, können sie für die Bekämpfung von Insekten oder Pilzen von Vorteil sein. Die dsRNAs, die auf diese Weise in die Pflanze gelangen, können ohne vorherige Prozessierung durch pflanzliche DCLs direkt von Pilzen oder Insekten aufgenommen, durch deren *Dicer*-Proteine prozessiert werden und ihre biologische Aktivität direkt im *target*-Organismus ausüben [66]. Zusätzlich zu den genannten physischen Barrieren wie Kutikula, Zellwand und Zellmembran spielen sowohl in Pflanzen als auch in Insekten biochemische Barrieren in Form von Nukleasen eine entscheidende Rolle. Diese wirken sich auf die Stabilität von dsRNA und somit auf deren Aufnahme in die jeweiligen *target*-Organismen bzw. deren Persistenz innerhalb dieser aus [143].

Um die Aufnahme von RNA in die Pflanzenzelle zu verbessern, werden RNA-Moleküle üblicherweise mit Trägerkomponenten verbunden. Ein vielversprechendes Beispiel dafür sind DNA-Nanostrukturen [143, 144]. Eine Vielzahl solcher DNA-Nanostrukturen wurde bereits synthetisiert und deren Funktionalität zur Applikation von DNA, RNA und Proteinen in tierischen Systemen gezeigt [144-146]. Zhang *et al.* haben DNA-Nanostrukturen auch vor dem Hintergrund einer pflanzlichen Anwendung untersucht [144]. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese ohne weiteres in Pflanzenzellen aufgenommen werden und ein effektives *silencing* in *N. benthamiana*-Blättern erzielen können. Dabei

können die siRNAs kontrolliert an spezifischen Stellen der DNA-Nanostruktur angebracht werden. Außerdem übertraf die *silencing*-Effizienz der an DNA-Nanostrukturen gekoppelten siRNA die Effizienz der siRNA ohne Trägerkomponente. Weiterhin haben strukturbedingte und mechanische Eigenschaften der DNA-Nanostruktur wie Größe, Form sowie die Position der siRNA einen Einfluss auf die Aufnahme in die Pflanzenzellen sowie die Effizienz und Art des *silencing*. Zusammengefasst stellen DNA-Nanostrukturen somit eine interessante und anpassungsfähige Gerüstsubstanz für den verbesserten Transport von RNA in Pflanzenzellen dar.

Wie zuvor erwähnt, sind neben dem Transfer der dsRNA ins Zellinnere jedoch auch die Stabilität der dsRNA sowie die Dauer des antiviralen Schutzes eine weitere Herausforderung für äußerlich applizierte RNAi-Anwendungen. Eine innovative Methode, um diese Probleme zu lösen, wurde von Mitter *et al.* publiziert [12, 147]. Der von ihnen entwickelte *BioClay*, bestehend aus ungiftigen, abbaubaren *layered double hydroxide* (LDH) *nanosheets* mit einer Partikelgröße von 80-300 nm, kann mit langen dsRNAs beladen werden. Die natürlich vorkommenden Minerale können die Stabilität der dsRNA verbessern und zu einem verlängerten antiviralen Schutz führen [12, 66]. Durch den *BioClay* kann die dsRNA vor Nukleasen geschützt werden und ist auch noch 30 Tage nach Spray-Applikation auf der Blattoberfläche detektierbar. Zudem wird die dsRNA unter natürlichen Bedingungen kontinuierlich freigesetzt, wobei die LDH-*nanosheets* mit der Zeit durch atmosphärisches Kohlenstoffdioxid und Feuchtigkeit vollständig abgebaut werden. Eine entscheidende Verbesserung, die mittels *BioClay* erzielt werden konnte, ist jedoch die Verlängerung des antiviralen Schutzes. Bei einer viralen Infektion 20 Tage nach Behandlung der Pflanze mit dem *BioClay*-RNA-Spray zeigten sowohl behandelte als auch unbehandelte Blätter einen Schutz gegen das entsprechende Virus (systemischer Schutz).

Es ist zu erwarten, dass die äußerliche dsRNA-Applikation in Form von Sprays durch die bereits vorhandenen, innovativen Methoden zur RNA-Applikation wie DNA-Nanostrukturen oder *BioClays* sowie weitere, neue Entwicklungen zur Optimierung der dsRNA-Stabilität und -Aufnahme weiter an Bedeutung gewinnen wird.

4.6 Risiken, Regulation und Akzeptanz RNA-basierter Biopestizide

In naher Zukunft wird der Einsatz chemischer Pestizide zur Kontrolle und Bekämpfung von Schädlingen und Pathogenen stark limitiert werden. Besonders durch den europäischen *Green Deal* ist zu erwarten, dass weniger chemische Pestizide in der EU zugelassen werden. Darum werden innovative wie auch nachhaltige alternative Strategien benötigt. RNAi ist als schnell wachsende Technologie von großem wirtschaftlichem Interesse. Dies spiegelt sich unter anderem in den globalen Trends zu deren Erforschung sowie der Patentsituation wider [148].

Die Zahl der Patentanmeldungen für RNAi-Anwendungen im Pflanzenbereich ist in den letzten 15 Jahren fast um das 100-fache gestiegen. Die meisten Anmeldungen gab es in den USA (387), gefolgt von Europa (146) und China (109). Dabei sind die Inhaber der Patente dem Industriesektor (z. B. Monsanto, BASF, Du Pont Pioneer und Dow AgroSciences), dem akademischen Umfeld und staatlichen Stellen zuzuordnen [149].

In der EU benötigen alle Pflanzenschutzmittel (*plant protection products*, PPPs) eine Genehmigung, die für die einzelnen aktiven Substanzen sowie das PPP im Ganzen erteilt werden muss. Die Zulassung basiert auf einer Gefährdungsbeurteilung (*risk assessment*) durch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*, EFSA). Bisher gibt es unter den Regularien für PPP jedoch keine Kategorie für Biopestizide, wie etwa in den USA, und PPP auf Basis von dsRNA passen in keine der bisher existierenden Kategorien. Darum gibt es aktuell in der EU auch keine Dokumente, welche die benötigten Daten für die Zulassung eines auf dsRNA basierenden PPPs definieren. Für einen baldigen kommerziellen Einsatz dsRNA-basierter Biopestizide als Pflanzenschutzmittel sollten deshalb der regulatorische Rahmen sowie die Anforderungen an die Gefährdungsbeurteilungen entsprechender Produkte zeitnah von den jeweiligen Behörden bzw. Institutionen definiert werden [148].

Generelle Anforderungen an RNA-basierte Pflanzenschutzmittel sind deren Kosteneffizienz, Sicherheit und der zuverlässige Transfer zum Wirkungsort des entsprechenden *target*-Organismus. GreenLight Biosciences hat bspw. ein zellfreies System zur Produktion von RNA entwickelt, bei dem sich die Kosten für die RNA-Herstellung auf 0,5 US-Dollar pro Gramm (\$/g) RNA belaufen. Verglichen mit Kosten von einem US-Dollar pro Gramm RNA in der Herstellung durch Fermentation, 1 000 \$/g RNA durch *in-vitro*-Transkription oder 100 000 \$/g RNA durch chemische Synthese konnten die Kosten für die RNA-Herstellung bereits erheblich gesenkt werden [150]. Die Herstellung von dsRNA in mikrobiellen Systemen ist eine kostengünstige Alternative, jedoch birgt sie Sicherheitsrisiken z. B. durch die mögliche Entstehung unerwünschter Nebenprodukte [148].

Einen weiteren Faktor für die Sicherheit von dsRNA-basierten Biopestiziden stellen sogenannte *off-target*-Effekte dar. Diese werden in unspezifische und spezifische *off-target*-Effekte unterschieden. Unspezifische *off-target*-Effekte werden durch eine hohe dsRNA-Dosis oder eine hohe Sensitivität gegenüber dsRNA ausgelöst wie bspw. in Säugetieren oder Käfern [133, 151]. Spezifische *off-target*-Effekte beruhen auf unerwünschten sequenzspezifischen Interaktionen von siRNAs oder dsRNAs mit mRNAs von nicht-*target*-Organismen (*non-target organism*, NTO) bzw. der behandelten Wirtspflanze [152]. Solche *off-target*-Effekte kommen auch im Rahmen einer natürlichen Infektion der Pflanze vor. Es konnte in einer genomweiten Studie gezeigt werden, dass vsiRNAs, die im Rahmen einer CMV-Infektion in *Arabidopsis*-Pflanzen gebildet werden, *targets* in 61 pflanzlichen Genen aufweisen. Dies betraf hauptsächlich Gene, die mit der Fotosynthese assoziiert sind. Es wird spekuliert, dass die

Beeinflussung Fotosynthese-assoziiierter Faktoren eine Stressantwort in der Pflanze auslöst, die einen vorzeitigen Eintritt der Blüte sowie eine beschleunigte Samenproduktion und somit indirekt die Übertragung von CMV auf die nächste Generation unterstützt [124]. Auch Shimura *et al.* konnten eine Interaktion von siRNAs, abgeleitet von einer CMV-Satelliten-RNA (Y-sat), mit der mRNA eines Gens der Chlorophyllsynthese nachweisen, was zur Ausbildung der typischen gelben Mosaiksymptome in Tabakpflanzen führt. Es wurde die Vermutung angestellt, dass die gelben Flecken auf den Tabakblättern Blattläuse anlocken und somit zur Verbreitung von CMV beitragen könnten, da Blattläuse die natürlichen CMV-Vektoren sind [153, 154].

Es herrscht jedoch noch Unklarheit bzgl. der Voraussetzungen für eine effiziente Interaktion von siRNAs bzw. dsRNAs und deren *off-targets*. Unterschiede zwischen den RNAi-Maschinerien verschiedener Organismen, die Expressionslevel potentieller *off-target*-mRNAs, die Aktivität dsRNA-abbauender RNasen, die dsRNA-Aufnahme durch verschiedene Organismen und der intrazelluläre Transport sowie die Amplifikation der *silencing*-Signale spielen hierbei eine Rolle.

Mit bioinformatischen Ansätzen können Vorhersagen über die Wahrscheinlichkeit der unerwünschten Interaktion einer siRNA oder dsRNA mit mRNAs getroffen werden. Diese beruhen jedoch auf der Verfügbarkeit der Sequenzinformationen verschiedenster NTOs, die aktuell noch limitiert sind. Die mittels bioinformatischer Prognosen identifizierten siRNAs oder dsRNAs wurden zudem meist nicht experimentell verifiziert [155]. Darum sollten im Hinblick auf deren Effizienz bzw. auf potentielle *off-target*-Effekte empirische Tests in *target*- sowie in nicht-*target*-Organismen durchgeführt werden.

Erst im Jahr 2021 konnte von Chen *et al.* gezeigt werden, dass dsRNAs mit einer mindestens 16 bp langen, kontinuierlichen Sequenz komplementär zu einem *off-target*-Gen dessen *silencing* in bestimmten Insekten-Spezies in signifikantem Maße auslöst. Darüber hinaus konnte ermittelt werden, dass auch längere dsRNAs (>26 bp) mit eingeschränkter Komplementarität zum *target* effektives RNA-*silencing* auslösen können, wenn einzelne *mismatches* durch mindestens fünf Basenpaar lange, komplementäre Sequenzen getrennt sind oder zwei direkt benachbarte *mismatches* durch mindestens acht Basenpaar lange, komplementäre Sequenzen [133].

Auch *off-target*-Effekte durch microRNA-artige RNAi sollten nicht außer Acht gelassen werden. MicroRNAs (miRNAs) sind 20-24 Nukleotide lange nicht-codierende RNAs, die in Pflanzen und Tieren vorkommen. Die Biogenese pflanzlicher miRNAs umfasst die Transkription von miRNA-Genen, die Prozessierung primärer miRNA-Transkripte (Haarnadelstruktur) durch DCL-Proteine zu reifen miRNAs (miRNA-Duplexe) sowie das Laden der einzelsträngigen miRNA in AGO-Proteine zur Bildung des *miRNA-induced silencing complex* (miRISC). Durch die Bindung an komplementäre mRNA-Sequenzen können miRISCs die Genexpression negativ regulieren [156].

MiRNAs können in Tieren auch bei stark eingeschränkter Komplementarität eine deutliche *silencing*-Aktivität vermitteln, auch wenn dieser Mechanismus in Pflanzen eine eher untergeordnete Rolle spielt

[112]. SiRNAs wirken ähnlich wie miRNAs und können z. B. über dsRNA-behandelte Futterpflanzen von Tieren aufgenommen werden. In Tieren ist bei der miRNA-vermittelten RNAi die Komplementarität der *seed*-Sequenz (nt 2-8 der miR) zum entsprechenden *target* ausreichend. Solche 7 nt langen Sequenzen sind schwer zu vermeiden [134]. Ein Versuch, solche *off-target*-Effekte zu reduzieren, besteht im sogenannten *pooling*. Das bedeutet, dass mehrere siRNAs gegen ein gewünschtes *target* eingesetzt werden, wodurch die Konzentrationen der individuellen siRNAs reduziert und dadurch weniger *off-target*-Effekte ausgelöst werden. Gleichzeitig wird durch den Einsatz mehrerer individueller siRNAs, die synergistisch gegen dasselbe *target* gerichtet sind, der spezifische *on-target*-Effekt beibehalten [134]. Derselbe Effekt kann vermutlich erzielt werden, wenn, wie in der vorliegenden Arbeit, dsRNAs, bestehend aus mehreren effizienten siRNAs, gegen eine CMV-spezifische *target*-RNA eingesetzt werden. Die individuellen esiRNAs vermitteln einen sehr effizienten *on-target*-Effekt in Hinblick auf CMV. Durch die größere Anzahl verschiedener esiRNAs „verdünnen“ sie aber mögliche *off-target*-Effekte, da jede einzelne siRNA in geringer Konzentration vorliegt.

Alles in allem gibt es jedoch aktuell noch keine optimale Methode zur sicheren Bewertung potentieller *off-target*-Effekte für die verschiedenen siRNA- bzw. dsRNA-Anwendungen in Mensch, Insekt oder Pflanze [133]. Zur Einschätzung eventueller Umweltrisiken durch dsRNA-basierte Biopestizide muss außerdem die Stabilität und Persistenz von dsRNA in der Umwelt ermittelt werden. Bisher gibt es dazu nur wenige publizierte Erkenntnisse. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Konzentration äußerlich auf Pflanzen applizierter dsRNA unter Feldbedingungen innerhalb von drei Tagen um 95 % abnimmt [157]. Auch in der Erde wird dsRNA schnell abgebaut. Dies liegt vermutlich am chemischen Abbau sowie dem Abbau durch Bodenmikroorganismen [72]. Es konnte zudem ermittelt werden, dass in aquatischen Umgebungen bereits vier Tage nach Applikation ca. 90 % der dsRNA abgebaut war [71]. Es ist daher anzunehmen, dass als Pflanzenschutzmittel eingesetzte dsRNA eine sehr geringe Persistenz im Boden sowie in aquatischen Umgebungen besitzt. Doch auch die Auswirkungen von dsRNA in der Umwelt hängen von weiteren individuellen Faktoren wie der Konzentration der aktiven Substanz, der Applikationsmethode, der Applikationshäufigkeit oder der Sensitivität verschiedener Organismen für RNAi ab.

Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von dsRNA in der Genregulation und Virusabwehr von Pflanzen und Tieren sind dsRNAs und die aus ihnen generierten Produkte natürlich vorkommende Komponenten unserer Nahrung. Der Verzehr durch Menschen und Tiere gilt als sicher [158]. Dies liegt unter anderem an der geringen Exposition im Rahmen der oralen Aufnahme von dsRNA und siRNA aufgrund des raschen Abbaus von RNA z. B. im Magen-Darm-Trakt von Säugetieren. Dieser stellt darüber hinaus auch eine physische Barriere dar [159-161]. Bezüglich der Akzeptanz von RNAi-basierten Methoden zum Pflanzenschutz wurde eine Studie von Shew *et al.* durchgeführt [162]. Bei der 2017 publizierten Analyse zur Marktfähigkeit wurde die Zahlungsbereitschaft von Konsumenten in

Hinblick auf verschiedene Strategien zum Schutz vor Insekten untersucht. Dabei wurden drei verschiedene Methoden verglichen: Eine hypothetische, mittels *Bacillus thuringiensis* genetisch modifizierte Reissorte, eine nicht genetisch modifizierte Reissorte, die äußerlich mit einem RNA-Spray behandelt wurde, sowie ein konventionelles Mittel zur Insektenkontrolle. Befragt wurden Konsumenten in den USA, Kanada, Australien, Frankreich und Belgien. Es zeigte sich, dass die Teilnehmer in den USA, Kanada, Australien und Frankreich bereit waren, den mittels Sprayapplikation von RNA behandelten Reis zu wählen, wenn dieser preislich günstiger als der konventionell behandelte Reis war. Zum Kauf der genetisch modifizierten Reissorte wäre hingegen ein Rabatt von 30 % bis 40 % gegenüber dem RNAi-Reis nötig. Dies zeigt, dass die Konsumenten zwischen den verschiedenen biotechnologischen Methoden differenzieren und die RNAi-behandelte Reissorte der transgenen Reissorte vorziehen würden. Dies spricht für das Potential der RNAi-basierten Methoden durch deren erhöhte Akzeptanz gegenüber transgenen Ansätzen [162]. Es ist anzunehmen, dass der Einsatz analoger Applikationen zum Schutz von Pflanzen vor Viren ähnliche Reaktionen der Konsumenten auslöst.

4.7 Ausblick

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass es mit der gewählten Herangehensweise gelungen ist, gleich mehrere effiziente siRNAs gegen das *Cucumber mosaic virus* zu identifizieren und *N. benthamiana*-Pflanzen mittels RNAi effektiv vor einer CMV-Infektion zu schützen. Daraus eröffnen sich weitere Anwendungsmöglichkeiten. Die Herstellung sowie der Transfer RNAi-basierter, antiviraler Wirkstoffe sind Themen mit großem Entwicklungspotential.

Eine mögliche interessante Anwendung der etablierten Methode wäre, das verwendete *in-vitro*-System auch auf andere Pathogene zu übertragen. Dies können weitere Pflanzen infizierende RNA-Viren, humanpathogene Viren oder auch Pathogene wie Pilze, Nematoden oder Schadinsekten sein. Für den Menschen wäre z. B. die Therapie respiratorischer Viren (z. B. Influenza A-Virus, Coronavirus, Respiratorisches Synzytial-Virus) mittels esiRNAs attraktiv.

Auch auf sich verändernde Viruspopulationen kann durch die gewählte Methode schnell reagiert werden. Die zügige Identifizierung neuer esiRNAs und somit Adaptierung an Virusvarianten erhöht deutlich die Flexibilität transienter Anwendungen. Die Kombination mehrerer siRNAs, die gegen verschiedene *targets* eines Virus oder sogar gegen verschiedene Viren gerichtet sind, kann zusätzlich den protektiven Effekt steigern und einen Schutz vor Co-Infektionen bieten. Vor allem in Pflanzen bietet sich jedoch der Einsatz längerer dsRNAs anstelle einzelner siRNAs an. Die dsRNAs können aus mehreren effizienten siRNAs aufgebaut werden. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch das gezielte Design dieser dsRNAs ein sehr effizienter Schutz erreicht wird. Systematische Analysen zur

Prozessierung weiterer dsRNAs unterschiedlichen Aufbaus (z. B. Länge der dsRNA oder Anordnung der siRNAs) können zur Optimierung des dsRNA-Designs beitragen. Möglicherweise kann dadurch das protektive Potential der dsRNAs weiter erhöht werden. Zudem können auch neue Erkenntnisse zur Vorgehensweise der unterschiedlichen DCL-Proteine gewonnen werden.

Auch bzgl. der Herstellung von dsRNAs sowie deren Applikation gibt es vielversprechende Entwicklungen für RNAi-basierte, antivirale Anwendungen. Die Produktion doppelsträngiger RNAs in RNAi-defizienten Hefen stellt eine günstige Alternative zur *in-vitro*-Synthese dar [141, 163, 164]. In Kombination mit der Erforschung von Nanopartikeln, *BioClays* oder Mikrogel-Containern für die kontrollierte Freisetzung der Pflanzenschutzmittel ergibt sich eine positive Perspektive für den Einsatz der RNAi-Technologie für eine nachhaltige Bioökonomie [12, 165-167].

V. ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren ist die RNA-Interferenz als vielversprechende Möglichkeit zum Schutz vor Pflanzenpathogenen zunehmend in den Fokus gerückt. RNAi ist ein natürlich vorkommender Mechanismus in Eukaryoten, der in Pflanzen neben der Genregulation auch der Virusabwehr dient. Dabei werden virale dsRNAs durch DCLs zu siRNAs prozessiert. Die siRNAs werden von AGO-Proteinen gebunden, die eine sequenzspezifische endonukleolytische Hydrolyse der komplementären viralen RNA vermitteln. Dadurch wird die Replikation und somit die Ausbreitung des Virus in der Pflanze verhindert. Ein Vertreter wirtschaftlich relevanter Pflanzenviren ist das *Cucumber mosaic virus* (CMV). Der Anspruch der vorliegenden Arbeit lag zum einen in der Identifizierung besonders effizienter antiviraler siRNAs gegen CMV, zum anderen sollte das Design doppelsträngiger RNAs für deren Anwendung als antivirales Pflanzenschutzmittel optimiert werden. Die Basis dafür bildete ein zytoplasmatischer Extrakt entvakuolisierter *Nicotiana tabacum*-Protoplasten (BYL), welcher *in vitro* die Rekonstitution des pflanzlichen RNA-silencing unkompliziert ermöglicht. Mittels dieses *in-vitro*-Systems sowie mithilfe von Infektionsexperimenten im Modell-Organismus *N. benthamiana* konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

- I. Aus den genomischen CMV-RNAs 2 und 3 wurden mittels DCL-Aktivität des BYL siRNA-Pools generiert.
- II. Mithilfe von AGO-Immunpräzipitationen wurden RNA 2- und RNA 3-spezifische, AGO-gebundene siRNA-*guide*-Stränge isoliert.
- III. Durch Sequenzierung der kleinen RNAs aus DCL-Assays und AGO-IPs mittels NGS wurden 21 nt lange siRNAs mit hoher Affinität für AGO1 bzw. AGO2 ermittelt.
- IV. In *Slicer*-Assays konnten jene siRNAs identifiziert werden, die *in vitro* in Verbindung mit AGO1 bzw. AGO2 die höchste *slicing*-Aktivität auf dem jeweiligen CMV-*target* vermittelten. Dies waren für RNA 2 die siRNAs 359, 1172 und 1489 (AGO1) bzw. 380, 1020 und 2041 (AGO2) und für RNA 3 die siRNAs 239, 507 und 985 (AGO1) bzw. 593, 1019 und 1569 (AGO2).
- V. Zur Verifizierung der siRNA-Wirksamkeit *in planta* konnte ein Protektionsassay für den Modellorganismus *N. benthamiana* etabliert werden, der auf der mechanischen Co-Inokulation von CMV-RNAs und siRNAs basierte. Die reproduzierbare und zuverlässige Infektion von 100 % der behandelten Pflanzen unter Verwendung von je 20 fmol der drei genomischen CMV-RNAs diente als Grundlage zur Charakterisierung des antiviralen Potentials individueller siRNAs.

- VI. Die unter IV. genannten, RNA 3-spezifischen siRNAs vermittelten in bis zu 53 % der Pflanzen einen protektiven Effekt.
Die RNA 2-spezifischen siRNAs schützten 60-100 % der *N. benthamiana*-Pflanzen vor einer CMV-Infektion und wurden aufgrund ihrer ausgeprägten antiviralen Wirkung als *efficient* siRNAs (*esiRNAs*) bezeichnet.
- VII. Der Einsatz von 22 nt-Versionen der bereits identifizierten 21 nt *esiRNAs* führte weder *in vitro* noch *in planta* zu einer Verbesserung des antiviralen Effekts.
- VIII. Die *in vitro* identifizierten und *in planta* verifizierten RNA 2-spezifischen 21 nt *esiRNAs* bildeten die Basis für das Design längerer dsRNAs. Diese aus *esiRNAs* aufgebauten dsRNAs (*edsRNAs*) könnten eine biologische Alternative zu bisherigen, konventionellen Pflanzenschutzmitteln bieten.
- IX. *In vitro* in *Slicer*-Assays konnte die Effizienz der *esiRNA*-basierten dsRNAs anhand der effektiven Spaltung der *target*-RNA demonstriert werden.
- X. Die NGS-Analyse *in vitro* prozessierter dsRNAs (dsCMV6si21 sowie dsCMV6si21-Ü) belegte, dass aus diesen zu einem erheblichen Teil die CMV-spezifischen *esiRNAs* prozessiert werden. Dies verdeutlicht den Vorteil des spezifischen *edsRNA*-Designs in Hinblick auf Effizienz sowie Spezifität des antiviralen Effekts.
- XI. *In planta* (*N. benthamiana*) wurde durch die dsRNA „dsCMV6si21-Ü“ ein bis zu 100%iges Protektionslevel gegenüber einer CMV-Infektion erzielt, während eine konventionelle dsRNA, bestehend aus einem kontinuierlichen Fragment der CMV-RNA 2, keinen anhaltenden Schutz vor der CMV-Infektion vermittelte. Die aus *esiRNAs* aufgebauten dsRNAs wurden darum als *efficient* dsRNAs (*edsRNAs*) bezeichnet.

Die Ziele der Arbeit waren die Steigerung der Effizienz und der Spezifität des pflanzlichen antiviralen RNA-silencing am Beispiel des *Cucumber mosaic virus*. Dies konnte durch die Identifizierung mehrerer effizienter siRNAs erfolgreich erreicht werden. Verglichen mit bisher publizierten Ansätzen konnte darüber hinaus die antivirale Wirksamkeit von dsRNAs mittels eines spezifischen Designs verbessert werden.

In Kombination mit entsprechenden Methoden zur dsRNA-Herstellung und -Applikation bieten die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit hohes Potential hinsichtlich einer effizienten antiviralen Anwendung für den biologischen Pflanzenschutz. Zudem wurden wertvolle Grundlagen zur Identifizierung weiterer protektiver Wirkstoffe für den Pflanzenschutz, aber auch für die Therapie humanpathogener Viren geschaffen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Rajam, M.V., *RNA silencing technology: A boon for crop improvement*. Journal of Biosciences, 2020. **45**(1): p. 1-5.
2. Loichinger, E., et al. *Globale Bevölkerungsentwicklung*. 2021; 30.03.23, 14 Uhr; URL: <https://www.bib.bund.de/Publikation/2021/Globale-Bevoelkerungsentwicklung.html>
3. FAO, et al. *The State of Food Security and Nutrition in the World 2021*. 2021; 30.03.23, 14 Uhr; URL: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/cb4474en>.
4. Liu, S., et al., *RNA-based technologies for insect control in plant production*. Biotechnol Adv, 2020. **39**(107463): p. 1-13.
5. Nicaise, V., *Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges*. Front Plant Sci, 2014. **5**(660): p. 1-18.
6. Chauhan, P., et al., *A systematic review of conventional and advanced approaches for the control of plant viruses*. Journal of Applied Biology & Biotechnology, 2019. **7**(4): p. 89-98.
7. Bos, L., *Crop losses caused by viruses*. CROP PROTECTION, 1982. **1**(3): p. 263-282.
8. Gallitelli, D., *The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture*. Virus Research, 2000. **71**(1-2): p. 9-21.
9. Anderson, P.K., et al., *Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers*. Trends Ecol Evol, 2004. **19**(10): p. 535-44.
10. European Union. *Farm to Fork Strategy*. 2020; 30.03.23, 14 Uhr; URL: https://ec.europa.eu/food/horizontal-topics/farm-fork-strategy_de.
11. Die Bundesregierung. *Deutsche Nachhaltigkeitsstrategie 2021*. 2021; 30.03.23, 14 Uhr; URL: <https://www.bundesregierung.de/breg-de/suche/nachhaltigkeitsstrategie-2021-1873560>.
12. Mitter, N., et al., *Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses*. Nature Plants, 2017. **3**(2): p. 1-10.
13. Zamore, P.D., *RNA interference: big applause for silencing in Stockholm*. Cell, 2006. **127**(6): p. 1083-1086.
14. Zotti, M., et al., *RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes*. Pest Manag Sci, 2018. **74**(6): p. 1239-1250.
15. Yang, Z. and Y. Li, *Dissection of RNAi-based antiviral immunity in plants*. Curr Opin Virol, 2018. **32**: p. 88-99.
16. Parent, J.S., et al., *Respective contributions of Arabidopsis DCL2 and DCL4 to RNA silencing*. Plant J, 2015. **81**(2): p. 223-232.
17. Ding, S.W., *RNA-based antiviral immunity*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(9): p. 632-44.
18. Carbonell, A. and J.C. Carrington, *Antiviral roles of plant ARGONAUTES*. Curr Opin Plant Biol, 2015. **27**: p. 111-117.
19. Llave, C., *Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions*. Trends Plant Sci, 2010. **15**(12): p. 701-707.
20. Gaffar, F.Y. and A. Koch, *Catch Me If You Can! RNA Silencing-Based Improvement of Antiviral Plant Immunity*. Viruses, 2019. **11**(7): p. 1-32.
21. Guo, Z.X., Y. Li, and S.W. Ding, *Small RNA-based antimicrobial immunity*. Nature Reviews Immunology, 2019. **19**(1): p. 31-44.
22. Sanan-Mishra, N., et al., *Secondary siRNAs in Plants: Biosynthesis, Various Functions, and Applications in Virology*. Front Plant Sci, 2021. **12**(610283): p. 1-32.
23. Wang, X.B., et al., *RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(1): p. 484-489.
24. Omarov, R.T. and H.B. Scholthof, *Biological chemistry of virus-encoded suppressors of RNA silencing: an overview*. Methods Mol Biol, 2012. **894**: p. 39-56.
25. Li, F. and A. Wang, *RNA-Targeted Antiviral Immunity: More Than Just RNA Silencing*. Trends Microbiol, 2019. **27**(9): p. 792-805.

