



**Untersuchungen zur Funktion eines viralen Suppressors
des RNA-silencing bei der Regulation der Aktivität von
microRNAs**

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I

(Biowissenschaften)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Robert Heinz Gerhard Pertermann

geb. am 04.04.1989 in Schkeuditz

Wer mit offenen Augen durch die Welt geht, sieht was in ihr vorgeht.

Diese schriftliche Ausführung stellt die archivierte Ausgabe der Dissertation von Herrn Robert Heinz Gerhard Pertermann dar. Die entsprechende Schrift wurde am 04.04.2019 zur Eröffnung des Promotionsverfahrens der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Naturwissenschaftliche Fakultät I, Dekanat) vorgelegt. Zur Bewertung wurden folgende Gutachter herangezogen:

1. Prof. Dr. Sven-Erik Behrens (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
2. Prof. Dr. Gary Sawers (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
3. Prof. Dr. Laura E. Rose (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Nach Eingang der Gutachten wurde die öffentliche Verteidigung am 17.10.2019 im großen Hörsaal des Institutes für Biochemie und Biotechnologie (Kurt-Mothes-Straße 3) unter Leitung von Prof. Dr. Elmar Wahle durchgeführt und bestanden. Die kumulierte Abschlussnote betrug 1,42 (*magna cum laude*).

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Das RNA- <i>silencing</i>	1
1.1.1	Komponenten des RNA- <i>silencings</i> in Angiospermen	2
1.1.1.1	Kleine RNAs (sRNAs)	2
1.1.1.2	<i>Dicer-like</i> -Ribonukleasen	5
1.1.1.3	<i>Argonaute</i> -Proteine	6
1.1.1.4	RNA-abhängige RNA-Polymerasen	8
1.1.2	Das antivirale RNA- <i>silencing</i>	8
1.1.3	Die miRNA-vermittelte Regulation der Genexpression	10
1.1.4	Das Zusammenspiel von siRNA- und miRNA-vermitteltem RNA- <i>silencing</i> bei viralen Infektionen von Pflanzen	12
1.2	Virale Suppressoren des RNA- <i>silencings</i> (VSRs)	14
1.2.1	p19: der VSR der Tombusviren	15
1.2.2	p19 und die Interaktion mit microRNAs	17
1.3	Zielstellung und Motivation der Arbeit	18
2.	Materialien und Methoden	20
2.1	Materialien	20
2.1.1	Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.2	Enzyme und kommerziell erhältliche Proteine	20
2.1.3	Nukleotide	20
2.1.4	Biologische Materialien und deren Kultivierung	20
2.1.4.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	20
2.1.4.2	Eukaryotische Zellen und Pflanzenmaterial	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Molekularbiologische Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäure (DNA)	22
2.2.1.1	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	22
2.2.1.2	Endonukleolytische Spaltung von DNA	23
2.2.1.3	Reinigung und Präzipitation von DNA	23
2.2.1.4	Konzentrationsbestimmung von DNA mittels UV/vis-Spektroskopie	24
2.2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	24
2.2.1.6	Isolation von DNA aus Agarosegelen	25

2.2.1.7	Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)	25
2.2.1.8	Sequenzierung von DNA	29
2.2.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten	29
2.2.1.10	Transformation von Plasmid-DNA	29
2.2.2	Molekulargenetische Arbeiten mit Ribonukleinsäuren (RNA)	29
2.2.2.1	<i>In-vitro</i> -Transkription	30
2.2.2.2	Reinigung und Präzipitation von RNA	30
2.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von RNA mittels UV/vis-Spektroskopie	31
2.2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese von RNA	31
2.2.2.5	RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial	31
2.2.2.6	Reverse Transkription	32
2.2.2.7	5'-Phosphorylierung kleiner RNA-Moleküle	32
2.2.2.8	Hybridisierungen kleiner RNA-Moleküle	32
2.2.2.9	Schmelzpunktanalyse von siRNAs und miRNAs	33
2.2.3	Proteinbiochemische Arbeiten	34
2.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.2.3.2	Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford	35
2.2.3.3	Protein-Konzentrationsbestimmung mittels UV/vis-Spektroskopie	36
2.2.3.4	Proteinbiosynthese und Zellaufschluss	36
2.2.3.5	Proteinreinigung von p19	37
2.2.3.6	Massenspektrometrische Untersuchungen von gereinigtem p19-Protein	39
2.2.3.7	Circular dichroismus-Messungen von p19-Varianten	39
2.2.3.8	Analytische Ultrazentrifugation von p19-Proben	40
2.2.3.9	Untersuchungen von p19-sRNA-Interaktionen	40
2.2.4	<i>In-vitro</i> -Versuche mit dem BY-2-Lysat (BYL)	42
2.2.4.1	Herstellung eines zytoplasmatischen Extraktes aus BY-2-Zellen	42
2.2.4.2	Mikrokokkus-Nuklease-Spaltung zellulärer mRNAs	43
2.2.4.3	Immunpräzipitation kleiner RNAs aus dem BY-2-Lysat	44
2.2.4.4	<i>In-vitro</i> -Translation	45
2.2.4.5	Luziferase-Reporterassay zur Darstellung von RISC-Aktivitäten	45
2.2.4.6	<i>cleavage</i> -Assays zur Darstellung von RISC-Aktivitäten	46
3.	Ergebnisse	48
3.1	Charakterisierungen der Bindungen von microRNAs durch p19	48
3.1.1	Immunpräzipitation von sRNAs aus dem BY-2-Lysat durch p19	48

3.1.2	Ableitungen der miRNA-Strukturen aus <i>Nicotiana benthamiana</i>	51
3.1.3	Differentielle Bindung der miRNAs 162, 168 und 403 durch p19 <i>in vitro</i>	53
3.2	Auswirkungen der differentiellen Bindung durch p19 auf das miRNA-vermittelte PTGS	57
3.2.1	Differentielle Beeinflussung von miRNA/RISC-Aktivitäten durch p19 <i>in vitro</i>	58
3.2.2	Spezifische Auswirkungen von p19 auf die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression <i>in vivo</i>	65
3.3	Molekulare Determinanten für die differentielle Bindung von miRNAs durch p19	70
3.3.1	Strukturdeterminanten für die differentielle Bindung von miRNAs durch p19 in der RNA-Duplex-Struktur	70
3.3.1.1	Generierung artifizierender RNA-Duplex-Moleküle zur Bestimmung von Bindungsdeterminanten <i>in vitro</i>	71
3.3.1.2	Systematische Charakterisierung der Bedeutung von Basenfehlpaarungen und G-U-Basenpaarungen in miR162-Varianten bei der Bindung durch p19	73
3.3.1.3	Charakterisierung der Bedeutung der G-U-Basenpaarungen in der miR168-Struktur bei der Bindung durch p19	76
3.3.2	Spezifische Aminosäuren in der p19-Primärstruktur für die differentielle Bindung von miRNAs durch p19	80
3.3.2.1	Ableitung von Aminosäureseitenketten für eine differentielle Bindung aus der Kristallstruktur	80
3.3.2.2	Untersuchung der miRNA-Bindung durch p19-Varianten im BYL	82
3.3.2.3	Biochemische Charakterisierung der p19-Varianten Q107A, V108A und G109A <i>in vitro</i>	84
3.4	Weiterführende Studien	87
4.	Diskussion	90
4.1	P19 moduliert miRNA-Aktivitäten während viraler Infektionen von Pflanzen	90
4.2	P19 reguliert miRNA-Aktivitäten durch eine differentielle Bindung unterschiedlich	93
4.2.1	P19 zeigt unterschiedliche Affinitäten bei Bindung an miR162, miR168 und miR403	94
4.2.2	P19 beeinflusst <i>in vitro</i> die Aktivitäten von miR162, miR168 und miR403 unterschiedlich	95

4.2.3	p19 zeigt eine differentielle Beeinflussung der Aktivitäten von miR162, miR168 und miR403 <i>in vivo</i>	96
4.3	Der molekulare Mechanismus der miRNA-Differenzierung von <i>CIRV</i> -p19.....	99
4.3.1	Determinanten für die differentielle Bindung von p19 an verschiedene miRNAs innerhalb der miRNA-Struktur.....	100
4.3.2	Konservierte Aminosäureseitenketten sind in die Differenzierung von miRNAs durch p19 involviert.....	102
4.4	Die biologische Bedeutung der miRNA-Diskriminierung.....	106
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	111
6.	Literaturverzeichnis.....	113
7.	Anhang.....	126

Abkürzungen

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
A_{260}/A_{280}	Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm
AGO	Argonaut-Nuklease
ad.	auffüllen auf... (latein: <i>addiere</i>)
b	Base(n)
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BYL	BY-2-Lysat
bzw.	beziehungsweise
c	zenti (10^{-2})
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CD	Circulardichroismus
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i>)
<i>CIRV</i>	<i>carnation italian ringspot virus</i>
<i>CymRSV</i>	<i>cymbidium ringspot virus</i>
dpi	<i>days post infection</i> (Tage nach der Infektion)
DCL	<i>Dicer-like</i> -Nuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleid acid)
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
engl.	englisch
<i>et al.</i>	und andere (latein: <i>et altera</i>)
f	femto (10^{-15})
F	Farad
FDR	<i>false discovery rate</i>
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase

h	Stunde(n)
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
hetsiRNA	<i>heterochromatic-siRNA</i>
H ₂ O	Wasser
hp-siRNA	<i>hairpin-derived-siRNA</i>
HR	<i>hypersensitive response</i>
lec	Anionenaustauschchromatographie (engl.: <i>ion exchange chromatography</i>)
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	kilo (10 ³)
K	Kelvin
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	Meter
m	mili (10 ⁻³)
M	Molar (Mol pro Liter)
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute(n)
MN	Mikrokokkus-Nuklease
mol	Mol
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i>)
miRNA	microRNA
n	nano (10 ⁻⁹)
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
natsiRNA	<i>natural-antisense-siRNA</i>
nt	Nukleotid(e)
Ω	Ohm
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	offenes Leseraster (engl. <i>open reading frame</i>)

p	pico (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	pH-Wert
PTGS	posttranskriptionelles Gen- <i>silencing</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> -PCR
RDR	RNA-abhängige RNA-Polymerase (engl.: RNA-dependent RNA polymerase)
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleid acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: sodium dodecylsulfate)
Sec	Größenausschlusschromatographie (engl.: <i>size exclusion chromatography</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sRNA	kleine RNA (engl.: <i>small RNA</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAV	<i>tomato aspermy virus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBSV	Tomatenzwergbuschvirus (engl.: <i>tomato bushy stunt virus</i>)
TCEP	Tris (2-carboxyethyl)-phosphinhydrochlorid
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGS	transkriptionelles Gen- <i>silencing</i>
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Aktivitätseinheit von Enzymen (engl.: <i>unit</i>)
UTR	untranslatierte Region (auch nichttranslatierte Region)
UV	ultraviolett/ultraviolettes Licht
V	Volt
VSR	viraler Suppressor des RNA- <i>silencings</i>

v/v	Volumen pro Volumen (engl.: <i>volume per volume</i>)
w/v	Masse pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i>)
x	mal
z.B.	zum Beispiel

Ribonukleosidtriphosphate

GTP Guanosin-5'-triphosphat

ATP Adenosin-5'-triphosphat

rNTP Ribonukleosidtriphosphat

rHTP Ribonukleosidtriphosphat ohne GTP

Desoxyribonukleosidtriphosphate

dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphat

Aminosäuren (Ein-Buchstaben-Code)

A Alanin

D Aspartat

K Lysin

Q Glutamin

V Valin

C Cystein

G Glycin

N Asparagin

T Threonin

W Tryptophan

1. Einleitung

Virale Infektionen von Pflanzen stellen eine bedeutende Schadensquelle in der weltweiten Agrarwirtschaft dar. Durch reduziertes oder verändertes Wachstum, Deformationen von Früchten oder nekrotische Erscheinungen werden Ernteerträge reduziert. So wurde 2013 ein jährlicher Verlust der globalen Felderträge von etwa 15 % errechnet, welcher auf pflanzliche Erkrankungen vor der Ernte zurückgeht [1]. Etwa die Hälfte dieser Erkrankungen ist viralen Ursprungs [2]. Aus diesen Verlusten resultiert ein wirtschaftliches und akademisches Interesse an der Untersuchung viraler Infektionen von ökonomisch relevanten Pflanzen, vor allem Bedecktsamern (Angiospermen), und deren antiviralem Immunsystem. Zusätzlich ergaben sich im Verlaufe der Studien viraler Infektionen bei Pflanzen diverse virusbasierte Anwendungsfelder im molekularbiologischen und biotechnologischen Bereich. So können virale Vektoren als Plattformen für den gezielten Gen-*knock-down* dienen [3] oder Genexpressionsplattformen darstellen [4,5]. Zudem finden einzelne virale Proteine wie das tombusvirale p19-Protein Anwendung im labortechnischen Bereich etwa zum Detektieren von microRNAs (miRNAs) oder als Transfektionsagenz für *small-interfering*-RNAs (siRNAs) [6,7].

Da es sich bei der Mehrzahl der Pflanzenviren um (+)-Strang-RNA-Viren handelt - Scholthof *et al.* beschreiben 2011 sieben der zehn nach wirtschaftlichem und akademischem Interesse wichtigsten Phytoviren als Einzelstrang-RNA-Viren, sechs davon mit positiver Orientierung [8] - , ist das im Folgenden vorgestellte antivirale RNA-*silencing* als gegen RNA-Moleküle gerichtete Immunantwort als eines der wichtigsten Immunsysteme in Pflanzen anzusehen [9].

1.1 Das RNA-*silencing*

Der Mechanismus des RNA-*silencings* (auch RNA-Interferenz, RNAi) ist in Eukaryoten hoch konserviert [10,11]. Es handelt sich dabei um einen Mechanismus des RNA-Metabolismus, mit dessen Hilfe aus RNA-Induktor-Molekülen kleinere RNAs hergestellt (prozessiert) werden, welche nach Einbau in größere Effektor-Komplexe diese Komplexe zu komplementären Nukleotid-Sequenzen dirigieren. Dort findet dann eine Stilllegung (engl. *silence* – die Stille) bzw. eine Regulation der Aktivität dieser Ziel-Nukleinsäure statt.

In Pflanzen (und anderen Organismen) erfüllt RNA-*silencing* im Wesentlichen drei biologische Funktionen: eine Immunantwort gegen Pathogene inklusive Viren [12–14], eine Inhibierung von

mRNA-Expressionen durch posttranskriptionelles Gen-*silencing* (auch PTGS) [15,16] und eine negative Regulation von mRNA-Transkriptionen durch DNA-Methylierung (transkriptionelles Gen-*silencing*, TGS) [17]. Die dafür benötigten Hauptkomponenten werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

1.1.1 Komponenten des RNA-*silencings* in Angiospermen

1.1.1.1 Kleine RNAs (sRNAs)

Im Wesentlichen können drei Hauptgruppen von kleinen RNAs (*small*-RNAs, sRNAs) definiert werden: MicroRNAs (miRNAs), *small-interfering*-RNAs (siRNAs) und *piwi-interacting*-RNAs (piRNAs). Letztere sind in Pflanzen nicht beschrieben, besitzen in tierischen Keimlinien jedoch Funktionen in der Regulation von Transposons und fungieren in der antiviralen Antwort gegenüber eindringenden Fremdnukleinsäuren.

SiRNAs und miRNAs sind in der Regel doppelsträngige RNA-Duplex-Moleküle mit einer Länge von 20-24 nt [18] und werden durch *Dicer-like*-Proteine (DCLs) aus RNA-Vorläufermolekülen prozessiert [18–20]. Im Allgemeinen werden sie zudem durch Phosphatgruppen am 5'-Ende und 2 nt lange Überhänge am 3'-Ende charakterisiert [21,22]. Außerdem findet eine Stabilisierung von sRNAs in Pflanzen durch 2'-O-Methylierung durch die Methyltransferase *HUA Enhancer 1* (HEN1) statt [23–25]. Die Methylierung am 3'-Ende der RNA-Moleküle inhibiert eine Polyuridylierung durch *HEN1 Suppressor 1* (HESO1) [26], welche ansonsten ein Abbausignal für die sRNA via *Small RNA degrading nuclease 1* (SDN1) darstellen würde [27].

MiRNAs sind endogene sRNAs, welche als Suppressoren von mRNAs fungieren. Dabei werden vor allem mRNAs von Transkriptionsfaktoren (bei etwa zwei Drittel der miRNAs) aber auch von Proteinen mit Funktionen in der Stressantwort, Proteinen in Hormonsignalwegen oder auch von Proteinen mit Funktionen in Entwicklung und Wachstum der Pflanzen negativ reguliert [28–31]. MiRNAs werden meist durch DCL1 aus Polymerase-II-Transkripten, welche Haarnadel-Strukturen bilden, prozessiert (siehe auch Abschnitt 1.1.3) [28,29,32,33]. Ebenso wie die Haarnadel-Strukturen weisen auch die RNA-Stränge der miRNA-Duplex-Moleküle in der Regel keine vollständige Basenkomplementarität zueinander nach dem durch Watson und Crick beschriebenen Basenpaarungsmuster auf. Beide Stränge eines miRNA-Duplex werden dabei unterschiedlich bezeichnet. Der funktionell aktive Strang wird in der Literatur zumeist (+)-Strang, auch *guide*-Strang oder auch als miRNA selbst bezeichnet. Demgegenüber steht der *-Strang (gesprochen *star*-Strang), welcher auch *passenger*-Strang genannt werden kann. Beide Stränge werden im Zytoplasma der Zellen in zumeist AGO1-enthaltende *RNA-induced silencing complexes* (RISCs) inkorporiert, welche nach Entfernung der *-Stränge zu den jeweiligen Ziel-

RNAs durch die (+)-Stränge geleitet werden [34–36]. Die Ziel-RNAs werden daraufhin inaktiviert, wobei dies abhängig aber auch unabhängig von einer endonukleolytischen Spaltung geschehen kann [20,37,38]. MiRNAs sind in Pflanzen weit verbreitet. So gibt es in *Embryophytae* acht konservierte miRNA-Familien [39]. Alle Angiospermen weisen 21 gemeinsame miRNA-Familien auf. Prinzipiell wird dabei unterschieden in konservierte miRNA-Familien, welche intrazellulär sehr abundant vorliegen, und in deutlich variablere, weniger weit verbreitete (teilweise speziesspezifische) und evolutionär viel jüngere miRNA-Familien [39–41]. In der Publikation von Jagtap und Kollegen (2014) wird ein Unterschied in der Konservierung von Sequenzen und miRNA-Struktur auch bei den in dieser Arbeit bearbeiteten miR168- und miR403-Familien aufgezeigt [42]. So ist die miR168-Familie innerhalb der Angiospermen deutlich weiter verbreitet als die miR403-Familie und weist einen höheren Konservierungsgrad auf.

Eine weitere Gruppe kleiner RNAs stellen siRNAs dar. Diese sind kleine RNA-Duplex-Strukturen mit einer Länge von 21-24 nt [43–45,17]. Sie werden dabei aus doppelsträngigen Vorläufermolekülen zumeist durch DCL2, DCL3 und DCL4 prozessiert (seltener durch DCL1). Die Vorläufermoleküle sind dabei häufig Produkte endogener RNA-abhängiger RNA-Polymerasen (RDR) [18,19,44–47]. Bei siRNAs können zunächst endogene und exogene siRNAs unterschieden werden. Die endogenen siRNAs können wiederum in verschiedene Gruppen wie *hairpin-derived*-siRNAs (hp-siRNAs), *natural-antisense*-siRNAs (natsiRNAs), sekundäre siRNAs oder *heterochromatic*-siRNAs (hetsiRNAs) unterteilt werden [47]. Für die vorliegende Schrift von Relevanz sind dabei die siRNAs, welche als Funktionsträger der antiviralen Immunantwort von *Embryophytae* fungieren können (siehe auch Abschnitt 1.1.2) [48]. Dies beinhaltet exogene siRNAs, welche dabei aus viraler doppelsträngiger RNA prozessiert werden [19,46,49,50], aber auch endogene siRNAs, welche über den Mechanismus der sekundären siRNAs entstehen können [51–54]. Die letztgenannten siRNAs können im Allgemeinen als Übergruppierung einer Reihe von siRNAs gesehen werden, denen in jedem Fall die Aktivität anderer kleiner RNAs vorgeht. Dabei werden einzelsträngige RNA-Moleküle durch sRNA-vermittelte AGO/RISC-Aktivität (siehe Abschnitt 1.1.1.3) gespalten, durch eine endogene RDR in doppelsträngige RNA umgewandelt und durch DCL2 oder DCL4 in sekundäre siRNAs prozessiert [47,55]. Ein Überblick der sRNAs in Pflanzen einschließlich der im Text nicht näher beschriebenen Gruppen ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

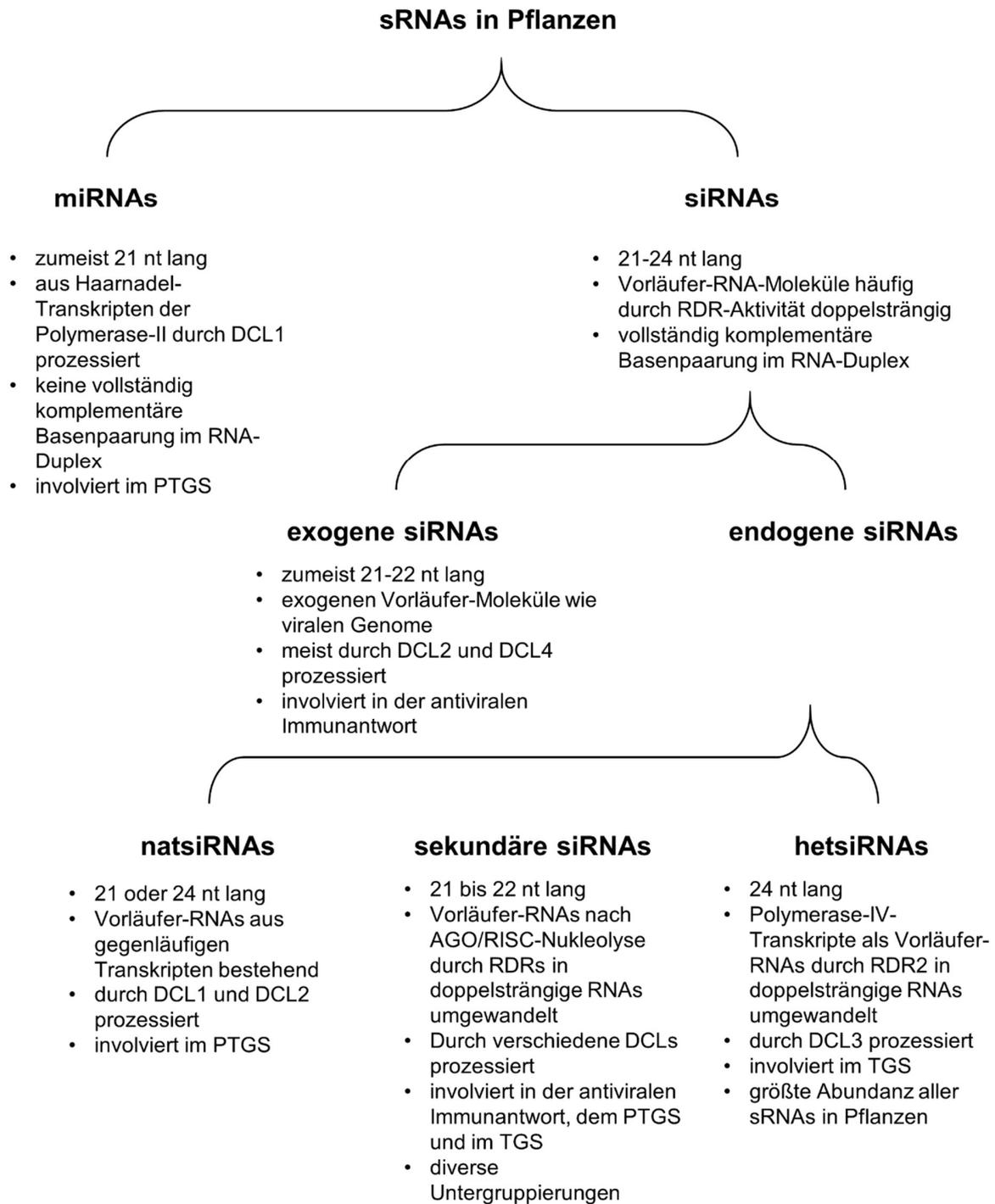


Abbildung 1.1: Darstellung einer Einteilung von sRNAs in Pflanzen, modifiziert nach Borges und Martienssen (2015) [47]

1.1.1.2 *Dicer-like*-Ribonukleasen

Doppelsträngige RNAs werden in Pflanzen durch Typ-III-Ribonukleasen in sRNAs prozessiert, welche *Dicer-like*-Proteine (DCLs) genannt werden [56]. Sie sind pflanzliche Orthologe zu *Dicer*, einer Ribonuklease aus *Drosophila melanogaster*, welche doppelsträngige RNA in sRNAs prozessiert und an der miRNA-Synthese beteiligt ist [57]. Die Bezeichnung ist dabei vom Verb *to dice* (engl.: in Würfel schneiden) abgeleitet, da auch *Dicer* Stücke definierter Größe von Doppelstrang-RNAs „abschneidet“. *Dicer*-Orthologe sind Multidomänen-Proteine, welche sechs Domänen enthalten können [58]: eine DEAD-box-Domäne (RNA-Helikase-Domänen mit ATPase-Aktivität), eine Helikase-C-Domäne, eine DUF-283-Domäne unbekannter Funktion, eine PAZ-Domäne (*Piwi/Argonaute/Zwille*, eine Domäne, die auch in *Argonaute*-Proteinen konserviert vorliegt), eine RNase-III-Domäne und eine oder zwei dsRBDs (Doppelstrang-RNA-Bindedomänen). Diese liegen gewöhnlich in der hier genannten Reihenfolge vom N-Terminus aus betrachtet vor [58]. Die PAZ-Domäne, die RNase-III-Domäne und die dsRBDs nehmen üblicherweise an der sRNA-Prozessierung teil [59]. Dabei bindet die PAZ-Domäne, welche auch in AGO-Proteinen konserviert vorliegt, vor allem an das 3'-Ende und hat eine Funktion in der Längenabmessung der kleinen RNAs [60].

In *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) sind vier DCL-Proteine beschrieben. Diese bilden den, bei Pflanzen allgemein üblichen, Satz an DCLs zur Prozessierung endogener, kleiner RNAs [58]. In Monokotyledonen tritt zusätzlich noch ein fünftes DCL-Protein auf. DCLs erfüllen dabei voneinander abzugrenzende Funktionen, können jedoch teilweise auch redundant wirken [46]. DCL1 wirkt als miRNA-Prozessor, indem es hauptsächlich 21 nt lange miRNA-Duplex-Moleküle aus den Haarnadel-Vorläufer-RNAs ausschneidet [29,58]. DCL2 prozessiert vornehmlich 22 nt lange siRNAs aus doppelsträngiger RNA. Neben der Produktion von natsiRNAs hat DCL2 zudem eine Funktion in der antiviralen Immunantwort [18,19,44,46,47]. DCL3 katalysiert die Produktion von vornehmlich 24 nt langen siRNAs, welche vor allem durch DNA-Methylierung im TGS involviert sind [17,61]. DCL4 ist an der Prozessierung 21 nt langer siRNAs, wie zum Beispiel tasiRNAs, beteiligt, welche neben Funktionen im PTGS auch antivirale Bedeutungen für die pflanzliche Zelle haben können (siehe auch Abschnitt 1.1.1.1) [18,19,43,45,46,62,63]. Im Zuge viraler Infektionen von Pflanzen sind einige hierarchische Verknüpfungen der DCL-Aktivitäten von Bedeutung: So haben sowohl DCL2 als auch DCL4 eine antivirale Funktion, jedoch ist zunächst DCL4 im antiviralen RNA-*silencing* involviert. Erst bei dessen Inhibierung wird die DCL4-Aktivität redundant durch DCL2 ersetzt [46]. Zudem wird ein DCL-Homöostase-Netzwerk vermutet, in dem die Expression von DCL3 und DCL4 von der DCL1-Aktivität abhängt [51,64]. Bei hoher DCL1-

Abundanz in den Zellen sind die DCL3- und DCL4-Abundanzen und -Aktivitäten intrazellulär erniedrigt. Ein dazugehöriger Mechanismus ist bisher nicht bekannt.

1.1.1.3 Argonaute-Proteine

Argonaute-Proteine (auch AGOs oder AGO-Proteine) bilden die zentralen Bestandteile der *RNA-induced silencing complexes* (RISCs) und sind in Eukaryoten wie Prokaryoten weit verbreitet [65]. Der Name *Argonaute* leitet sich dabei vom Phänotyp einer *A. thaliana*-Pflanze mit *AGO1-knock-out* ab [66]. Die aufgerollten Blätter der *ago1*-Pflanzen weisen optische Ähnlichkeiten mit Tentakeln des Kopffüßers *Argonauta argo* auf. Die Funktion der AGO-Proteine kann mit der Inkorporation der sRNA-Duplex-Moleküle, dem Entfernen des jeweiligen *passenger*-Strangs und der Inaktivierung der Ziel-Nukleinsäure, welche eine Basen-Komplementarität zum verbliebenen *guide*-Strang aufweist, zusammengefasst werden [67]. Bei AGO-Proteinen handelt es sich um Multi-Domänen-Endoribonukleasen. Deren Domänenstruktur ist dabei hochkonserviert: So weisen alle eukaryotischen AGO-Proteine eine variable N-terminale Domäne, eine PAZ-Domäne, eine MID(*middle*)-Domäne und eine PIWI(*P-element-induced wimpy testis*)-Domäne, in dieser Reihenfolge vom N-Terminus an auf [67]. Die MID-Domäne bildet dabei eine basische Nukleotid-Bindungsdomäne, welche vor allem am 5'-Phosphat des verbleibenden *guide*-Strangs mit der sRNA assoziiert. Zudem zwingt sie die RNA in eine helikale Form, was die Interaktion mit der Ziel-Nukleinsäure erleichtert [68–71]. Die PIWI-Domäne stellt das RNase-H-artige, aktive Zentrum der nukleolytisch aktiven AGO-Proteine [71–73]. Die PAZ-Domäne bindet das 3'-Ende der *guide*-Stränge. Dies schützt die RNA vor Abbau durch RNasen [74–76]. Die N-terminale Domäne ist bedeutsam für die endonukleolytische Spaltung der Ziel-RNA und für das Entfernen der *passenger*-Stränge [77–79]. Letzteres kann dabei von einer endonukleolytischen Spaltung abhängig oder unabhängig vonstattengehen.