26. Fukudome, A. and T. Fukuhara, *Plant dicer-like proteins: double-stranded RNA-cleaving enzymes for small RNA biogenesis*. J Plant Res, 2017. **130**(1): p. 33-44.
27. Xie, Z. and X. Qi, *Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1779**(11): p. 720-4.
28. Svoboda, P., *Key Mechanistic Principles and Considerations Concerning RNA Interference*. Front Plant Sci, 2020. **11**(1237): p. 1-13.
29. Hiraguri, A., et al., *Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol, 2005. **57**(2): p. 173-88.
30. Owen, J., et al., *Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 3*. Journal of General Virology, 1990. **71**: p. 2243-2249.
31. Park, J.E., et al., *Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing*. Nature, 2011. **475**(7355): p. 201-205.
32. Nagano, H., et al., *Distinct substrate specificities of Arabidopsis DCL3 and DCL4*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(3): p. 1845-1856.
33. Fang, X. and Y. Qi, *RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View*. The Plant Cell, 2016. **28**(2): p. 272-285.
34. Bohmert, K., et al., *AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development*. The EMBO Journal, 1998. **17**(1): p. 170-180.
35. Kwak, P.B. and Y. Tomari, *The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(2): p. 145-151.
36. Willkomm, S. and T. Restle, *Conformational Dynamics of Ago-Mediated Silencing Processes*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(7): p. 14769-14785.
37. Mallory, A. and H. Vaucheret, *Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins*. Plant Cell, 2010. **22**(12): p. 3879-3889.
38. Gu, S., et al., *Slicing-independent RISC activation requires the argonaute PAZ domain*. Curr Biol, 2012. **22**(16): p. 1536-1542.
39. Lingel, A., et al., *Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(6): p. 576-577.
40. Frank, F., et al., *Arabidopsis Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs*. EMBO J, 2012. **31**(17): p. 3588-3595.
41. Nakanishi, K., *Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins?* Wiley Interdiscip Rev RNA, 2016. **7**(5): p. 637-660.
42. Parker, J.S., S.M. Roe, and D. Barford, *Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 663-666.
43. Gago-Zachert, S., et al., *Highly efficacious antiviral protection of plants by small interfering RNAs identified in vitro*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(17): p. 9343-9357.
44. Schuck, J., et al., *AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant in vitro system*. Nucleic Acids Research, 2013. **41**(9): p. 5090-5103.
45. Mi, S.J., et al., *Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide*. Cell, 2008. **133**(1): p. 116-127.
46. Takeda, A., et al., *The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins*. Plant and Cell Physiology, 2008. **49**(4): p. 493-500.
47. Song, J.-J., et al., *Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1434-1437.
48. Rivas, F.V., et al., *Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(4): p. 340-349.
49. Nakanishi, K., et al., *Structure of yeast Argonaute with guide RNA*. Nature, 2012. **486**(7403): p. 368-374.
50. Becker, W.R., et al., *High-Throughput Analysis Reveals Rules for Target RNA Binding and Cleavage by AGO2*. Mol Cell, 2019. **75**(4): p. 741-755.
51. Pantaleo, V., G. Szittyá, and J. Burgyan, *Molecular bases of viral RNA targeting by viral small interfering RNA-programmed RISC*. J Virol, 2007. **81**(8): p. 3797-3806.

52. Miozzi, L., et al., *Genome-wide identification of viral and host transcripts targeted by viral siRNAs in Vitis vinifera*. Mol Plant Pathol, 2013. **14**(1): p. 30-43.
53. Duan, C.G., et al., *Artificial MicroRNAs highly accessible to targets confer efficient virus resistance in plants*. J Virol, 2008. **82**(22): p. 11084-11095.
54. Brown, K.M., C.Y. Chu, and T.M. Rana, *Target accessibility dictates the potency of human RISC*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(5): p. 469-470.
55. Ameres, S.L., J. Martinez, and R. Schroeder, *Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC*. Cell, 2007. **130**(1): p. 101-112.
56. Westerhout, E.M. and B. Berkhout, *A systematic analysis of the effect of target RNA structure on RNA interference*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(13): p. 4322-4330.
57. Blevins, T., et al., *Massive production of small RNAs from a non-coding region of Cauliflower mosaic virus in plant defense and viral counter-defense*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(12): p. 5003-5014.
58. Rajeswaran, R., et al., *Interactions of Rice tungro bacilliform pararetrovirus and its protein P4 with plant RNA-silencing machinery*. Mol Plant Microbe Interact, 2014. **27**(12): p. 1370-1378.
59. Ramesh, S.V., et al., *Transcriptome-wide identification of host genes targeted by tomato spotted wilt virus-derived small interfering RNAs*. Virus Res, 2017. **238**: p. 13-23.
60. Prado, J.R., et al., *Genetically Engineered Crops: From Idea to Product*. Annual Review of Plant Biology, Vol 65, 2014. **65**: p. 769-790.
61. Duan, C.G., C.H. Wang, and H.S. Guo, *Application of RNA silencing to plant disease resistance*. Silence, 2012. **3**(1): p. 5-8.
62. Garcia-Ruiz, H., et al., *Mechanisms, applications, and perspectives of antiviral RNA silencing in plants*. Rev Mex Fitopatol., 2016. **34**(3): p. 1-25.
63. Niraula, P.M. and V.N. Fondong, *Development and Adoption of Genetically Engineered Plants for Virus Resistance: Advances, Opportunities and Challenges*. Plants, 2021. **10**(2339): p. 1-18.
64. Bawa, A.S. and K.R. Anilakumar, *Genetically modified foods: safety, risks and public concerns-a review*. J Food Sci Technol, 2013. **50**(6): p. 1035-1046.
65. The Law Library of Congress. *Restrictions on Genetically Modified Organisms*. 2014; 30.03.23, 14 Uhr; URL: <https://www.loc.gov/item/2014427358/>.
66. Dalakouras, A., et al., *Genetically Modified Organism-Free RNA Interference: Exogenous Application of RNA Molecules in Plants*. Plant Physiol, 2020. **182**(1): p. 38-50.
67. Dalakouras, A., et al., *Induction of Silencing in Plants by High-Pressure Spraying of In vitro-Synthesized Small RNAs*. Frontiers in Plant Science, 2016. **7**(1327): p. 1-5.
68. Niehl, A., et al., *Synthetic biology approach for plant protection using dsRNA*. Plant Biotechnology Journal, 2018. **16**(9): p. 1679-1687.
69. Dubrovina, A.S. and K.V. Kiselev, *Exogenous RNAs for Gene Regulation and Plant Resistance*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(9): p. 1-21.
70. Dubelman, S., et al., *Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. 1-7.
71. Fischer, J.R., et al., *Aquatic fate of a double-stranded RNA in a sediment---water system following an over-water application*. Environ Toxicol Chem, 2017. **36**(3): p. 727-734.
72. Parker, K.M., et al., *Environmental Fate of RNA Interference Pesticides: Adsorption and Degradation of Double-Stranded RNA Molecules in Agricultural Soils*. Environ Sci Technol, 2019. **53**(6): p. 3027-3036.
73. Konakalla, N.C., et al., *Exogenous application of double-stranded RNA molecules from TMV p126 and CP genes confers resistance against TMV in tobacco*. Planta, 2016. **244**(4): p. 961-969.
74. Scholthof, K.B.G., et al., *Top 10 plant viruses in molecular plant pathology*. Molecular Plant Pathology, 2011. **12**(9): p. 938-954.
75. Rybicki, E.P., *A Top Ten list for economically important plant viruses*. Archives of Virology, 2015. **160**(1): p. 17-20.

76. Mochizuki, T. and S.T. Ohki, *Cucumber mosaic virus: viral genes as virulence determinants*. *Molecular Plant Pathology*, 2012. **13**(3): p. 217-225.
77. Namgial, T., et al., *Topical application of double-stranded RNA molecules containing sequences of Tomato leaf curl virus and Cucumber mosaic virus confers protection against the cognate viruses*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2019. **108**: p. 1-9.
78. Garcia-Arenal, F. and P. Palukaitis, *Cucumber Mosaic Virus*, in *Encyclopedia of Virology (Third Edition)*. 2008, Elsevier Ltd. p. 614-619.
79. Jacquemond, M., *Cucumber mosaic virus*, in *Advances in Virus Research*. 2012, Elsevier Inc. p. 439-504.
80. Holeva, M.C., et al., *Topical Application of Double-Stranded RNA Targeting 2b and CP Genes of Cucumber mosaic virus Protects Plants against Local and Systemic Viral Infection*. *Plants (Basel)*, 2021. **10**(5): p. 1-19.
81. Morroni, M., J.R. Thompson, and M. Tepfer, *Twenty Years of Transgenic Plants Resistant to Cucumber mosaic virus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008. **21**(6): p. 675-684.
82. Nouri, S., et al., *Genetic Structure and Molecular Variability of Cucumber mosaic virus Isolates in the United States*. *Plos One*, 2014. **9**(5): p. 1-12.
83. Roossinck, M.J., *Evolutionary history of Cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses*. *J Virol*, 2002. **76**(7): p. 3382-3387.
84. Roossinck, M.J., *Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution*. *Molecular Plant Pathology*, 2001. **2**(2): p. 59-63.
85. Palukaitis, P., *Satellite RNAs and Satellite Viruses*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2016. **29**(3): p. 181-186.
86. Seo, J.K., et al., *Evidence for alternate states of Cucumber mosaic virus replicase assembly in positive- and negative-strand RNA synthesis*. *Virology*, 2009. **383**(2): p. 248-260.
87. Ali, A. and M. Kobayashi, *Seed transmission of Cucumber mosaic virus in pepper*. *J Virol Methods*, 2010. **163**(2): p. 234-237.
88. O'Keefe, D.C., et al., *Lack of Seed Coat Contamination with Cucumber mosaic virus in Lupin Permits Reliable, Large-Scale Detection of Seed Transmission in Seed Samples*. *Plant Dis*, 2007. **91**(5): p. 504-508.
89. Lin, C.Y., et al., *Development of transgenic watermelon resistant to Cucumber mosaic virus and Watermelon mosaic virus by using a single chimeric transgene construct*. *Transgenic Res*, 2012. **21**(5): p. 983-993.
90. Hu, Q., et al., *Virus-derived transgenes expressing hairpin RNA give immunity to Tobacco mosaic virus and Cucumber mosaic virus*. *Virol J*, 2011. **8**(41): p. 1-11.
91. Galvez, L.C., et al., *Engineered plant virus resistance*. *Plant Sci*, 2014. **228**: p. 11-25.
92. Hug, K., *Genetically modified organisms: do the benefits outweigh the risks?* *Medicina (Kaunas)*, 2008. **44**(2): p. 87-99.
93. James, C., *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014*. ISAAA, 2014. **49**: p. 1-259.
94. Kumar, K., et al., *Genetically modified crops: current status and future prospects*. *Planta*, 2020. **251**(91): p. 1-27.
95. Gursinsky, T., B. Schulz, and S.E. Behrens, *Replication of Tomato bushy stunt virus RNA in a plant in vitro system*. *Virology*, 2009. **390**(2): p. 250-260.
96. Komoda, K., S. Naito, and M. Ishikawa, *Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(7): p. 1863-1867.
97. Blum, H., H. Beier, and H.J. Gross, *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels*. *Electrophoresis*, 1987. **8**(2): p. 93-99.
98. Stokowy, T., et al., *Analysis options for high-throughput sequencing in miRNA expression profiling*. *BMC Res Notes*, 2014. **7**(114): p. 1-12.
99. Rizzo, T.M. and P. Palukaitis, *Construction of full-length cDNA clones of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2 and 3: Generation of infectious RNA transcripts*. *Molecular & General Genetics*, 1990. **222**(2-3): p. 249-256.

100. Ho, T., et al., *Evidence for targeting common siRNA hotspots and GC preference by plant Dicer-like proteins*. FEBS Lett, 2007. **581**(17): p. 3267-3272.
101. Iki, T., et al., *In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90*. Mol Cell, 2010. **39**(2): p. 282-291.
102. Chen, H.M., et al., *22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(34): p. 15269-15274.
103. Ahn, S.J., et al., *Microbial-Based Double-Stranded RNA Production to Develop Cost-Effective RNA Interference Application for Insect Pest Management*. Int J Insect Sci, 2019. **11**(1179543319840323): p. 1-8.
104. Liu, Q., Y. Feng, and Z. Zhu, *Dicer-like (DCL) proteins in plants*. Funct Integr Genomics, 2009. **9**(3): p. 277-286.
105. Szittyá, G., et al., *Structural and Functional Analysis of Viral siRNAs*. Plos Pathogens, 2010. **6**(4): p. 1-15.
106. Carbonell, A., C. Lopez, and J.A. Daros, *Fast-Forward Identification of Highly Effective Artificial Small RNAs Against Different Tomato spotted wilt virus Isolates*. Mol Plant Microbe Interact, 2019. **32**(2): p. 142-156.
107. Pitzalis, N., et al., *Turnip mosaic virus in oilseed rape activates networks of sRNA-mediated interactions between viral and host genomes*. Commun Biol, 2020. **3**(702): p. 1-16.
108. Setten, R.L., J.J. Rossi, and S.P. Han, *The current state and future directions of RNAi-based therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2019. **18**(6): p. 421-446.
109. Elena, S.F. and R. Sanjuan, *Adaptive value of high mutation rates of RNA viruses: separating causes from consequences*. J Virol, 2005. **79**(18): p. 11555-11558.
110. Venkataraman, S., B. Prasad, and R. Selvarajan, *RNA Dependent RNA Polymerases: Insights from Structure, Function and Evolution*. Viruses, 2018. **10**(76): p. 1-23.
111. Heo, K.J., et al., *Newly emerged resistance-breaking variants of cucumber mosaic virus represent ongoing host-interactive evolution of an RNA virus*. Virus Evol, 2020. **6**(2): p. 1-14.
112. Liu, Q., F. Wang, and M.J. Axtell, *Analysis of complementarity requirements for plant microRNA targeting using a Nicotiana benthamiana quantitative transient assay*. Plant Cell, 2014. **26**(2): p. 741-53.
113. Barends, S., et al., *tRNA-like structure regulates translation of Brome mosaic virus RNA*. J Virol, 2004. **78**(8): p. 4003-4010.
114. Goodin, M.M., et al., *Nicotiana benthamiana: Its History and Future as a Model for Plant-Pathogen Interactions*. MPMI, 2008. **21**(8): p. 1015-1026.
115. Gursinsky, T., et al., *Homeologs of the Nicotiana benthamiana Antiviral ARGONAUTE1 Show Different Susceptibilities to microRNA168-Mediated Control*. Plant Physiol, 2015. **168**(3): p. 938-952.
116. Dommes, A.B., et al., *Virus-induced gene silencing: empowering genetics in non-model organisms*. J Exp Bot, 2019. **70**(3): p. 757-770.
117. Velasquez, A.C., S. Chakravarthy, and G.B. Martin, *Virus-induced gene silencing (VIGS) in Nicotiana benthamiana and tomato*. J Vis Exp, 2009(28).
118. Bally, J., et al., *The Rise and Rise of Nicotiana benthamiana: A Plant for All Reasons*. Annu Rev Phytopathol, 2018. **56**: p. 405-426.
119. Harvey, J.J., et al., *An antiviral defense role of AGO2 in plants*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. 1-6.
120. Varallyay, E., E. Olah, and Z. Havelda, *Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(1): p. 599-608.
121. Allen, E., et al., *microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants*. Cell, 2005. **121**(2): p. 207-21.
122. Ludman, M., J. Burgyan, and K. Fatyol, *Crispr/Cas9 Mediated Inactivation of Argonaute 2 Reveals its Differential Involvement in Antiviral Responses*. Sci Rep, 2017. **7**(1010): p. 1-12.