In *A. thaliana* wurden zehn Gene für AGO-Proteine beschrieben, deren Orthologe in den meisten Dikotyledonen verbreitet sind. Jedoch wird das *Ago8*-Gen als inaktiv vermutet. Die AGO-Proteine sind in drei Kladen - also phylogenetischen Gruppen - angeordnet [80]. Dabei enthält die erste Klade AGO1, AGO5 und AGO10. Die zweite besteht aus AGO2, AGO3 und AGO7. AGO4, AGO6 und AGO9 bilden die dritte Gruppe. Diese letzte Gruppe wird hauptsächlich mit dem TGS in Verbindung gebracht. Die biologische Bedeutung der anderen beiden Kladen ist teilweise überlappend. *AtAGO1* ist dabei als hauptsächlicher Bestandteil von miRNA-RISCs beschrieben, welcher ubiquitär in allen Geweben exprimiert wird [29,81,82]. Jedoch können auch andere AGO-Proteine Funktionen im miRNA-vermittelten PTGS erfüllen [83–87]. Beispielsweise kann eine miR168-abhängige Funktion von AGO10 in der AGO1-Regulation vermutet werden, die jedoch

ansonsten durch AGO1 selbst vermittelt wird (Autoregulation) [88]. Zudem können viele AGO-Proteine der ersten beiden Kladen antivirale Funktionen erfüllen. Je nach Virustyp und Wirtsorganismus - gemeint ist dann das jeweilige AGO-Ortholog - können unterschiedliche AGO-Proteine in der selben Pflanze diese Funktion erfüllen [89]. Die hauptsächlichen Akteure der Virusabwehr stellen AGO1 und AGO2 dar.

Die Frage, welche Funktion welches AGO-Protein erfüllt, hängt mit der inkorporierten sRNA und deren Zielsequenz zusammen. Pflanzliche AGO-Proteine weisen dabei Inkorporationspräferenzen für bestimmte Merkmale kleiner RNAs auf. So konnte bei *AtAGO*-Proteinen eine Selektion kleiner RNAs nach dem 5'-Nukleotid des *guide*-Stranges und der Länge der kleinen RNA nachgewiesen werden [35,90,91]. *AtAGO1* weist beispielsweise eine bevorzugte Inkorporation kleiner, 21 nt langer RNAs mit einem Uracil am 5'-Ende auf. Bei *AtAGO2* wird ein Adenin am 5'-Ende bevorzugt. Zudem konnte auch ein Einfluss der Doppelstrangstruktur der sRNA-Duplex-Moleküle auf die Inkorporation in *AtAGO1* gezeigt werden. So werden vorzugsweise miRNAs mit einer Basenpaarung am 15. Nukleotid des (+)-Stranges in AGO1 oder AGO2 inkorporiert [92]. AGO1 toleriert zudem zentral gelegene Basenfehlpaarungen im RNA-Duplex, was bei AGO2 hingegen nicht der Fall ist.

Die Funktion der AGO-Proteine kann bei RNA-Zielsequenzen entweder auf einer endonukleolytischen Spaltung (*slicer*-Aktivität) oder auf einer *slicer*-unabhängigen Inhibition der Translation beruhen [20,37,38,93]. Eine *slicer*-Aktivität bei endonukleolytisch aktiven AGO-Proteinen findet grundsätzlich bei großer Basenkomplementarität zwischen der im RISC inkorporierten *guide*-RNA und der Ziel-RNA statt [94]. Sie stellt eine hydrolytische Spaltung zwischen zehntem und elftem Nukleotid des dann gepaarten Doppelstranges, gezählt vom 5'-Ende der *guide*-RNA, dar [21,95] und kann sowohl bei miRNA-vermittelter RISC-Aktivität als auch bei siRNA-vermittelter RISC-Aktivität auftreten. Zudem kann eine *slicer*-unabhängige, miRNA-vermittelte Inhibition der Translation der Ziel-mRNA stattfinden. In pflanzlichen Systemen sind dafür neben den ebenso in Tieren beschriebenen Basenpaarungen der *seed*-Sequenz (Nukleotid zwei bis neun der *guide*-RNA) auch Basenpaarungen im 3'-Bereich der *guide*-RNA mit der Ziel-Sequenz für eine AGO-Aktivität notwendig [37]. Ein Mechanismus hierzu ist jedoch nicht aufgeklärt. Dennoch zeigen die Daten von Iwakawa und Tomari (2013), dass die *slicer*-unabhängige Translationsrepression in Pflanzen hauptsächlich auf einer sterischen Blockade der Ribosomen und somit der Elongation beruht [37]. Der in Tieren verbreitete Mechanismus der Repression der Translationsinitiation ist demnach in Pflanzen eher unterrepräsentiert.

1.1.1.4 RNA-abhängige RNA-Polymerasen

RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RDRs) sind endogene Proteine, welche RNA-Moleküle entlang eines RNA-*templates* synthetisieren. Sie sind in Pflanzen häufig an der Bereitstellung von Vorläufermolekülen für die siRNA-Synthese beteiligt (siehe auch Abschnitt 1.1.1.1). Lange Doppelstrang-RNAs können dabei mit oder ohne Primer synthetisiert werden [96,97]. In Eukaryoten sind RDRs weit verbreitet und treten phylogenetisch in drei Kladen auf: RDR α , RDR β und RDR γ [98,99]. Dabei ist die β -Gruppe in Pflanzen nicht vertreten. In *A. thaliana* sind sechs RDRs beschrieben. RDR1, RDR2 und RDR6 repräsentierten dabei die RDR α -Gruppe. RDR3, RDR4 und RDR5 gehören zur RDR γ -Klade [99]. Im Zuge der antiviralen Immunantwort nehmen RDRs eine wichtige Stellung ein, da sie durch die Bereitstellung doppelsträngiger, viraler RNA die Produktion sekundärer, viraler siRNAs ermöglichen [100]. *Loss-of-function*-Mutationen von RDR1 [54,101], RDR2 und RDR6 [51,102] in *A. thaliana* erhöhen dementsprechend die Anfälligkeit dieser Pflanze für virale Infektionen. Für RDR1 und RDR6 konnten ähnliche Beobachtungen auch in anderen Pflanzen gemacht werden. So ist es nicht verwunderlich, dass die ausgeprägte Infizierbarkeit der Modellpflanze *Nicotiana benthamiana* durch viele Viren mit einer 72-nt-Insertion mit Stopp-Codon in der codierenden Sequenz von RDR1 verknüpft ist [103].

1.1.2 Das antivirale RNA-silencing

Da die meisten Pflanzenviren ein einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität aufweisen [8], fungiert ein RNA-*silencing*-Mechanismus als hauptsächliche, intrazelluläre Immunantwort der Pflanzen auf einen phytoviralen Befall [9,48]. Diese kann formal in drei Stufen gegliedert werden.

In der ersten Stufe wird virale Doppelstrang-RNA als sogenanntes *pathogen associated molecular pattern* erkannt [104,105] und durch DCL4 zusammen mit dessen Ko-Faktor DRB4 zu exogenen, viralen siRNAs (vsiRNAs) prozessiert [19,46,49,50]. Alternativ dazu kann die Prozessierung auch durch DCL2 erfolgen [18,46,50]. Dafür benötigte doppelsträngige RNA können Replikationsintermediate, also die genomische RNA des Virus assoziiert an eine komplementäre Gegenstrang-RNA [106], die genomische RNA selbst, welche häufig viele Haarnadelstrukturen aufweist [107], oder virale mRNAs mit Sekundärstrukturen sein. Jedoch sind Replikationsintermediate zumeist vor dem Zugriff durch pflanzliche Nukleasen geschützt, da die Replikation in der Regel in Membranvesikeln stattfindet [106,108]. Somit sind einzelsträngige, genomische RNA-Moleküle als DCL-Substrate wahrscheinlicher [109].

In der zweiten Stufe werden die 21 nt oder 22 nt langen vsiRNAs in AGO-Proteine inkorporiert und formen mit diesen und anderen Proteinen die antiviralen RISCs. Diese werden dann zu viralen

Ziel-RNAs mit komplementären Sequenzen zur jeweiligen *guide*-RNA geleitet, welche durch endonukleolytische Spaltung inaktiviert werden [21,64,94,95,110]. Dabei können verschiedene AGO-Orthologe in verschiedenen Pflanzen zum Einsatz kommen [89]. In *A. thaliana* konnten in AGO1 [110,111], AGO2 [90,110–112], AGO5 [90] und AGO10 [111] erhöhte vsiRNA-Mengen im Zuge viraler Infektionen nachgewiesen werden. AGO1 und AGO2 stellen die hauptsächlich antiviral wirkenden Effektoren dar [89]. Dies ist auch in *Nicotiana benthamiana* der Fall [89].

Die dritte Stufe stellt eine Amplifikation des *silencing*-Signals dar. Dabei werden gespaltene Ziel-RNAs der vsiRNAs durch endogene RDR-Proteine, vorzugsweise RDR6 und dessen Ko-Faktor SGS3 oder RDR1, in doppelsträngige RNAs umgewandelt [51,52,102,110,113,114]. Diese können erneut als Substrat für DCL4 oder DCL2 dienen und werden zu sekundären vsiRNAs prozessiert, welche dann in die umgebenden Gewebe durch die Plasmodesmata eindringen können und über das Phloem größere Strecken innerhalb der Pflanze zurücklegen [52]. Da durch sekundäre vsiRNAs auch Distanzen von mehr als 15-Zellen überwunden werden können, kann eine systemische Immunität gegen das infizierende Virus generiert werden [54,115–117]. Abbildung 1.2 stellt das antivirale RNA-*silencing* schematisch dar.

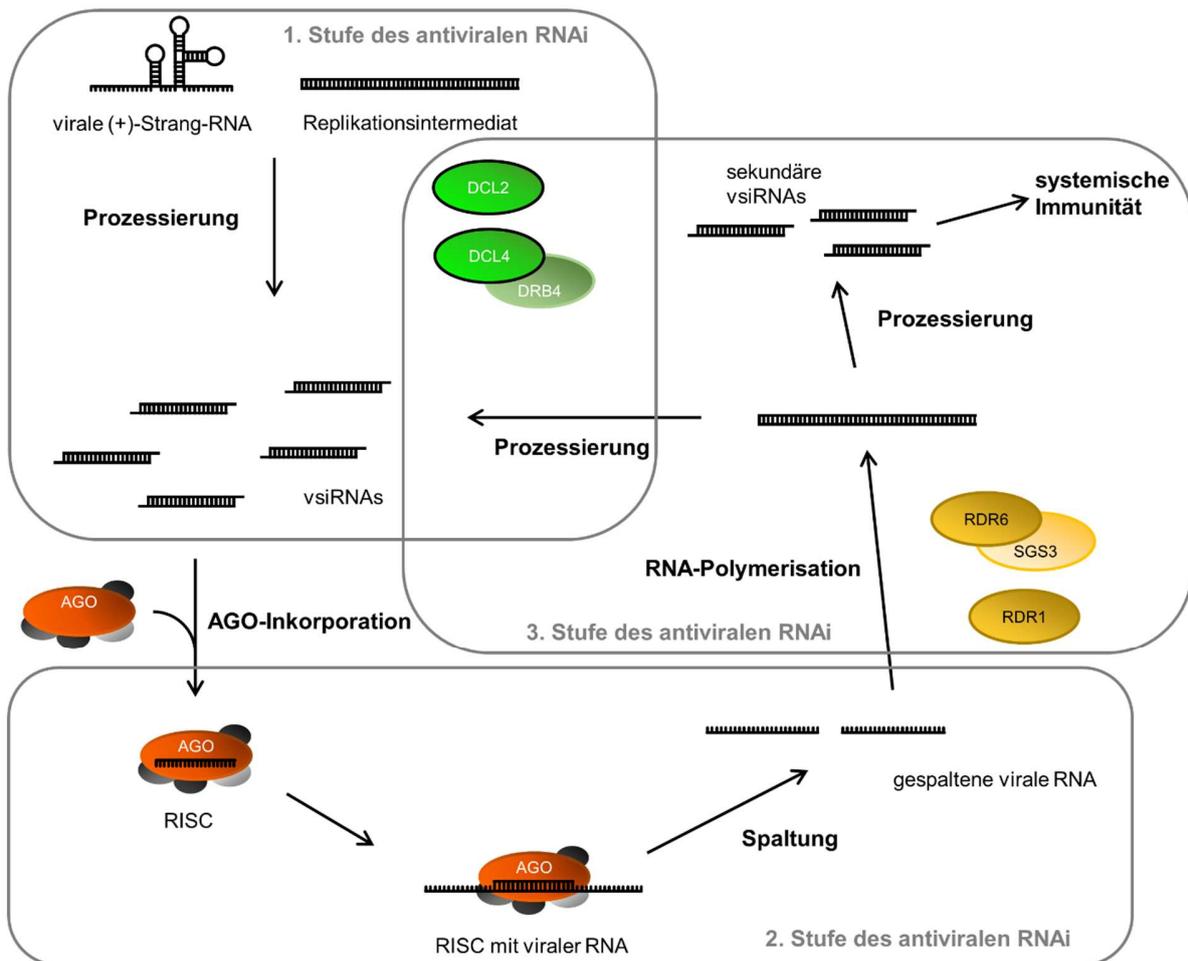


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des antiviralen RNA-silencings in Pflanzen. Dargestellt sind die drei im Text beschriebenen Stufen des antiviralen RNA-silencings: 1. Prozessierung der viralen RNA durch DCL-Proteine in vsiRNAs. 2. Inkorporation der vsiRNAs in AGO-Proteine, welche dann von den *guide*-Strängen zu den viralen Ziel-RNAs geleitet werden. Dort erfolgt dann eine endonukleolytische Spaltung der viralen RNA. 3. Amplifikation des *silencing*-Signals durch Umwandlung der RNA-Splattfragmente zu doppelsträngiger RNA und durch anschließende Prozessierung zu sekundären vsiRNAs, welche durch Diffusion benachbarte Zellen immunisieren können oder aber in den *silencing*-Kreislauf erneut eintreten.

1.1.3 Die miRNA-vermittelte Regulation der Genexpression

Eine andere Form des RNA-silencings, welche für diese Arbeit bedeutsam ist, stellt das miRNA-vermittelte RNA-silencing dar [20]. Dies ist eine Form des PTGS und in Eukaryoten weit verbreitet. Bei dieser Art der Regulation von Genexpressionen werden in Pflanzen zunächst primäre miRNA-Vorläufermoleküle (pri-miRNAs) durch Polymerase-II synthetisiert [118,119]. Diese bilden Haarnadelstrukturen mit unvollständiger Basenpaarung. Im Anschluss werden diese Strukturen durch DCL1 und dessen Ko-Faktor HYL1 [120] zunächst initial an der Basis der Haarnadel in miRNA-*precursor*-Moleküle (pre-miRNAs) prozessiert und erneut durch DCL1 zu 21 nt langen

miRNA-Duplex-Molekülen umgewandelt [121–123]. Nach Export ins Zytoplasma [124] werden die Duplex-Moleküle zunächst durch eine 2'-O-Methylierung der 3'-Enden der RNA-Stränge durch HEN1 stabilisiert [23–25] und anschließend in AGO-Proteine inkorporiert. Neuere Studien legen jedoch nahe, dass die Inkorporation in AGO-Proteine auch bereits im Nukleus erfolgen könnte [125]. Entsprechend der überproportional häufig auftretenden Uracil-Basen am 5'-Ende der miRNA-(+)-Stränge werden diese bevorzugt in AGO1 inkorporiert [35,90]. Dennoch sind auch für AGO5, AGO7 und AGO10 miRNA-Inkorporationen beschrieben [45,83–88]. Die mit den AGO-Proteinen gebildeten miRNA-RISCs werden durch die inkorporierten *guide*-RNAs zu ihren komplementären Ziel-Sequenzen – meist Sequenzen in mRNA-Molekülen – geleitet [34,36]. Die Inaktivierung dieser Nukleinsäuren stellt dementsprechend eine posttranskriptionelle Regulation der Genexpression dar. Abbildung 1.3 fasst diesen Mechanismus schematisch zusammen. Zudem kann das miRNA-Signal zur Erzeugung sekundärer kleiner RNAs, den tasiRNAs, führen [43,45,62,63]. MiRNAs in Pflanzen erfüllen häufig Funktionen in der Stressantwort, in Hormonsignalwegen oder in Entwicklung und Wachstum der Pflanzen [28–31]. Außerdem befinden sich einige Komponenten des antiviralen RNA-*silencings* und anderer pflanzlicher Immunsysteme unter regulatorischer Kontrolle durch miRNAs, was das miRNA-vermittelte PTGS im Zuge viraler Infektionen relevant macht [126].

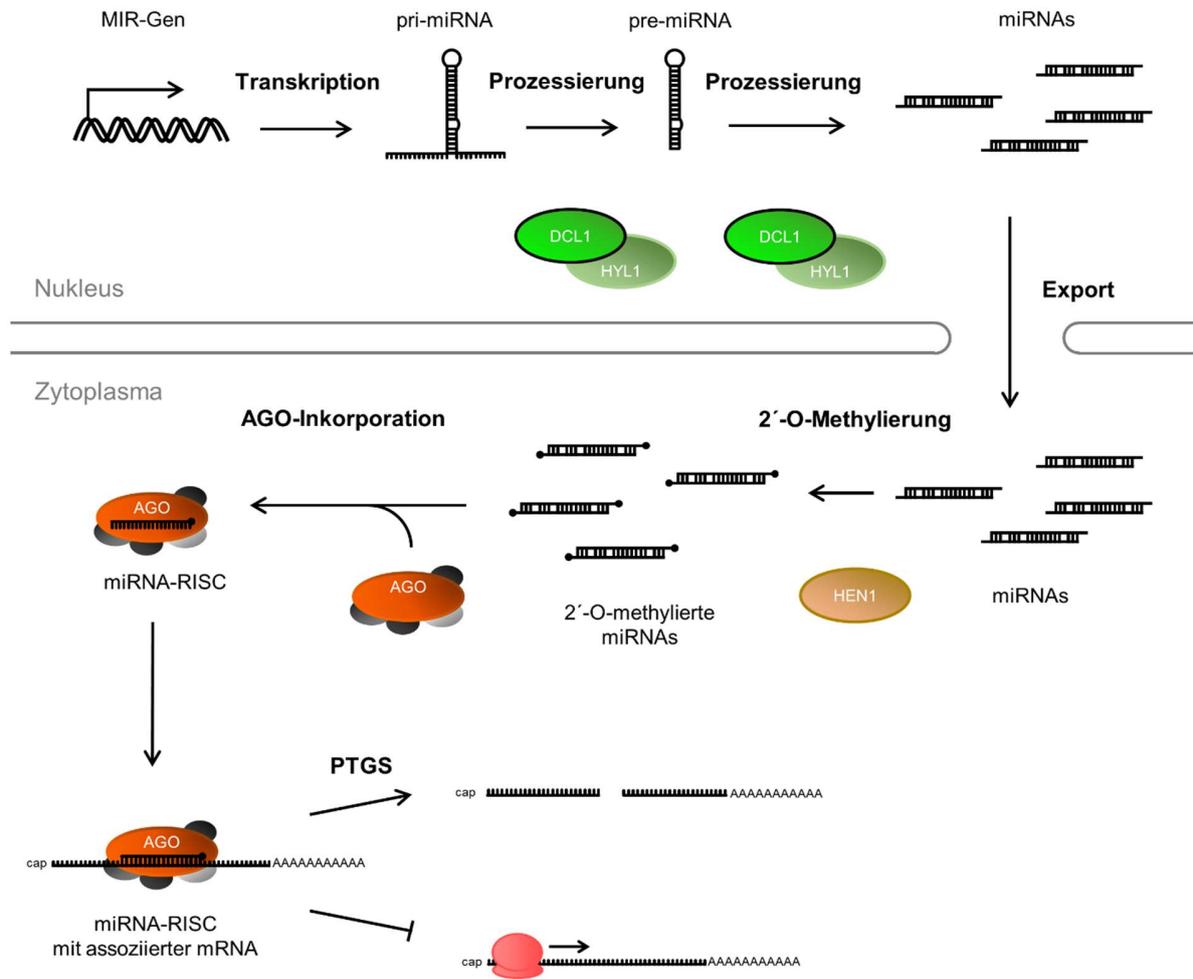


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des im Text beschriebenen, miRNA-vermittelten PTGS

1.1.4 Das Zusammenspiel von siRNA- und miRNA-vermitteltem RNA-silencing bei viralen Infektionen von Pflanzen

RNA-silencing-Signalwege können vereinfacht ausgedrückt zwei Funktionen in Lebewesen aufweisen: Die Inaktivierung von Fremdnucleinsäuren, beispielsweise viralen Ursprungs, oder die Feinabstimmung der Expression der eigenen Gene. In Pflanzen werden – ebenso wie in *Nematoda* und *Arthropoda* – beide mögliche Aufgaben durch *silencing*-Mechanismen gleichzeitig erfüllt. Davon abgesehen überwiegt in Prokaryoten der Aspekt der Inaktivierung von Fremdnucleinsäuren, wohingegen in *Chordata* RNA-silencing vornehmlich als System der Regulation von Genexpressionen in Erscheinung tritt [10].

Im Kontext viraler Infektionen von Pflanzen sind antivirale Immunantwort und miRNA-vermitteltes RNA-silencing miteinander verknüpft. Dies wird zunächst durch Komponenten-Überlappungen

beider RNA-*silencing*-Mechanismen deutlich: So ist *AtAGO1* und dessen Orthologe sowohl ein wesentlicher miRNA-Effektor als auch eine der bedeutsamsten antiviralen RISC-Komponenten [29,35,81,82,89]. Die DCLs können jeweils eingeschränkt redundant die Funktionen der jeweils anderen ausfüllen [19,46,127–129]. RDR-Aktivitäten sind sowohl für die Verstärkung des antiviralen *silencing*-Signals während einer viralen Infektion der Pflanze als auch für die Übertragung einiger miRNA-Signale in tasiRNAs essentiell [43,45,51,52,62,63,102,110,113,114]. Dabei kommen auch dieselben RDRs zum Einsatz.

Zudem stehen viele Gene von Komponenten des RNA-*silencings* selbst unter negativ regulatorischer Kontrolle von miRNAs: Die Aktivität von AGO1 wird durch einen autoregulatorischen Kreislauf miR168-vermittelt kontrolliert [81,82,130,131]. Die Translation von DCL1 wird durch die Aktivität von miR162 inhibiert [32]. Außerdem werden die Expressionen der mRNAs der nah verwandten AGO2 und AGO3 durch die Aktivitäten von miR403 in einigen Angiospermen negativ reguliert [16,43]. Zusätzlich zu diesen bekannten Regulationswegen ist eine negative Regulation der DCL3- und DCL4-Aktivitäten durch DCL1 in *A. thaliana* indiziert [51,64]. Bislang konnte dieser Regulation zwar kein Signalweg zugeordnet werden, es ist aber zu vermuten, dass auch dieser Einfluss miRNA-vermittelt ist. Martinez de Alba und Kollegen deuteten auf Basis ihrer Ergebnisse 2011 folgenden Zusammenhang an: Das siRNA-vermittelte Transgen-*silencing* durch exogene RNAs insgesamt befindet sich unter generell negativer regulatorischer Kontrolle durch das miRNA-vermittelte RNA-*silencing* [132]. Damit ergibt sich das Modell des antiviralen RNA-*silencings* unter regulatorischer Kontrolle durch das miRNA-vermittelte PTGS.

Dies hat auch eine Bedeutung während viraler Infektionen von Pflanzen: Durch Codieren von viralen Suppressoren des RNA-*silencings* (siehe Abschnitt 1.2) wirken viele Phytoviren den Auswirkungen der antiviralen Immunantwort entgegen. Jedoch können aufgrund der Ähnlichkeit und den Überlappungen beide RNA-*silencing*-Signalwege durch diese Proteine inhibiert werden. Für das antivirale RNA-*silencing* bedeutet dies einerseits eine Inhibition durch die virale Komponente andererseits eine Schwächung der negativen Regulation durch miRNA-vermitteltes PTGS. Eine gezielte Beeinflussung des antiviralen und nicht des miRNA-vermittelten RNA-*silencings* würde eine wesentlich zielgerichtete Störung der pflanzlichen Immunantwort darstellen. Zwischen diesen sehr ähnlichen RNA-abhängigen Mechanismen zu unterscheiden wäre also vorteilhaft für ein pflanzliches Virus bei dessen Infektion von pflanzlichem Gewebe.

Zusätzlich hätten Eingriffe von VSRs in das miRNA-vermittelte RNA-*silencing* auch Folgen für dadurch regulierte weitere Immunsysteme der Pflanzen [126].

1.2 Virale Suppressoren des RNA-silencings (VSRs)

Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, enthalten viele virale Genome codierende Regionen für so genannte virale Suppressoren des RNA-silencings (VSRs), um den Auswirkungen des antiviralen RNA-silencings zu entgehen [133]. Bis 2015 wurden etwa 60 verschiedene VSRs in Pflanzenviren beschrieben. Auch in insekteninfizierenden und pilzinfizierenden Viren konnten solche Suppressoren nachgewiesen werden [14]. Dabei sind diese Proteine grundsätzlich sehr verschieden in Struktur und Funktion. Ihnen gemein ist lediglich ihre antagonistische Wirkweise gegen das antivirale RNA-silencing. Theoretisch können alle Phasen des antiviralen silencings durch VSRs inhibiert werden. Mögliche Mechanismen dabei sind die Sequestrierung doppelsträngiger RNAs im Allgemeinen oder siRNAs im Speziellen durch VSRs [134–138], eine siRNA-Spaltung durch Nukleaseaktivität des VSRs [139], RISC-Inhibierung nach erfolgter Bindung an diesen Komplex [64,140,141], eine Destabilisierung der AGO-Proteine [142–144], eine Stabilisierung der negativen AGO1-Regulation durch miR168-Induktion [145] oder eine Inhibierung der endogenen RDR-Aktivitäten [146–148]. Darüber hinaus sind weitere, hier nicht aufgeführte Mechanismen möglich [133].

Historisch betrachtet sind VSRs sehr bedeutsam für die Phytovirologie. So wurden durch ihre Entdeckung einige der ersten Hinweise erhalten, dass das pflanzliche RNA-silencing antivirale Funktionen ausfüllen kann [149]. Dennoch sind die Untersuchungen zu den Wirkweisen und den physiologischen Auswirkungen der VSR-Aktivitäten *in vivo* teils kompliziert. Durch transgene Expression der VSR-codierenden Sequenzen sind unterschiedliche Funktionen der VSRs zu bestimmten Zeitpunkten nach der viralen Infektion nicht zu erfassen. Ebenso wenig könnten Unterschiede in der Wirkebene der VSRs untersucht werden. So könnte eine effektive intrazelluläre Inhibierung des RNA-silencings gegenüber einer Inhibierung der Ausbreitung sekundärer vsiRNAs nicht experimentell unterschieden werden [150,151]. Zudem weisen VSRs häufig mehrere Funktionen auf, welche zu Untersuchungszwecken experimentell isoliert betrachtet werden müssten. Neben mehreren simultan vorhandenen VSR-Funktionen können VSRs auch Aktivitäten abseits der Suppressorfunktion für das RNA-silencing aufweisen. Beispielsweise fungiert das carmovirale p38 sowohl als Inhibitor der pflanzlichen Immunantwort als auch als Hüllprotein des Virus [152].

Das akademische Interesse an diesen Proteinen begründet sich neben der möglichen Aufklärung der Mechanismen der antiviralen Immunantwort selbst auch mit technischen Anwendungsfeldern dieser Proteine im molekularbiologischen und biotechnologischen Bereich [6,7].

1.2.1 p19: der VSR der Tombusviren

In Tombusviren erfüllt das p19-Protein die Funktion des viralen Suppressors des RNA-*silencings* [136]. Dieses Protein mit einem Molekulargewicht von 18,9 bis 19,8 kDa (je nach Ortholog) wird durch die Tombusviren im 3'-Bereich ihres Genoms codiert (siehe Abbildung 1.4 (A)) [153]. Dabei wird die codierende Sequenz von p19 vollständig von der des p22 Proteins überspannt. Beide ORFs weisen unterschiedliche Start-Codons auf und werden in verschiedenen Rastern abgelesen. Eine weitere Besonderheit der p19-Codierung ist, dass für die Translation nicht das genomische RNA-Molekül als *template* fungiert, sondern eine ca. 0,9 kb lange, subgenomische RNA in derselben Orientierung wie das Genom [154,155].

Das p19-Protein ist einer der am besten charakterisierten VSRs. Die hauptsächliche Funktion besteht in der hochaffinen Bindung und Sequestrierung von siRNAs [136,156–158], die damit nicht für eine Inkorporation in AGO-Proteine zur Verfügung stehen. Bindungskonstanten an siRNAs von unter 0,2 nM wurden publiziert. Zusätzlich inhibiert der VSR damit auch das systemische RNA-*silencing* durch sekundäre siRNAs [150,159]. Zur RNA-Sequestrierung formt p19 ein Homodimer, welches an jeweils einen siRNA-Duplex assoziiert. Die Kontakte zwischen Protein und RNA belaufen sich auf Stapelwechselwirkungen von je zwei Tryptophan-Seitenketten mit den terminalen Nukleobasen des Doppelstrang-Bereiches des siRNA-Duplex und sequenzunspezifischen Interaktionen polarer Aminosäureseitenketten mit dem Phosphatrückgrat der RNA [156]. Durch die Abstände der interagierenden Tryptophane ergibt sich eine optimale Größe des zu bindenden RNA-Doppelstranges von 19 nt. Neben einer Bindungsspezifität für kurze Doppelstrang-RNA-Moleküle ist zudem ein Phosphatrest am 5'-Ende jedes RNA-Stranges für eine hochtaffine Bindung derselben durch p19 notwendig. Eine Bindungsspezifität bezüglich der Nukleotidsequenz der siRNAs bei der Bindung an p19 ist bisher nicht beschrieben bzw. wird ausgeschlossen [156]. Mehrere p19-Homologe und die zugehörigen Tombusviren wurden bislang untersucht. Im Zuge dieser Charakterisierungen konnten die p19-Orthologe des *Carnation Italian Ringspot Virus (CIRV)* und des *Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV)* zusammen mit daran assoziierten siRNAs ko-kristallisiert werden (siehe Abbildung 1.4 (B)) [156,160]. Dabei ist *in vitro* vor allem das *CIRV*-p19 Gegenstand intensiver Forschung gewesen und demnach am besten charakterisiert [156,161–167]. Dies drückt sich ebenso in der Verbreitung dieses Orthologs in biotechnologischen Ansätzen oder als potentiell medizinisches Werkzeug aus [6,7,168–171]. *In vivo* wurden hauptsächlich *Cymbidium RingSpot Virus (CymRSV)* [136,172–175] aber auch *TBSV* [176,177] bei der Infektion von Wirtspflanzen untersucht.

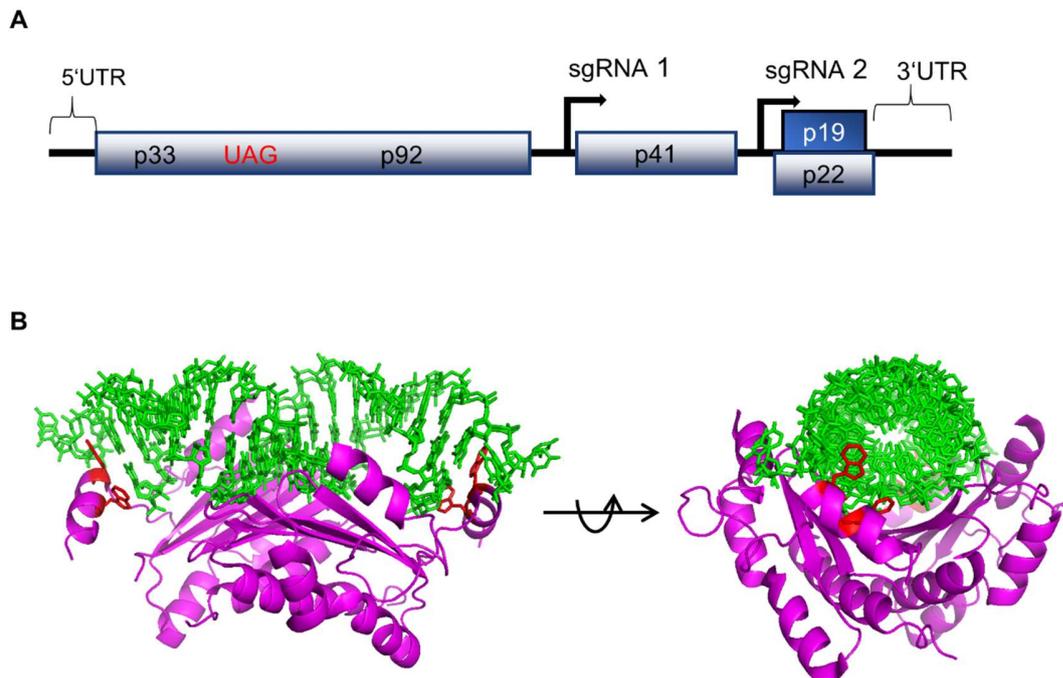


Abbildung 1.4: Darstellung des tobusviralen p19-Proteins und dessen Codierung. (A) Schematische Darstellung eines tobusviralen Genommoleküls (beispielhaft *TBSV* aus White *et al.* (2004) [177]). Dargestellt sind terminale untranslatierte Regionen, welche für die Replikation und Translationsinitiation essentiell sind, sowie die Protein-codierenden Regionen. In offenen Leserahmen codiert werden: die Replikaseproteine p33 und p92, welche sich ein Start-Codon teilen, p92 entsteht dabei durch Überlesen des UAG-Stopp-Codons; p41, das Hüllprotein; p22, das *movement*-Protein; sowie p19, angezeigt durch das dunkelblaue Rechteck. Die 3' gelegenen ORFs werden nicht direkt von der genomischen RNA translatiert, sondern von den während der Replikation gebildeten, subgenomischen RNAs (sgRNA 1 und sgRNA 2). (B) Kristallstruktur eines *CIRV*-p19-Dimers in Komplex mit einer siRNA (PDB-Code: 1rpu; [156]). In Grün: siRNA; in Magenta: Sekundärstrukturdarstellung des *CIRV*-p19-Dimers; Rot: Tryptophane 39 und 42, welche durch Stapelwechselwirkungen mit den terminalen Nucleobasen der siRNA interagieren (siehe Text).

Durch die sich überlagernde Codierung mit p22 ergibt sich für p19-Orthologe zudem eine Besonderheit. Aminosäuren mit essentiellen Funktionen in jeweils einem dieser Proteine können eine Sequenz-Konservierung auch in der Primärstruktur des anderen Proteins hervorrufen, da sie größtenteils durch dieselben Nucleotide codiert werden. Gleichzeitig können auch Veränderungen in einer Primärstruktur auf die des anderen Proteins übertragen werden. Allison und Kollegen konnten 2016 dennoch zeigen, dass einige Aminosäuren in der p19-Konsensus-Struktur einer positiven Selektion unterliegen [178]. Damit gemeint ist, dass sich diese Aminosäuren in den Primärstrukturen verschiedener p19-Orthologen aufgrund eines Selektionsdruckes verstärkt unterscheiden, also hypervariabel sind, ohne dass dies auf das p22-Protein zurückzuführen ist. Es konnte zudem gezeigt werden, dass diese Aminosäuren dennoch essentielle Funktionen für

die p19-Aktivität erfüllen könnten und die auftretende Variabilität den Umstand reflektiert, dass mehrere Aminosäuren unterschiedlicher Position dieselbe Rolle erfüllen können.

Die p19-Proteine weisen noch einige weitere Besonderheiten und Eigenschaften auf. So sind Interaktionen und Relokalisationen von *TBSV*-p19 mit den nukleären, RNA-bindenden ALY-Proteinen [179] und Hin19 beschrieben [180]. Zudem inhibiert p19 *in vivo* die HEN1-Aktivität, was vermutlich eine Folge der sRNA-Sequestrierung darstellt [134,181]. Unabhängig von der sRNA-Bindungsfähigkeit erhöht p19 in Tombusvirus-infizierten Pflanzen vermutlich durch Induktion der Transkription die Abundanz der miR168 [81,82,130]. Somit wird die AGO1-Autoregulation verstärkt und die Aktivität des antiviral wirkenden AGO1-Proteins bei viralen Infektionen der Pflanze beschränkt.

Die Beobachtungen zur miR168-Akkumulation führen zur Frage ob die p19-Orthologen auch direkt mit miRNA-Aktivitäten interferieren. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit siRNAs könnten auch microRNAs durch p19 sequestriert werden. Zudem legen bereits einige Studien die Interaktion einiger VSRs mit den miRNA-Signalwegen nahe [134,182–185].

1.2.2 p19 und die Interaktion mit microRNAs

Die genaue Bedeutung einer möglichen Sequestrierung von miRNAs durch die p19-Orthologen ist bisher nicht bekannt. Zwar können auch miRNAs durch in transgenen Pflanzen produziertes p19 *in vivo* sequestriert werden [183,185–188]. Jedoch werden diese Sequestrierungen in Zuge viraler Infektionen oft als irrelevant angenommen, da die bisher dahingehend untersuchten miRNAs wie miR171 von einer Sequestrierung durch den VSR nicht betroffen sind [181]. Dem entgegen steht jedoch die Tatsache, dass p19 Krankheitssymptome bei Tombusvirus-infizierten Pflanzen induziert und diese wiederum auf die Aktivitäten von miRNA-regulierten Enzymen zurückzuführen sind [185,189,190]. Diese Ergebnisse stellen scheinbar einen Widerspruch dar. Das p19-Protein könnte jedoch eine unterschiedlich starke Bindung an verschiedene miRNAs (differenzielle Bindung) aufweisen. Eine solche ist jedoch bisher nicht beschrieben worden. Der oben genannte Widerspruch der Ergebnisse der Studien zu p19 wäre durch diese Eigenschaft allerdings erklärbar [6,130,163,183,185,189].

Bisher festgestellte Bindungskonstanten von p19 an miRNAs sind oft 20-fach bis 100-fach höher als die an siRNAs, damit jedoch noch immer im als hochaffin anzusehenden Bereich (Konstanten ca. zwischen 3 und 15 nM) und möglicherweise biologisch relevant [6]. Zudem enthalten bisherige Untersuchungen zu den p19-miRNA-Interaktionen *in vivo* einige Schwächen. So wurden entsprechende Viren häufig entweder in infizierten Pflanzen zu relativ späten Zeitpunkten der

Infektion untersucht [130,145,191] oder aber die p19-Proteine in transgenen Pflanzen *in vivo* produziert [183,185–187]. Im Falle der Tombusvirus-infizierten Pflanzen machen die späten Zeitpunkte Studien der p19-Einflüsse auf die miRNA-vermittelte Translationsregulation kompliziert, da die nun in hoher Zahl entstandenen siRNAs mit miRNAs um Bindung an p19 konkurrieren [130,192] und einsetzende Veränderungen auf Transkriptionsebene mögliche Veränderungen auf posttranskriptioneller Ebene überlagern könnten [191]. Bei transgener Produktion von p19 besteht der Nachteil, dass hier intrazellulär hohe Konzentrationen des Proteins auf einen Überschuss an sRNAs inklusive der miRNAs treffen könnten und nahezu alle sRNAs sequestrieren. Die Frage, ob und wie die Aktivitäten mehrerer miRNAs während viraler Infektionen durch p19 beeinflusst werden und damit auch eine Modulation der antiviralen Immunantwort stattfindet, ist bisher nicht ausreichend untersucht worden. Diese Fragestellung ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.3 Zielstellung und Motivation der Arbeit

Virale Infektionen von Pflanzen stellen eine bedeutende Schadensquelle in der weltweiten Agrarwirtschaft dar. Aus diesem Grund besteht ein wirtschaftliches und akademisches Interesse an der Untersuchung viraler Infektionen von Pflanzen und der Aufklärung der Mechanismen des antiviralen Immunsystems.

Einer der wohl bedeutsamsten Vorgänge der pflanzlichen, antiviralen Immunantwort ist das antivirale RNA-*silencing*, bei dem virale siRNAs in AGO-Nukleasen inkorporiert werden und diese zu viralen Genom-Molekülen leiten. Phyto-viren wiederum inhibieren das RNA-*silencing* durch Bereitstellung von VSRs. Jedoch treffen Viren in Pflanzen nicht nur auf einen antiviralen sondern auch auf einen miRNA-vermittelten RNA-*silencing*-Mechanismus. Das miRNA-vermittelte PTGS spielt aufgrund der Überlappungen vieler Komponenten mit dem antiviralen RNA-*silencing* und der regulatorischen Kontrolle einiger antiviraler Faktoren ebenso eine Rolle in der pflanzlichen Immunantwort. Durch die insgesamt negative Regulation des antiviralen RNA-*silencings* durch miRNA-vermitteltes PTGS wäre es vorteilhaft für ein Phytovirus zwischen diesen RNA-*silencing*-Mechanismen zu unterscheiden. Daher sollten genauere Untersuchungen zur Beeinflussung von miRNA-Aktivitäten durch VSRs während viraler Infektionen durchgeführt werden, insbesondere bei Aktivitäten von miRNAs wie beispielsweise der AGO2-regulierenden miR403.

Für eine solche Untersuchung wurde ein VSR, das tombusvirale p19-Protein, als Modell-Molekül ausgewählt. Dabei handelt es sich um ein Protein mit der Funktion siRNAs durch hochaffine

Bindung zu sequestrieren. Eine Bindung an die strukturell ähnlichen miRNAs erscheint möglich. Sie wurde aber in bisherigen Publikationen als irrelevant während viraler Infektionen angenommen, obwohl umfassendere Studien bislang fehlen.

Vor Beginn dieser Arbeit konnte bereits ein pflanzliches *in-vitro*-System aus Suspensionskulturen aus *Nicotiana tabacum*-Protoplasten etabliert werden, welches sowohl die Rekonstitution von AGO/RISC-Aktivitäten als auch die Darstellung der p19-Aktivität *in vitro* ermöglicht. Des Weiteren stand mit dem *CymRSV-Nicotiana benthamiana*-System bereits ein etabliertes System zur Untersuchung tombusviraler Infektionen von Pflanzen zur Verfügung.

Auf dieser Grundlage sollten somit die Bindeeigenschaften des tombusviralen p19-Proteins an verschiedene miRNAs *in vitro* charakterisiert und die biologische Relevanz dieser Eigenschaften während einer frühen viralen Infektion *in vivo* beurteilt werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind im Anhang unter 7.9.1 und 7.9.2 aufgeführt.

2.1.2 Enzyme und kommerziell erhältliche Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind unter 7.9.3 (Anhang) aufgelistet. Dazu verwendete Puffer entsprachen, sofern nicht anders angegeben, den Herstellerempfehlungen.

2.1.3 Nukleotide

Alle für die Arbeit relevanten Informationen zu Nukleotiden sind im Anhang aufgeführt. Dies beinhaltet Sequenzinformationen von Oligonukleotiden (Abschnitt 7.9.4), Strukturinformationen (siehe Abschnitt 7.9.4.2) und Plasmidbeschreibungen (siehe Abschnitt 7.9.6).

Für die Ableitung von miRNA-Sequenzen aus *N. benthamiana* wurden die *precursor*-Sequenzen der ausgewählten miRNAs aus *N. tabacum* (miR162 und miR168) und *S. lycopersicum* (miR403) von www.mirbase.org einer *basic local alignment search tool*-Analyse (BLAST) auf www.solgenomics.net gegen das *N. benthamiana*-Transkriptom (Version 1.0.1) unterworfen. Die so identifizierten *precursor*-Sequenzen sind im Anhang unter 7.9.5 gelistet. Mit Hilfe des mFOLD-Tools wurden mögliche Sekundärstrukturen gebildet und analysiert. Daraus und aus dem Sequenzabgleich mit bereits vorhandenen miRNA-Sequenzen ergaben sich miRNA-Duplex-Strukturen der miRNAs 162, 168 und 403 aus *N. benthamiana* (Abb. 3.2).

2.1.4 Biologische Materialien und deren Kultivierung

2.1.4.1 *Escherichia coli*-Stämme

Im Verlaufe der hier aufgeführten Arbeiten wurden *Escherichia coli*-Bakterien folgender Stämme verwendet:

E. coli One Shot® Top10

Invitrogen, Groningen, NL

Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr**hsdRMS**mcrBC*) ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*araleu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str_R) *endA1* *nupG*.

BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL

Agilent Technologies,
Böblingen, D

Genotyp: F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ(DE3) *endA Hte* [*argU proL Cam*^r] [*argU ileY leuW* Strep/Spec^r]

Der *E. coli*-Stamm „Top10“ wurde dabei zu Klonierungszwecken verwendet. Zur Proteinsynthese kam der Stamm „RIPL“ zum Einsatz. Die bakteriellen Zellen wurden zur Kultivierung aerob unter Schütteln bei 37 °C (Schüttler SM 30 A, 250 rpm) in sterilem *lysogeny broth*-Medium (LB-Medium; 1 % (w/v) Trypton oder Pepton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl) flüssig oder auf Platten mit zugesetztem Bacto-Agar (1,5 % (w/v)) kultiviert. Dabei wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum (0,1 mg/ml Ampicillin) zugesetzt.

Zu Transformationszwecken wurden chemokompetente *E. coli*-Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt. Dafür wurden 1 ml einer Übernachtskultur der jeweiligen *E. coli*-Bakterien in 100 ml LB++-Medium (LB-Medium mit zusätzlich 20 mM MgSO₄ und 10 mM KCl) ohne Antibiotikum überführt und bis zu einer OD₆₀₀ (optische Dichte bei 600 nm) von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Danach wurden die Zellen für 10 min auf Eis abgekühlt und pelletiert (Zentrifuge: Rotina 38R; 10 min; 3000 rpm; 4 °C). Nach Abnahme des Überstandes wurden die Bakterien in 30 ml kaltem Transformationspuffer I (30 mM Kaliumacetat pH 5,8; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert. Nach einer erneuten Inkubation auf Eis (10 min) wurden die Zellen ebenso pelletiert (Zentrifuge: Rotina 38R; 10 min; 3000 rpm; 4 °C). Durch Dekantieren wurde der Transformationspuffer I entfernt und die Bakterien in 4 ml kaltem Transformationspuffer II (10 mM MOPS pH 6,5; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂; 15 % (v/v) Glycerin) aufgenommen. Es folgte eine Aliquotierung zu je 100 µl. Nach einem Schockfrieren dieser Zellen mit flüssigem Stickstoff wurden sie bei -80 °C bis zur Transformation (siehe Abschnitt 2.2.1.10.1) gelagert.

2.1.4.2 Eukaryotische Zellen und Pflanzenmaterial

2.1.4.2.1 BY-2-Zellen

Die in der Abteilung „Mikrobielle Biotechnologie“ kultivierten *N. tabacum*-Zellen des Stammes BY-2 (BY-2-Zellen) wurden zuvor von Prof. Dr. B. Hause (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) zur Verfügung gestellt. Jeweils 50 ml der Zellen in MS-Medium (1x Murashige & Skoog Basal Medium; 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) wurden unter Lichtausschluss bei 23 °C unter Schütteln (Infors Multitron; 120 rpm) kultiviert. Nach jeweils

sieben Tagen wurden 2-3 ml der Suspensionskultur steril in 47-48 ml frisches MS-Medium überführt und erneut kultiviert.

2.1.4.2.2 *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen

Die Kultivierung der *N. benthamiana*-Pflanzen erfolgte durch Dr. Vitantonio Pantaleo (*Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante*, Forschungsgruppe Bari, Bari, Italien) bei 21 °C mit einer 14-h-Lichtphase bis zum Sechsstadium. Danach folgte der Einsatz der Pflanzen in den in Abschnitt 3.2.2 aufgeführten Experimenten.

2.2 Methoden

Für die in den folgenden Abschnitten aufgeführten Methoden wurden die Zentrifugen „Mikro 200“ oder „Mikro 200R“ (beide: Hettich) für Probenvolumina bis 2 ml verwendet. Bei Volumen bis 50 ml wurde die Zentrifuge „Rotina 38R“ (Hettich) genutzt. Abweichungen davon sind im Einzelnen vermerkt.

2.2.1 Molekularbiologische Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäure (DNA)

2.2.1.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurde auf das Prinzip der alkalischen Lyse zurückgegriffen. Dabei werden *E. coli*-Zellen im alkalischen Milieu und unter Anwesenheit eines Detergenz lysiert. Bei der anschließenden Neutralisation präzipitieren Zellbestandteile wie Proteine, genomische DNA oder Membranreste, aber nicht die Plasmid-DNA. Diese wird danach durch Präzipitation und/oder einen schwachen Anionenaustausch (bei kommerziell erhältlichen Reinigungssystemen) gereinigt.

2.2.1.1.1 Plasmid-Minipräparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab aus transformierten *E. coli*-Bakterien wurden diese in je 1,5 ml LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum zur Selektion der Plasmide überführt. Nach einer Inkubation über Nacht, unter Schütteln und bei 37 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation (13.000 rpm; RT; 1 min) pelletiert. Im Anschluss erfolgte eine Resuspension der Zellen in je 100 µl Lösung I (25 mM Tris/HCl pH 7,9; 50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNaseA (AppliChem GmbH)). Nach der Zugabe von je 200 µl Lösung II (0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS) und dem mehrfachen Invertieren der Reaktionsgefäße folgte eine Inkubation auf Eis für 5 min. Durch Zugabe von je 150 µl Lösung III (2,55 M Kaliumacetat pH 4,8) wurde die Lösung

neutralisiert. Nach einer Zentrifugation (13.000 rpm; RT; 15 min) wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und die vorhandenen Nukleinsäuren durch Zugabe von 315 µl Isopropanol präzipitiert. Nach dem Pelletieren (13.000 rpm; RT; 10 min) wurden die DNA-Präparationen mit 0,5 ml Ethanol (70 %) versetzt und erneut zentrifugiert (13.000 rpm; RT; 10 min). Die erhaltene Plasmid-DNA wurde luftgetrocknet und in 30 µl H₂O aufgenommen. Bei stark verunreinigten Proben wurde die DNA im Anschluss mit Hilfe des „GeneJET Plasmid Miniprep Kits“ (Thermo Scientific) gereinigt. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren.

2.2.1.1.2 Plasmid-Midipräparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurden Midipräparationen durchgeführt. Dafür wurden transformierte *E. coli*-Bakterien in je 100 ml LB-Medium mit Ampicillin-Zusatz überführt. Diese Kultur wurde bei 37 °C schüttelnd über Nacht inkubiert und die Zellen anschließend pelletiert (6.000 rpm; RT; 10 min). Der Aufschluss der Zellen und die Plasmid-Isolation erfolgten mit Hilfe des „PureYield™ Plasmid Midiprep System“ (Promega) nach Herstellerangaben.

2.2.1.2 Endonukleolytische Spaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen vom Typ II katalysieren eine sequenzspezifische, endonukleolytische Hydrolyse des Desoxyribose-Phosphat-Rückrates von DNA. Dabei entstehen durch Spaltungen in den palindromischen Erkennungssequenzen Sequenzüberhänge oder abgeschlossene Enden (*blunt ends*). Durch die Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme lassen sich DNA-Moleküle entsprechend der Erfordernisse der Klonierungen so gezielt spalten und später wieder zusammenfügen (siehe Abschnitt 2.2.1.9). Die Wahl der Reaktionspuffer richtete sich nach den Herstellerangaben der jeweiligen verwendeten Enzyme. Für analytische Endonukleolysen wurden jeweils 1-2 µg DNA (1 µl Lösung aus einer Minipräparation, siehe 2.2.1.1.1) mit jeweils 2-4 U des Restriktionsenzym in 20 µl Reaktionsansatz für 2 h inkubiert. DNA-Spaltungen für präparative Zwecke wurden in 200 µl mit jeweils 25-30 µg DNA und 20-40 U der jeweiligen Nuklease für mindestens 4 h durchgeführt. Der Erfolg der Spaltungen wurde gelelektrophoretisch (siehe 2.2.1.5) überprüft.

2.2.1.3 Reinigung und Präzipitation von DNA

Um DNA-Präparationen aus enzymatischen Reaktionen von Proteinen zu trennen, wurden diese weitergehend gereinigt. Kürzere DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen (siehe 2.2.1.7) wurden mittels „GeneJET™ PCR Purification Kit“ (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben gereinigt. Längere DNA-Fragmente aus Plasmid-Präparationen (siehe 2.2.1.1) oder endonukleolytischen Spaltungsreaktionen (siehe 2.2.1.2) wurden einer Phenol/Chloroform-Extraktion mit

anschließender Ethanol-Fällung unterzogen. Dabei wird eine Phenol/Chloroform-Mischung zu der wässrigen DNA-Probe hinzugegeben. Es entsteht ein zweiphasiges System mit hydrophober und wässriger Phase. Aufgrund der Neigung von Proteinen in die hydrophobe Phase überzugehen, ist es möglich diese von den, in der wässrigen Phase befindlichen, Nukleinsäuren abzutrennen.

Lösungen mit darin gelöster DNA wurden mit einem Volumen eines Gemisches aus TE-gesättigtem Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und 5 min geschüttelt. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation (13.000 rpm; 3 min; RT) und die Überführung der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß. Diesem wurde ein Volumen Chloroform zugesetzt. Der Ansatz wurde erneut 5 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert (13.000 rpm; 3 min; RT). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation bei RT folgte eine Zentrifugation (13.000 rpm; 4 °C; 30 min) um die ausgefallene DNA zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und die verbliebene DNA mit 0,5 ml Ethanol (70 %) versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 rpm; RT; 10 min) wurde der Ethanol verworfen, die DNA luftgetrocknet und in 30-50 µl H₂O aufgenommen. Zur Verbesserung der Reinigung wurden gegebenenfalls einzelne Präzipitationsschritte mehrfach durchgeführt.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA mittels UV/vis-Spektroskopie

Die DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen wurde photometrisch bestimmt. Dabei wurde die Absorption der Lösung bei 260 nm gemessen. Eine Absorption von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Vor der Messung wurden die Proben 1:50 in 10 mM Tris/HCl pH 7,4 verdünnt. Die Messung erfolgte am „BioPhotometer“ (Eppendorf). Die Reinheit der Proben wurde durch Bestimmung des Quotienten A_{260}/A_{280} überprüft. Dabei deuten Werte größer als 1,8 auf die Abwesenheit von Proteinen und Phenol-Verunreinigungen hin.

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Mittels Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle aus einer DNA-Mischung entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes migrieren DNA-Fragmente durch ein Netz aus Agarose-Molekülen. Dabei werden große DNA-Stücke stärker in ihrer Migration gehindert als kleine, was zu einer Auftrennung der Moleküle führt.

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte in einer horizontalen Gelkammer in 1-2 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetate pH 8,5; 1 mM EDTA). Limitierend war eine elektrische Spannung von 130 V. Die DNA-Proben (meist 0,1-1,5 µg) wurden in 1x Ladepuffer (1,67 mM Tris/HCl pH 7,6; 0,005 % (w/v) Bromphenolblau; 0,005 % (w/v) Xylencyanol; 10 %

Glycerin; 10 mM EDTA) aufgetragen. Eine Ethidiumbromid-Konzentration von 0,3 mg/ml ermöglichte eine UV-Detektion der DNA (bei 312 nm) und eine Geldokumentation am „Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290“ oder am „UVP UVsolo touch“ (Analytik Jena).

2.2.1.6 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolation von DNA aus Agarosegelen wurde das „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ (Thermo Scientific) nach Herstellervorgaben verwendet.

2.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

Zur Amplifikation (Vervielfältigung) von DNA-Fragmenten definierter Größen wurden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR; engl.: *polymerase chain reaction*) durchgeführt. Dabei legen spezifische DNA-Oligonukleotide (auch Primer) die Grenzen der Fragmente fest, welche durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase in mehreren Zyklen synthetisiert werden.

2.2.1.7.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten zu Klonierungszwecken

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten für spätere Klonierungen wurde auf die wenig fehleranfällige „Phusion High-Fidelity DNA Polymerase“ (Thermo Scientific) zurückgegriffen. Die Reaktionen wurden im 25- μ l-Maßstab auf Eis zusammengeführt. Tabelle 2.1 fasst das Pipettierschema zusammen.

Tabelle 2.1: Allgemeines Pipettierschema einer PCR zu Klonierungszwecken

Komponenten	Menge in μ l
H ₂ O	15,75
Reaktionspuffer (5x)	5
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5
Primerlösung 1 (10 μ M)	1,25
Primerlösung 2 (10 μ M)	1,25
<i>template</i> -DNA	1
Polymerase (2 U/ μ l)	0,25 (0,5 U)

Die Reaktionsansätze wurden während der initialen Denaturierung in den „Mastercycler personal“ (Eppendorf) gestellt. Das Temperaturprofil der PCR ist in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.2: Temperaturprofil für die PCR zu Klonierungszwecken

	Programmschritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale	1	98 °C	3 min	1
Denaturierung				
Denaturierung	2	98 °C	10 s	31
Hybridisierung	3	60 °C	20 s	31
Elongation	4	72 °C	x s	31
Finale	5	72 °C	7 min	1
Elongation				

Die Dauer der Elongation richtete sich nach der Größe der zu erwartenden Fragmente. Dabei wurde ein Nukleotidumsatz von etwa 4 kb/min angenommen. Nach der PCR wurden die Proben bis zur Nutzung auf Eis gestellt oder bei -20 °C gelagert.

2.2.1.7.2 Kolonie-PCR

Um den Erfolg bei der Klonierung von DNA-Fragmenten vor der Sequenzierung (siehe 2.2.1.8) zu überprüfen wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Dabei wurde auf die „DreamTaq Polymerase“ (Thermo Scientific) zurückgegriffen. Die Reaktionen wurden im 25- μ l-Maßstab auf Eis zusammengeführt. Tabelle 2.3 fasst das Pipettierschema zusammen.

Tabelle 2.3: Allgemeines Pipettierschema einer Kolonie-PCR.

Komponenten	Menge in μl
H ₂ O	19,35
Reaktionspuffer (10x)	2,5
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5
Primerlösung 1 (10 μ M)	1,25
Primerlösung 2 (10 μ M)	1,25
Polymerase (5 U/ μ l)	0,15 (0,75 U)

Die Reaktionsansätze wurden mit Kolonien aus Plasmid-Transformationsreaktionen (siehe 2.2.1.10.1) versetzt und während der initialen Denaturierung in den „Mastercycler personal“ (Eppendorff) gestellt. Das Temperaturprofil der PCR ist in Tabelle 2.4 zusammengefasst.

Tabelle 2.4: Temperaturprogramm für die Kolonie-PCR.

	Programmschritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale	1	95 °C	3 min	1
Denaturierung				
Denaturierung	2	94 °C	20 s	31
Hybridisierung	3	55 °C	20 s	31
Elongation	4	72 °C	x s	31
Finale	5	72 °C	5 min	1
Elongation				

Die Elongationszeit richtete sich dabei nach der Größe des erwarteten Fragments. Es wurde eine Nukleotidumsatz von etwa 1 kb/min angenommen.

2.2.1.7.3 Mutagenese-PCR (ortsgerichtete Mutagenese)

Mutagenese-PCRs für eine ortsgerichtete Mutagenese wurden, wie unter 2.2.1.7.1 beschrieben, mit folgenden Änderungen durchgeführt. Die Reaktionsvolumina wurden auf 50 µl verdoppelt. Die Elongationszeiten wurden so gewählt, dass DNA-Fragmente der Länge des zu mutierenden Plasmides synthetisiert werden konnten. Die Zyklenzahl der PCR wurde gegebenenfalls auf 35 erhöht. Die Primer wurden so erstellt, dass sie komplementär zum Mutationsort sind mit Ausnahme der gewünschten Mutation von maximal 3 nt. Dabei beinhalteten diese Primer jeweils mindestens 20 nt beidseitig des Mutationsortes jeweils inklusive von mindestens zehn Guanin-/Cytosin-Basen.

Nach Abschluss der PCR wurden die Reaktionsansätze mit 20 U DpnI (Thermo Scientific) versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert, um die *template*-DNA abzubauen. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für die Transformation in *E. coli* (siehe 2.2.1.10.1) eingesetzt.

2.2.1.7.4 Quantitative *real time*-PCR (qRT-PCR) von mRNA-Sequenzen

Die quantitative *real time*-PCR (qRT-PCR) ist ein Verfahren zur Konzentrationsbestimmung spezifischer Nukleinsäuren in Gemischen von Nukleinsäuren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Gesamt-RNA aus biologischem Material (siehe 2.2.2.5) durch eine reverse Transkription (siehe 2.2.2.6) in komplementäre DNA überführt. Diese wurde als Ausgangsmaterial verwendet, um gezielt einzelne DNA-Fragmente zu amplifizieren, welche wiederum Teilsequenzen der jeweiligen Zielgene darstellen. Der im Reaktionsansatz vorhandene Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green I interagiert mit der gebildeten doppelsträngigen DNA und ermöglicht eine Detektion des Amplifikates in Echtzeit. Das Fluoreszenzsignal kann gegen die Zahl der PCR-Zyklen aufgetragen werden. Der Punkt, an dem das Signal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, wird als c_t -Wert (*cycle threshold*) bezeichnet und stellt ein negatives, logarithmisches Maß für die Konzentration der Ziel-DNA dar.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCR-Experimente zur Quantifizierung von mRNA-Sequenzen wurden durch Dr. Vitantonio Pantaleo (*Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante*, Forschungsgruppe Bari, Bari, Italien) modifiziert nach dem Vorgehen aus Pantaleo *et al.* (2016) [193] ausgeführt.