123. Wang, X.B., et al., *The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, 2011. **23**(4): p. 1625-1638.
124. Annacondia, M.L. and G. Martinez, *Reprogramming of RNA silencing triggered by cucumber mosaic virus infection in Arabidopsis*. Genome Biol, 2021. **22**(340): p. 1-22.
125. Donaire, L., et al., *Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes*. Virology, 2009. **392**(2): p. 203-214.
126. Kakiyama, S., et al., *Long DCL4-substrate dsRNAs efficiently induce RNA interference in plant cells*. Sci Rep, 2019. **9**(6920): p. 1-10.
127. Qiu, Y., et al., *Profiling of small RNAs derived from cucumber mosaic virus in infected Nicotiana benthamiana plants by deep sequencing*. Virus Res, 2018. **252**: p. 1-7.
128. Katsarou, K., et al., *DCL-suppressed Nicotiana benthamiana plants: valuable tools in research and biotechnology*. Molecular Plant Pathology, 2019. **20**(3): p. 432-446.
129. Hur, S., *Double-Stranded RNA Sensors and Modulators in Innate Immunity*. Annu Rev Immunol, 2019. **37**: p. 349-375.
130. Takeuchi, O. and S. Akira, *Innate immunity to virus infection*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 75-86.
131. Kim, D.H., et al., *Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(2): p. 222-226.
132. Csorba, T., L. Kontra, and J. Burgyan, *viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence*. Virology, 2015. **479-480**: p. 85-103.
133. Chen, J., et al., *Off-target effects of RNAi correlate with the mismatch rate between dsRNA and non-target mRNA*. RNA Biol, 2021. **18**(11): p. 1747-1759.
134. Neumeier, J. and G. Meister, *siRNA Specificity: RNAi Mechanisms and Strategies to Reduce Off-Target Effects*. Front Plant Sci, 2020. **11**(526455): p. 1-7.
135. Hernandez-Soto, A. and R. Chacon-Cerdas, *RNAi Crop Protection Advances*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(22).
136. Rego-Machado, C.M., et al., *siRNA biogenesis and advances in topically applied dsRNA for controlling virus infections in tomato plants*. Sci Rep, 2020. **10**(22277): p. 1-13.
137. Ciechanowska, K., M. Pokornowska, and A. Kurzynska-Kokorniak, *Genetic Insight into the Domain Structure and Functions of Dicer-Type Ribonucleases*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(616): p. 1-18.
138. Welker, N.C., et al., *Dicer's helicase domain discriminates dsRNA termini to promote an altered reaction mode*. Mol Cell, 2011. **41**(5): p. 589-599.
139. Papis, L., et al., *Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant Escherichia coli HT115 in fed-batch culture*. Biotechnol Rep (Amst), 2018. **20**(e00292): p. 1-4.
140. Tenllado, F., et al., *Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections*. BMC Biotechnology, 2003. **3**(3): p. 1-11.
141. Duman-Scheel, M., *Saccharomyces cerevisiae (Baker's Yeast) as an Interfering RNA Expression and Delivery System*. Curr Drug Targets, 2019. **20**(9): p. 942-952.
142. Freimoser, F.M., et al., *Biocontrol yeasts: mechanisms and applications*. World J Microbiol Biotechnol, 2019. **35**(154): p. 1-19.
143. Bennett, M., et al., *Barriers to Efficient Foliar Uptake of dsRNA and Molecular Barriers to dsRNA Activity in Plant Cells*. Front Plant Sci, 2020. **11**(816): p. 1-7.
144. Zhang, H., et al., *DNA nanostructures coordinate gene silencing in mature plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019. **116**(15): p. 7543-7548.
145. Li, J., et al., *Smart drug delivery nanocarriers with self-assembled DNA nanostructures*. Adv Mater, 2013. **25**(32): p. 4386-4396.
146. Yan, J., et al., *Tetrahedral DNA nanostructures for effective treatment of cancer: advances and prospects*. Journal of Nanobiotechnology, 2021. **19**(412): p. 1-16.

147. Worrall, E.A., et al., *Exogenous Application of RNAi-Inducing Double-Stranded RNA Inhibits Aphid-Mediated Transmission of a Plant Virus*. *Front Plant Sci*, 2019. **10**(265): p. 1-9.
148. Dietz-Pfeilstetter, A., et al., *Considerations and Regulatory Approaches in the USA and in the EU for dsRNA-Based Externally Applied Pesticides for Plant Protection*. *Front Plant Sci*, 2021. **12**(682387): p. 1-7.
149. Jalaluddin, N.S.M., R.Y. Othman, and J.A. Harikrishna, *Global trends in research and commercialization of exogenous and endogenous RNAi technologies for crops*. *Crit Rev Biotechnol*, 2019. **39**(1): p. 67-78.
150. Taning, C.N., et al., *RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market*. *Pest Manag Sci*, 2020. **76**(3): p. 841-845.
151. Baum, J.A. and J.K. Roberts, *Progress Towards RNAi-Mediated Insect Pest Management, in Advances in Insect Physiology*. 2014, Elsevier Ltd. p. 249-295.
152. Christiaens, O., et al., *Literature review of baseline information on RNAi to support the environmental risk assessment of RNAi-based GM plants*. EFSA Supporting Publications, 2018: p. 1-173.
153. Shimura, H., et al., *A Viral Satellite RNA Induces Yellow Symptoms on Tobacco by Targeting a Gene Involved in Chlorophyll Biosynthesis using the RNA Silencing Machinery*. *Plos Pathogens*, 2011. **7**(5): p. 1-12.
154. Smith, N.A., A.L. Eamens, and M.B. Wang, *Viral Small Interfering RNAs Target Host Genes to Mediate Disease Symptoms in Plants*. *Plos Pathogens*, 2011. **7**(5): p. 1-9.
155. Shawan, M., et al., *Designing an effective therapeutic siRNA to silence RdRp gene of SARS-CoV-2*. *Infect Genet Evol*, 2021. **93**(104951): p. 1-15.
156. Chen, X. and O. Rechavi, *Plant and animal small RNA communications between cells and organisms*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022. **23**(3): p. 185-203.
157. Bachman, P., et al., *Environmental Fate and Dissipation of Applied dsRNA in Soil, Aquatic Systems, and Plants*. *Front Plant Sci*, 2020. **11**(21): p. 1-6.
158. Dávalos, A., et al., *Literature review of baseline information on non-coding RNA (ncRNA) to support the risk assessment of ncRNA-based genetically modified plants for food and feed*. EFSA Supporting Publications, 2019: p. 1-220.
159. O'Neill, M.J., et al., *Intestinal delivery of non-viral gene therapeutics: physiological barriers and preclinical models*. *Drug Discov Today*, 2011. **16**(5-6): p. 203-218.
160. Petrick, J.S., et al., *Safety assessment of food and feed from biotechnology-derived crops employing RNA-mediated gene regulation to achieve desired traits: a scientific review*. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2013. **66**(2): p. 167-176.
161. Kleter, G.A., *Food safety assessment of crops engineered with RNA interference and other methods to modulate expression of endogenous and plant pest genes*. *Pest Manag Sci*, 2020. **76**(10): p. 3333-3339.
162. Shew, A.M., et al., *New innovations in agricultural biotech: Consumer acceptance of topical RNAi in rice production*. *Food Control*, 2017. **81**: p. 189-195.
163. Hernandez-Fernandez, M., et al., *Culturable Yeasts as Biofertilizers and Biopesticides for a Sustainable Agriculture: A Comprehensive Review*. *Plants (Basel)*, 2021. **10**(5): p. 1-19.
164. Murphy, K.A., et al., *Ingestion of genetically modified yeast symbiont reduces fitness of an insect pest via RNA interference*. *Scientific Reports*, 2016. **6**(22587): p. 1-13.
165. Meurer, R.A., et al., *Biofunctional Microgel-Based Fertilizers for Controlled Foliar Delivery of Nutrients to Plants*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017. **56**(26): p. 7380-7386.
166. Jiang, L., et al., *Systemic gene silencing in plants triggered by fluorescent nanoparticle-delivered double-stranded RNA*. *Nanoscale*, 2014. **6**(17): p. 9965-9969.
167. Kozielski, K.L., S.Y. Tzeng, and J.J. Green, *Bioengineered nanoparticles for siRNA delivery*. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2013. **5**(5): p. 449-468.

VII. ANHANG

7.1 Kommerziell erhältliche sowie im Rahmen der Arbeit konstruierte Plasmide

Tabelle 16 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Die folgenden Plasmide wurden von Frau Dr. Jana Schuck (Abteilung Mikrobielle Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.	
pSPLF2-NbAGO1L	Das Plasmid diente, nach Linearisierung mit SmaI, der <i>in-vitro</i> -Transkription von NbAGO1-mRNA und die RNA nachfolgend der <i>in-vitro</i> -Translation von NbAGO1 im BYL.
pSPLF2-NbAGO2	Das Plasmid diente, nach Linearisierung mit SmaI, der <i>in-vitro</i> -Transkription von NbAGO2-mRNA und die RNA anschließend der <i>in-vitro</i> -Translation von NbAGO2 im BYL.
pSPLF2-FLAG-NbAGO1L	Das Plasmid diente, nach Linearisierung mit SmaI, der <i>in-vitro</i> -Transkription von FLAG-NbAGO1-mRNA und die RNA nachfolgend der <i>in-vitro</i> -Translation von FLAG-NbAGO1 im BYL.
pSPLF2-FLAG-NbAGO2	Das Plasmid diente, nach Linearisierung mit SmaI, der <i>in-vitro</i> -Transkription von FLAG-NbAGO2-mRNA und die RNA anschließend der <i>in-vitro</i> -Translation von FLAG-NbAGO2 im BYL.
Das folgende Plasmid wurde von Promega (Madison, USA) erworben.	
pSP-luc+	Das Plasmid diente, nach Linearisierung mit XhoI, der <i>in-vitro</i> -Transkription von Luciferase-RNA, die anschließend in <i>Slicer</i> -Assays als Kompetitor-RNA für unspezifische RNasen des BYLs eingesetzt wurde.
Das folgende Plasmid wurde von Thermo Scientific (Bonn, D) erworben.	
pUC18	Das Plasmid diente als Grundlage zur Klonierung eines <i>backbones</i> zur Generierung von dsRNAs.
Das folgende Plasmid wurde von Clontech Laboratories GmbH (Heidelberg, D) erworben.	
pGFP-C1	Das Plasmid diente zur Generierung des DNA- <i>templates</i> für die <i>in-vitro</i> -Transkription einer GFP- <i>target</i> -RNA.
Folgende Plasmide wurden von Prof. Fernando García-Arenal Rodríguez (Universidad Politécnica de Madrid) und Prof. John Carr (University of Cambridge) zur Verfügung gestellt.	
pFny109	Das Plasmid beinhaltet die cDNA entsprechend der genomischen RNA 1 von CMV (Fny).
pFny209	Das Plasmid beinhaltet die cDNA entsprechend der genomischen RNA 2 von CMV (Fny).
pFny309	Das Plasmid beinhaltet die cDNA entsprechend der genomischen RNA 3 von CMV (Fny).
Die cDNA-Klone der CMV-RNAs dienen der Herstellung von PCR- <i>templates</i> für die <i>in-vitro</i> -Transkription der genomischen CMV-RNAs (Stamm: Fny).	

Die folgenden Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert.	
p-dsRNA- <i>backbone</i>	Das Plasmid dient als <i>backbone</i> zur Generierung von dsRNAs. Es besitzt flankierende T7-Promotoren und VSV-Terminatoren, zwischen denen verschiedene siRNA-Oligos mittels Bpil-Schnittstellen inseriert werden können.
p-dsbb-CMV168con	Das Plasmid enthält ein kontinuierliches Fragment entnommen aus CMV-RNA 2 zwischen flankierenden T7-Promotoren und VSV-Terminatoren und diente als Vergleich zu dsRNAs, die aus spezifischen esiRNAs aufgebaut waren.
p-dsbb-GFP168con	Das Plasmid enthält ein kontinuierliches Fragment einer GFP-mRNA zwischen flankierenden T7-Promotoren und VSV-Terminatoren und diente als CMV-unspezifische dsRNA-Kontrolle.
p-dsbbCMV21nt	Das Plasmid enthält sechs 21 nt lange esiRNAs (3 x AGO1-präferiert, 3 x AGO2-präferiert) aus CMV-RNA 2 sowie zwei Pseudo-siRNAs zwischen flankierenden T7-Promotoren und VSV-Terminatoren.
p-dsbbCMV22nt	Das Plasmid enthält sechs 22 nt lange esiRNAs (3 x AGO1-präferiert, 3 x AGO2-präferiert) aus CMV-RNA 2 sowie zwei Pseudo-siRNAs zwischen flankierenden T7-Promotoren und VSV-Terminatoren.
p-dsbbCMV21nt-5'U	Das Plasmid entspricht dem Plasmid dsbbCMV21nt, wobei alle CMV-spezifischen esiRNAs als AGO1-spezifische Version (5'-terminales U im <i>guide</i> -Strang) vorliegen.
p-dsbbCMV21nt-5'A	Das Plasmid entspricht dem Plasmid dsbbCMV21nt, wobei alle CMV-spezifischen esiRNAs als AGO2-spezifische Version (5'-terminales A im <i>guide</i> -Strang) vorliegen.