Durch Analyse der c_t -Werte können die Ausgangskonzentrationen der DNA-Moleküle, beziehungsweise die Konzentrationen der mRNA-Moleküle, in der Gesamt-RNA-Präparation

ermittelt werden. Neben einer absoluten Quantifizierung sind auch relative Quantifizierungen möglich, bei denen zum Beispiel Transkriptmengen einer biologischen Probe mit jenen einer Kontrollprobe verglichen werden. Dabei sind zwei Methoden möglich: Die Δc_t -Methode und die $\Delta\Delta c_t$ -Methode [194]. Bei der erstgenannten Methode werden exakt gleiche Mengen an Total-RNA aus der Probe und der Kontrollprobe in die reverse Transkription und später in die PCR eingesetzt. Dies stellt eine externe Normalisierung dar. Die erhaltenen c_t -Werte werden voneinander abgezogen (der Δc_t -Wert gebildet). Ist der Δc_t -Wert verschieden von Null, so hat sich die Transkriptmenge des Zielgens in der Probe im Vergleich zu dem in der Kontrollprobe verändert.

Bei der $\Delta\Delta c_t$ -Methode ermöglicht die relative Quantifizierung von Transkriptmengen in Bezug auf ein Referenzgen. Dessen mRNA sollte in beiden biologischen Proben stabil vorliegen. Dabei werden in beiden Proben die c_t -Werte der Referenzgene von denen der Zielgene abgezogen (der Δc_t -Wert wird gebildet; Formel (2.1)). Dies stellt eine interne Normalisierung dar. Durch Abzug des Δc_t -Wertes der Kontrollprobe von dem der zu untersuchenden Probe erhält man den $\Delta\Delta c_t$ -Wert (Formel (2.2)), welcher durch Formel (2.3) in eine relative Transkriptmenge umzurechnen ist.

$$\Delta c_t = c_t(\text{Zielgen}) - c_t(\text{Referenzgen}) \quad 2.1$$

$$\Delta\Delta c_t = \Delta c_t(\text{Probe}) - \Delta c_t(\text{Kontrolle}) \quad 2.2$$

$$\text{relative Transkriptmenge} = 2^{-\Delta\Delta c_t} \quad 2.3$$

Voraussetzung für die $\Delta\Delta c_t$ -Methode ist die Stabilität der Transkriptmenge des Referenzgens sowie eine vergleichbare Effizienz bei der Amplifikation des DNA-Fragmentes des Zielgens und von der der Referenz von etwa 1 (100%).

2.2.1.7.5 Quantitative *real time*-PCR (qRT-PCR) von miRNA-Sequenzen

Die qRT-PCR zur Bestimmung der Konzentrationen von miRNAs wurde durch Dr. Giorgio Gambino (*Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante*, Forschungsgruppe Turin, Turin, Italien) nach der in Pantaleo *et al.* (2016) [193] beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wurden in der Vorbereitung der Experimente Gesamt-RNA-Proben aus *N. benthamiana* mittels des „Poly(A) Tailing Kit“ (Life Technologies) polyadenyliert. Mit Hilfe von Oligo(dT)-Primern konnten so auch miRNA-Sequenzen während einer reversen Transkription (siehe auch 2.2.2.6) in cDNA überführt und untersucht werden.

2.2.1.8 Sequenzierung von DNA

Das Sequenzieren von isolierter Plasmid-DNA (siehe 2.2.1.1.1) wurde durch die Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Entsprechende Sequenzieransätze wurden nach Herstellerangaben gemischt. Die Sequenzierprimer sind unter 7.9.4 aufgeführt.

2.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten zu Klonierungszwecken erfolgte mit Hilfe der „T4 DNA Ligase“ (Thermo Scientific). Die Reaktionen erfolgten in einem Volumen von 20 µl nach Herstellerangaben. Es wurde ein Stoffmengenverhältnis des Vektors zum DNA-Fragment von mindestens eins zu sechs eingehalten. Die Reaktionsansätze wurden nach zusammenführen für mindestens 2 h bei 22 °C inkubiert und hiernach für Transformationsreaktionen in *E. coli* (siehe 2.2.1.10.1) verwendet.

2.2.1.10 Transformation von Plasmid-DNA

2.2.1.10.1 Transformation in *E. coli*

Zur Transformation von DNA in chemokompetente *E. coli*-Zellen wurden je 20-40 ng Plasmid-DNA bzw. 2,5 µl Ligationsansatz auf Eis zu einem 50 µl-Aliquot der Zellen gegeben. Der Ansatz wurde anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C. Im Anschluss wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und 500 µl LB-Medium hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 15-30 min bei 37 °C. Danach wurden etwa 100 µl der Zellen auf einer LB-Agar-Platte (1,5 % Agarose) mit einem Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und die Platte bei 37 °C über Nacht inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.2.1.10.2 Inokulation von *Nicotiana benthamiana* mit *CymRSV*

Die Infektion von *N. benthamiana* mit *CymRSV* wurde durch Dr. Vitantonio Pantaleo (*Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante*, Forschungsgruppe Bari, Bari, Italien) nach der *rub-in*-Inokulationsmethode durchgeführt. Dabei werden den Blattoberseiten der Pflanzen durch Auftupfen von Siliziumcarbid Mikroverletzungen zugefügt. Auf diese wird die virale RNA als Lösung aufgetragen und somit in die Pflanze inokuliert.

2.2.2 Molekulargenetische Arbeiten mit Ribonukleinsäuren (RNA)

Sämtliche Arbeiten mit RNA fanden unter RNase-freien Bedingungen statt. Dafür wurden RNase-freie Gefäße (Eppendorf) sowie RNase-freies Wasser (Sigma-Aldrich) verwendet.

2.2.2.1 *In-vitro*-Transkription

Im Rahmen dieser Arbeit kam die *in-vitro-run-off*-Transkription zum Einsatz. Dabei werden zuvor linearisierte Plasmide einer Transkriptionsreaktion unterworfen. Diese Plasmide enthalten zudem die Promotorsequenz für eine RNA-Polymerase. Durch den Promotor und die Schnittstelle in der DNA sind die Grenzen der transkribierten RNA festgelegt und RNA-Moleküle definierter Länge werden produziert.

Für das vorliegende Projekt wurden Transkriptionsreaktionen mit der „SP6 RNA Polymerase“ (Thermo Scientific) durchgeführt. Dafür kam linearisierte und gereinigte Plasmid-DNA (siehe 2.2.1.2 und 2.2.1.3) zum Einsatz. Die Verwendung eines *cap*-Analogons (m7G(5')ppp(5')G) während der Reaktion, welches jeweils am 5'-Ende der RNA angefügt wird, erhöht deren Stabilität und ermöglicht eine effizientere Initiation der Translation (siehe 2.2.4.4). Tabelle 2.5 fasst das Pipettierschema einer *in-vitro*-Transkription zusammen.

Tabelle 2.5: Allgemeines Pipettierschema einer *in-vitro*-Transkription

Komponente	Menge
Linearisiertes Plasmid	500-1500 ng
<i>cap</i> -Analogon (10 mM; Jena Bioscience)	8 µl
Transkriptionspuffer (Thermo Scientific) (5x)	20 µl
rNTPs (20 mM HTP; 5 mM GTP)	10 µl
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl; Thermo Scientific)	0,5 µl
„SP6 RNA Polymerase“ (Thermo Scientific)	30 U
H ₂ O	ad. 100 µl

Nach dem Zusammenführen dieser Reaktionen auf Eis wurden die Reaktionsansätze für 2,5-4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 U DNase I (Roche Diagnostics) hinzugegeben und erneut für 20 min bei 37 °C inkubiert. Dadurch sollte *template*-DNA abgebaut werden. Die *in vitro* transkribierten RNA-Moleküle wurden hiernach einer Phenol/Chloroform-Extraktion und einer Ethanol-Präzipitation unterzogen (siehe 2.2.2.2).

2.2.2.2 Reinigung und Präzipitation von RNA

RNA-Lösungen wurden nach dem in 2.2.1.3 beschriebenen Prinzip einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Anstelle von TE-gesättigtem Phenol wurde jedoch wassergesättigtes Phenol verwendet.

Zur Präzipitation wurden die RNA-Lösungen auf ein Volumen von 200 µl mit Wasser aufgefüllt. Danach wurden 36 µl Ammoniumacetat (6 M) sowie 472 µl Ethanol hinzugegeben. Nach einer Inkubation bei RT für 10 min wurde die RNA durch Zentrifugation (13.000 rpm; 30 min; RT) pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden 0,5 ml Ethanol (70 %) hinzugegeben und die Proben erneut zentrifugiert (13.000 rpm; 10 min; RT). Die erhaltene RNA wurde luftgetrocknet und in 30-50 µl Wasser aufgenommen. Zur Verbesserung der Reinheit wurden gegebenenfalls einzelne Präzipitationsschritte wiederholt.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von RNA mittels UV/vis-Spektroskopie

Die Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen erfolgte analog zu der von DNA mittels UV/vis-Spektroskopie (siehe 2.2.1.4) nach demselben Vorgehen. Eine Absorption von 1 entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Ein Quotient A_{260}/A_{280} größer als 2,0 weist dabei auf eine reine RNA-Probe hin.

2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

RNA-Lösungen wurden analog zur DNA (siehe 2.2.1.5) mittels Gelelektrophorese analysiert. Die Auftrennung der Moleküle erfolgte in 1,2 % (w/v) Agarose-Gelen in 1x MOPS-Puffer (20 mM MOPS pH 7,0; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; 2,7 % (v/v) Formaldehyd (37 %)) in einer horizontalen Laufkammer. Die Proben wurden zuvor mit dem gleichen Volumen 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) gemischt und für 10 min bei 75 °C inkubiert. Die Auftrennung und die Dokumentation der Gele erfolgten wie in 2.2.1.5 beschrieben.

2.2.2.5 RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial

Für die RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial wurde eine TRIzol™-Extraktion durchgeführt. Diese stellt eine Modifizierung der in 2.2.1.3 beschriebenen Phenol/Chloroform-Extraktion dar. TRIzol™ (Thermo Scientific) ist eine einphasige Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat, welche Zellen lysiert, aber Biomoleküle wie RNA intakt belässt. Durch Zugabe von Chloroform bildet sich ein dreiphasiges System mit RNA-Molekülen in der wässrigen, DNA-Molekülen in der Inter- und Proteinen innerhalb der hydrophoben Phase.

Die RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial geschah vor Ort durch Dr. Vitantonio Pantaleo (*Consiglio Nazionale delle Ricerche – Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante*, Forschungsgruppe Bari, Bari, Italien).

2.2.2.6 Reverse Transkription

Mittels reverser Transkription können RNA-Proben in Vorbereitung zur qRT-PCR (siehe 2.2.1.7.4) in cDNA-Moleküle überführt werden. Dafür wurden ca. 2 µg Gesamt-RNA mit DNase behandelt und mit Hilfe des „High Capacity cDNA Reverse Transcription kit“ (Life technologies) nach Herstellerangaben behandelt.

2.2.2.7 5'-Phosphorylierung kleiner RNA-Moleküle

Aufgrund der Präferenz von p19 für 5'-phosphorylierte siRNA wurden sämtliche RNA-Oligonukleotide vor Untersuchungen mit p19 5'-phosphoryliert. Dies wurde mittels der „T4 Polynucleotide Kinase“ (Thermo Scientific) durchgeführt. Tabelle 2.6 fasst das Pipettierschema einer Phosphorylierungsreaktion zusammen.

Tabelle 2.6: Allgemeines Pipettierschema einer 5'-Phosphorylierungsreaktion kleiner RNAs.

Komponente	Menge
RNA	50 pmol
ATP (50 µM)	2 µl (=100 pmol)
PNK-Puffer A (Thermo Scientific)	2 µl
T4 Polynucleotide Kinase (Thermo Scientific)	1 µl
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl; Thermo Scientific)	0,5 µl
H ₂ O	ad. 20 µl

Diese Reaktionsansätze wurden auf Eis zusammengeführt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur radioaktiven Markierung wurden den Reaktionsansätzen jeweils 25 µCi an γ-[³²P]-ATP hinzugesetzt. Anschließend wurde zum Stoppen der Reaktionen 1 µl EDTA (500 mM) hinzugegeben und die Reaktionsansätze für 10 min bei 70 °C inkubiert. Es folgte die Hybridisierung der RNA-Moleküle.

2.2.2.8 Hybridisierungen kleiner RNA-Moleküle

Zur Bildung von RNA-Duplex-Molekülen wie siRNAs oder miRNAs wurden die zuvor phosphorylierten RNA-Moleküle hybridisiert. Dazu wurden 5'-Phosphorylierungsansätze der zugehörigen RNAs aus 2.2.2.7 vollständig gemischt und für 3 min auf 94 °C erhitzt. Es folgte eine schrittweise Abkühlung in Schritten zu je 3 K von je 3 min Länge bis auf 25 °C.

Nach Abschluss der Hybridisierung wurden siRNA- oder miRNA-Duplex-Moleküle mittels „illustra microspin G-25 columns“ (GE Healthcare) nach Herstellervorgaben gereinigt, um nicht verbrauchtes ATP von den Ansätzen abzutrennen. Voruntersuchungen mit [³²P]-markierter RNA

ergaben dabei einen Verlust an RNA von etwa 1/3 der Gesamtmenge. Dies wurde in die Konzentrationsangaben der RNA-Proben mit einbezogen.

2.2.2.9 Schmelzpunktanalyse von siRNAs und miRNAs

Zur Verifizierung der erfolgten Hybridisierung kleiner RNA-Moleküle und zur thermodynamischen Analyse wurden thermische De- bzw. Renaturierungen durchgeführt. Dazu wurden die hybridisierten RNA-Helices in 600 µl Bindepuffer (siehe 2.2.3.9) auf eine Konzentration von 0,5 µM verdünnt. Diese Ansätze wurden im „Jasco v-550 Spektrometer“ (Jasco) von 20 °C auf 90 °C (mit 0,4 K/min) unter Stickstoffatmosphäre erhitzt. Um ein Verdampfen der Lösung zu verhindern, wurde diese mit Mineralöl (Carl Roth) überschichtet. Die Dissoziation der RNA-Stränge wurde durch Absorptionsmessungen bei 268 nm dokumentiert. Die erhaltenen Datensätze (Absorption gegen Temperatur) werden im Rahmen dieser Arbeit Schmelzkurven genannt. Es folgte die Abkühlung des Ansatzes auf 20 °C (0,4 k/min) bei Dokumentation der Absorption bei 268 nm. Diese Datensätze werden Hybridisierungskurven genannt. Die Schmelz- und Hybridisierungskurven wiesen jeweils zwei Transitionen auf. Da lediglich die Transitionen bei niedrigerer Temperatur eine Variabilität bei verschiedenen miRNA-Varianten aufwies (siehe Abschnitt 7.5), wurden diese zur Auswertung einer nichtlinearen Regression an die Formeln 2.4 und 2.5 nach Riechmann *et al.* (2005) [195] unterworfen. Dabei galt die Annahme, dass diese Transitionen unimolekulare De-/Renaturierungsreaktionen darstellen.

$$A = \frac{(A_N + m_N T) - [A_N + m_N T - (A_U + m_U T)] * e^{-\frac{\Delta G^0}{RT}}}{1 + e^{-\frac{\Delta G^0}{RT}}} \quad 2.4$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 * \left(1 - \frac{T}{T_M}\right) + \Delta C_p * \left(T - T_M - T * \ln \frac{T}{T_M}\right) \quad 2.5$$

A steht dabei für das Absorptionssignal, A_N/A_U für die Signalamplituden im nativen bzw. denaturierten Zustand bei 0 K, m_N/m_U für die Anstiege der Grundlinien des nativen bzw. denaturierten Zustandes, T für die Temperatur, T_M für den Transitionsmittelpunkt (auch Schmelztemperatur), R für die Gaskonstante, ΔG^0 für die Änderung in der freien Gibbs-Enthalpie im Gleichgewicht, ΔH^0 für die Änderung der Enthalpie im Gleichgewicht und ΔC_p für die Differenz der Wärmekapazität des nativen und des denaturierten Zustandes. Durch Umstellen von Formel 2.6 ist es möglich die Entropieänderung (ΔS^0) im Gleichgewicht bei T_M zu bestimmen.

$$\Delta G = \Delta H - \Delta S * T \quad 2.6$$

2.2.3 Proteinbiochemische Arbeiten

2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach deren Molekulargewicht wurden diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophoresen durchgeführt. Dabei werden die Proteine unter Hitze und der Anwesenheit von SDS und β -Mercaptoethanol in einen denaturierten Zustand überführt und dort gehalten. Anschließend werden sie in einem grobporigen Sammelgel fokussiert und fortführend in einem feinporigen Trenngel aufgetrennt. Tabelle 2.7 enthält die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen.

Tabelle 2.7: Zusammensetzungsschema von diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelen (10 cm x 10 cm x 1 mm) für die SDS-PAGE

Komponente	Trenngel 10 % (ca. 8 ml)	Sammelgel 5 % (ca. 3 ml)
Puffer	2 ml	0,75 ml
Acrylamid-Bisacrylamidlösung (37,5:1) 30 %	2,7 ml	0,4 ml
H₂O	3,2 ml	1,6 ml
Ammoniumperoxodisulfat 10 % (w/v)	50 μ l	15 μ l
TEMED	12,5 μ l	7,5 μ l

4 x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS

4 x Sammelgelpuffer: 0,25 M Tris/HCl pH 6,8; 0,2 % (w/v) SDS

Bei Verwendung von 15 %igen SDS-Gelen wurde die Menge an Acrylamid-Bisacrylamid entsprechend heraufgesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben 1:4 mit SDS-Probenpuffer (20 mM Tris/HCl pH 6,8, 12 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycin, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau, 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol) versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte durch ein elektrisches Feld mit einer begrenzenden Stromstärke von 25-35 mA je Gel. Nach der Auftrennung wurden die Gele Coomassie-gefärbt (siehe 2.2.3.1.1) oder einer Silberfärbung (siehe 2.2.3.1.2) unterzogen.

2.2.3.1.1 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Zur Coomassie-Färbung wurden die Gele nach der Auftrennung in Färbelösung (0,6 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau G-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Methanol) für 20 min schüttelnd inkubiert. Es folgten Inkubationsschritte in Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure; 40 % (v/v) Methanol) für je 20 min bis zur gewünschten Entfärbung. Anschließend wurden die Gele getrocknet und digitalisiert oder für Silberfärbungen weiterverwendet.

2.2.3.1.2 Silberfärbung von SDS-Gelen

Die Silberfärbungen von Proteingelen erfolgten nach dem Protokoll von Nesterenko *et al.* (1994) [196]. Tabelle 2.8 fasst das Protokoll zusammen.

Tabelle 2.8: Protokoll der Silberfärbung von SDS-Gelen.

Arbeitsschritt	Pufferzusammensetzung	Volumen (ml)	Inkubationszeit
Fixieren	30 ml Aceton 0,75 ml TCA (100 % (w/v)) 25 µl Formaldehyd (37 %) ad. H ₂ O	60	5 min
Waschen	H ₂ O	-	3 x 5 s; 1 x 1 min; 3 x 5 s
Vorbehandeln I	30 ml Aceton ad. H ₂ O	60	5 min
Vorbehandeln II	100 µl Na ₂ S ₂ O ₃ (20 % (w/v))	60	1 min
Waschen	H ₂ O	-	3 x 5 s
Färben	0,8 ml AgNO ₃ (14 % (w/v)) 0,6 ml Formaldehyd (37 %) ad. H ₂ O	60	8 min
Waschen	H ₂ O	-	3 x 5 s
Entwickeln	1,2 g Na ₂ CO ₃ 25 µl Formaldehyd (37 %) 25 µl Na ₂ S ₂ O ₃ (20 % (w/v)) ad. H ₂ O	60	10-20 s
Stopp	1 %ige Essigsäure	-	-

Im Anschluss wurden die Gele getrocknet und digitalisiert.

2.2.3.2 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Proteinkonzentrationen von Proteingemischen wurden mit der Methode nach Bradford bestimmt. Diese Methode basiert auf der Interaktion von Coomassie-Brilliant-Blau-Farbstoff mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen. Durch Bildung von Komplexen während dieser Interaktionen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 nm auf 595 nm. Die Absorption der Probe bei 595 nm stellt daher ein Maß für gebildete Coomassie-Aminosäure-Komplexe und somit für die eingesetzte Proteinmenge dar.

Dafür wurden je 10 µl der Proteinlösung mit 490 µl Bradfordlösung (wässrige Lösung aus Coomassie-Brilliant-Blau G-250, Ethanol und ortho-Phosphorsäure; Bio-Rad) vermischt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Nachfolgend wurde die Absorption der Probe am „BioPhotometer“ (Eppendorf) bestimmt und die Konzentration der Probe mittels Lambert-

Beerschen Gesetzes bestimmt. Jede verwendete Lösung wurde vor Nutzung durch Einsatz von Rinderserumalbumin geeicht.

2.2.3.3 Protein-Konzentrationsbestimmung mittels UV/vis-Spektroskopie

Die Konzentrationen vollständig gereinigter, rekombinanter Proteinlösungen wurden photospektrometrisch bestimmt. Dafür wurden im „Jasco V-550 Spektrometer“ (Jasco) Absorptionsspektren von 340-240 nm aufgenommen und die Proteinkonzentration bei 280 nm mittels Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt. Dabei wurde ein Extinktionskoeffizient ϵ_{280} von $34.950 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für alle p19-Varianten verwendet.

2.2.3.4 Proteinbiosynthese und Zellaufschluss

Zur Herstellung von *CIRV*-p19 und dessen Varianten wurde ein auf den pGEX-Vektoren (Amersham Biosciences) basierendes Plasmid, welches für die p19-Variante mit N-terminal fusionierter Glutathion-S-Transferase (GST) codiert, in *E. coli* des Stammes BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL transformiert (siehe 2.2.1.10.1). Die Anzucht der Zellen erfolgte im Schüttelkolben (6 x 1 l) oder durch Fermentation an einem Biostat ED-Reaktor.

Für die Zellanzucht im Schüttelkolben wurde eine 200 ml-Vorkultur der Zellen in LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Mit jeweils 25 ml dieser Vorkultur wurden je 1 l LB-Medium (+100 µg/ml Ampicillin) versetzt. Diese Hauptkultur wurde ebenso schüttelnd bei 37 °C inkubiert und die optische Dichte (OD_{600}) stündlich bestimmt. Nachdem eine OD_{600} von etwa 0,6 erreicht wurde, folgte die Induktion der Expression des p19-ORFs durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach einer weiteren Inkubation für 4 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (Zentrifuge: SORVALL RC-6 Plus, Thermo Whatman; Rotor: PTI F10S – 6 x 500y; 6.000 rpm, 5 °C, 25 min) pelletiert und mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zum Zellaufschluss wurden die Zellen bei -20 °C gelagert.

Die Fermentationsprozesse wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Ralph Golbik (AG Mikrobielle Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg, Halle(Saale), Deutschland) an einem Biostat ED-Reaktor durchgeführt. Dafür wurden 2 l einer LB-Vorkultur mit Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Zentrifuge: SORVALL RC 6 Plus, Thermo Whatman; Rotor: PTI F10S – 6 x 500y; 6.000 rpm, RT, 25 min) pelletiert und in 20 ml LB-Medium resuspendiert. Mit diesem wurden im Biostat ED-Reaktor 6 l Komplexmedium (60 g/l Hefeextrakt; 0,06 M K_2HPO_4 ; 6 mM $MgSO_4$; 0,03 M Glukose; 0,01 NH_4Cl) versetzt. Die Zellanzucht erfolgte bei einem Sauerstoffgehalt von 30 % bei 37 °C und pH 7,0. Ab einer OD_{600} von 10 erfolgte eine digital gesteuerte Zugabe von *feeding*-Lösung (300 g/l Glycerin; 300 g/l

Hefeextrakt). Nach 10 h Inkubation wurde die Lösung innerhalb einer Stunde auf 30 °C abgekühlt und die Genexpression mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 9 h erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation für zweimal 40 min bei 4.200 rpm und RT (Zentrifuge: Avanti J-20; Beckman Coulter Inc.; Rotor: JL8.1000). Die Zellen wurden anschließend mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Benutzung bei -40 °C gelagert.

Zum Zellaufschluss wurden 10-15 g der gefrorenen Zellen in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und dieses mit Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 mg/ml Lysozym) aufgefüllt. Nachdem die Zellen aufgetaut und für 3 h auf Eis inkubiert wurden, folgte der Aufschluss im „GAULIN homogenizator“ (APV Homogenizer GmbH) in jeweils drei Durchläufen. Unlösliche Bestandteile wurden zunächst durch Zentrifugation (Zentrifuge: Hettich ROTINA 38 R; 10 min, 10.500 rpm; 4 °C) abgetrennt und das Protein aus der gelösten Fraktion gereinigt. Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 4 °C und 35.000 rpm für 1 h (Zentrifuge: L8-60M; Beckman Instruments; Rotor: Type 45 Ti). Das so erhaltene Lysat wurde entweder unverzüglich zur Chromatographie verwendet oder mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.3.5 Proteinreinigung von p19

Zur Aufreinigung des p19-Proteins wurde die Proteinlösung aus 2.2.3.4 verschiedenen chromatographischen Reinigungsschritten unterzogen. Pufferwechsel und Konzentrieren der Probe fand durch Dialyse (siehe 2.2.3.5.2) oder mit Hilfe eines „Spin-X UF Concentrator“ (Corning; MWCO: 10.000) nach Herstellerangaben statt. Die Details zu den einzelnen Reinigungsschritten sind in den folgenden Abschnitten aufgeführt und in diesem Abschnitt zusammengefasst.

Zunächst wurde die Proteinlösung mit dem Glutathion-S-Transferase-p19-Fusionsprotein (GST-p19) einer Affinitätschromatographie unterworfen, bei der die GST spezifisch an die Säulenmatrix bindet. Damit wurde der Mehrzahl der zellulären Proteine aus *E. coli* abgetrennt. Die GST wurde daraufhin durch Einsatz der „PreScission™ Protease“ (GE Healthcare) nach Herstellerangaben auf der Affinitätssäule (siehe 2.2.3.5.1) oder separat abgespalten. In letzterem Fall folgte eine erneute Affinitätschromatographie zum Abtrennen der Glutathion-S-Transferase. Nach einem Pufferwechsel (siehe 2.2.3.5.2) wurde die p19-Lösung einer Anionenaustauschchromatographie (Iec; siehe 2.2.3.5.3) unterworfen, um Nukleinsäure-Verunreinigungen abzutrennen. Die so erhaltene Lösung wurde konzentriert und zur Analyse verwendet.

2.2.3.5.1 Affinitätschromatographie und Proteolyse von GST-p19-Fusionsproteinen

Zur Reinigung von GST-p19-Fusionsproteinen aus Zelllysaten wurden Affinitätschromatographien mittels „GSTrap FF“-Säulen (Säulenvolumen: 5 ml; GE Healthcare) durchgeführt. Alle Schritte fanden dabei in gekühlter Umgebung (ca. 8 °C) mit einer Flussgeschwindigkeit von ca. 2 ml/min statt. Zunächst wurden etwa 150 mg Proteinmischung aus dem Zelllysat auf das Säulenmaterial geladen. Es folgte ein Waschschrift mit 2 Säulenvolumen PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄). Zur Abspaltung der GST wurde die Säule in 50 mM Tris/HCl pH 7,5 und 150 mM NaCl äquilibriert. Anschließend wurden im selben Puffer 100 U „PreScission™ Protease“ (GE Healthcare) hinzugegeben und das Säulenmaterial über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Elution des, von der GST abgespaltenen, p19-Proteins erfolgte durch Spülen der Säule mit 6 ml des Reaktionspuffers. Sämtliche GST-fusionierten Proteine wurden durch 2 Säulenvolumen des Elutionspuffers (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM L-Glutathion (reduziert)) eluiert.

2.2.3.5.2 Dialyse von Proteinproben

Zum Pufferwechsel wurden p19-enthaltende Lösungen mit Hilfe eines „SERVAPOR®“ (SERVA electrophoresis GmbH) -Dialysierschlauches (MWCO: 12.000-14.000) gegen das jeweilige 20-fache Volumen des Dialysierpuffers dialysiert. Es wurden jeweils 3 Dialysierschritte für mindestens 3 h bei 8 °C durchgeführt.

2.2.3.5.3 Anionenaustauschchromatographie (Iec)

Während der Proteinreinigung wurden Anionenaustauschchromatographien (Iec) durchgeführt. Neben einer Abtrennung von Fremdproteinen sollten so auch Nukleinsäureverunreinigungen, welche an das p19 binden, entfernt werden. Die Iec fand am „Äkta-Purifier“ (GE Healthcare) bei 10 °C statt. Dafür wurden entweder „Resource Q“ (5 ml; Amersham Biosciences) oder „Mono Q 5/50 GL“ (Amersham Biosciences) -Säulen verwendet. Druck und Fließgeschwindigkeiten richteten sich dabei nach Herstellerangaben. Das Protein wurde in Niedrigsalzpuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 50 mM NaCl) auf die Chromatographiesäulen geladen und diese mit 2 Säulenvolumen desselben Puffers gespült. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten (0-100 %) mit Hochsalzpuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl) über jeweils 40 Säulenvolumen. Der Durchfluss wurde zu je 1 ml fraktioniert und die p19-enthaltenden Fraktionen nach einer Analyse über SDS-PAGE (siehe 2.2.3.1) zusammengeführt und konzentriert (siehe 2.2.3.5). Die Proteinlösung wurde anschließend bis zur Charakterisierung in Lagerungslösung (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50 % (v/v) Glycerin) bei -20 °C gelagert.

2.2.3.6 Massenspektrometrische Untersuchungen von gereinigtem p19-Protein

Zur Identitätsprüfung der Proteine wurden massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Dafür wurden die p19-Proben durch Dialyse (siehe 2.2.3.5.2) gegen H₂O entsalzt und etwa 100 µg des Proteins an einem „Ultraflex-II TOF/TOF“ Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) mit einer MALDI-Quelle analysiert. Die massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgten durch Dr. Angelika Schierhorn (MLU Halle-Wittenberg, Halle(Saale), Deutschland).

2.2.3.7 Circular dichroismus-Messungen von p19-Varianten

Chirale Moleküle mit Chromophor absorbieren spezifisch zirkulär polarisiertes Licht. Trifft Licht auf eine Lösung chiraler Moleküle, in der jeweils eines der Stereoisomere ausschließlich oder im Überschuss vorliegt, kann diese spezifische Absorption durch Änderung der Elliptizität spektroskopisch erfasst werden (Circular dichroismus, CD). Spezifische Konformationen von chiralen Peptidbindungen weisen dabei ein charakteristisches CD-Spektrum im Fern-UV-Bereich auf. Somit ist es möglich, Sekundärstrukturelemente von Peptidketten durch CD spektroskopisch zu erfassen. Dabei stellt ein CD-Spektrum eines Proteins ein Summenspektrum dar, welches sich aus den Einzelspektren der jeweiligen Peptidbindungen zusammensetzt. Aussagen über den Gesamt-Sekundärstrukturgehalt eines Proteins sind daher unter Vorbehalt möglich. Änderungen im Fern-UV-CD-Spektrum deuten jedoch auf Änderungen in der Konformation des jeweiligen Proteins hin.

Die CD-Messungen dieser Arbeit wurden an einem „J-810 Spectropolarimeter“ (Jasco) bei 20 °C durchgeführt. Dabei wurden jeweils 30-40 µg/ml p19-Lösung in Bindepuffer (siehe 2.2.3.9) in einer Präzisionsküvette vom Typ „110-QS“ mit einer Schichtdicke von 1 mm für ein Fern-UV-Spektrum (Wellenlänge: 198-250 nm) verwendet. Die so erhaltenen Spektren wurden pufferkorrigiert und mittels „Spectra Manager I Software“ (Jasco) geglättet. Zur Vergleichbarkeit mit anderen CD-Spektren war zudem eine Normierung notwendig. Diese erfolgte nach folgender Gleichung:

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta * F * 3300 * \frac{M}{n-1}}{c * d} \quad 2.7$$

Dabei steht $[\theta]_{MRW}$ für die genormte Elliptizität (*mean residue weight ellipticity*), θ für die gemessene Elliptizität, F für die Eichgröße des Gerätes (142,5/5610051), M für die molare Masse des Proteins, n für die Zahl der Aminosäuren, c für die Konzentration des Proteins in mg/ml und d für die Schichtdicke der Küvette in cm.

2.2.3.8 Analytische Ultrazentrifugation von p19-Proben

Zu Ermittlung des Oligomer-Zustandes von p19 wurden analytische Ultrazentrifugationen durchgeführt. Sedimentationsgeschwindigkeits- und Gleichgewichtsmessungen wurden bei jeweils 40.000 rpm bzw. 8.000 rpm in einer analytischen Ultrazentrifuge „XL-A“ (Beckman Instruments) bei 20 °C durchgeführt. Die Zentrifuge war dabei mit einem „An50Ti“-Rotor und Doppelsektorzellen bestückt. Für die Analysen wurden 1,2-13 µM *CIRV*-p19 (Monomerkonzentration) in 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 150 mM NaCl und 1 mM TCEP untersucht und die Daten mit Hilfe der Software „Sedfit“ analysiert. Die Durchführung und die Analyse der Daten erfolgte durch Dr. Hauke Lilie (MLU Halle-Wittenberg, Halle(Saale), Deutschland).

2.2.3.9 Untersuchungen von p19-sRNA-Interaktionen

Zur Untersuchung der Interaktionen von *CIRV*-p19 mit kleinen RNAs wurden Studien zur direkten Bindung von p19 an einzelne kleine RNAs sowie Versuche in Präsenz einer weiteren, kompetitierenden RNA durchgeführt. Letztgenannte Versuche werden im Folgenden auch Konkurrenzexperimente genannt. Dabei wurden 5'-markierte, kleine RNAs (siehe 2.2.2.7) durch Titration nichtmarkierter RNAs aus zuvor gebildeten Komplexen mit *CIRV*-p19 verdrängt.

Nachdem in den Erstversuchen festgestellt wurde, dass sich die durch Konkurrenzexperimente erhaltenen Bindekonstanten nicht relevant von den Konstanten der direkten Messungen unterscheiden, konnten für die Messung bedeutende Zwischenschritte bei der Komplexbildung ausgeschlossen werden. Daher sind spätere Folgeversuche nur noch als Studien zur direkten Bindung von p19 an siRNAs und miRNAs durchgeführt worden.

2.2.3.9.1 Studien zur direkten Bindung von p19 mit siRNAs und miRNAs

Zur Bestimmung der Affinität von p19 bei der Bindung an die entsprechende kleine RNA, wurden etwa 3 pM kleine, markierte RNA (siehe 2.2.2.7 und 2.2.2.8) mit verschiedenen Mengen *CIRV*-p19 in 20 µl Bindepuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,02 % (v/v) Tween-20; 1 mM DTT) für 1-1,5 h bei 24 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden komplexierte und freie RNA durch einen *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA; siehe 2.2.3.9.3) aufgetrennt.

2.2.3.9.2 Konkurrenzexperimente

Zur Untersuchung der Spezifität der Bindung von *CIRV*-p19 an kleine RNAs wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Mengen 5'-phosphorylierter, unmarkierter, kleiner RNA zu jeweils 3 pM 5'-markierter, kleiner RNA (siehe 2.2.2.7 und 2.2.2.8) mit 0,5 nM *CIRV*-p19 (Dimerkonzentration) titriert. Dabei kam derselbe Bindepuffer wie in

2.2.3.9.1 zum Einsatz. Diese Ansätze wurden über Nacht bei 24 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden RNA-p19-Komplexe und freie RNA durch EMSA (siehe 2.2.3.9.3) aufgetrennt.

2.2.3.9.3 *Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)*

Zur Auftrennung von freier, 5'-markierter RNA von Komplexen aus p19 und 5'-markierter, kleiner RNA wurden *Electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) durchgeführt. Dafür wurde jeder Reaktionsansatz aus 2.2.3.9.1 und 2.2.3.9.2 mit je 5 µl Ladebuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,002 % (w/v) Bromphenolblau; 0,002 % (w/v) Xylencyanol; 50 % (v/v) Glycerin) vermischt und unverzüglich auf ein 6 %iges Polyacrylamid-Gel (10 cm x 10 cm x 1 mm) in 1x TBE (89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA) aufgetragen. Die Auftrennung in 0,5x TBE-Laufpuffer (44,5 mM Tris; 44,5 mM Borsäure; 1 mM EDTA) erfolgte in einem elektrischen Feld bei einer begrenzenden Spannung von 120 V bei Raumtemperatur (23,5-24 °C geprüft im oberen Pufferreservoir). Nach der Auftrennung wurden TBE-Polyacrylamid-Gele für 15-20 min in 5 %iger Essigsäure inkubiert und vakuumgetrocknet. Anschließend wurde ein „Storage Phosphor Screen S 230“ (GE Healthcare) aufgelegt und die Gele für mindestens drei Tage exponiert. Es folgte ein Scan mittels eines „Storm 860“-Phosphorimagers (Molekular Dynamics).

2.2.3.9.4 *Auswertung der Bindungsstudien*

Die aus den EMSA-Versuchen erhaltenen Autoradiogramme wurden mit dem Programm „ImageQuant 5.0 Build 050“ (Molecular Dynamics) ausgewertet. Dabei wurden die Signalstärken der Banden, welche freier RNA bzw. RNA-p19-Komplex zuzuordnen sind, quantifiziert. Die Signalstärke der RNA-p19-Bande geteilt durch die Gesamtintensität der Signale in der jeweiligen Lauf-Spur ergab das normalisierte Signal für die Bindung der RNA durch p19 (auch *relative shift* oder *fraction bound*).

Bei direkten Bindungsstudien (siehe 2.2.3.9.1) wurde das normalisierte Bindungssignal gegen die eingesetzte Gesamt-Konzentration von CIRV-p19 aufgetragen. Durch nichtlineare Regression der Daten an die Formel 2.8 konnte die apparente Dissoziationskonstante (K_D) ermittelt werden.

$$S = (S_{max} - S_0) * \frac{P_t^n}{K_D + P_t^n} + S_0 \quad 2.8$$

Dabei steht S für die normalisierte Signalstärke (*fraction bound*), S_{max} für die Amplitude, P_t für die eingesetzte p19-Gesamt-Konzentration (Dimer-Konzentration), K_D für die Dissoziationskonstante, n für die Kooperativität und S_0 für das *offset* der Daten. Diese Gleichung fand Anwendung unter der Voraussetzung, dass die Konzentration der eingesetzten 5'-

markierten, kleinen RNA wesentlich kleiner (mindestens 10-fach) als die Dissoziationskonstante war.

Bei Konkurrenzexperimenten (siehe 2.2.3.9.2) wurde das normalisierte Bindungssignal gegen die eingesetzte Konzentration der Kompetitiv-RNA aufgetragen. Durch Regression der Daten an Gleichung 2.9 konnten apparente Bindekonstanten (K_C) ermittelt werden.

$$S = \frac{S_{max}-S_0}{2 \cdot R_t} \cdot \left[K_D + \frac{K_D}{K_C} \cdot C_t + P_t + R_t - \sqrt{\left(K_D + \frac{K_D}{K_C} \cdot C_t + P_t + R_t \right)^2 - 4 \cdot R_t \cdot P_t} \right] + S_0 \quad 2.9$$

Dabei steht S für die normalisierten Signalstärke (*fraction bound*), S_{max} für die Amplitude, R_t für die eingesetzte Menge an 5'-markierter, kleiner RNA, C_t für die jeweilige eingesetzte Menge an Kompetitiv-RNA, P_t für die eingesetzte p19-Gesamt-Konzentration (Dimer-Konzentration), K_D für die Dissoziationskonstante von CIRV-p19 an die 5'-markierte RNA, K_C für die apparente Bindekonstante und S_0 für das *offset* der Daten.

2.2.4 *In-vitro*-Versuche mit dem BY-2-Lysat (BYL)

Bei dem BY-2-Lysat (BYL) handelt es sich um einen zytoplasmatischen Extrakt aus evakuolisierten *N. tabacum*-Protoplasten. Dieses pflanzenbasierte Lysat enthält alle wichtigen Komponenten für eine *in-vitro*-Translation von exogen zugegebenen mRNA-Molekülen [197]. Zudem ermöglicht es RISC-Aktivitäten zu rekonstituieren durch *in-vitro*-Translation von AGO-Proteinen und Zugabe spezifischer, kleiner RNAs [37,198]. Auch die Replikation von viralen RNA-Genomen kann nachgestellt werden [197,199] sowie deren Inhibition durch *in vitro* rekonstituierte RISC-Aktivität [91]. Die Möglichkeit, die miRNA-vermittelte Regulation der Genexpression nachzustellen, macht das BYL zu einem geeigneten System, um den Einfluss von CIRV-p19 auf das miRNA-vermittelte RNA-*silencing* zu untersuchen.

2.2.4.1 Herstellung eines zytoplasmatischen Extraktes aus BY-2-Zellen

Zur Herstellung des BYLs wurden ca. 3-4 ml der BY-2-Suspensionskultur in 50 ml frisches MS-Medium überführt. Nach einer Inkubation für 5 Tage bei 23 °C im Dunkeln unter leichtem Schütteln (Infors Multitron, 120 rpm) wurden die Zellen durch Zentrifugation (Zentrifuge: Rotina 38R; Hettich; 1 min; 800 rpm; Beschleunigung: 3; Bremse: 0) pelletiert. Etwa 50 ml der so pelletierten Zellen wurden mit 100 ml Protoplastierlösung ((0,312 % (w/v) Cellulase Onozuka RS; 0,1 % (w/v) Pectolyase Y23) in Protoplasten-Waschpuffer (12,5 mM Natriumacetat; 5 mM CaCl₂; 0,37 M Mannitol; pH 5,8)] resuspendiert und für etwa 3 h bei 26 °C unter leichtem Schütteln (Infors Multitron, 110 rpm) im Dunkeln inkubiert. Die so erfolgte Protoplastierung der Zellen wurde lichtmikroskopisch bestätigt. Anschließend wurden die Zellen auf sechs 50 ml-Reaktionsgefäße

aufgeteilt, pelletiert (Zentrifuge: Rotina 38R; Hettich; 5 min; 800 rpm; Beschleunigung: 3; Bremse: 0) und je 3x mit Protoplasten-Waschpuffer gewaschen. Dafür wurden die pelletierten Zellen in je 30 ml Protoplasten-Waschpuffer (je Gefäß) resuspendiert und erneut pelletiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 15 ml Protoplasten-Waschpuffer resuspendiert und auf zuvor frisch hergestellte Percoll-Gradienten verteilt.

Für die Herstellung von Percoll-Gradienten wurden zunächst zwei Lösungen bereitgestellt: Eine 0 % Percoll-Lösung (0,7 M Mannitol; 20 mM MgCl₂; 5 mM PIPES/KOH pH 7,0) und eine 70 % Percoll-Lösung (70 % (v/v) Percoll; 0,7 M Mannitol; 20 mM MgCl₂; 5 mM PIPES/KOH pH 7,0). Percoll-Lösungen mit anderen Konzentrationen an Percoll wurden durch Mischen dieser beiden Lösungen erstellt. Für einen Percoll-Gradienten wurde in einem 14 ml-Zentrifugenröhrchen (Beckmann) zunächst ein linearer Gradient aus 0-30 %iger Percoll-Lösung (insgesamt 6 ml) generiert. Dieser wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers erzeugt und mit 2,1 ml 40 %iger Percoll-Lösung unterschichtet. Diese wurde wiederum mit 1,9 ml einer 70 % Percoll-Lösung unterschichtet.

Nachdem diese Gradienten mit den gewaschenen BY-2-Protoplasten beladen wurden, erfolgte eine Auftrennung der Zellen durch Zentrifugation (Ultrazentrifuge: L8-M; Rotor: SW40Ti; 60 min; 7500 rpm; Beschleunigung: 1; Bremse 0; 23 °C). Entvakuolierte Miniprotoplasten sammelten sich in der Interphase zwischen der 40 % Percoll-Schicht und der 70 % Percoll-Schicht an. Diese wurden isoliert und je 2x mit Protoplasten-Waschpuffer gewaschen (siehe selber Abschnitt oben). Nachfolgend wurden diese Zellen im 3,5-4 fachen Volumen TR-Puffer (30 mM HEPES/KOH pH 7,4; 80 mM Kaliumacetat; 1,8 mM Magnesiumacetat; 2 mM DTT; 1x Protease-Inhibitor (Roche, complete Mini, EDTA free)) resuspendiert und mittels eines auf Eis vorgekühlten „dounce homogenizer“ (*tight fit*) in etwa 100 Stößen aufgeschlossen. Dabei wurden jeweils 10 Stöße durchgeführt, bevor der „homogenizer“ auf Eis für eine Minute erneut gekühlt werden musste. Anschließend wurden die Zellkerne durch zweimalige Zentrifugation (Zentrifuge: Mikro 200R; 10 min und 2 min; 3000 rpm; 4 °C) entfernt und der Überstand als BYL aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung des Lysats bei -80 °C.

2.2.4.2 Mikrokokkus-Nuklease-Spaltung zellulärer mRNAs

Die Mikrokokkus-Nuklease (MN) ist eine extrazelluläre Nuklease aus *Staphylococcus aureus*. Es handelt sich um eine Endonuklease mit einer Präferenz für einzelsträngige Nukleinsäuren. Im Verlaufe dieser Promotion wurde die MN zur Spaltung endogener mRNAs im BYL verwendet [199]. Aufgrund der (schwächeren) Katalyse der Spaltung doppelsträngiger Nukleinsäuren und der Spaltung von mRNAs, musste die MN durch Zugabe von EGTA inaktiviert werden, um die

Lysate für spätere *in-vitro*-Translationsreaktionen vorzubereiten. Dieses komplexiert Ca^{2+} -Ionen, welche essentielle Kofaktoren der MN darstellen.

Zur Spaltung zellulärer mRNAs wurden je 100 μl BYL mit 0,5 mM CaCl_2 und 7,5 U der MN (Roche Diagnostics) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurde die MN durch Zugabe von 3 mM EGTA inaktiviert. Die Translationsaktivität der behandelten Lysate wurde durch Luziferase-Assays (siehe 2.2.4.5) überprüft. MN-behandelte Lysate wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.4.3 Immunpräzipitation kleiner RNAs aus dem BY-2-Lysat

Für Immunpräzipitationen kleiner RNAs wurde das „microRNA detection kit“ (New England Biolabs) verwendet. Dieses nutzt ein Fusionsprotein bestehend aus einem Maltosebindeprotein, dem p19 des *Carnation italian ringspot virus* und einem Chitinbindeprotein, um kleine RNAs zu präzipitieren. Die praktische Durchführung der Immunpräzipitation fand durch Dr. Jana Schuck (AG Mikrobielle Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg, Halle(Saale), Deutschland) statt.

Dafür wurden 20 μg Gesamt-RNA aus dem BYL (isoliert mit Phenol/Chloroform-Extraktion: siehe 2.2.2.2) und 7 U des Fusionsproteins nach den Herstellervorgaben für eine sRNA-Präzipitation verwendet. Das so erhaltene Präzipitat wurde mit 20 μg Proteinase K (Sigma) in Anwesenheit von 0,5 % (w/v) SDS für 30 min bei 37 °C behandelt und die erhaltenen sRNAs mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung (siehe 2.2.2.2) gereinigt.

Die Sequenzierung der Präzipitate erfolgte als *next generation sequencing* mit einem „Highscan“-Sequenziergerät (Illumina, San Diego, USA) und wurde durch Dr. Knut Krohn (Core Unit DNA-Technologien; Universität Leipzig, Leipzig, Deutschland) durchgeführt.

Die bioinformatische Auswertung der Daten erfolgte durch Dipl.-Bioinform. Claus Weinholdt (AG Bioinformatik, MLU Halle-Wittenberg, Halle(Saale), Deutschland). Dafür wurden die Rohsequenzen mit den Programmen „cutadapt“ (Version 1.12) und „sickle“ um Adaptersequenzen gekürzt und gefiltert. Anschließend wurden die Sequenzen mit bekannten rRNA-Genen verglichen (Programm: „Bowtie“ (Version 1.1.2)). Dabei wurde ein Maximum an drei *seed*-Fehlpaarungen zugelassen. Nicht-übereinstimmende Sequenzen wurden mit einer Kombination aus *Nicotiana tabacum*-miRNA-*hairpin*-Sequenzen aus der miRbase (Version 21) (www.mirbase.org) und snoRNA-Sequenzen aus der „plant snoRNA database“ (http://bioinf.scri.sari.ac.uk/cgi-bin/plant_snorna/home) unter Zuhilfenahme von „Bowtie“ (maximal drei Fehlpaarungen) verglichen. Sequenzen mit miRNA-Übereinstimmungen wurden mittels eines modifizierten „R scripts“ gezählt und mittels „Bioinductor package edgeR“ (Version 3.12.1) verglichen. MiRNAs

wurden als signifikant unterschiedlich abundant deklariert, sofern die ermittelte „false discovery rate“ (FDR) einen Wert unterhalb von 0,05 annahm.

2.2.4.4 *In-vitro*-Translation

In-vitro-Translationen wurden mit MN-behandeltem BYL (siehe 2.2.4.2) durchgeführt. Der zugehörige Reaktionsansatz ist in Tabelle 2.9 zusammengefasst.

Tabelle 2.9: Reaktionsansatz für eine *in-vitro*-Translation im BYL

Komponenten	Menge
BYL	10 μ l
Kreatinphosphatkinase (10 mg/ml)	0,4 μ l
4x TR*-Puffer	2 μ l
10x TM-Puffer	2 μ l
mRNA	1 μ g
H ₂ O	ad. 20 μ l

Der 4x TR*-Puffer (120 mM HEPES/KOH pH 7,4; 400 mM Kaliumacetat; 7,2 mM Magnesiumacetat; 2 mM DTT; 4x Protease-Inhibitor (Roche)) enthält die für die Translation von AGO-Proteinen optimale Kaliumacetat-Konzentration, wurde jedoch auch für die *in-vitro*-Translation anderer Proteine verwendet. Der verwendete 10x TM (Translationsmix) enthielt die nachfolgenden Bestandteile: 7,5 mM ATP; 1 mM GTP; 250 mM Kreatinphosphat und 0,8 mM Spermin.

Im Falle einer radioaktiven Markierung wurden dem Reaktionsansatz 10 μ Ci [³⁵S]-L-Methionin (1000 Ci/mmol; Hartman Analytic) zugesetzt. Die Reaktionsansätze wurden für eine Stunde bei 25 °C inkubiert.

2.2.4.5 Luziferase-Reporterassay zur Darstellung von RISC-Aktivitäten

Einen experimentellen Ansatz, um RISC-Aktivitäten *in vitro* darzustellen, stellte ein sogenannter Luziferase-Reporterassay dar. Dafür wurde zunächst *N. benthamiana*-AGO1-1L [131] im BYL nach dem Protokoll aus 2.2.4.4 *in vitro* translatiert. Dies geschah unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von CIRV-p19. Bei Abwesenheit dieses Proteins wurde das Volumen des Translationsansatzes durch das entsprechende Volumen des p19-Lagerungspuffers (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50 % (v/v) Glycerin) aufgefüllt. Nach einer Translation von einer Stunde wurden dem Reaktionsansatz ca. 0,07 μ M einer phosphorylierten (siehe 2.2.2.7), doppelsträngigen, kleinen RNA zugegeben (Gesamtvolumen: 22 μ l). Einer weiteren Inkubation bei 25 °C für 30 min folgend wurden je 10 μ l in zwei neue

Reaktionsgefäße überführt. In diese wurden jeweils entweder 5 fmol einer Luziferase-mRNA oder 5 fmol einer Luziferase-Reporter-mRNA (enthält ein *firefly*-Luziferase-ORF fusioniert mit einer Zielsequenz für die jeweilige miRNA) gegeben. Nach einer weiteren Inkubation bei 25 °C für 1 h wurden die Aktivitäten der so synthetisierten Luziferasen durch einen Luziferase-Assay gemessen.

Dafür wurden zunächst 20 µl Luziferase-Substrat (*luciferase assay system*; Promega) bei Raumtemperatur in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Zu diesem wurden 2,5 µl des Reaktionsansatzes pipettiert und etwa 10-12 s bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte eine Messung des emittierten Lichtes durch ein Luminometer (Berthold detection systems) über einen Zeitraum von 20 s als relative Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s). Dieses war möglich, da das Luziferin-Substrat im Reagenz durch die Luziferasen zu Oxyluziferin unter Lichtemission umgesetzt wird.

Zur Auswertung dieser Messreihen wurden zunächst die gemessenen Luziferase-Aktivitäten aus Reporter-mRNA-Translationen durch die zugehörigen Luziferase-Aktivitäten aus den Luziferase-mRNA-Translationen geteilt. Dies stellt eine Normalisierung der Daten dar. Zudem wurde in jeder Messreihe eine siRNA (gf698) eingesetzt, welche keine spezifische Zielsequenz in der Reporter-mRNA auswies. Die mit dieser siRNA erhaltenen, normalisierten Luziferase-Aktivitäten wurden als 100 %-Wert der Luziferase-Reporter-Aktivität festgelegt. Eine Abnahme dieses Wertes durch den Einsatz einer Reporter-spezifischen miRNA (oder siRNA) stellte ein Maß für die spezifische RISC-Aktivität des Lysates dar.

2.2.4.6 cleavage-Assays zur Darstellung von RISC-Aktivitäten

Eine weitere Möglichkeit RISC-Aktivitäten *in vitro* darzustellen, waren *cleavage*-Assays. Die praktische Durchführung dieser Versuche fand durch Dr. Torsten Gursinsky (AG Mikrobielle Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg, Halle(Saale), Deutschland) statt. Dafür wurden zunächst 0,5 pmol *N. benthamiana*-AGO1-1L [131] im BYL nach dem Protokoll aus 2.2.4.4 *in vitro* translatiert. Dabei waren von Beginn an ebenso die jeweilige phosphorylierte (siehe 2.2.2.7), doppelsträngige, kleine RNA sowie gegebenenfalls 0,1 bzw. 1 µM (Dimerkonzentration) des CIRV-p19 zugegen (Puffer und Konzentration entaprechend Abschnitt 2.2.4.5). Nach der Translationsreaktion für 2,5 h wurden je Ansatz 2 µg Luziferase-RNA sowie 50 fmol [³²P]-markierter Ziel-RNA hinzugegeben. Nach einer Spaltungreaktion für 15 min bei 25 °C folgte die Zugabe von 20 µg Proteinase K unter Anwesenheit von 0,5 % (w/v) SDS. Danach wurden die Reaktionsansätze für 30 min bei 37 °C inkubiert, mit RNase-freiem Wasser auf 120 µl aufgefüllt und die RNA mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch

Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 2,9 Volumen Ethanol und 20 µg t-RNA über Nacht bei -20 °C. Nach der anschließenden Zentrifugation (13.000 rpm, 4 °C, 30 min) erfolgte eine Waschung durch Ethanol (70 % (v/v), siehe Abschnitte 2.2.2.2), eine Trocknung des Präzipitats und die Aufnahme der RNA in 25 µl 1x Ladepuffer (45 % (v/v) deionisiertes Formamid 10 mM Tris/HCL pH 7,4; 2 mM EDTA; 0,002 % (w/v) Bromphenolblau; 0,002 % (w/v) Xylencyanol). Vor der Analyse wurde die RNA durch Inkubation bei 75 °C für 5 min denaturiert. Daraufhin wurden je 10 µl Probenvolumen auf ein 10 %iges Polyacrylamid-Gel (10 cm x 10 cm x 1 mm) in 1x TBE (89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA) und 8 M Harnstoff aufgetragen. Die Auftrennung in 0,5x TBE-Laufpuffer erfolgte in einem elektrischen Feld bei einer begrenzenden Spannung von 350 V. Nach der Auftrennung wurden TBE-Polyacrylamid-Gele für 15-20 min in 5 %iger Essigsäure inkubiert und vakuumgetrocknet. Anschließend wurde ein „Storage Phosphor Screen S 230“ (GE Healthcare) aufgelegt und die Gele für mindestens drei Tage exponiert. Es folgte ein Scan mittels eines „Storm 860“-Phosphorimagers (Molekular Dynamics).

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierungen der Bindungen von microRNAs durch p19

3.1.1 Immunpräzipitation von sRNAs aus dem BY-2-Lysat durch p19

Um die Bindungseigenschaften von p19 an verschiedene miRNAs charakterisieren zu können, sollte zunächst ein Gesamtbild über die Interaktionen von miRNAs eines pflanzlichen Organismus mit p19 generiert werden. Dabei sollte auf Organismen wie den im Bereich der pflanzlichen Virologie verwendeten Modellorganismus *Nicotiana benthamiana* [200] zurückgegriffen werden.

Einige der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden im BY-2-Lysat durchgeführt. Dabei handelte es sich um einen zytoplasmatischen Extrakt aus evakuolisierten *Nicotiana tabacum*-Protoplasten (nah verwandt mit *N. benthamiana*). In vorherigen Studien [37,91,198,199] konnte gezeigt werden, dass dieses Lysat die Rekonstitution von aktiven und durch siRNA- oder miRNA-Zugabe programmierbaren *RNA-induced silencing complexes* (RISCs) aus *in vitro* translatierten AGO-Proteinen ermöglicht. Des Weiteren konnte die Aktivität des VSRs p19 durch Verminderung von AGO/RISC-Aktivitäten *in vitro* nachgewiesen werden. Daher wurde dieses Lysat ausgewählt, um Interaktionen von p19 mit cytoplasmatischen kleinen RNAs nachzuweisen und eine erste Charakterisierung der Bindung verschiedener miRNAs an diesen VSR durchzuführen. Um miRNAs identifizieren zu können, welche mit p19 während viraler Infektionen relevante Interaktionen eingehen könnten, mussten zunächst Daten generiert werden, ob und welche microRNAs *in vitro* mit p19 assoziieren. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt, bei der die im BYL vorhandenen kleinen RNAs durch p19 präzipitiert werden sollten.

Für diesen Versuch wurde das „p19 siRNA binding protein“ (New England Biolabs; Katalognummer M0310) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein, bestehend aus einem Maltosebindeprotein, dem p19 des *Carnation italian ringspot virus* (CIRV-p19) und einem Chitinbindeprotein. Es wurde gewählt, da dessen Fähigkeit das *RNA-silencing* im BYL zu inhibieren bereits nachgewiesen werden konnte [91] und zudem das CIRV-p19 die bisher am besten *in vitro* charakterisierte Variante von p19 bei der Bindung an siRNAs darstellt. Somit eignet es sich auch, um die Interaktionen von p19 mit miRNAs *in vitro* zu charakterisieren. Dafür wurde Gesamt-RNA aus dem BYL mit dem Fusionsprotein versetzt und die IP durchgeführt. Durch Proteolyse mittels Proteinase K, Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung konnte die

RNA danach isoliert werden (siehe 2.2.4.3). Die praktische Durchführung dieser Experimente erfolgte durch Dr. Jana Schuck (AG Mikrobielle Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg, Halle(Saale), Deutschland). So erhaltene RNA-Moleküle wurden mit einem „Highscan“-Sequenziergerät (Illumina, San Diego, USA) durch PD Dr. Knut Krohn vom Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Universität Leipzig (Core Unit DNA-Technologien, Universität Leipzig, Leipzig, Deutschland) sequenziert. Nach diesem Vorgang wurden die Sequenzen durch Dipl.-Bioinform. Claus Weinholdt (AG Bioinformatik, MLU Halle-Wittenberg, Halle, Deutschland) gefiltert (siehe Abschnitt 2.2.4.3). Die gefilterten RNA-Sequenzen wurden danach den *precursor*-Sequenzen der miRNAs aus *N. tabacum* zugeordnet, welche in der miRBase (www.mirbase.org) annotiert vorlagen und anschließend quantifiziert. Durch Vergleich der in die IP eingesetzten RNA (*input*) mit den präzipitierten Sequenzen konnten Anreicherungen von einigen annotierten miRNA-*precursor*-Sequenzen nachgewiesen werden, ebenso wie einige Sequenzen mit geringerer Präsenz nach der IP. Abbildung 3.1 fasst die Ergebnisse dieser IP im Bezug die Sequenzen mit veränderter Abundanz zusammen.