7.2 Plasmidkarten

7.2.1 Plasmidkarte: p-dsRNA-backbone

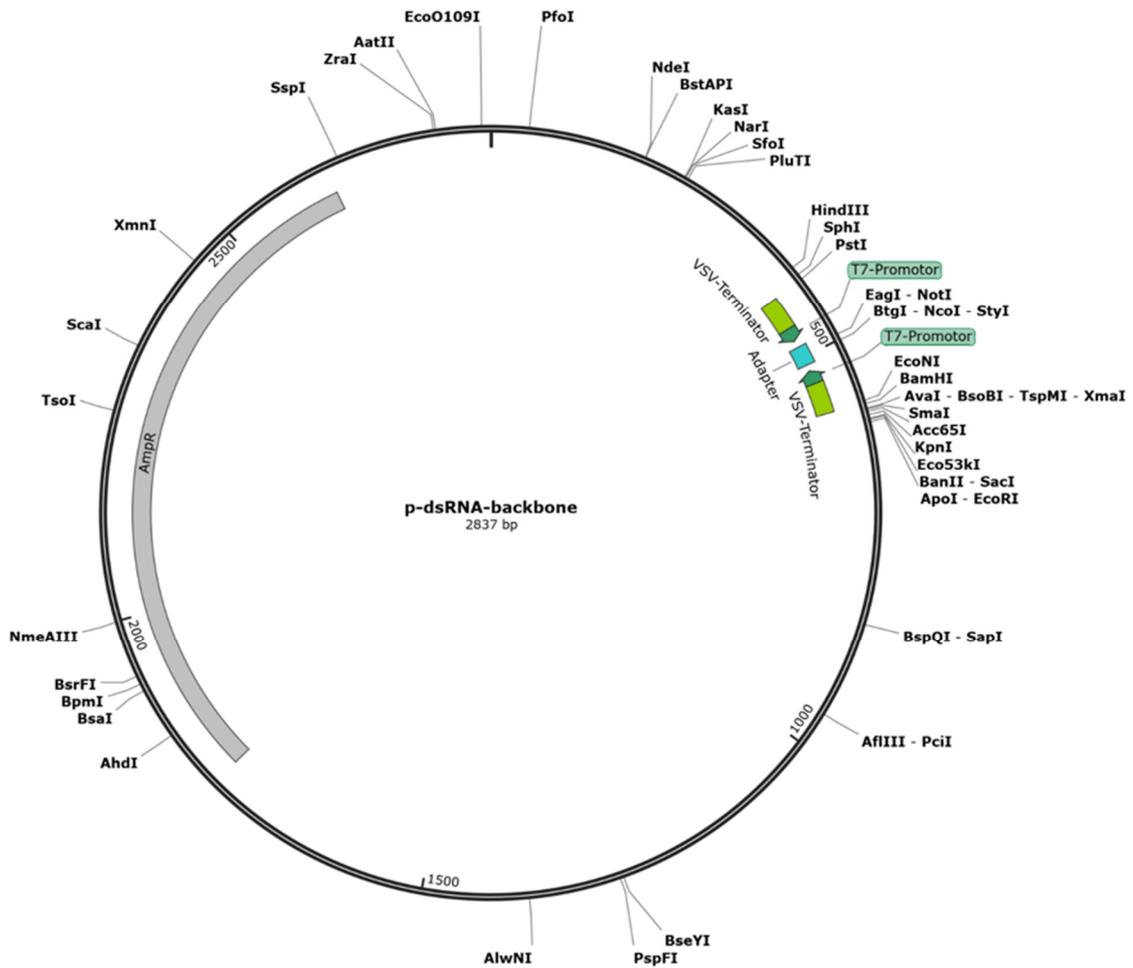


Abbildung 35 Plasmidkarte des im Rahmen dieser Arbeit generierten p-dsRNA-backbone.

Merkmale

VSV-Terminator:	417-458
T7-Promotor:	459-476
Adapter:	486-511
T7-Promotor:	520-537
VSV-Terminator:	538-579
Ampicillin-Resistenzgen (AmpR):	1777-2637

7.2.2 Plasmidkarte: p-dsbb-CMV168con

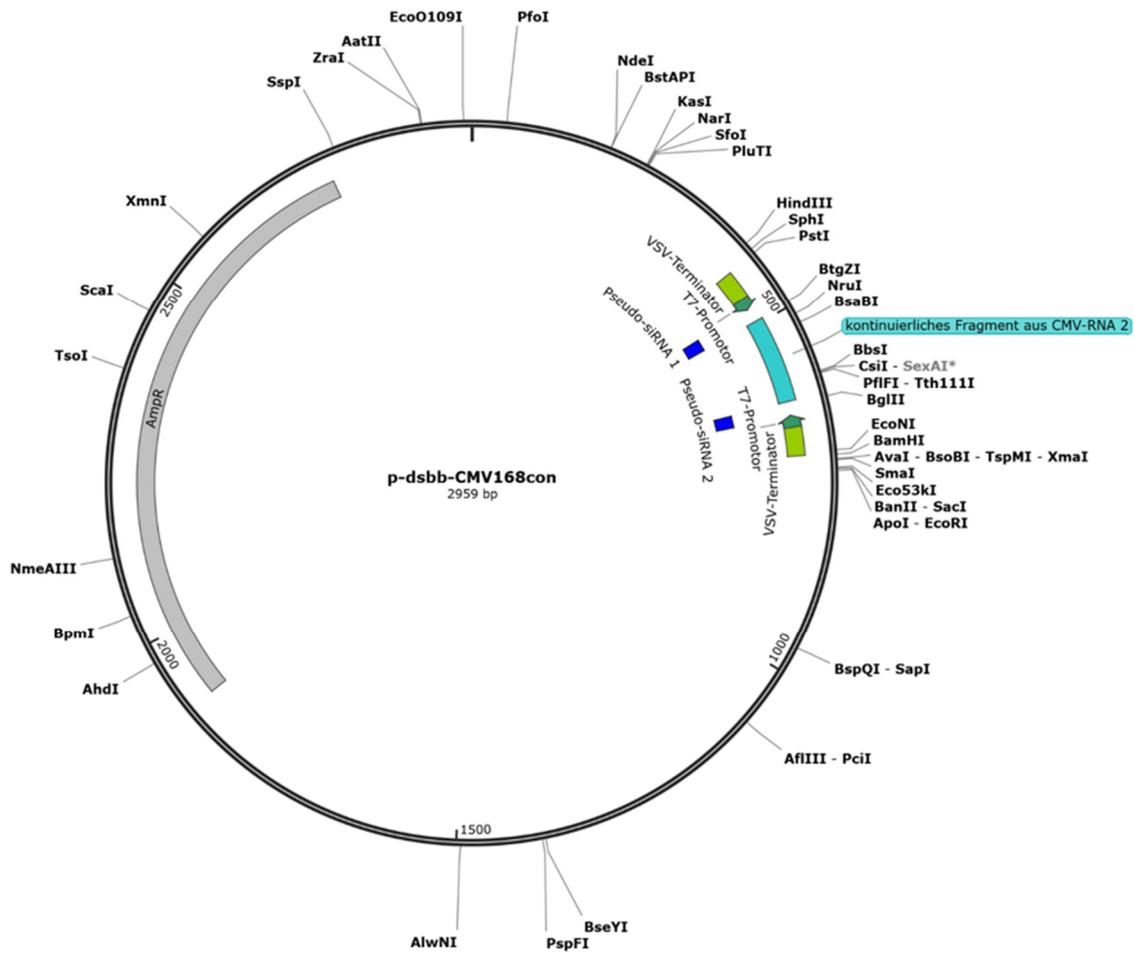


Abbildung 36 Plasmidkarte des im Rahmen dieser Arbeit generierten p-dsbb-CMV168con.

Merkmale

VSV-Terminator:	417-457
T7-Promotor:	458-475
Pseudo-siRNA 1:	475-495
kontinuierliches Fragment aus CMV-RNA 2:	496-621
Pseudo-siRNA 2:	622-642
T7-Promotor:	642-659
VSV-Terminator:	660-701
Ampicillin-Resistenzgen (AmpR):	1899-2759

7.2.3 Plasmidkarte: p-dsbb-GFP168con

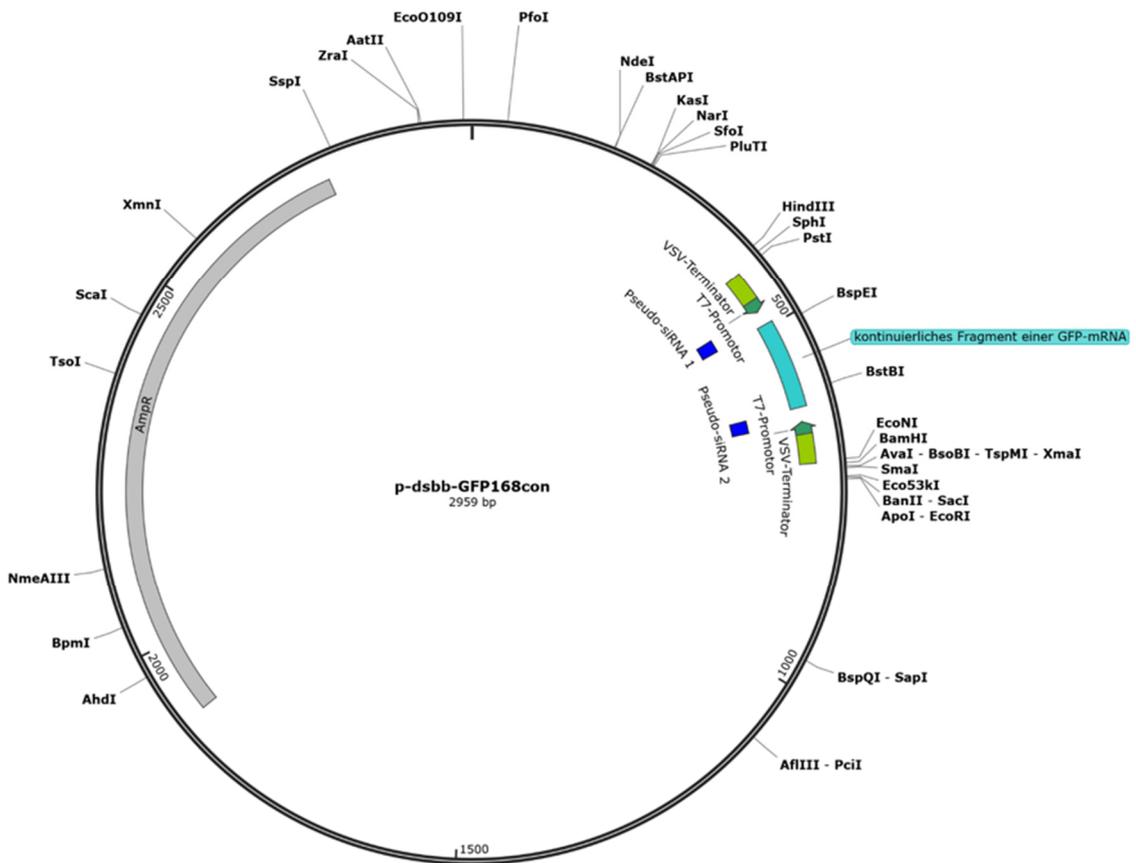


Abbildung 37 Plasmidkarte des im Rahmen dieser Arbeit generierten p-dsbb-GFP168con.

Merkmale

VSV-Terminator:	417-457
T7-Promotor:	458-475
Pseudo-siRNA 1:	475-495
kontinuierliches Fragment aus CMV-RNA 2:	496-621
Pseudo-siRNA 2:	622-642
T7-Promotor:	642-659
VSV-Terminator:	660-701
Ampicillin-Resistenzgen (AmpR):	1899-2759

7.2.4 Plasmidkarte: p-dsbbCMV21nt

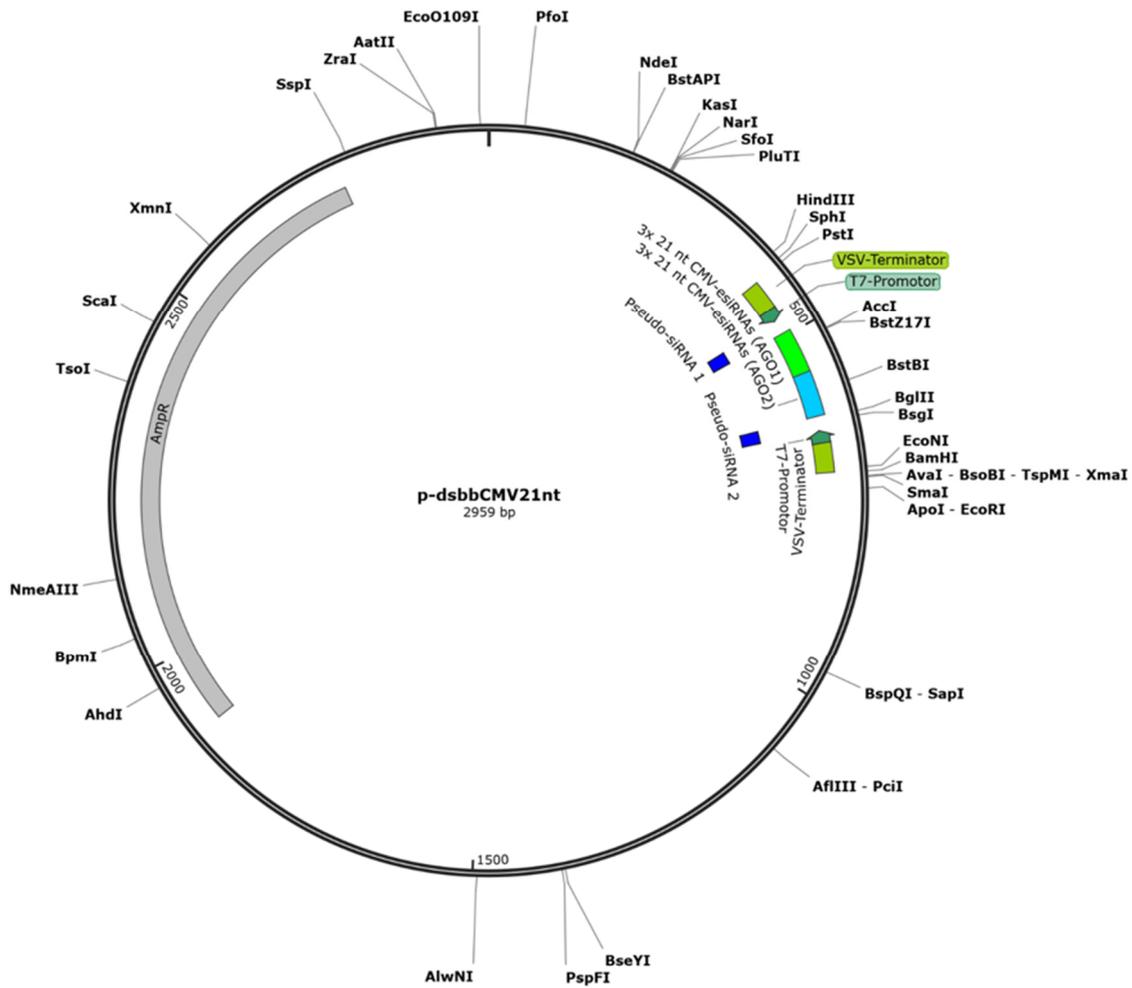


Abbildung 38 Plasmidkarte des im Rahmen dieser Arbeit generierten p-dsbbCMV21nt.