Zusätzlich zu der genannten IP wurde eine zweite Immunpräzipitation unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Bei dieser wurde jedoch vor der RNA-Extraktion genomische RNA des *TBSV* dem Lysat zugesetzt und für 2 h inkubiert. Hierbei sollten Bedingung zu späten Zeitpunkten viraler Infektionen simuliert werden. Bei diesen liegen relevante Mengen viraler genomischer RNA intrazellulär vor, genauso wie erhöhte Mengen an siRNAs viralen Ursprungs. Durch die Inkubation des viralen Genoms im Lysat sollten virale siRNAs durch die endogenen DCL-Aktivitäten des Lysates erzeugt werden. Die Ergebnisse dieses IP-Versuches sind im Anhang unter 7.1 aufgeführt.

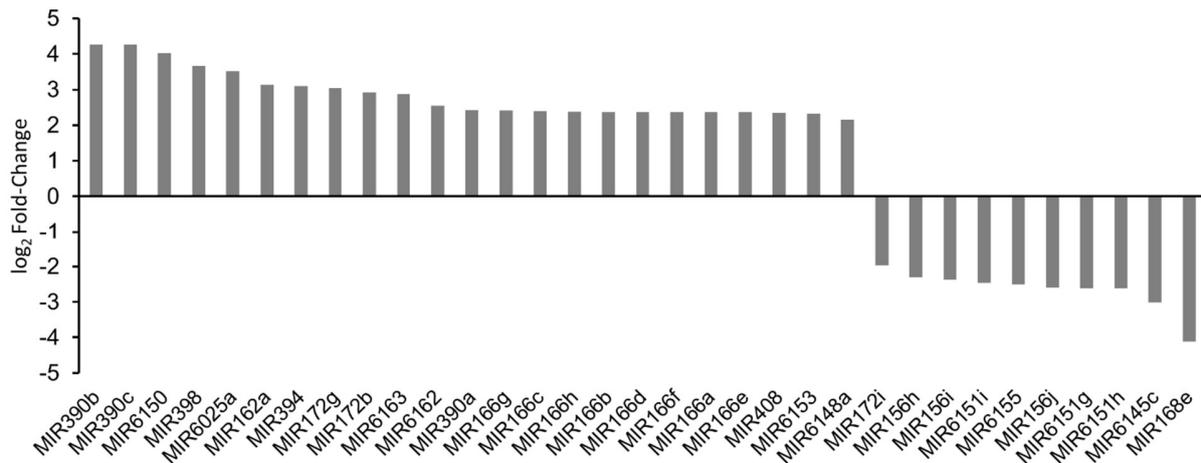


Abbildung 3.1 Ergebnisse der p19-Immünpräzipitation (IP) aus dem BYL Die sequenzierten kleinen RNAs wurden zu *precursor*-Sequenzen von miRNAs aus *N. tabacum* zugeordnet und anschließend quantifiziert. Nach Vergleich dieser Zuordnungen nach der IP mit denen der *input*-Sequenzen ergaben sich Anreicherungen sowie weniger abundante Sequenzen. Dargestellt sind alle Abundanzveränderungen, welche durch Bestimmung der *false discovery rate* (FDR) als signifikant ($FDR < 0,05$) gekennzeichnet wurden. Das Experiment wurde mit drei Chargen des BYL durchgeführt. Aus 162 annotierten und zugeordneten Sequenzen lagen 23 angereichert und 10 weniger abundant nach der IP vor.

Die erhaltenen sRNA-Sequenzen konnten allen annotierten *precursor*-Sequenzen aus *N. tabacum* (162) zugeordnet werden. Jedoch zeigten die in Abbildung 3.1 dargestellten Ergebnisse, dass nur ein kleiner Teil dieser Sequenzen durch die IP angereichert (23x) oder weniger abundant (10x) vorlag. Auch die Ergebnisse der zweiten IP in Abschnitt 7.1 zeigten Anreicherungen und Verminderungen der Abundanz einiger aber nicht aller miRNAs. Diese Daten wiesen darauf hin, dass das p19-Protein eine Bindungspräferenz zu einigen wenigen miRNAs aufweist. Andere miRNAs hingegen interagierten offensichtlich signifikant schwächer mit dem Protein. Unter den sRNA-Sequenzen mit veränderter Abundanz waren auch zwei Isoformen von miRNAs mit zentraler Bedeutung für das antivirale RNA-*silencing* (siehe Abschnitt 1.1.4): miR162a und miR168e. Die *N. tabacum*-miR162a lag nach der IP angereichert vor und stellt einen Regulator von DCL1 dar. Die *N. tabacum*-miR168e reguliert die Aktivität des antiviralen AGO1-Proteins. Diese miRNA wies nach der IP eine verminderte Abundanz auf.

Um der Möglichkeit einer Unterscheidung von miRNAs durch p19 durch verschiedene Bindepräferenzen (differentielle Bindung) nachzugehen, wurden diese beiden miRNAs (miR162 und miR168) für weitere Versuche ausgewählt. Sie stehen dabei auch stellvertretend für andere durch p19 an- oder abgereicherte miRNAs. Zudem sollte auch ein Bezug zur antiviralen Immunantwort bewertet werden. Daher wurde auch die nicht in den IP-Daten enthaltene miR403 in weiteren Studien verwendet. Diese reguliert die Translation des AGO2-Proteins, welches

ebenso wie AGO1 einen zentralen Bestandteil antiviraler RISCs darstellt (siehe Abschnitt 1.1.4) und stellt damit ebenso eine miRNA von zentraler Bedeutung für die Regulation der antiviralen Immunantwort dar. An Hand dieser drei Modell-miRNAs sollte die Bindung von p19 charakterisiert und eine mögliche differentielle Bindung des Proteins an miRNAs untersucht werden.

3.1.2 Ableitungen der miRNA-Strukturen aus *Nicotiana benthamiana*

Häufig wird zur Untersuchung biologischer Vorgänge in Pflanzen mit dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (Familie: *Brassicaceae*) gearbeitet. So wurden bisherige Studien mit transgen synthetisiertem p19 ausschließlich in diesem Organismus durchgeführt [183,185–187], obwohl dieser Organismus keinen natürlichen Wirt der Tombusviren darstellt. Jedoch wird speziell im Bereich der pflanzlichen Virologie *Nicotiana benthamiana* (Familie: *Solanaceae*) als Modellorganismus verwendet [200]. Der Grund dafür liegt unter anderem in der Infizierbarkeit dieses Organismus durch diverse Phyto-viren, inklusive der Tombusviren [201]. Um eine Vergleichbarkeit mit vorherigen Studien anderer Autoren zu gewährleisten, wurde entschieden im Verlaufe dieser Arbeit die miRNA-Duplex-Strukturen beider Pflanzenspezies in ihrer Bindung zu p19 zu untersuchen.

Zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit lagen jedoch noch keinerlei Sequenzinformationen über microRNAs aus *N. benthamiana* vor. Daher wurden die *precursor*-Sequenzen der ausgewählten miRNAs aus *N. benthamiana* auf Basis der Sequenzen aus *N. tabacum* (miR162 und miR168) und *S. lycopersicum* (miR403) mittels einer BLAST-Analyse online ermittelt (siehe Abschnitt 2.1.4.2). Die Strukturen der miRNAs aus *A. thaliana* wurden der Datenbank miRBase (www.mirbase.org) entnommen. Die schematischen Darstellungen der miRNA-Duplex-Moleküle der drei ausgewählten miRNAs aus *A. thaliana* und *N. benthamiana* wurden in Abbildung 3.2 aufgeführt. Zur Unterscheidung wurden im Zuge dieser Arbeit miRNAs aus *A. thaliana* mit dem Präfix *At* und aus *N. benthamiana* mit *Nb* gekennzeichnet (z.B. *AtmiR403*).

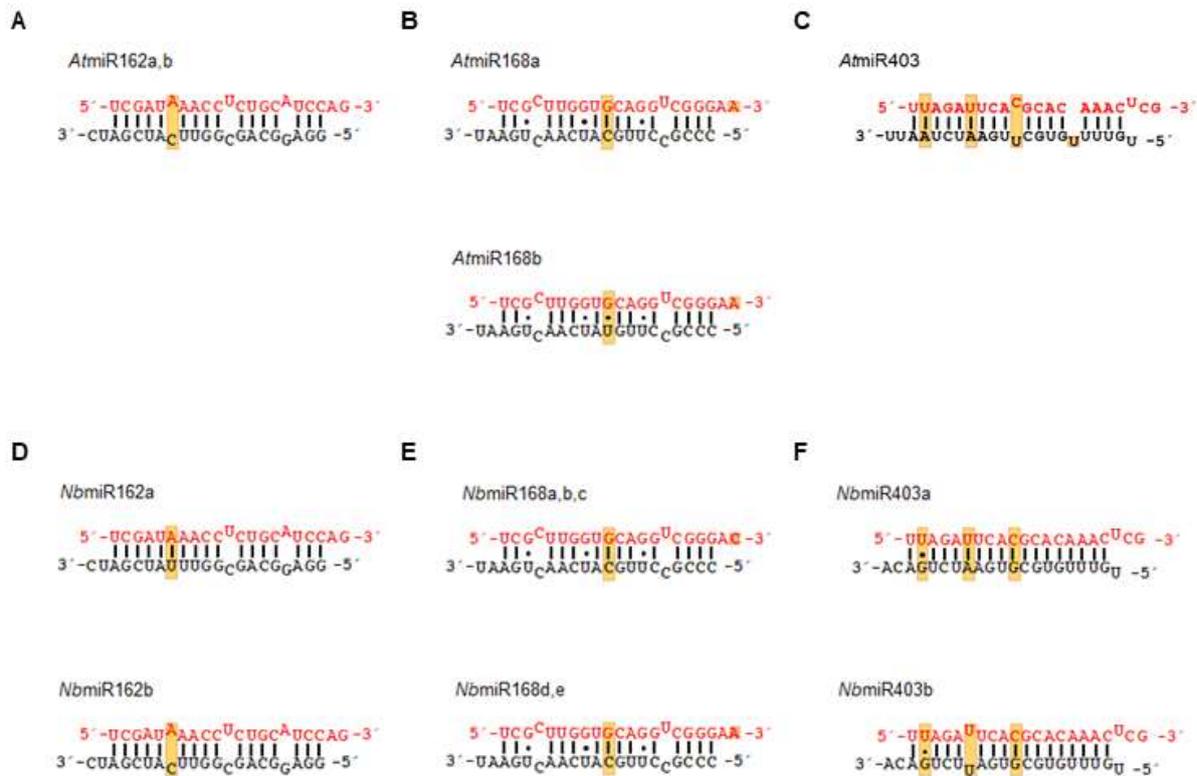


Abbildung 3.2: Duplex-Strukturen der microRNAs 162, 168 und 403 aus *A. thaliana* und *N. benthamiana* Die Strukturen der *N. benthamiana*-miRNAs wurden aus den ermittelten *precursor*-Strukturen abgeleitet (siehe Text). Jeweils in rot sind die miRNA-(+)-Stränge dargestellt, in schwarz die *-Stränge. (A-C) Duplex-Strukturen der miRNAs aus *A. thaliana*. (D-F) Duplex-Strukturen der miRNAs aus *N. benthamiana*. (A, D) Verschiedene Isoformen der miR162. (B, E) Isoformen der miR168. (C, F) Isoformen der miR403. Bei identischen Duplex-Strukturen mehrerer Isoformen aus demselben Organismus ist jeweils nur ein Duplex dargestellt. Die farbigen Kästen zeigen die Positionen innerhalb der Duplex-Strukturen an, an denen sich die Isoformen derselben miRNA unterscheiden.

Es wurden einige Gemeinsamkeiten zwischen den miRNA-Duplex-Strukturen aus beiden Pflanzenspezies deutlich. So sind die *AtmiR162*-Isoformen a und b identisch mit der als *NbmiR162b* bezeichneten Isoform. Ebenso unterscheiden sich die *AtmiR168a*-Isoform und die als *NbmiR168 d* und e ermittelten Isoformen nicht. Aufgrund dieser Übereinstimmungen und des hohen Grades an Konservierung der miR168 [39,42] wurden die *AtmiR162* (*NbmiR162b*) und die *AtmiR168a* (*NbmiR168d,e*) als die jeweiligen Konsensus-Strukturen dieser miRNA-Duplex-Strukturen angenommen. Im Falle der miR403 sind die Duplex-Strukturen sehr verschieden. Zwar sind die jeweiligen (+)-Stränge identisch, jedoch unterscheiden sich die *-Stränge stark voneinander. So ist der *-Strang der *AtmiR403* um ein Nukleotid länger als der (+)-Strang, was ein *gap* in der Duplex-Struktur zur Folge hat. Alle der in Abbildung 3.2 aufgeführten miRNA-Duplex-Strukturen wurden im Folgenden den Bindungsstudien an p19 unterzogen.

3.1.3 Differentielle Bindung der miRNAs 162, 168 und 403 durch p19 *in vitro*

Für eine Charakterisierung der Bindeeigenschaften von p19 an die im vorigen Abschnitt dafür ausgewählten miRNAs sollte dieses Protein heterolog rekombinant synthetisiert und gereinigt werden. Nachdem bereits die IP mit einer Fusionsvariante des p19-Proteins des *Carnation italian ringspot virus* (CIRV) durchgeführt wurde, wurde auch für die *in-vitro*-Charakterisierung der Bindeeigenschaften auf das p19 des CIRV zurückgegriffen. Dieses wurde als Fusionsprotein mit einer Glutathion-S-Transferase (GST) produziert. Durch eine chromatographische Reinigung mittels Affinitätschromatographie, Abspaltung der GST und erneuter Affinitätschromatographie wurde die Mehrzahl der zellulären Proteine aus *E. coli* abgetrennt (siehe 2.2.3.5.1). Anschließend konnten Nukleinsäuren und die verbliebenen Protein-Verunreinigungen durch eine Anionenaustauschchromatographie (Iec) abgetrennt werden (siehe 2.2.3.5.3). Der Erfolg dieser Reinigung wurde mittels Massenspektrometrie (siehe 2.2.3.6) und Absorptionsspektroskopie sichergestellt und ist in Abbildung 3.3 dokumentiert.

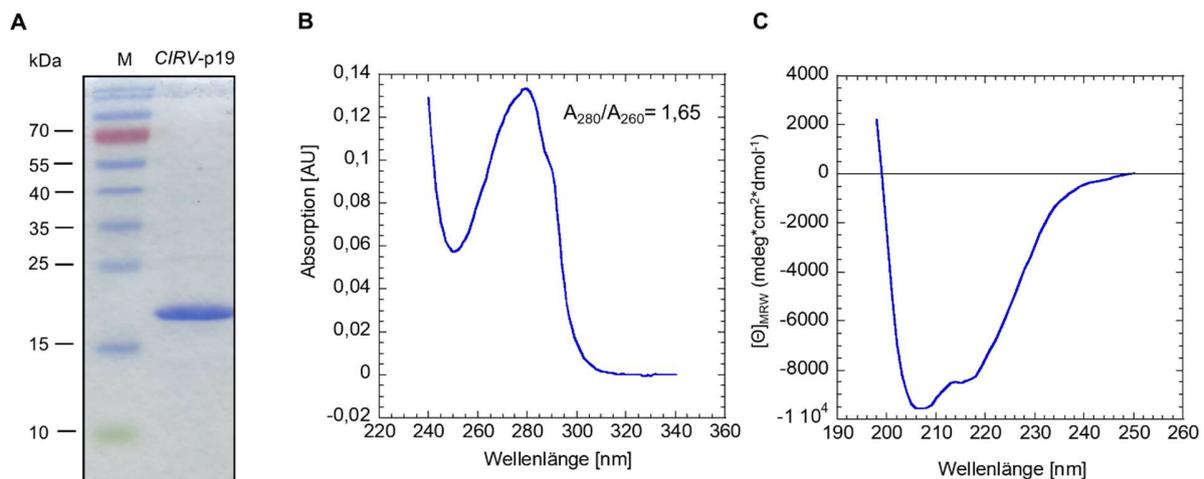


Abbildung 3.3: Dokumentation des Reinigungserfolgs des CIRV-p19. (A) CIRV-p19 nach der Reinigung auf einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel. (B) Absorptionsspektrum der p19-Präparation mit ermitteltem Quotienten der Absorptionen bei 280 nm und 260 nm. (C) Circular dichroismus-Spektrum der p19-Präparation.

Mit Hilfe des Absorptionsspektrums der Präparation nach der Reinigung konnte bestätigt werden, dass die Präparation frei von Nukleinsäuren vorlag (Quotient A_{280}/A_{260} : 1,65). CD-Messungen der p19-Präparation deuteten auf ein Protein mit geringem α -helicalem Anteil und geringem Faltblattanteil (10,6 % α -Helix und 28,4 % β -Faltblatt, ermittelt mittels „BeStSel“-online-Werkzeugs (<http://bestsel.elte.hu/>)) hin. Dies ist abweichend von dem publizierten Modell von Vargason *et al.* (2003) [156] (ca. 33 % α -Helix und 20 % β -Faltblatt). Mögliche Erklärungen dafür

sind Unterschiede in der Proteinfaltung nach der Bindung kleiner RNAs oder stärker in der Kristallstruktur als in der Lösung ausgeprägte Sekundärstrukturen des Proteins. Des Weiteren konnte der Oligomerisierungszustand des Proteins durch analytische Ultrazentrifugation (siehe 2.2.3.8) bestimmt werden. *CIRV*-p19 lag bei allen getesteten Konzentrationen als Dimer vor (Daten nicht gezeigt).

Um die Interaktionen von *CIRV*-p19 mit kleinen RNAs zu charakterisieren, wurden sowohl Studien zur direkten Bindung des Proteins an einzelne kleine RNAs als auch Versuche in Präsenz einer weiteren, kompetitierenden RNA (Kompetitionsexperimente) durchgeführt (siehe 2.2.3.9). Bei Studien zur direkten Bindung wurden zunächst kleine, festgelegte Mengen an 5'-markierter sRNA mit unterschiedlichen Konzentrationen *CIRV*-p19 inkubiert. Die entstandenen sRNA-p19-Komplexe wurden danach mittels nichtdenaturierender Gelelektrophorese (EMSA) von der freien RNA abgetrennt und die Gele nach Auftrennung getrocknet. Nachdem mittels Autoradiographie die Signale der Komplexe und der freien RNA quantifiziert wurden, konnten die relativen, gebundenen Anteile der freien RNA ($[RNA-p19]/[RNA]_{Total}$) gegen die Gesamt-Proteinkonzentration aufgetragen und die Dissoziationskonstante (K_D) nach Formel 2.8 ermittelt werden (siehe Abbildung 3.4). Dabei wurden auch Bindungsstudien mit der siRNA „gf698“ durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine siRNA mit einer Länge von 21 nt und einer Zielsequenz innerhalb der codierenden Region des GFP (grün fluoreszierendes Protein). Sie wurde erstmals von Iki *et al.* (2010) [198] beschrieben und stellt im Zuge dieser Arbeit eine Referenz-siRNA dar.

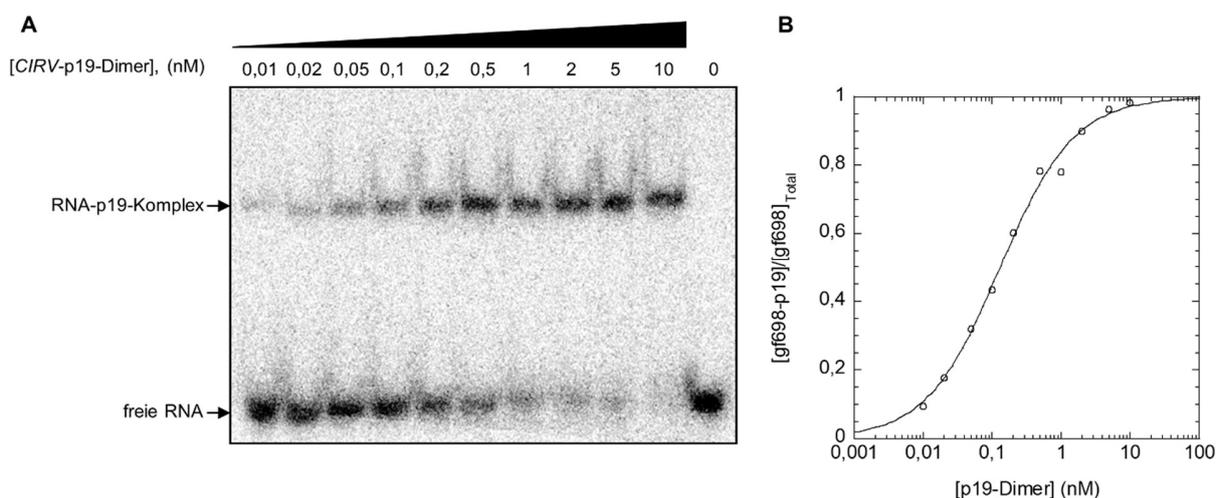


Abbildung 3.4: Beispielhafte Darstellung einer Bindungsstudie von p19 mit einer siRNA. (A) Autoradiogramm eines EMSAs aus einer Bindungsstudie von *CIRV*-p19 bei der Bindung an die siRNA gf698 (siehe Text); (B) Diagramm zur Auswertung einer solchen Bindungsstudie. Die Signalstärken der einzelnen Banden aus (A) wurden quantifiziert und der relative Anteil an gebundener RNA (hier: $[gf698-p19]/[gf698]_{Total}$) pro p19-Konzentration ermittelt; Schwarze Kreise in (B): relative Anteile an gebundener RNA aus (A); Schwarze Linie in (B): nichtlineare Regression der Datenpunkte nach Formel 2.8.

Die so ermittelten Dissoziationskonstanten für die Isoformen der miRNAs 162, 168 und 403 wurden in Tabelle 3.1 gelistet.

Tabelle 3.1: Dissoziationskonstanten der miRNAs 162, 168 und 403 aus *A. thaliana* und *N. benthamiana* sowie der siRNA „gf698“ bei der Bindung an *CIRV*-p19. Die relativen Bindekonstanten (K_{rel}) stellen die relativen Affinitäten im Vergleich zu gf698 dar. Standardabweichungen wurden als Wert nach „ \pm “ hier mit aufgeführt. Jede Messung wurde mindestens dreimal durchgeführt.

sRNA-Familie	sRNA	K_D (nM)	relative Bindekonstante (K_{rel})
siRNA	gf698	$0,06 \pm 0,04$	1
miR162	<i>At</i> miR162a,b/ <i>Nb</i> miR162b	$0,07 \pm 0,03$	1,17
	<i>Nb</i> miR162a	$0,14 \pm 0,05$	2,33
miR168	<i>At</i> miR168a/ <i>Nb</i> miR168d,e	$2,29 \pm 0,78$	38,17
	<i>At</i> miR168b	$4,83 \pm 1,57$	80,5
	<i>Nb</i> miR168a,b,c	$6,57 \pm 1,50$	109,5
miR403	<i>At</i> miR403	$1,37 \pm 0,29$	22,83
	<i>Nb</i> miR403a	$0,11 \pm 0,02$	1,83
	<i>Nb</i> miR403b	$0,37 \pm 0,06$	6,17

Die siRNA „gf698“ wurde hochaffin durch das *CIRV*-p19 ($K_D = 0,06$ nM) gebunden. Damit konnten auch vorher publizierte Affinitäten von p19 an siRNAs ($K_D = 0,17$ nM; [156]) reproduziert werden. Für die miRNAs ergab sich ein differenziertes Bild. So konnten beide Isoformen der miR162 mit einer sehr hohen Affinität gebunden werden, welche sich nicht signifikant von der der siRNA unterschied. Alle Isoformen der miR168 hingegen wurden wesentlich schwächer gebunden ($K_D = 2,29$ - $6,57$ nM). Zusätzlich zu den Bindekonstanten unterschieden sich auch die maximalen Signalstärken (Amplituden) bei den Experimenten mit beiden miRNA-Familien (siehe Abschnitt 7.2). So wurden in Experimenten mit miR162-Varianten Amplituden in gleicher Höhe wie die in den siRNA-Experimenten erhalten. Bei Versuchen mit den Varianten der miR168 hingegen wurden wesentlich schwächere, maximale Signalstärken bestimmt (siehe 7.2). Bei der miR403 wurden, in Abhängigkeit vom Herkunftsorganismus, sehr unterschiedliche Bindungskonstanten ermittelt. So zeigte die *At*miR403 eine eher geringe Affinität zu p19 ($K_D = 1,37$ nM), jedoch wiesen die *Nb*miR403a und die *Nb*miR403b deutlich höhere Affinitäten auf (K_D s jeweils $0,11$ nM und $0,37$ nM).

Zusätzlich zu den Messungen zur Bindung von p19 an jeweils eine kleine RNA wurden auch Konkurrenzexperimente durchgeführt (siehe 2.2.3.9.2; Beispiel in Abbildung 3.5). Dabei wurde dieselbe Menge an 5'-markierter gf698-siRNA wie in den Studien zur direkten Bindung mit $0,5$ nM *CIRV*-p19-Dimer inkubiert (führt zu einem relativen Anteil gebundener RNA von etwa 90 %). Zusätzlich wurden verschiedene Konzentrationen an 5'-phosphorylierter, unmarkierter sRNA hinzutitriert. Durch Abnahme der relativen Anteile gebundener, 5'-markierter gf698 mit

zunehmender Konzentration an Kompetitor-RNA kann eine apparente Bindungskonstante (K_C) nach Formel 2.9 ermittelt werden. Diese Konstante kann bei einfachsten Bindungsmodellen den K_D -Wert der Kompetitor-RNA darstellen, jedoch bei komplexeren Bindungsvorgängen davon abweichen.

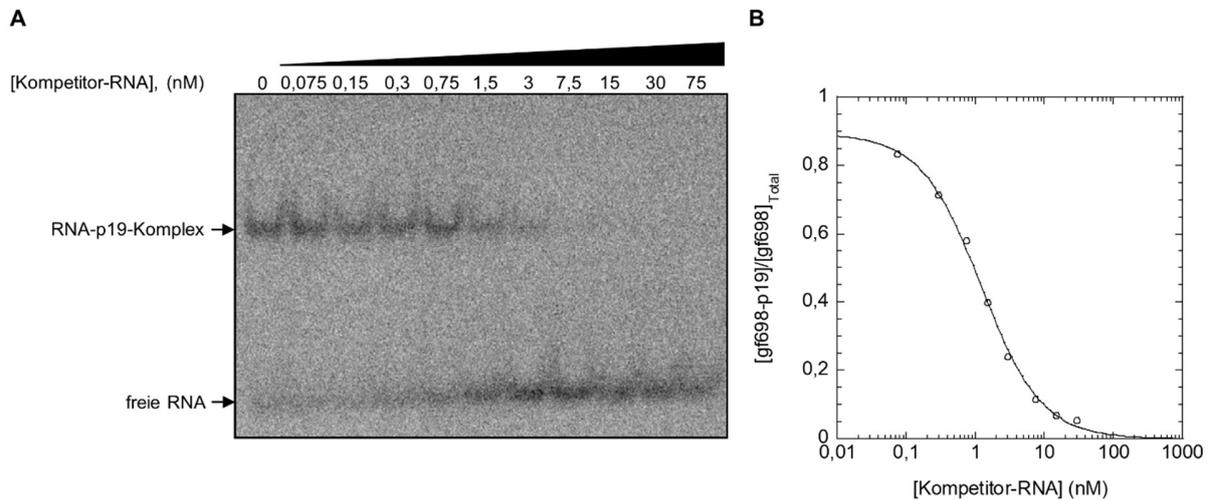


Abbildung 3.5: Beispielhafte Darstellung eines Konkurrenzexperimentes von p19 mit 5'-markierter gf698 und unmarkierter gf698. (A) Autoradiogramm eines EMSAs aus einem Bindungsexperimentes von *CIRV*-p19 bei der Bindung an gf698 (^{32}P -markiert) und in Präsenz verschiedener Konzentrationen 5'-phosphorylierter, unmarkierter gf698; (B) Diagramm zur Auswertung des Autoradiogramms aus (A). Die Signalstärken der einzelnen Banden wurden quantifiziert und der relative Anteil an gebundener RNA pro Kompetitor-Konzentration (hier: $[\text{gf698-p19}]/[\text{gf698}]_{\text{Total}}$) ermittelt; Schwarze Kreise in (B): relative Anteile an gebundener RNA aus (A); Schwarze Linie in (B): nichtlineare Regression der Datenpunkte nach Formel 2.9.

Die ermittelten apparenten Bindungskonstanten (K_C) sind in Tabelle 3.2 gelistet.

Tabelle 3.2: Apparente Bindungskonstanten der Kompetitor-RNAs *AtmiR162a,b*, *AtmiR168a* und *AtmiR403*, sowie gf698 in Konkurrenzexperimenten mit 5'- ^{32}P -markierter gf698 und *CIRV*-p19. Die relativen Bindekonstanten (K_{rel}) stellen die normalisierten K_C -Werte in Referenz zu gf698 dar. Standardabweichungen wurden als Wert nach „±“ hier mit aufgeführt. Jede Messung wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Kompetitor-RNA	K_C (nM)	Kompetitiver K_{rel} (normalisierter K_C)	K_{rel} aus direkter Bindung (Tabelle 3.1)
gf698	$0,07 \pm 0,03$	1	1
<i>AtmiR162a,b</i>	$0,12 \pm 0,05$	1,71	1,17
<i>AtmiR168a</i>	$1,59 \pm 0,35$	22,71	38,17
<i>AtmiR403</i>	$1,09 \pm 0,43$	15,57	22,83

Im Ergebnis der Konkurrenzexperimente konnte das schon zuvor beobachtete differentielle Bindungsverhalten von p19 an verschiedene miRNAs bestätigt werden. Zwar zeigten sich die Unterschiede in den K_C -Werten weniger prägnant als die der K_D -Werte aus den vorherigen

Messungen, jedoch konnte die Tendenz einer schwachen Bindung der *AtmiR168a* und *AtmiR403* gegenüber einer höher affinen Bindung der *AtmiR162* bestätigt werden.

Als Fazit kann festgehalten werden, dass die getesteten miRNAs 162, 168 und 403 mit *CIRV*-p19 interagierten, sich jedoch ihre Affinitäten zu diesem Protein dabei stark unterschieden. So wurden alle Isoformen der miR162 mit Affinitäten an p19 gebunden, welche die Affinitäten der Referenz-siRNA reproduzierten. Die Varianten der miR168 wiesen allesamt deutlich niedrigere Affinitäten zu p19 auf. Bei den miR403-Varianten wurden unterschiedliche Ergebnisse je nach dem Herkunftsorganismus der Isoform erhalten. So konnten die *N. benthamiana*-Isoformen mit höheren Affinitäten mit *CIRV*-p19 interagieren, welche denen der miR162 nahe kamen. Andererseits interagierte die *A. thaliana*-Isoform deutlich schwächer mit dem VSR. Diese Ergebnisse konnten grundsätzlich auch durch eine zweite Messreihe bestätigt werden, bei der Bindungsstudien mit *CIRV*-p19 in Präsenz einer 5'-markierten *gf698* und einer zweiten, kompetitierenden sRNA durchgeführt wurden.

Die Erkenntnis, dass *CIRV*-p19 sehr unterschiedlich mit verschiedenen miRNAs interagiert, führte zu der Frage nach der biologischen Signifikanz dieses Ergebnisses. Dieser wurde in Abschnitt 3.2 nachgegangen.

3.2 Auswirkungen der differentiellen Bindung durch p19 auf das miRNA-vermittelte PTGS

Bei der im vorigen Abschnitt gewonnenen Erkenntnis, dass p19 miRNAs mit sehr unterschiedlichen Affinitäten binden kann, blieb die Frage offen, ob diese Unterschiede auch in Unterschieden in der Sequestrierung kleiner RNAs und in Konsequenz in unterschiedlichen Regulationen der Ziel-RNAs resultieren. Dies war in Anbetracht der Dissoziationskonstanten für die Bindung von p19 an die miR168 (2,23 nM als kleinster Wert) nicht offensichtlich. Bei dieser Affinität konnte eine vollständige Sequestrierung der microRNA durch p19 im Zuge einer viralen Infektion nicht ausgeschlossen werden, da es sich im Vergleich zu anderen intrazellulären Interaktionen nach wie vor um eine hochaffine Interaktion handelt. Mit den Experimenten des folgenden Abschnittes sollte der Einfluss der differentiellen Bindung auf die miRNA-vermittelte posttranskriptionelle Regulation der Expressionen von *AtAgo1*, *Dcl1* und *AtAgo2* *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden.

3.2.1 Differentielle Beeinflussung von miRNA/RISC-Aktivitäten durch p19 *in vitro*

Um den Einfluss der differentiellen Bindung von p19 an miRNAs auf die Regulation der Translation *in vitro* zu untersuchen, wurde das BYL als System zur Untersuchung von RISC-Aktivitäten verwendet. Dabei wurden zwei Versuchstypen durchgeführt: Luziferase-Reporterversuche und *cleavage*-Assays. Mit den Luziferase-Reporterversuchen konnten sowohl *slicer*-abhängige als auch *slicer*-unabhängige Translationsinhibitionen dargestellt werden. *Cleavage*-Assays machten ausschließlich die endonukleolytische RISC-Aktivität sichtbar. Durch Verwendung beider Versuche konnte somit zumindest teilweise beurteilt werden, welche der möglichen RISC-Aktivitäten (endonukleolytische Spaltung oder spaltungsunabhängige Translationsinhibition) durch die miRNAs vermittelt und diese durch CIRV-p19 beeinflusst werden.

Für ein Luziferase-Reporterexperiment (siehe auch 2.2.4.5) wurde AGO1-mRNA (codiert für AGO1-1L [131] aus *N. benthamiana*) im BYL *in vitro* translatiert. Es folgte die Zugabe der jeweiligen zu untersuchenden kleinen RNA. Dadurch konnte diese kleine RNA in das gebildete AGO1-Protein integriert und ein programmierter RISC gebildet werden. Zu diesem Ansatz wurde eine Reporter-mRNA gegeben. Diese enthielt die Zielsequenz der jeweiligen untersuchten miRNA sowie ein offenes Leseraster (ORF) für eine *firefly*-Luziferase. Die miRNA-Zielsequenzen wurden zudem jeweils mit flankierenden Sequenzen aus den Herkunfts-mRNAs kloniert, um eine möglichst authentische Sequenzumgebung zu gewährleisten (Schema der Reporter-mRNAs in Abbildung 3.6 (B)). Dabei wurden für die Reporter-mRNA zum Nachweis der miR162-Aktivität jeweils 9 Nukleotide 5' und 3' zur miRNA-Zielsequenz hinzugefügt, welche die authentischen, benachbarten Nukleotide des *Dcl1*-Gens aus *A. thaliana* darstellten (der *DCL1*-ORF aus *N. benthamiana* war zum Zeitpunkt der Konstruktion nicht bekannt). Die miR168-Reporter-mRNA enthielt die ersten 450 Nukleotide des *AtAGO1*-ORF inklusive der miR168-Zielsequenz. Im Falle des miR403-Reporters wurde die 3'-untranslatierte-Region (3'-UTR) der *AGO2*-mRNA aus *N. benthamiana* 3' vom Luziferase-ORF kloniert. Nach Translation der Reporter-mRNA konnte die Aktivität der gebildeten Luziferase gemessen werden. Die Verminderung dieser Aktivität durch die jeweils eingesetzte miRNA stellte ein Maß für die programmierte Aktivität des *in vitro* gebildeten RISC dar. Diese Aktivität setzte sich aus endonukleolytischer Spaltung und *slicer*-unabhängiger Translationsinhibition zusammen. Je nach genutzter Charge des BYL unterschied sich die erreichte RISC-Aktivität oder der Einfluss von p19 (siehe folgende Textabschnitte). Die Ergebnisse innerhalb einer Charge lagen jedoch konsistent vor (siehe Abbildungen 3.6 und 3.7). Aufgrund der Begrenzung jeder Chargenmenge konnten nicht alle Ergebnisse dieser Arbeit mit derselben Charge dargestellt werden. Es wurden daher zwei BYL-Chargen (nummeriert mit 1 und 2) mit weitgehend homogenen miR162-vermittelten RISC-Aktivitäten verwendet.

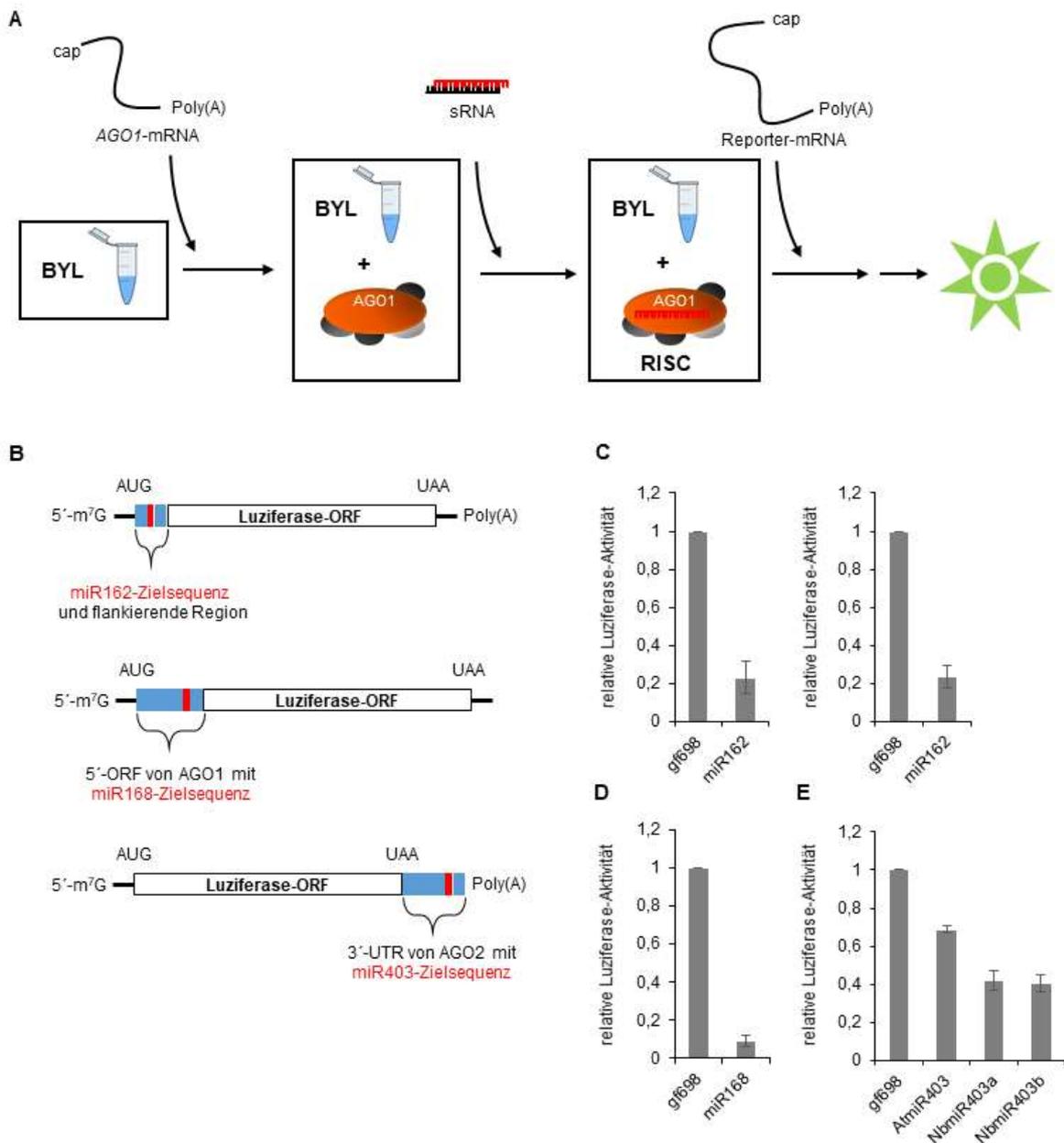


Abbildung 3.6: Luziferase-Reporterexperimente zur Darstellung der miRNA-vermittelten RISC-Aktivitäten *in vitro*. (A) Fließschema zur Darstellung der Vorgehensweise bei Luziferase-Reporterversuchen: Zunächst wurde *NbAGO1-1L*-mRNA im BYL *in vitro* translatiert. Anschließend folgte die Zugabe einer sRNA und eine Inkubation zur Formation von AGO/RISCs. Eine Reporter-mRNA (siehe auch (B)) wurde daraufhin hinzugegeben und translatiert. Die erfolgte Translation wurde durch einen Luziferaseassay quantifiziert; (B) Schematische Darstellung des Aufbaus der Reporter-mRNAs (siehe Text): oben: miR162-Reporter-mRNA; mittig: miR168-Reporter-mRNA; unten: miR403-Reporter-mRNA; (C) Darstellung der Ergebnisse von Reporterexperimenten für miR162-vermittelte RISC-Aktivitäten mit zwei ausgewählten Chargen des BYL (siehe Text); links Charge 1; rechts: Charge 2; (D) Ergebnisse von Reporterexperimenten für miR168-vermittelte RISC-Aktivitäten im BYL der Charge 1; (E) Ergebnisse von Reporterexperimenten für miR403-vermittelte RISC-Aktivitäten im BYL der Charge 2. Alle Ergebnisse stellen technische Replikate mit wenigstens drei Durchführungen des jeweiligen Experimentes dar.

Die miRNA-vermittelte Aktivität von AGO/RISCs im BYL konnte für alle hier untersuchten miRNAs dargestellt werden. Untersucht wurden dabei die jeweiligen Isoformen der miRNAs, welche in Abschnitt 3.1.2 als Konsensus-Strukturen ausgewiesen wurden (*AtmiR162*; *AtmiR168a*) sowie *AtmiR403*. Nachdem jedoch die geringe, durch *AtmiR403* vermittelte RISC-Aktivität festgestellt wurde (siehe Abbildung 3.6 (E)), wurden die beiden miR403-Isoformen aus *N. benthamiana* diesen Versuchen ebenso unterzogen. Auch durch Einsatz dieser miRNAs wurde die Luziferase-Aktivität vergleichsweise gering reduziert (um ca. 60 %).

Um den Einfluss der differentiellen Bindung von *CIRV*-p19 von unterschiedlichen miRNAs auf die Regulation von Expressionen von mRNAs zu untersuchen, wurden die eben aufgeführten Experimente in Anwesenheit des Proteins durchgeführt. Dabei wurde rekombinant produziertes *CIRV*-p19 (siehe Abschnitt 3.1.3) dem BYL vor Zugabe der *AGO1*-mRNA zugesetzt. Dadurch wurde im Verlaufe des Experimentes bei miRNA-Zugabe ein Zustand geschaffen, in dem p19 mit den gebildeten AGO-Proteinen um die Bindung der frisch zugegebenen miRNAs konkurriert. Auf diese Weise wurden die zugegebenen kleinen RNAs nicht vorzeitig in AGO-Proteine inkorporiert oder durch p19 gebunden. Somit konnte der relative Einfluss des VSRs p19 auf das PTGS untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

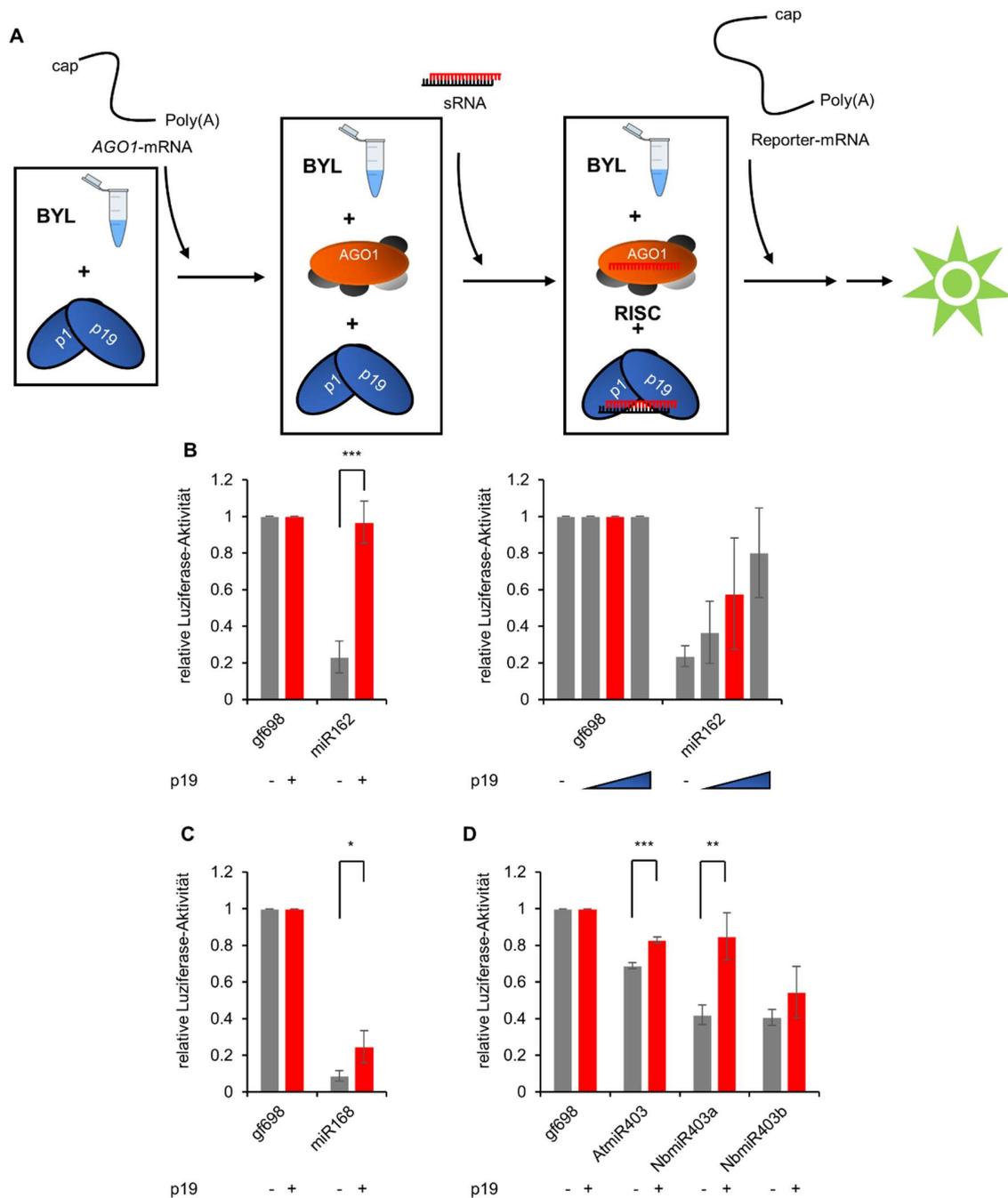


Abbildung 3.7: Luziferase-Reporterversuche zur Darstellung des Einflusses von CIRV-p19 auf die miRNA-vermittelte RISC-Aktivitäten *in vitro*. (A) Fließschema zur Darstellung der Vorgehensweise bei Luziferase-Reporterversuchen mit p19: Diese liefen wie in Abbildung 3.6 beschrieben ab, jedoch wurde rekombinant produziertes CIRV-p19 zu Beginn der Versuche dem Reaktionsansatz hinzugegeben; (B) Ergebnisse von Experimenten für miR162-vermittelte RISC-Aktivitäten mit p19 mit zwei Chargen des BYL; links Charge 1; rechts: Charge 2; Rechts wurden verschiedene p19-Konzentrationen (0,05 μ M; 0,1 μ M; 0,2 μ M) verwendet. Die bei allen anderen Experimenten eingesetzte p19-Konzentration (0,1 μ M Dimerkonzentration) ist durch rote Balken gekennzeichnet; (C) Ergebnisse von Experimenten für miR168-vermittelte RISC-Aktivitäten (BYL: Charge 1) ohne (grauer Balken) und mit (roter Balken) p19; (D) Ergebnisse von Experimenten für miR403-vermittelte RISC-Aktivitäten (BYL: Charge 2) ohne (grauer Balken) und mit (roter Balken) p19; Sterne: Signifikante Aktivitätserhöhungen durch p19 (ein Stern: $p \leq 0,05$; zwei Sterne: $p \leq 0,01$; drei: $p \leq 0,001$).

Wie durch die Abbildung veranschaulicht wurde, führt die Zugabe von *CIRV*-p19 zu einer Wiederherstellung der zuvor verminderten Luziferase-Aktivitäten. Durch Titration von verschiedenen p19-Konzentrationen konnte gezeigt werden, dass dies ein dosisabhängiger Effekt ist (siehe Abbildung 3.7 (B), rechtes Diagramm). Es wird jedoch auch deutlich, dass sich die Ergebnisse in Abhängigkeit von der verwendeten Charge des BYL unterscheiden können (siehe Abbildung 3.7 (B), Vergleich der beiden Diagramme). Daher können die Ergebnisse verschiedener miRNAs nur verglichen werden, wenn dafür dieselbe BYL-Charge verwendet wurde. Für die Reporterversuche mit verschiedenen miRNAs wurde als eingesetzte Konzentration von p19 0,1 μM (Dimer) ausgewählt. Dies entsprach in etwa der Menge an zugegebener kleiner RNA.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass *CIRV*-p19 bei Einsatz der miR168 einen eher geringen Einfluss auf die zugehörige RISC-Aktivität aufwies. Bei Einsatz der miR162 in derselben BYL-Charge (siehe Abbildung 3.7; Vergleiche (B) und (C)) wurde die RISC-Aktivität durch p19 nahezu vollständig blockiert. Die miR403-abhängigen Reporterexperimente wiesen unterschiedliche Ergebnisse auf. So zeigte der Einsatz von *CIRV*-p19 mit der *NbmiR403a* relativ den größten Effekt (siehe Abbildung 3.7 (D)). Das bedeutet, dass bei dieser miRNA-Isoform der größte Anteil an zuvor verminderter Luziferase-Aktivität durch p19 wiederhergestellt werden konnte. Dabei handelte es sich auch um die miR403-Isoform mit der höchsten Affinität zu p19 (siehe Tabelle 3.1). Die beiden anderen miR403-Isoformen hingegen wurden in ihrer Aktivität durch p19 weniger stark eingeschränkt.

Zusätzlich zu den Luziferase-Reporterexperimenten zur Untersuchung des Einflusses von *CIRV*-p19 auf die RISC-Aktivitäten *in vitro* wurden auch *cleavage*-Assays im BYL durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.4.6). Bei diesen wurde spezifisch die endonukleolytische Aktivität der *in vitro* rekonstituierten AGO/RISC-Komplexe dargestellt. Dadurch konnte auch der Einfluss des VSRs auf diese spezifische Aktivität dargestellt werden, was bei den Luziferase-Reporterexperimenten nicht möglich war. Die praktische Durchführung dieser Experimente erfolgte durch Dr. Torsten Gursinsky (AG Mikrobielle Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg, Halle(Saale), Deutschland).

Analog zu den Luziferase-Reporterexperimenten wurde *AGO1*-mRNA (codiert für AGO1-1L [131] aus *N. benthamiana*) im BYL *in vitro* translatiert (siehe 2.2.4.4). Dies geschah in Präsenz der jeweiligen zu untersuchenden kleinen RNA sowie in An- oder Abwesenheit des rekombinanten *CIRV*-p19. Dabei wurde bei Einsatz von p19 dieses mit einer Konzentration von 0,1 μM verwendet (in etwa die Konzentration an zugegebener miRNA) oder mit zehnfacher Menge. Anders als bei den Luziferase-Reporterversuchen wurde den Reaktionsansätzen nach *in-vitro*-Rekonstitution

der RISC-Komplexe jedoch eine [³²P]-markierte Ziel-RNA hinzugegeben, deren miRNA-vermittelte Spaltung dann nach erfolgter Gelelektrophorese mittel Autoradiographie nachgewiesen werden konnte. Dabei wurden Fragmente der jeweiligen mRNAs von jeweils ca. 500 bp verwendet, welche die natürlichen Ziel-Sequenzen der jeweiligen miRNA enthielten. Bei miR162 wurde somit ein Fragment der *DCL1*-mRNA eingesetzt. Für Untersuchungen der miR168 war dies ein Fragment der *AGO1*-mRNA. Die miR403-vermittelten AGO/RISC-Aktivitäten wurden mit Hilfe eines *AGO2*-mRNA-Fragmentes dargestellt. Abbildung 3.8 zeigt den schematischen Aufbau sowie die Ergebnisse dieser Versuche.

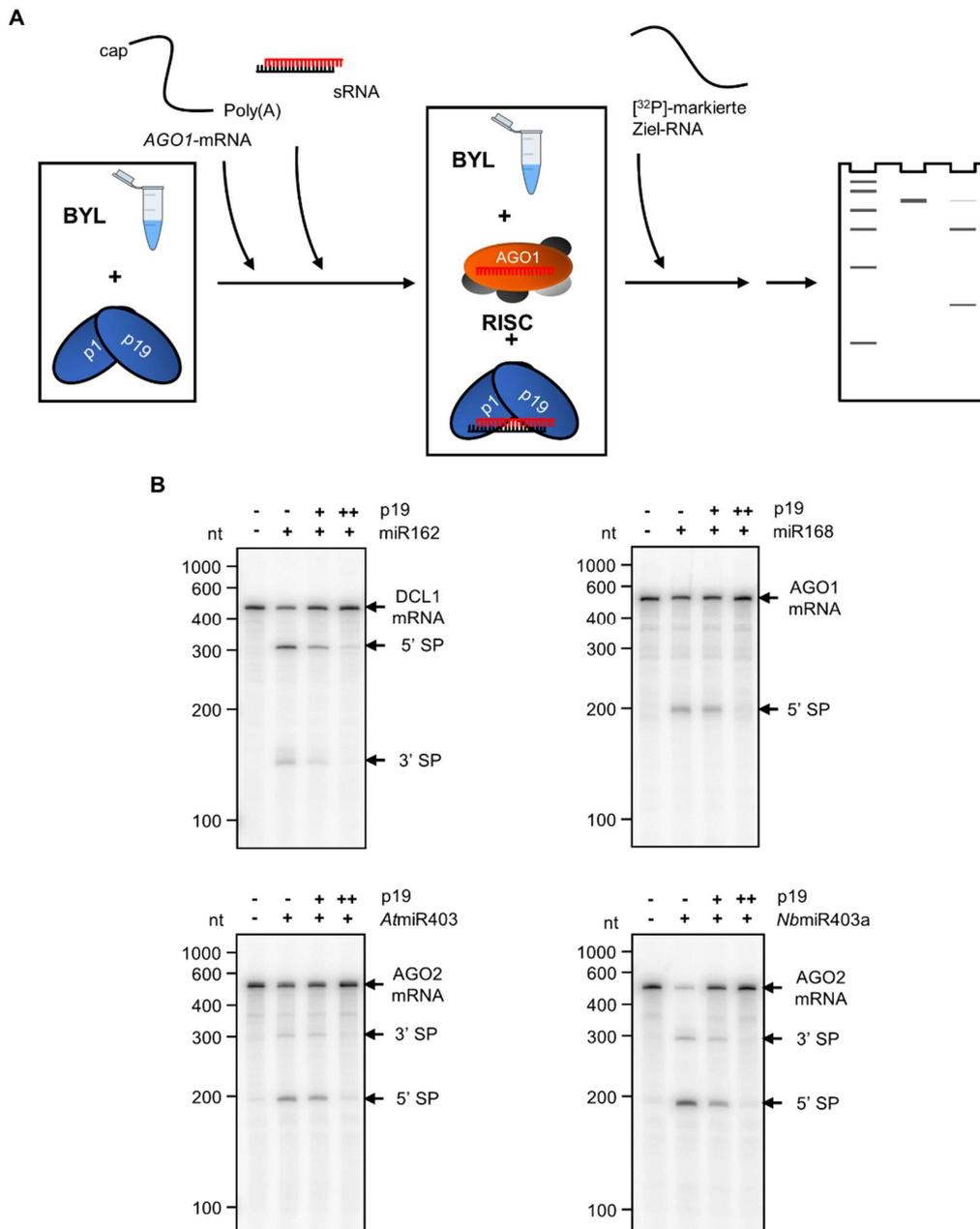


Abbildung 3.8: Cleavage-Assays zur Darstellung des Einflusses von CIRV-p19 auf die miRNA-vermittelten slicer-Aktivitäten *in vitro*. (A) Fließschema zur Darstellung der Vorgehensweise dieser Experimente: Zunächst wurde *NbAGO1-1L*-mRNA im BYL in Anwesenheit einer sRNA und gegebenenfalls *CIRV*-p19 *in vitro* translatiert. Anschließend folgte eine Inkubation zur Formation von AGO/RISCs. Eine [³²P]-markierte Ziel-RNA wurde daraufhin hinzugegeben. Die erfolgte Spaltung wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Autoradiographie verifiziert. (B) Repräsentative Darstellung der Ergebnisse dieser Experimente als Autoradiogramme. Oben von links: Darstellung der Beeinflussung der miR162- und miR168-vermittelten RISC-Aktivitäten; unten von links: *AtmiR403*- und *NbmiR403a*-vermittelte RISC-Aktivitäten. SP: Spaltprodukte der Ziel-RNAs; (-): keine Zugabe; (+): Zugabe; (++) bei p19: Zugabe in der 10-fachen Menge. Alle Experimente wurden dreifach durchgeführt.

Die miRNA-vermittelte *slicer*-Aktivität von AGO/RISCs konnte für alle hier untersuchten miRNAs dargestellt werden. Untersucht wurden dabei die jeweiligen Isoformen der miRNAs, welche in Abschnitt 3.1.2 als Konsensus-Strukturen ausgewiesen wurden (*AtmiR162*; *AtmiR168a*) sowie *AtmiR403*. Aufgrund der deutlich unterschiedlichen K_D -Werte und der Ergebnisse aus den Luziferase-Reporterversuchen wurde auch *NbmiR403a* in die Untersuchungen mit einbezogen. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl miR168 als auch *AtmiR403* deutlich geringere Spaltungsaktivitäten der AGO/RISC-Komplexe vermitteln konnten als miR162 und *NbmiR403a*. Insbesondere bei miR168 stand dies im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Abbildung 3.6. Dieser Umstand konnte damit begründet werden, dass die Luziferase-Reporterversuche AGO/RISC-vermittelte Translationsinhibitionen darstellten, welche sowohl auf endonukleolytische Spaltungsaktivitäten als auch auf *slicer*-unabhängige Translationsinhibition zurückgehen können. Die *slicer*-unabhängigen RISC-Aktivitäten waren jedoch in den *cleavage*-Assays nicht visualisierbar.

Durch Einsatz von *CIRV*-p19 konnte jede dargestellte, endonukleolytische RISC-Aktivität inhibiert werden. Während jedoch die miR162- und *NbmiR403a*-vermittelten RISC-Aktivitäten bereits bei p19-Konzentrationen von 0,1 μ M (wie in Abbildung 3.7) größtenteils inhibiert werden konnten, war dies bei miR168- und *AtmiR403*-vermittelten *slicer*-Aktivitäten nicht der Fall. Auffällig ist dabei, dass die miR168 und die *AtmiR403* in diesem Experiment auch die beiden sRNA-Duplex-Strukturen mit den kleinsten Affinitäten zu *CIRV*-p19 aufwiesen.

Als Fazit kann folgendes festgehalten werden: Der Einfluss von *CIRV*-p19 auf die AGO/RISC-Aktivitäten schien den unterschiedlichen Affinitäten des Proteins zu den miRNAs zu folgen. Die unterschiedliche Bindung dieses Proteins an verschiedene miRNAs kann also auch zu einer unterschiedlichen Beeinflussung der AGO/RISC-Aktivitäten *in vitro* führen. Dabei konnte die Frage nach der biologischen Relevanz dieser Eigenschaft nicht adressiert werden. Dies ist Gegenstand von Abschnitt 3.2.2.