Merkmale

VSV-Terminator:	417-457
T7-Promotor:	458-475
Pseudo-siRNA 1:	475-495
3x 21 nt CMV-esiRNAs (AGO1):	496-558
3x 21 nt CMV-esiRNAs (AGO2):	559-621
Pseudo-siRNA 2:	622-642
T7-Promotor:	642-659
VSV-Terminator:	660-701
Ampicillin-Resistenzgen (AmpR):	1899-2759

7.2.5 Plasmidkarte: p-dsbbCMV22nt

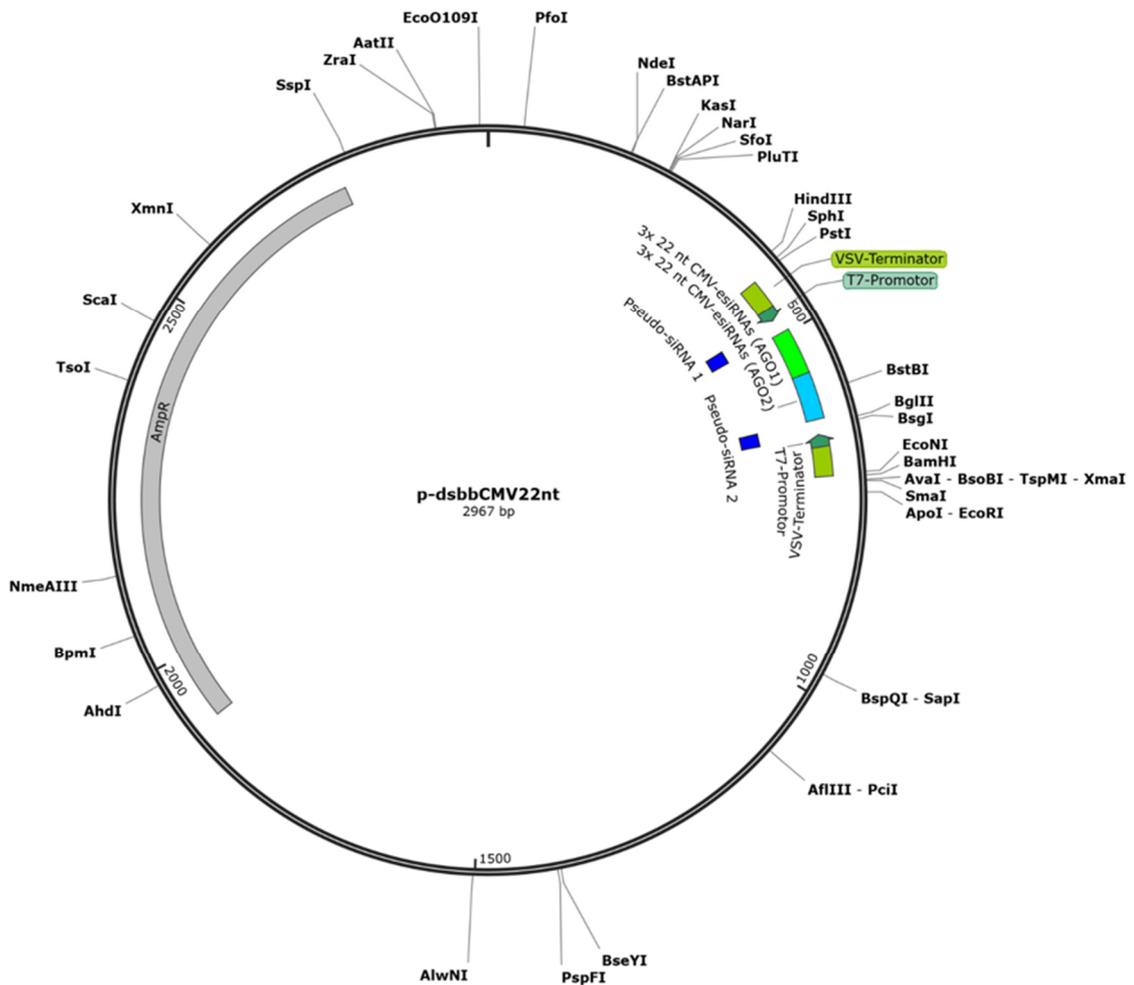


Abbildung 39 Plasmidkarte des im Rahmen dieser Arbeit generierten p-dsbbCMV22nt.

Merkmale

VSV-Terminator:	417-457
T7-Promotor:	458-475
Pseudo-siRNA 1:	475-496
3x 22 nt CMV-esiRNAs (AGO1):	497-562
3x 22 nt CMV-esiRNAs (AGO2):	563-628
Pseudo-siRNA 2:	629-650
T7-Promotor:	650-667
VSV-Terminator:	668-709
Ampicillin-Resistenzgen (AmpR):	1907-2767

7.2.6 Plasmidkarte: p-dsbbCMV21nt-5'U

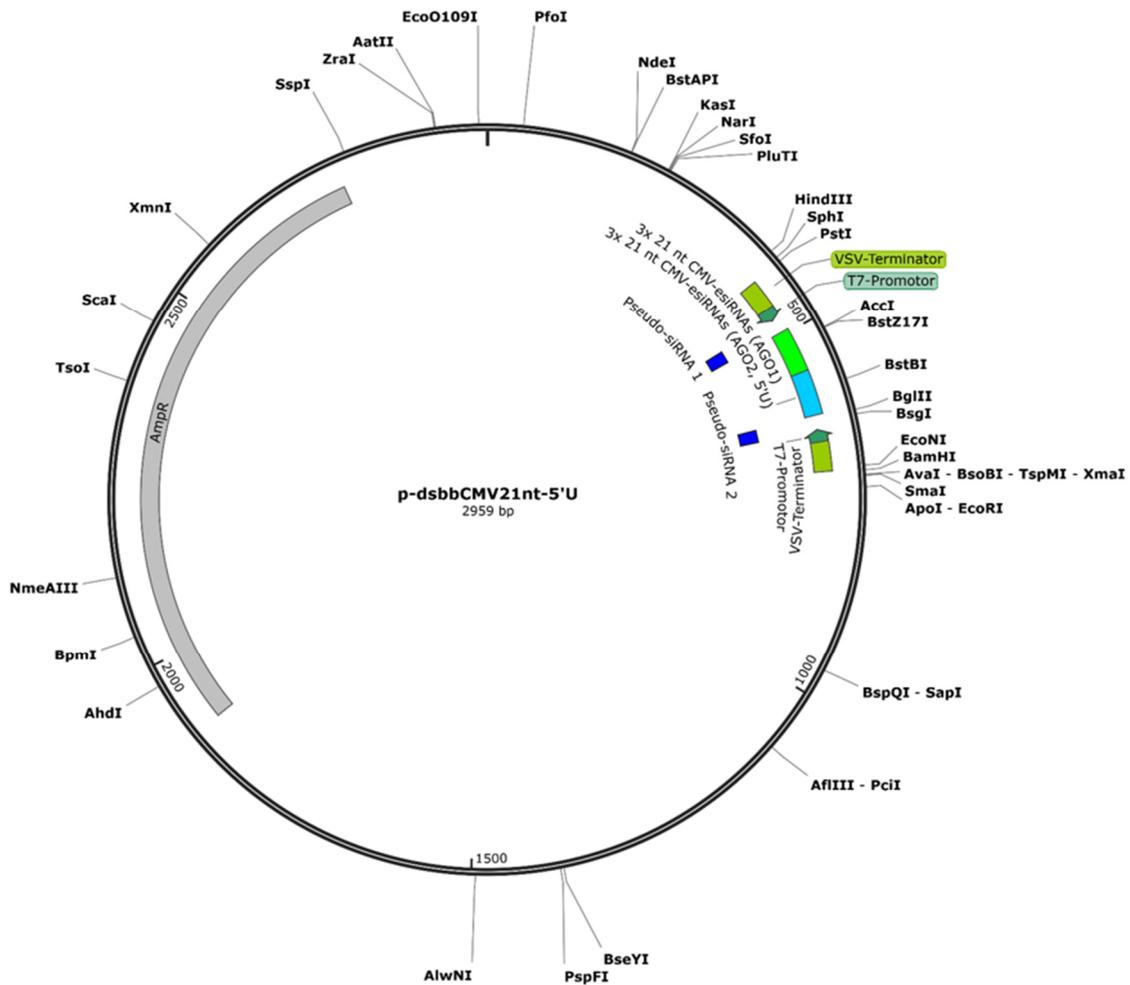


Abbildung 40 Plasmidkarte des im Rahmen dieser Arbeit generierten p-dsbbCMV21nt-5'U.

Merkmale

VSV-Terminator:	417-457
T7-Promotor:	458-475
Pseudo-siRNA 1:	475-495
3x 21 nt CMV-esiRNAs (AGO1):	496-558
3x 21 nt CMV-esiRNAs (AGO2, 5'U):	559-621
Pseudo-siRNA 2:	622-642
T7-Promotor:	642-659
VSV-Terminator:	660-701
Ampicillin-Resistenzgen (AmpR):	1899-2759

7.2.7 Plasmidkarte: p-dsbbCMV21nt-5'A

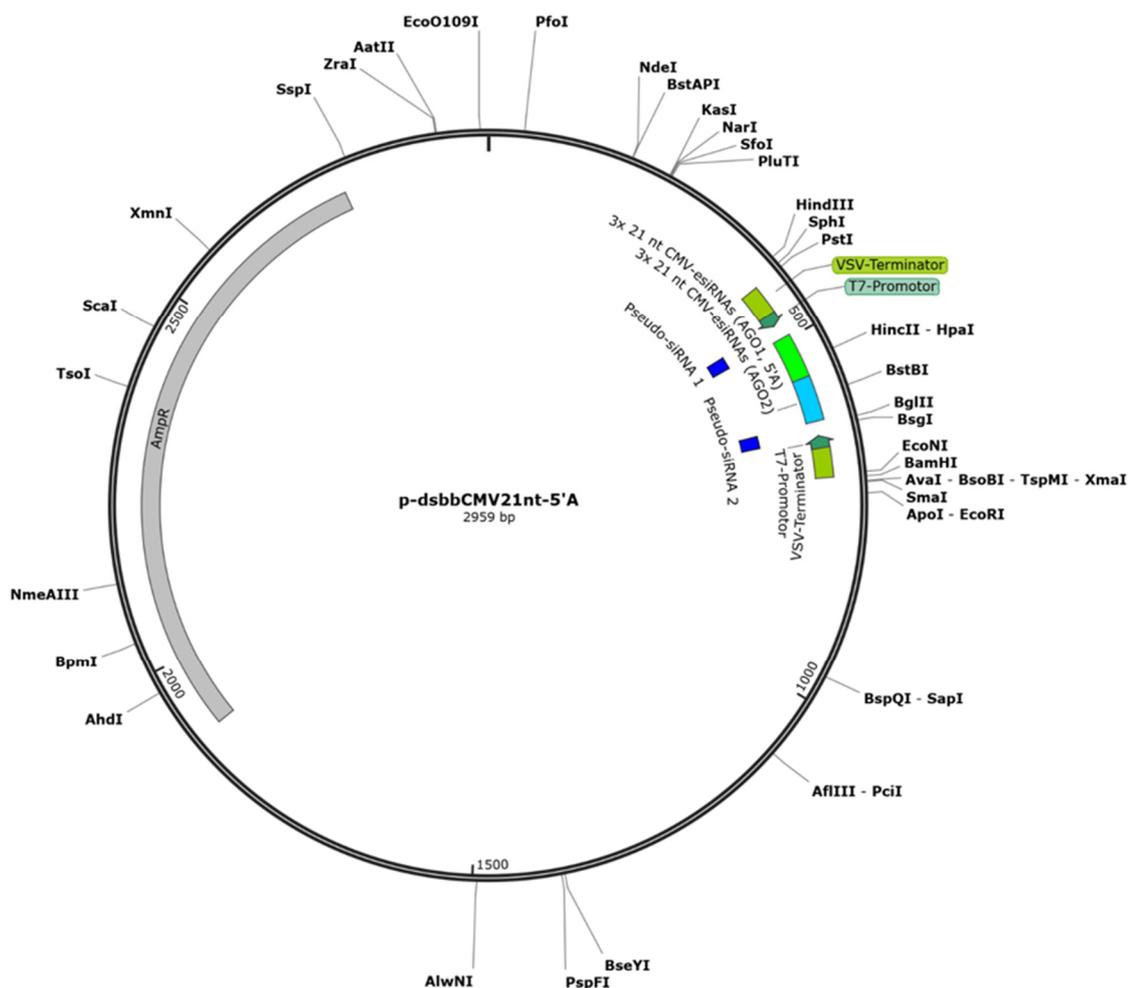


Abbildung 41 Plasmidkarte des im Rahmen dieser Arbeit generierten p-dsbbCMV21nt-5'A.

Merkmale

VSV-Terminator:	417-457
T7-Promotor:	458-475
Pseudo-siRNA 1:	475-495
3x 21 nt CMV-esiRNAs (AGO1, 5'A):	496-558
3x 21 nt CMV-esiRNAs (AGO2):	559-621
Pseudo-siRNA 2:	622-642
T7-Promotor:	642-659
VSV-Terminator:	660-701
Ampicillin-Resistenzgen (AmpR):	1899-2759

7.3 DNA-Oligonukleotide

Tabelle 17 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primer und DNA-Oligonukleotide. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firmen Eurofins Genomics (Ebersberg, D) sowie Microsynth Seqlab (Göttingen, D).

Name	Sequenz (5'→3')
Primer zur Sequenzierung der CMV-cDNA-Klone	
CMV1seq1f	GAGTGCTTTCTCCGAAACTGAAG
CMV1seq2f	ATACGTTGCTACGCAGGCTG
CMV2seq1r	AGCGGTGTA CTTCTTAAACG
CMV2seq1f	ACATGTAGTTCAAGCCGTTTGC
CMV3seq1r	GTCCATGACTCGACTCAATTC
CMV3seq1f	CCGCAGGTGGTTAACGGTCTTTAG
CMV1seq1f	CTGGATCATGTTAGACTTCGACAG
CMV1seq1r	CCGAACTCGTCAGAGAGTAAGAAC
CMV2seq2f	GTAATACACTGATATTACCAAG
CMV3seq2f	GTCGTGGAGAAATCCACGCCAGCAG
CMV2FNYseq2f	TGAACGGGTTGTCCATCCAG
CMV1seq3f	TGATCGTTACCGCGAACAAG
Standard-Primer zur Sequenzierung von Plasmiden ausgehend von pUC18	
SeqUPN	AGGGTTTTCCAGTCACGACGTTG
SeqRPN	CAATTCACACAGGAAACAGCTATG
Primer zur Generierung von DNA-templates für die <i>in-vitro</i>-Transkription von CMV-RNAs	
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC
T7CMV1_MK1r	CCCTAATACGACTCACTATAGGGTCTCCTTTTAGAGACC
TraCMV1G_MK1r	GGGTCTCCTTTTAGAGACC
TraCMV1T_MK1r	TGGTCTCCTTTTAGAGACC
T7CMV2_MK1f	CCCTAATACGACTCACTATAGGTTTATTACAAGAGCGTAC
TraCMV2G_MK1r	GGGTCTCCTTTTGAGGCC
TraCMV2T_MK1r	TGGTCTCCTTTTGAGGCC
T7CMV3_MK1f	CCCTAATACGACTCACTATAGGTAATCTTACCACTGTGTGTG
TraCMV2_MK1f	GGTTTATTACAAGAGCGTAC
T7CMV2_MK1r	CCCTAATACGACTCACTATAGGGTCTCCTTTTGAGGCC
TraCMV3_MK1f	GGTAATCTTACCACTGTGTGTG
Primer zur Generierung von DNA-templates für die Transkription der GFP-target-RNA	
T7GFP2f	CGTAATACGACTCACTATAGGAGAATCGAGTAAAAGGTATTG
TraGFP1r	ATTTGCGGCCGCTTATCTAGATCCGGTGGATCCCG

DNA-Oligonukleotide zur Generierung von <i>templates</i> für die Transkription von dsRNAs als DCL-Substrate	
GFP- sowie CMV-Kontroll-Konstrukt	
fragCMV168-1f	GACCATGAAGACTCTAGGGCGAATTGGGTACCGGGGAATAACCGGGTACATC GCGAG
fragCMV168-1r	GACCATGAAGACTCATAGGGAGACCGGCAGATCTGAACCGAACCATGAAGTG TTTT
fragGFP168-1f	GACCATGAAGACTCTAGGGCGAATTGGGTACCGGGCAAGATCTGAGTCCGGA CTTGT
fragGFP168-1r	GACCATGAAGACTCATAGGGAGACCGGCAGATCTGATGTCCACACAATCTGCC CTTTC
CMV-spezifische esiRNA-Konstrukte (21 nt siRNA-Versionen)	
siR6CMV21-1f	TAGGGCGAATTGGGTACCGGGCATTACGTTTCTTAATTGCTGTATACTTTCTT ATGATACGTTATCAGATTTTTCAAGGTAATCT
siR6CMV21-2f	TGATGAGCTCCTTGTGCTTTTTTGTTCGAAGTTCTTACTCTTTCGTCGAAAGTG CAGACTATTCTCAGATCTGCCGGTCTCC
siR6CMV21-1r	ATCAAGATTACCTTGAAAAATCTGATAACGTATCATAAGAAGAGTATACAGCA ATTAAGAAACGTAATGCCCGGTACCCAATTCGC
siR6CMV21-2r	ATAGGGAGACCGGCAGATCTGAGAATAGTCTGCACTTTCGACGAAAGAGTAA GAACTTCGAACAAAAAAGCGACAAGGAGCTC
CMV-spezifische esiRNA-Konstrukte (22 nt siRNA-Versionen)	
siR6CMV22-1f	TAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCATTACGTTTCTTAATTGCTGTAATACTTCTC TTATGATACGTTATTAGATTTTTCAAGGTAATCTT
siR6CMV22-2f	ATGATGAGCTCCTTGTGCTTTATTTGTTCGAAGTTCTTACTCTGTTTCGTCGAAA GTGCAGACTATTCATCAGATCTGCCGGTCTCC
siR6CMV22-1r	TCATAAGATTACCTTGAAAAATCTGAATAACGTATCATAAGAAGAGTATTACA GCAATTAAGAAACGTAATGGCCCGGTACCCAATTCGC
siR6CMV22-2r	ATAGGGAGACCGGCAGATCTGATGAATAGTCTGCACTTTCGACGAACAGAGT AAGAACTTCGAACAAATAAAGCGACAAGGAGCTCA
AGO1-spezifische Variante der dsCMV6si21	
siR6CMV21-4f	TGATGAGCTCCTTGTGCTTATTTGTTCGAAGTTCTTACTCATTTCGTCGAAAGTG CAGACTAATCTCAGATCTGCCGGTCTCC
siR6CMV21-4r	ATAGGGAGACCGGCAGATCTGAGATTAGTCTGCACTTTCGACGAATGAGTAA GAACTTCGAACAAATAAAGCGACAAGGAGCTC
AGO2-spezifische Variante der dsCMV6si21	
siR6CMV21-3f	TAGGGCGAATTGGGTACCGGGCAATACGTTTCTTAATTGCTGTAAACTTCTTCTT ATGATACGTTAACAGATTTTTCAAGGTAATCT
siR6CMV21-3r	ATCAAGATTACCTTGAAAAATCTGTTAACGTATCATAAGAAGAGTTTACAGCAA TTAAGAAACGATTGCCCGGTACCCAATTCGC
Primer zum Nachweis viraler RNA aus cDNA	
T7_CMV-S_3'reg1r	CCCTAATACGACTCACTATAGGGCACCCGTACCCTGAAACTAGC
Tra_CMV-S_3'reg1f	GGCGGGATCTGAGTTGGC

7.4 RNA-Oligonukleotide

Tabelle 18 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete siRNAs. Die Synthese der RNAs erfolgte durch die Firma biomers.net GmbH (Ulm, D).

siRNA	<i>guide</i> -Strang (5'→3')	<i>passenger</i> -Strang (5'→3')
Basierend auf CMV-RNA 2		
siCMV2-2441m	UUGCACCUACGUUCAAUUCCA	GAAUUGAACGUAGGUGCAAUG
siCMV2-2562m	UUUGAACGCGCUCUCUCGCGUG	GCGAGAGAGCGCGUUCAAAUC
siCMV2-186m	UUGCUCAGAUCGAAACGUUC	ACGUUUGCGAUCUGAGCAACG
siCMV2-1613m	UUGACAUCAAAUCCUGCCAUC	UGGCAGGAUUUGAUGUCAAGA
siCMV2-1844m	GUAUUGCCAAAAUAAGUGAGU	UCACUUAUUUUGGCAAUACCA
siCMV2-1489m	UACUCUUCUUAUGAUACGUUA	ACGUAUCAUAAGAAGAGUAUA
siCMV2-149m	UCGACACCGUAACUGCCGUUC	ACGGCAGUUACGGUGUCGACA
siCMV2-1982m	UUGAAAAGAGUUGUGAAUUUA	AAUUCACAACUCUUUUAACA
siCMV2-2727m	UUACCGGCGAACCAUUCUGUA	CAGAUUGGUUCGCCGGUAACG
siCMV2-1172m	UUACGUUUCUUAUUUGCUGUA	CAGCAAUUAAGAAACGUAAUG
siCMV2-359m	UCAGAUUUUUAAGGUAUUCU	AUUACCUUGAAAAUCUGAUG
siCMV2-2740m	UUCCGCCAUUCGUUACCGGC	CGGUAACGAAUGGGCGGAAGG
siCMV2-2634m	ACAUGGCGGCAUGACCCUGUC	CAGGGUCAUGCCGCAUGUGA
siCMV2-1054m	ACUGUCGAAGUCUAACAUGAU	CAUGUUAGACUUCGACAGUCU
siCMV2-2041m	AGAGUAAGAACUUCGAACAAA	UGUUCGAAGUUCUACUCUCU
siCMV2-1020m	AUAGUCUGCACUUCGACGAA	CGUCGAAAGUGCAGACUAUUC
siCMV2-557m	AAAUCAGAUUUAGUGUAAAUA	UUUACACUAAAUCUGAUUUUCU
siCMV2-2801m	ACUCAGCUCGCCACAGAAA	UCUGUGGCGGGAGCUGAGUUG
siCMV2-2863m	AUGGACAACCCGUUACCACA	UGGUGAACGGGUUGUCCAUC
siCMV2-2955m	AAACCUAGGAGAUUGGUUCAA	GAAACCAUCUCCUAGGUUUCU
siCMV2-1248m	AAUGAAGAAUCUCUCAGCCAC	GGCUGAGAGAUUCUUCAUUUC
siCMV2-380m	AAAGCGACAAGGAGCUCAUCA	AUGAGCUCCUUGUCGCUUUUG
siCMV2-540m	AAUAGCCGCGACCAGGUCUUC	AGACCUUGUCGCGGCUAUUUA
siCMV2-449m	AUAAAAGAACAUUUAUUAAAC	UUAAUAAAUGUUCUUUUUUUU
siCMV2-407m	AUACGCAUGGGUUUGACCAUC	UGGUCAAACCAUGCGUAUCG
siCMV2-2748m	AAAGCACCUUCCGCCAUUCG	AAUGGGCGGAAGGUGCUUUCU
siCMV2-1489m-22	UACUCUUCUUAUGAUACGUUAU	AACGUAUCAUAAGAAGAGUAUA
siCMV2-1172m-22	UUACGUUUCUUAUUUGCUGUAA	ACAGCAAUUAAGAAACGUAAUG

siCMV2-359m-22	UCAGAUUUUUCAAGGUAUUCUU	GAUUACCUUGAAAAUCUGAUG
siCMV2-2041m-22	AGAGUAAGAACUUCGAACAAAU	UUGUUCGAAGUUCUACUCUCU
siCMV2-1020m-22	AUAGUCUGCACUUUCGACGAAC	UCGUCGAAAGUGCAGACUAUUC
siCMV2-380m-22	AAAGCGACAAGGAGCUCAUCAU	GAUGAGCUCCUUGUCGCUUUUG
Basierend auf CMV-RNA 3		
siCMV3-35m	ACACACACACGCACACACACA	UGUGUGUGCGUGUGUGUGUGU
siCMV3-151m	UUAAAGUCCUACUGGUACCUU	GGUACCAGUAGGACUUUAACU
siCMV3-239m	UCACACUCAGUAGCCAUUUUC	AAAUGGCUACUGAGUGUGACC
siCMV3-358m	AUUCACCAACAUCAUAUCCAG	GGAUUGAUGUUGGUGAAUUA
siCMV3-478m	AUAACUCCUUGUCGCCAGAU	CUGGGCGACAAGGAGUUAUCU
siCMV3-496m	AUUGCCCAUCUAUGGGAGUA	UCUCCAUAGAUGGGCAAUGC
siCMV3-507m	UAACGAAACGCAUUGCCCAUC	UGGGCAAUGCGUUUCGUUACA
siCMV3-592m	AACACCGCUUACGAUUCCTAA	GGGAAUCGUAAGCGGUGUUUU
siCMV3-593m	AAACACCGCUUACGAUUCCTA	GGAAUCGUAAGCGGUGUUUUG
siCMV3-733m	AAGGCAGUACUAGAGUCUUC	AAGACUCUAGUACUGCCUUC
siCMV3-985m	UUUAUACUAAUACGCACCAA	GGUGCGUAUUAGUAUAUAAGU
siCMV3-988m	UACUUAUACUAAUACGCAC	GCGUAUUAGUAUAUAAGUAUU
siCMV3-1019m	AUAGAUUAAGUAUAUAUGUACA	UACAUAAUACUUAUCUAUAG
siCMV3-1098m	UUACUAAAACCAGAUGUGUUC	ACACAUCUGGUUUUAGUAAGC
siCMV3-1132m	AAGAGGAAUUGAACCUCAAAA	UUGAGGUUCAAUCCUCUUC
siCMV3-1394m	AACGUCUUAUUAAGUCGCGAA	CGCGACUUAUAAGACGUUAG
siCMV3-1569m	AACAAGCUUCUUAUCAUAUUC	AUAUGAUAGAAGCUUGUUUC
siCMV3-2061m	UUCUCCACGACUGACCAUUUU	AAUGGUCAGUCGUGGAGAAAU
siCMV3-2099m	AAGGCGCCUCAGAGAUUUGUA	CAAUCUCUGAGGCGCCUUG
siCMV3-2174m	UACCCUGAAACUAGCACGUUG	ACGUGCUAGUUUCAGGGUACG
GFP-siRNA als Positivkontrolle und Kompetitor-siRNA		
gf698 (21U)	UAGUUCAUCCAUGCCAUGUGU	ACAUGGCAUGGAUGAACUAUA
gf698 (21A)	AAGUUCAUCCAUGCCAUGUGU	ACAUGGCAUGGAUGAACUUUA

7.5 Chemikalien

Acrylamid / Bisacrylamid Rotiphorese 30 (37,5 : 1)	Roth, Karlsruhe, D
Acrylamid / Bisacrylamid Rotiphorese 40 (19 : 1)	Roth, Karlsruhe, D
Agarose low EEO	AppliChem, Darmstadt, D
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumthiocyanat	AppliChem, Darmstadt, D
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, D
Bacto-Agar	Becton, Dickinson & Co., MD, USA
Bacto-Hefe-Extrakt	Becton, Dickinson & Co., MD, USA
Bacto-Pepton	Becton, Dickinson & Co., MD, USA
Bacto-Trypton	Becton, Dickinson & Co., MD, USA
Borsäure	AppliChem, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
Cellulase Onozuka RS	Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL
Chloroform	Roth, Karlsruhe, D
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt, D
Essigsäure	VWR International, Darmstadt, D
Ethanol	VWR International, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, D
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Formamid (deionisiert)	Roth, Karlsruhe, D
Glycerol (wasserfrei)	AppliChem, Darmstadt, D
Glycin	AppliChem, Darmstadt, D
Guanidiniumthiocyanat	AppliChem, Darmstadt, D
Harnstoff	AppliChem, Darmstadt, D
HCl	VWR International, Darmstadt, D
Hepes	AppliChem, Darmstadt, D
Isoamylalkohol	VWR International, Darmstadt, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Thermo Scientific, Bonn, D
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Kreatinphosphat	AppliChem, Darmstadt, D
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Mannitol	AppliChem, Darmstadt, D

β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
Methanol	VWR International, Darmstadt, D
MOPS	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Natriumthiocyanat	Merck, Darmstadt, D
Pectolyase	Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL
Percoll	GE Healthcare, München, D
Phenol (equilibriert, stabilisiert)	AppliChem, Darmstadt, D
Phenol (wassergesättigt, stabilisiert)	AppliChem, Darmstadt, D
PIPES	AppliChem, Darmstadt, D
Protease-Inhibitor (<i>cOmplete EDTA-free</i> Protease-Inhibitor)	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Siliziumcarbid (Carborundum)	Roth, Karlsruhe, D
Spermin	Roth, Karlsruhe, D
SUCOFiN (Magermilchpulver)	TSI GmbH & Co. KG, Zeven, D
TEMED	Roth, Karlsruhe, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
tRNA (<i>from yeast</i>)	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Tween 20	Merck, Darmstadt, D
Wasser (Nuklease-frei)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Xylencyanol	AppliChem, Darmstadt, D

7.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage ABJ	KERN & SOHN GmbH, Balingen, D
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Dounce Homogenizer (tight fit)</i>	KONTES GLASS, Vineland, USA
Dri-Block, DB-3D	TECHNE, Staffordshire, UK
Einmalküvetten PLASTIBRAND, Polystyrol	Roth, Karlsruhe, D
Elektrophorese <i>Power Supply</i> Consort EV 233	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Feinwaage ABJ 120-4M	KERN & SOHN GmbH, Balingen, D
<i>FiveEasy</i> Standard pH-Messgerät	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, D
<i>FlexCycler² Thermocycler</i>	Analytik Jena AG, Jena, D
Gradientenmischer	Hoefer, Holliston, USA
Heizblock QBD2	Grant Instruments, Cambridgeshire, UK
Kontaminationsmonitor LB122	Berthold Technologies GmbH & Co.KG, Bad Wildbad, D
LI-COR ODYSSEY CLx	LI-COR, Lincoln, USA
Magnetrührer IKA Reo <i>basic</i> C	IKA, Staufen, D
<i>NanoDrop One</i> Spektralphotometer	Thermo Scientific, Bonn, D
Nitrocellulose-Membran	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Pflanzen-Anzuchtammer/Percival	CLF Plant Climatics, Wertingen, D
pH-Meter inoLab pH 7110	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, D
<i>Power Supply Pack</i> P25	Biometra, Göttingen, D
Präzisionswaage PCB	KERN & SOHN GmbH, Balingen, D
Rotations-Labormischer F205	Falc Instruments s.r.l, Treviglio, IT
Rotor SW40Ti	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
Standard <i>Orbital Shaker</i>	VWR International, Darmstadt, D
<i>Storage Phosphor Screen</i> S 230	GE Healthcare, München, D
Szintillationszähler 300 SL	Hidex Deutschland Vertrieb GmbH, Mainz, D
<i>Thermocycler MasterCycler personal</i>	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf, Hamburg, D
Typhoon Trio+ <i>Phosphoimager</i>	GE Healthcare, München, D
<i>Uni-Geldryer</i> 3545D	Bio-Rad, Hercules, USA
UVP UVsolo <i>touch</i>	Analytik Jena AG, Jena, D
Vakuumpumpe, LABOPORT N 840	KNF DAC GmbH, Hamburg, D
VIBRAX VXR <i>basic</i>	IKA, Staufen, D
Vortex <i>Genius</i> 3	IKA, Staufen, D
Waage <i>accu-622</i>	Thermo Scientific, Bonn, D
<i>Whatman</i> -Papier GB 005	GE Healthcare, München, D
Winkelrotor 6-fach	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, D

Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Mikro 200	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge Rotina 38R	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifugenröhrchen <i>Ultra clear</i> 14x95 mm	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Vereinfachtes Schema des antiviralen RNA- <i>silencing</i> in Pflanzen.....	3
Abbildung 2 Schematischer Aufbau von <i>Dicer</i> - und <i>Dicer-like</i> -Proteinen verschiedener Modellorganismen.	4
Abbildung 3 Schematische Darstellung des AGO-basierten mRNA-Abbaus.....	6
Abbildung 4 <i>Cucumber mosaic virus</i>	9
Abbildung 5 Genomorganisation von CMV (Fny).	11
Abbildung 6 Agarose-Gelelektrophorese der CMV-RNAs.....	37
Abbildung 7 Beispiele symptomatischer und asymptomatischer <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen.	37
Abbildung 8 Ermittlung der minimalen CMV-RNA-Menge für eine zuverlässige Infektion von <i>N. benthamiana</i>	38
Abbildung 9 DCL-Assay mit genomischen CMV-dsRNAs.....	39
Abbildung 10 NGS-Analyse kleiner RNAs aus dem DCL-Assay mit CMV-dsRNAs 2 bzw. 3.	40
Abbildung 11 Isolierung AGO-gebundener vsiRNAs.	42
Abbildung 12 NGS-Analyse kleiner RNAs aus den AGO-Immunpräzipitationen mit den CMV-dsRNAs 2 bzw. 3.....	43
Abbildung 13 Relative Häufigkeit der entsprechenden 5'-terminalen Nukleotide der AGO1- und AGO2-gebundenen 21 nt langen siRNA- <i>guide</i> -Stränge abgeleitet vom Plus- und Minusstrang der CMV-RNAs 2 und 3.....	44
Abbildung 14 Schematische Darstellung des <i>Slicer</i> -Assays.....	46
Abbildung 15 <i>Slicer</i> -Assay mit AGO1- und AGO2-präferierten vsiRNAs aus dem <i>screening</i> mit CMV-dsRNAs 2 und 3.....	47
Abbildung 16 Kompetitiver <i>Slicer</i> -Assay mit AGO1- und AGO2-präferierten vsiRNAs aus dem <i>screening</i> mit CMV-dsRNAs 2 und 3.	48
Abbildung 17 Charakterisierung RNA 2-spezifischer vsiRNAs <i>in planta</i>	50
Abbildung 18 RT-PCR zum Nachweis der viralen Infektion auf RNA-Ebene.	51
Abbildung 19 Charakterisierung RNA 3-spezifischer vsiRNAs <i>in planta</i>	52
Abbildung 20 Vergleich der <i>Slicer</i> -Aktivitäten von esiRNA-Kandidaten aus der RNA 2- und RNA 3-Analyse.	54
Abbildung 21 Vergleich der esiRNA-Kandidaten aus der RNA 2- und RNA 3-Analyse bzgl. ihrer AGO-Affinität.....	55
Abbildung 22 Vergleich 21 nt bzw. 22 nt langer siRNAs.	57
Abbildung 23 Vergleich der protektiven Wirkung 21 nt und 22 nt langer siRNAs <i>in planta</i>	58
Abbildung 24 DsRNA-Design.	61

Abbildung 25 Schematische Darstellung des DCL/ <i>Slicer</i> -Assays.	62
Abbildung 26 Charakterisierung des <i>target</i> -Abbaus in Abhängigkeit verschiedener dsRNA-Mengen und dsRNA-Termini.	63
Abbildung 27 Prozessierung der dsRNA durch DCLs <i>in vitro</i>	64
Abbildung 28 Prozentualer Anteil 20-25 nt langer <i>reads</i> prozessiert aus dsCMV6si21 und dsCMV6si21-Ü.	66
Abbildung 29 Anteil der 21 nt esiRNA- <i>reads</i> an der Gesamtheit aller 21 nt- <i>reads</i>	67
Abbildung 30 Vergleich der protektiven Wirkung verschiedener dsRNAs <i>in planta</i>	70
Abbildung 31 Vergleich der protektiven Wirkung doppel- sowie einzelsträngiger RNA <i>in planta</i>	72
Abbildung 32 Vergleich AGO1- und AGO2-spezifischer dsRNAs <i>in vitro</i>	73
Abbildung 33 Vergleich AGO1- und AGO2-spezifischer dsRNAs <i>in planta</i>	74
Abbildung 34 Schematische Darstellung der <i>target sites</i> effizienter siRNAs aus RNA 2 und RNA 3.	81
Abbildung 35 Plasmidkarte des im Rahmen dieser Arbeit generierten p-dsRNA- <i>backbone</i>	113
Abbildung 36 Plasmidkarte des im Rahmen dieser Arbeit generierten p-dsbb-CMV168con.	114
Abbildung 37 Plasmidkarte des im Rahmen dieser Arbeit generierten p-dsbb-GFP168con.	115
Abbildung 38 Plasmidkarte des im Rahmen dieser Arbeit generierten p-dsbbCMV21nt.	116
Abbildung 39 Plasmidkarte des im Rahmen dieser Arbeit generierten p-dsbbCMV22nt.	117
Abbildung 40 Plasmidkarte des im Rahmen dieser Arbeit generierten p-dsbbCMV21nt-5'U.	118
Abbildung 41 Plasmidkarte des im Rahmen dieser Arbeit generierten p-dsbbCMV21nt-5'A.	119

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete prokaryotische Zellen (Thermo Scientific)	16
Tabelle 2 Komponenten einer <i>in-vitro</i> -Translation	19
Tabelle 3 Zusammensetzung der Puffer für die <i>in-vitro</i> -Translation	19
Tabelle 4 Antibiotika-Konzentrationen	22
Tabelle 5 Zusammensetzung einer <i>DreamTaq</i> - sowie einer <i>Phusion</i> -PCR-Reaktion	24
Tabelle 6 Reaktionsbedingungen der <i>DreamTaq</i> - bzw. der <i>Phusion</i> -PCR-Reaktion	24
Tabelle 7 Komponenten einer <i>in-vitro</i> -Transkription	26
Tabelle 8 Reaktionsansatz zur Generierung radioaktiv markierter RNA	27
Tabelle 9 Mastermix für die reverse Transkription von RNA	30
Tabelle 10 Ablauf der Silberfärbung von Nukleinsäuren in Polyacrylamid-Gelen nach Blum <i>et al.</i> [97]	32
Tabelle 11 Komponenten der <i>in-vitro</i> -Translation für die anschließende AGO-Immunpräzipitation ..	33
Tabelle 12 Komponenten zur Herstellung zweier SDS-Gele	35
Tabelle 13 siRNA-Kandidaten aus NGS-Analysen mit CMV-RNAs 2 und 3.....	45
Tabelle 14 Prozentualer Anteil der <i>guide</i> - und <i>passenger</i> -Stränge CMV-spezifischer esiRNAs an den 21 nt- <i>reads</i>	68
Tabelle 15 Vergleich der <i>target sites</i> CMV (Fny)-spezifischer siRNAs mit RNA-Sequenzen weiterer CMV- Stämme.....	83
Tabelle 16 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide.....	111
Tabelle 17 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primer und DNA-Oligonukleotide.	120
Tabelle 18 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete siRNAs.	122

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Sven-Erik Behrens für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich möchte mich auch für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken sowie für die wertvolle Zeit, die er sich genommen hat, um in konstruktiven Diskussionen die Entstehung dieser Doktorarbeit zu unterstützen.

Bei Prof. Dr. Gary Sawers und Prof. Dr. Norbert Tautz möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens bedanken.

Ganz besonders dankbar bin ich Herrn Dr. Torsten Gursinsky für seinen unermüdlichen Einsatz! Mit seinem enormen Wissen und seiner außerordentlichen Hilfsbereitschaft hat er einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung dieser Arbeit geleistet. Auch darüber hinaus danke ich Herrn Dr. Torsten Gursinsky für sein offenes Ohr, für unterhaltsame Lysatpräparationen sowie angeregte Unterhaltungen, besonders über die kontroversen Themen Musik und Sport.

Des Weiteren möchte ich Herrn Apl. Prof. Dr. Ralph Golbik für viele gute Gespräche und wertvolle Hinweise, unter anderem bei mathematischen Fragestellungen, sowie für seinen Einsatz in jeglichen Belangen im Labor danken.

Frau Dr. Selma Gago-Zachert danke ich für die interessierte und kritische Auseinandersetzung mit meinem Projekt und dafür, dass Sie mit ihrer umfangreichen Erfahrung einen großen Beitrag zum Gelingen der Pflanzenexperimente geleistet hat.

Ebenfalls ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei unseren technischen Assistentinnen Frau Dipl.-Biologin Katja Rostowski und Frau Christine Hamann, die mit viel Energie und Hilfsbereitschaft die reibungslose Arbeit im Labor ermöglichten und für alle damit einhergehenden Anliegen wichtige Ansprechpartnerinnen waren.

Ich danke auch allen weiteren derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung Mikrobielle Biotechnologie für die freundliche und konstruktive Arbeitsatmosphäre sowie die gegenseitige Motivation und Unterstützung. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit!

Mein persönlicher Dank gilt Frau Dr. Alexandra Meyer und Herrn M. Sc. Konstantin Stopp. Eure Hilfsbereitschaft ist bemerkenswert. Darüber hinaus habt ihr meinen Laboralltag nicht nur mit dem ein oder anderen *running gag* verschönert.

Herrn Prof. Fernando García-Arenal Rodríguez (Universidad Politécnica de Madrid) und Herrn Prof. John Carr (University of Cambridge) danke ich für die Bereitstellung der cDNA-Klone der genomischen CMV-RNAs.

Weiterhin gilt mein Dank dem Leiter der *Core Unit* DNA-Technologien, Herrn PD Dr. Knut Krohn, und Frau Kathleen Schön (Medizinische Fakultät, Universität Leipzig) für die Durchführung der NGS-Analysen sowie Herrn Claus Weinholdt und Herrn Dr. Jan Grau (Institut für Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die freundliche Kooperation zur Auswertung der generierten Daten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Steffen Abel, Frau Petra Jansen, Frau Sabine Voigt sowie dem gesamten Team der Versuchsgärtnerei des Leibniz-Instituts für Pflanzenbiochemie (Halle) für die Bereitstellung der Tabakpflanzen und auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Mikrobielle Biotechnologie, die mir viele Male beim Transport der Pflanzen geholfen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie inklusive meiner besten Freundin Bianca und meinem Robi. Ich danke euch von ganzem Herzen für eure konstante Unterstützung in allen Belangen und die fortwährende Motivation während meiner gesamten Doktorandenzeit und darüber hinaus.

Danke, dass ihr immer hinter mir steht.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marie Knoblich
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

seit 11/2017 Promotion
Thema: „*RNA-silencing*-basierte Methoden zum Schutz von Pflanzen vor viralen Infektionen“,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Biochemie und Biotechnologie,
Abteilung Mikrobielle Biotechnologie,
Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

10/2015-10/2017 Master of Science Biochemie
Masterarbeit: „Charakterisierung der antiviralen Wirkung von *small interfering* RNAs des *Tomato bushy stunt virus*“,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Biochemie und Biotechnologie,
Abteilung Mikrobielle Biotechnologie,
Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

10/2012-08/2015 Bachelor of Science Biochemie
Bachelorarbeit: „Untersuchungen zur microRNA-vermittelten Regulation pflanzlicher Argonaut-Gene“,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Biochemie und Biotechnologie,
Abteilung Mikrobielle Biotechnologie,
Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

2005-2012 Abitur am Johann Heinrich Pestalozzi Gymnasium, Stadtroda

Publikationsliste

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften:

Kunisch, E., Maenz, S., Knoblich, M., Ploeger, F., Jandt, KD., Bossert, J., Kinne, RW., Alsalameh, S. (2017). Short-time pre-washing of brushite-forming calcium phosphate cement improves its in vitro cytocompatibility. *Tissue Cell*, 49(6), 697-710.

Gago-Zachert, S., Schuck, J., Weinholdt, C., Knoblich, M., Pantaleo, V., Grosse, I., Gursinsky, T., Behrens, S.-E. (2019). Highly efficacious antiviral protection of plants by small interfering RNAs identified in vitro. *Nucleic Acids Research*, 47(17), 9343–9357.

Patentanmeldung:

Europäische Patentanmeldung Nr. 22 205 810.9:

"Nukleinsäurewirkstoffe gegen variable Pflanzenpathogene",

Knoblich, M., Ghazemzadeh, A., Gago-Zachert, S., Gursinsky, T., Behrens, S.-E.

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der im Quellen- und Literaturverzeichnis aufgeführten Werke angefertigt habe. Textstellen, die aus diesen Werken inhaltlich oder wörtlich übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt wurde und ich mich erstmals für die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Leipzig, den 03.04.2023

Marie Knoblich