3.2.2 Spezifische Auswirkungen von p19 auf die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression *in vivo*

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Bindungsunterschiede von p19 an miRNAs und die hernach *in vitro* beobachtete unterschiedliche Beeinflussung von mRNA-Translationen im Zuge einer viralen Infektion der Pflanze auch zu deutlich verschiedenen Auswirkungen auf das pflanzliche PTGS führen, wurden Infektionsexperimente durchgeführt. Diese erfolgten in Kollaboration mit Dr. Vitantonio Pantaleo (*Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante*, Forschungsgruppe Bari, Bari, Italien), der die Experimente

für eine Quantifizierung von miRNAs, mRNAs und genomischer RNA der Viren entnommen. Diese Prozedur wurden ebenso 4 dpi durchgeführt für ein Kontrollexperiment zu einer späteren Phase der Infektion. Studienergebnisse anderer Autoren [136], nach denen nach 2 dpi virale genomische RNA von *CymRSV* und *Cym19Stop* noch in sehr geringer, für Transkriptionsverstärkungen irrelevanter Konzentration vorlagen, konnten bestätigt werden (siehe Abschnitt 7.3). Um die Bindung kleiner RNAs an p19 *in vivo* zu erfassen, wurden (+)- und *-Stränge der jeweiligen miRNA quantifiziert und ins Verhältnis gesetzt. Da bei einer in AGO-Proteine inkorporierten kleinen RNA der *-Strang entfernt und abgebaut wird, können bei Quantifizierungen so einer RNA mehrheitlich (+)-Stränge detektiert werden. Wird eine kleine RNA im Zuge einer Infektion hingegen durch p19 gebunden, geschieht dies mit beiden RNA-Strängen und das Duplex-Molekül wird stabilisiert. Dadurch würde sich bei Quantifizierung der RNAs ein gesteigertes *-Strang/(+)-Strang-Verhältnis (*/+ -Verhältnis) ergeben, wenn die RNA *in vivo* mit p19 interagiert. Daher wurde das */+-Verhältnis der kleinen RNAs als Maß für eine Bindung durch das Protein herangezogen und ist für 2 dpi in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: Die */+-Verhältnisse der untersuchten miRNAs in *N. benthamiana* 2 dpi nach *CymRSV*- bzw. *Cym19Stop*-Infektionen

miRNA-Duplex	*/+-Verhältnis bei <i>CymRSV</i> -Infektion	*/+-Verhältnis bei <i>Cym19Stop</i> -Infektion	Veränderung durch p19
miR162*/miR162	0,32 ± 0,12	0,2 ± 0,1	Anstieg um ca. 60 %
miR168*/miR168	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,06	Keine
miR403*/miR403	0,49 ± 0,11	0,23 ± 0,07	Anstieg um ca. 115 %

Es wird deutlich, dass die beiden miRNAs mit geringem K_D -Wert (siehe Abschnitt 3.1.3) auch *in vivo* bevorzugt durch p19 gebunden werden. Dieses Ergebnis konnte auch 4 dpi (Tabelle 3.4) bestätigt werden. Die hier beobachteten Anstiege der */+-Verhältnisse sind sogar noch deutlicher, konnten allerdings aufgrund der großen Fehler nur eingeschränkt mit den Daten nach 2 dpi verglichen werden.

Tabelle 3.4: Die */+-Verhältnisse der untersuchten miRNAs in *N. benthamiana* 4 dpi nach *CymRSV*- bzw. *Cym19Stop*-Infektionen

miRNA-Duplex	*/+-Verhältnis bei <i>CymRSV</i> -Infektion	*/+-Verhältnis bei <i>Cym19Stop</i> -Infektion	Veränderung durch p19
miR162*/miR162	0,37 ± 0,2	0,14 ± 0,1	Anstieg um ca. 165 %
miR168*/miR168	0,08 ± 0,04	0,09 ± 0,01	Keine
miR403*/miR403	0,43 ± 0,17	0,18 ± 0,03	Anstieg um ca. 140 %

Nach diesen Ergebnissen wurden die mRNA-Mengen der Ziel-Gene der untersuchten miRNAs mittels qRT-PCR quantifiziert. *N. benthamiana* codiert für mehrere Isoformen von AGO1:

NbAGO1-1L; *NbAGO1-1H* und *NbAGO1-2* [131]. Die im Verlauf der *in-vivo*-Versuche quantifizierten mRNA-Mengen beinhalteten die Isoformen *NbAGO1-1L* und *NbAGO1-1H*. Sie wurden zusammenfassend jedoch *AGO1*-mRNA bezeichnet. Die mRNA-Mengen in *N. benthamiana* 2 dpi nach *CymRSV*-Infektion sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

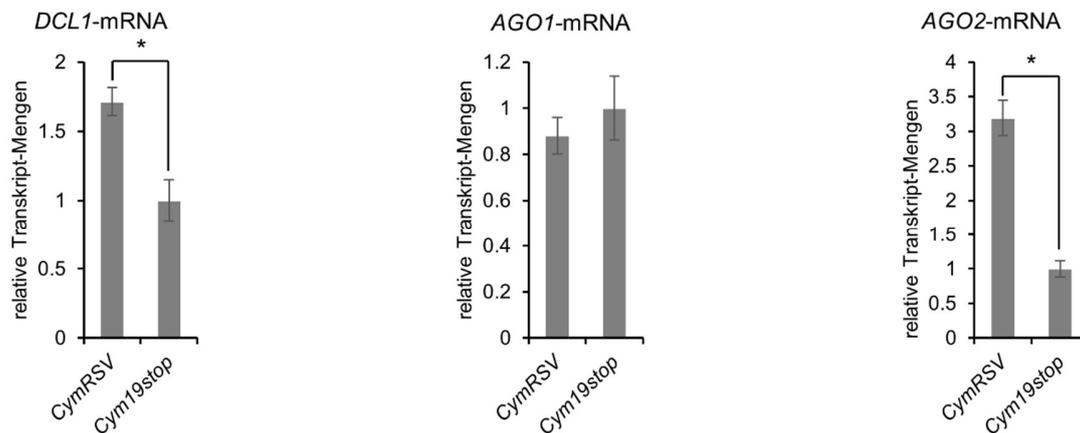


Abbildung 3.10: Darstellung der Transkript-Mengen von *DCL1*, *AGO1* und *AGO2* 2 dpi. Als Referenzgen wurde Cyclophilin (CPH) verwendet. Die Sterne deuten auf signifikante ($p \leq 0,05$) Steigerungen der mRNA-Mengen in *CymRSV*-infizierten Pflanzen im Gegensatz zu *Cym19stop*-infizierten Pflanzen hin.

In Abbildung 3.10 ist deutlich zu erkennen, dass die mRNAs von *DCL1* und *AGO2* bei *CymRSV*-Infektion deutlich stärker akkumulieren als bei *Cym19Stop*-infizierten Pflanzen. Diese mRNAs stellen die Ziel-RNAs der miRNAs dar, welche mit p19 *in vivo* interagieren (siehe Tabelle 3.3). Die Menge an *AGO1*-mRNA bleibt bei 2 dpi unverändert. Eine Quantifizierung ergab stabile miRNA-Gesamt-Mengen. Dadurch konnten unterschiedliche miRNA-Aktivitäten nur auf unterschiedliche Inkorporationstendenzen in AGO-Proteine zurückgeführt werden. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die beobachteten Unterschiede der mRNA-Mengen in *CymRSV*- und *Cym19Stop*-infizierten Pflanzen mit den Affinitäten der miRNAs mit p19 korrelieren (siehe Tabelle 3.3). Zur Kontrolle wurden auch mRNA-Mengen nach 4 dpi quantifiziert und in Abbildung 3.11 dargestellt.

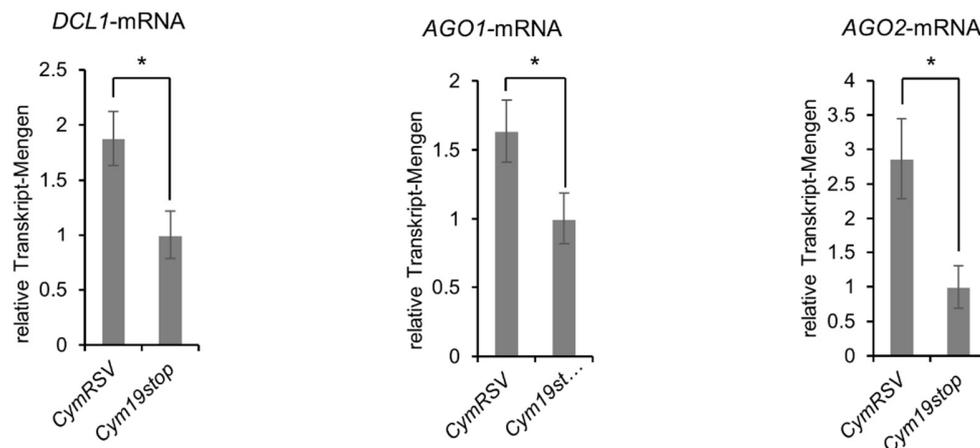


Abbildung 3.11: Darstellung der Transkript-Mengen von *DCL1*, *AGO1* und *AGO2* 4 dpi. Als Referenzen wurde Cyclophilin (CPH) verwendet. Die Sterne deuten auf signifikante ($p \leq 0,05$) Steigerungen der mRNA-Mengen in *CymRSV*-infizierten Pflanzen im Gegensatz zu *Cym19stop*-infizierten Pflanzen hin.

Wie anhand der Abbildung 3.11 zu sehen ist, lag nach 4 dpi die *AGO1*-mRNA-Menge ebenso wie die *DCL1*- und *AGO2*-mRNA-Mengen bei *CymRSV*-infizierten Pflanzen höher als in *Cym19Stop*-infizierten Pflanzen. Zu diesem Zeitpunkt der Infektion wurde jedoch bereits die Verstärkung der Transkription von *Ago1* beschrieben [191]. Eine Transkriptionsverstärkung wäre aber prinzipiell auch für *Dcl1* und *Ago2* denkbar. Daher konnten auch die erhöhten Abundanzen der *DCL1*- und *AGO2*-mRNAs nicht eindeutig die Sequestrierung von miRNAs durch p19 zurückgeführt werden.

MiRNA-vermittelte RISC-Aktivitäten können sich prinzipiell aus endonukleolytischen und *slicer*-unabhängigen Aktivitäten zusammensetzen. Insbesondere bei miR168 konnten auch *slicer*-unabhängige RISC-Aktivitäten angenommen werden, welche zur Translationsinhibition der *AGO1*-mRNA führen (siehe auch Abschnitt 3.2.1). Daher wurden auch die Proteinmengen von *NbAGO1* mittels Immundetektion quantifiziert (siehe Abschnitt 7.3). Die Abundanzen von *AGO1* zeigten sich dabei trotz gesteigerter *AGO1*-mRNA-Mengen in *CymRSV*-infizierten Pflanzen stabil. Dies bestätigte die Ergebnisse dieses Abschnittes, dass miR168 von der p19-Sequestrierung unberührt und damit aktiv verblieb. Da für *N. benthamiana* keine Antikörper für *DCL1* und *AGO2* vorhanden waren, konnten die korrespondierenden Protein-Mengen nicht mittels Immundetektion bestimmt werden.

Die Ergebnisse von Abschnitt 3.2.2 können wie folgt zusammengefasst werden: Es konnte anhand der ausgewählten miRNAs gezeigt werden, dass im Zuge einer viralen Infektion von *N. benthamiana* durch *CymRSV* diese sRNAs bereits nach 2 dpi durch p19 sequestriert wurden. Dies führte auch zu Modulationen der durch diese miRNAs vermittelten RISC-Aktivitäten. Allerdings wurden diese Interaktionen durch die Affinität des VSRs an diese miRNAs bestimmt. Die miR168,

welche *in vitro* mit deutlich niedrigerer Affinität als die anderen beiden untersuchten kleinen RNAs aus *N. benthamiana* mit p19 interagiert, wurde in ihrer Aktivität durch das den VSR codierende Virus nicht eingeschränkt. Nach 4 dpi war die unterschiedliche Bindung der miRNAs durch p19 nach wie vor festzustellen. Allerdings konnten durch die bereits in anderen Publikationen beschriebene Transkriptionsverstärkung der *AGO1*-mRNA modulierte RISC-Aktivitäten nicht mehr zweifelsfrei festgestellt werden. Das tombusvirale p19-Protein zeigt also ein differentielles Bindungsverhalten bei der Bindung an verschiedene miRNAs während einer viralen Infektion und daraus folgend auch eine differentielle Beeinflussung der Regulation der Expression der Ziel-mRNAs dieser miRNAs. Um auch Rückschlüsse auf das Bindungsverhalten des Proteins an andere miRNAs ziehen zu können, sollten die Ursachen für dieses differentielle Bindungsverhalten eruiert werden. Dies wurde in Abschnitt 3.3 dargestellt.

3.3 Molekulare Determinanten für die differentielle Bindung von miRNAs durch p19

Im vorhergehenden Abschnitt wurde gezeigt, dass ein unterschiedliches Bindungsverhalten von p19 an verschiedene miRNAs die Regulation von Komponenten, welche für die antivirale Immunantwort der Pflanze relevant sind, differentiell beeinflusst. Danach sollte das Bindungsverhalten von p19 an miRNAs im Allgemeinen untersucht werden, um den Vorgang der Differenzierung verschiedener miRNAs durch p19 verstehen zu können. Dafür wurden molekulare Determinanten für eine Unterscheidung zwischen verschiedenen miRNAs herausgearbeitet. Dies betraf Determinanten innerhalb der sRNA-Duplex-Struktur. Aber auch in der Primärstruktur des Proteins wurden Aminosäuren identifiziert, welche an der Differenzierung von miRNAs durch p19 beteiligt sind. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Studien aufgezeigt.

3.3.1 Struktur determinanten für die differentielle Bindung von miRNAs durch p19 in der RNA-Duplex-Struktur

Für das Auffinden von Determinanten innerhalb der Nukleinsäurestruktur, anhand derer die miRNAs durch p19 differenziert werden, wurden die Konsensus-Strukturen der miRNAs 162 und 168 (siehe Abbildung 3.2) verglichen. Diese beiden repräsentieren kleine RNAs, welche mit besonders niedrigem (miR162) oder hohem (miR168) K_D an *CIRV*-p19 binden. Dabei fällt auf, dass in beiden Duplex-Strukturen Basenfehlpaarungen an unterschiedlichen Positionen enthalten sind. Außerdem enthält die miR168-Struktur drei G-U-Basenpaarungen (auch *G-U-wobbles*),

welche keine Watson-Crick-Basenpaarungen darstellen. Unterschiedliche, aber definierte Abweichungen vom kanonischen Watson-Crick-Basenpaarungsmuster könnten als Determinanten für die Diskriminierung von verschiedenen miRNAs durch *CIRV*-p19 dienen. Um dies zu untersuchen, wurden Varianten der miR162 erstellt, mit denen systematisch der Einfluss von Basenfehlpaarungen und G-U-*wobbles* auf die Bindeaffinität der miRNAs zu p19 analysiert werden sollte. Das Vorgehen bei der Erstellung dieser Varianten ist im folgenden Abschnitt dargelegt.

3.3.1.1 Generierung artifizieller RNA-Duplex-Moleküle zur Bestimmung von Bindungsdeterminanten *in vitro*

Für die Erstellung artifizieller RNA-Duplex-Moleküle wurden Bezeichnungen für die Nukleotide eingeführt, mit denen die Lokalisation von eingefügten Veränderungen deutlich gemacht werden sollten. Die meisten miRNAs und vsiRNAs bestehen aus RNA-Duplex-Molekülen mit einer Einzelstranglänge von 21 Nukleotiden. Sie weisen dabei jeweils einen doppelsträngigen Bereich von 19 Basenpaarungen, eventuell unterbrochen durch Basenfehlpaarungen, auf, sowie einen Überhang von 2 nt am 3'-Ende. Jedes Basenpaar wird im Folgenden entsprechend der Nummer der Nukleotide im Einzelstrang, gezählt vom 5'-Ende des jeweiligen Stranges, nummeriert. Zusätzlich werden bei miRNAs funktionell (+)-Strang und *-Strang unterschieden. Daher werden durch Einfügen der Anhängsel „+“ oder „*“ die Zugehörigkeiten zum jeweiligen Strang deutlich gemacht. Eine miRNA enthält also die Basenpaarpositionen „1+/19*“, „2+/18*“ bis zu „19+/1*“. Abbildung 3.12 verdeutlicht noch einmal schematisch den Aufbau kleiner RNAs und die daraus folgende Benennung der Basenpaarpositionen.

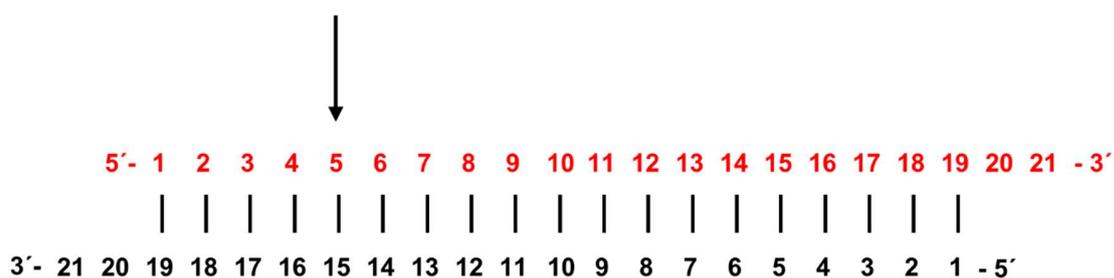


Abbildung 3.12: Piktogramm zum generellen Aufbau von kleinen RNAs und Bezeichnung der Basenpaare. Rot: (+)-Strang (oder *guide*-Strang); Schwarz: *-Strang; Aus der im Text beschriebenen Nomenklatur für die Basenpaarungen ergibt sich für das mit dem Pfeil gekennzeichnete Basenpaar die Positionsbezeichnung 5+/15*.

Um den Einfluss von Abweichungen im Watson-Crick-Paarungsmuster im doppelsträngigen Bereich von miRNAs auf die Bindung durch *CIRV*-p19 zu untersuchen, sollten artifizielle Varianten

der miR162 erstellt werden. Dafür wurde folgende Überlegung einbezogen: Wie in der Kristallstruktur von *CIRV*-p19 und einer siRNA zu sehen ist [156], bindet ein p19-Dimer an den RNA-Duplex in symmetrischer Art. Das bedeutet, dass jeder Terminus des Doppelstrangbereichs der RNA in gleicher Weise mit den p19-Monomeren interagiert. Um die Rolle einzelner Basenpaare bei der Bindung an p19 einzuschätzen, war es demnach ausreichend einen Terminus der miR162 zu modifizieren. In diesen wurden systematisch G-U-*wobbles* oder Fehlpaarungen eingefügt, um aus der affin an *CIRV*-p19 bindenden RNA (mit niedrigem K_D) eine weniger affine RNA (mit hohem K_D) zu erstellen. So wurde zunächst eine miR162-Variante mit zwei Nukleotidaustauschen an den Positionen 4 und 9 des *-Stranges erstellt. Diese Duplex-Variante wurde miR162-0 genannt und beinhaltete einen Terminus mit komplett komplementären Basenpaarungen. Sie wurde in der Folge als Ausgangsversion genutzt, um systematisch Basenfehlpaarungen oder G-U-*wobbles* einzuführen, und die entstandenen Varianten auf die Bindungskonstanten zu *CIRV*-p19 untersucht. Dafür wurde nach Möglichkeit zunächst nur der *-Strang verändert, um möglichst authentische und funktionale (+)-Stränge zu gewährleisten. Abbildung 3.13 fasst diese Strategie zur miR162-Variantenerzeugung zusammen.

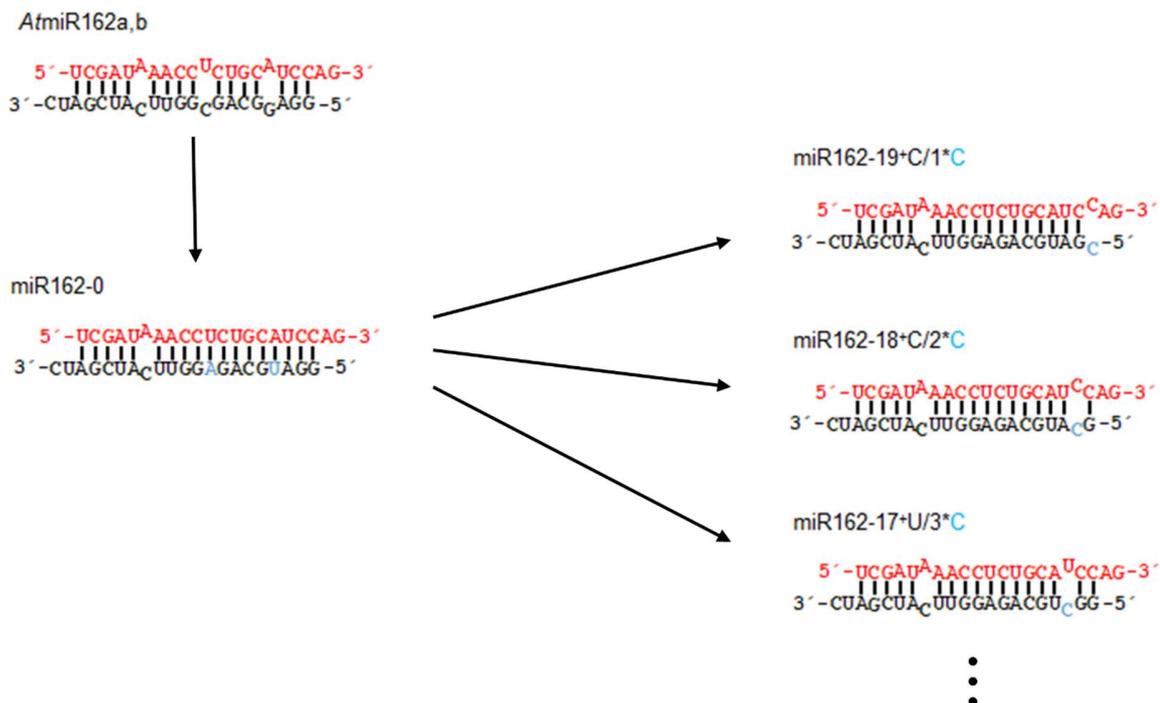
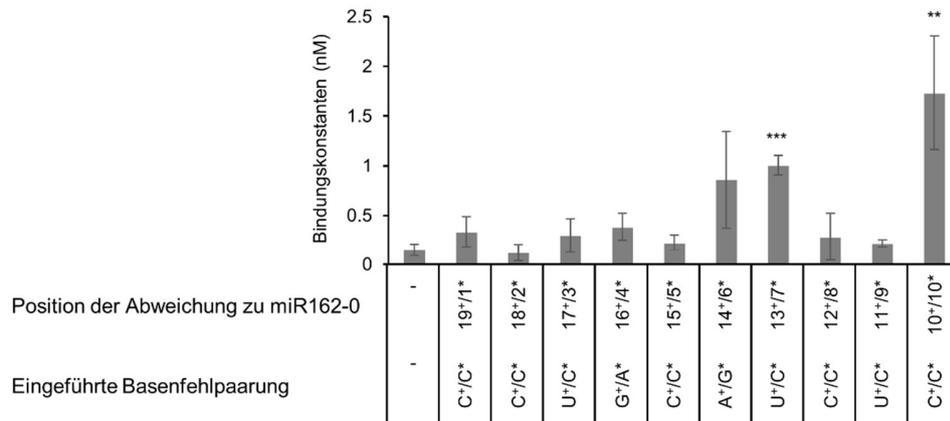


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der Gestaltung artifizierender miR162-Varianten zur systematischen Untersuchung des Einflusses von Basenfehlpaarungen in der miRNA-Struktur auf die Bindung an p19. Rot: (+)-Stränge der miRNA-Varianten; Schwarz: *-Stränge der miRNA-Varianten; Blau: Nukleotidveränderungen in jeder Struktur im Vergleich zu Wildtyp-miR162 (bei miR162-0) oder zur miR162-0 (bei den weiteren Varianten).

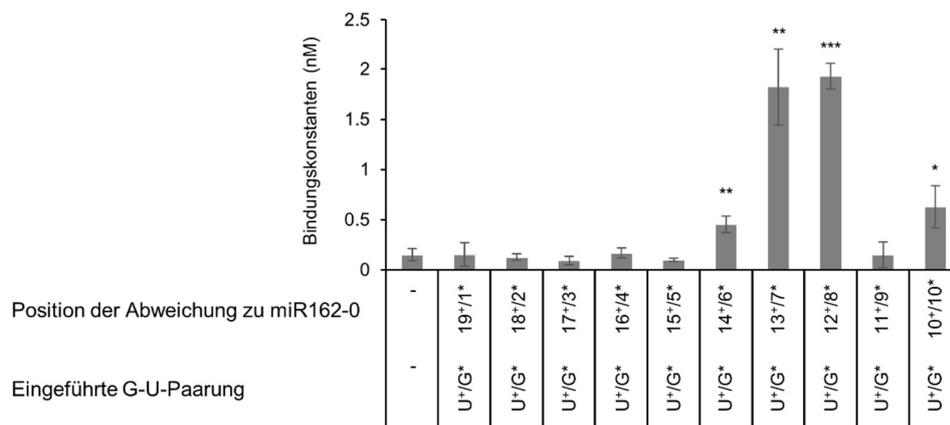
3.3.1.2 Systematische Charakterisierung der Bedeutung von Basenfehlpaarungen und G-U-Basenpaarungen in miR162-Varianten bei der Bindung durch p19

Für die systematische Untersuchung des Einflusses von Basenfehlpaarungen im doppelsträngigen Bereich einer miRNA auf die Bindung zu *CIRV*-p19 wurden, entsprechend der Ergebnisse von Huang *et al.* (2009) [202], Basenfehlpaarungen eingeführt, bei denen jeder Pyrimidinbase ein Cytosin gegenübergestellt wurde und jeder Purinbase die jeweils andere Purinbase (also jeweils Adenin gegenüber von Guanin und Guanin gegenüber von Adenin). Diese Änderungen sollten die Doppelstrang-Duplex-Strukturen möglichst stark destabilisieren und nach Möglichkeit auch zu maximalen Auswirkungen in den Bindekonstanten bei der miRNA-Bindung zu p19 führen. Die so veränderten miR162-Varianten wurden nach dem in Abschnitt 3.1.3 beschriebenen Vorgehen (siehe auch Abschnitt 2.2.3.9.1 im Methodenteil) Bindungsstudien mit rekombinant produziertem *CIRV*-p19 unterworfen. Die dabei bestimmten K_D -Werte wurden im Weiteren in Bezug zu dem der miR162-0 ($0,15 \pm 0,05$ nM) gesetzt, welcher sich nicht signifikant vom K_D -Wert der *AtmiR162* ($0,07 \pm 0,03$ nM) unterschied und deswegen als Kontrollwert verwendbar war. Die Ergebnisse dieser Studien sind in Abbildung 3.14 (A) und tabellarisch im Anhang unter Abschnitt 7.4 aufgeführt.

A



B



C

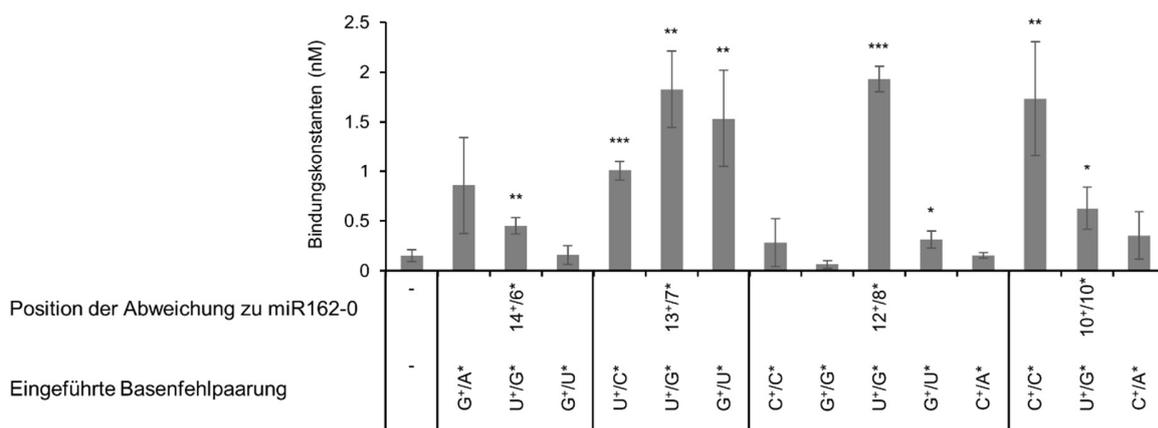


Abbildung 3.14: Systematische Untersuchung der Einflüsse von Basenfehlpaarungen und G-U-Paarungen in miR162-Varianten auf die Bindung zu p19. Dargestellt sind Bindungskonstanten (K_D -Werte) verschiedener miR162-Varianten. Alle Varianten wurden ausgehend von miR162-0 erstellt; (A) Darstellung der K_D -Werte von Varianten mit Basenfehlpaarungen; (B) Darstellung des Einflusses von U*/G*-Paarungen auf die Bindung zu *CIRV*-p19; (C) Darstellung der Einflüsse verschiedener Abweichungen vom Watson-Crick-Paarungsmuster auf die Bindung zu p19 an den Positionen 14*/6*, 13*/7*, 12*/8* und 10*/10*. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die Sterne zeigen signifikante Abweichungen zu miR162-0 an (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

Wie anhand von Abbildung 3.14 (A) zu erkennen ist, hatten Basenfehlpaarungen in der miR162-Struktur sehr unterschiedliche Wirkungen auf die Bindung der jeweiligen Variante zu *CIRV*-p19. Während die meisten Fehlpaarungen nur zu geringen Veränderungen der Affinitäten führten, banden miR162-Varianten mit Fehlpaarungen an den Positionen 13^{+/7*} und 10^{+/10*} mit signifikant höheren K_D -Werten an *CIRV*-p19.

Die im Zuge dieser Arbeit betrachtete miR168 weist neben Basenfehlpaarungen auch G-U-*wobbles* auf (siehe auch Abbildung 3.2 und nachfolgend Abbildung 3.15). Diese befinden sich im eher mittleren Bereich des RNA-Duplex und beinhalten ebenso die Position 13/7. Daher wurden auch diese Abweichungen vom Watson-Crick-Basenpaarmuster in die Untersuchungen einbezogen. Analog des Vorgehens zur Konstruktion der miR162-Varianten mit Basenfehlpaarungen wurden weitere Varianten erstellt, in denen G-U-Paarungen eingeführt wurden (siehe Abschnitt 3.3.1.1). Diese enthielten das entsprechende Guanin jeweils im *-Strang und das Uracil im (+)-Strang (Orientierung U^{+/G*}). Für diese Varianten mussten zudem auch Änderungen in den (+)-Strängen der RNA-Duplex-Moleküle eingeführt werden. Nach der Markierung, Hybridisierung und Reinigung dieser artifiziellen miRNAs (siehe Abschnitte 2.2.2.7 und 2.2.2.8) wurden diese, ebenso wie die Varianten mit Fehlpaarungen, direkten Bindungsstudien (siehe auch Abschnitt 2.2.3.9) unterworfen. Abbildung 3.14 (B) fasst die Ergebnisse dieser Studien zusammen.

Es wurde deutlich, dass die meisten G-U-Paarungen keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität der jeweiligen miR162-Variante an *CIRV*-p19 hatten. Jedoch wurden durch Einführen von G-U-*wobbles* an den Basenpaarpositionen 13^{+/7*} und 12^{+/8*} signifikant erhöhte K_D -Werte gemessen. Durch G-U-Paarungen an 14^{+/6*} und 10^{+/10*} sanken die Bindungsaffinitäten der artifiziellen miRNAs im Vergleich zur miR162-0 ebenfalls, jedoch weniger stark ausgeprägt als an 13^{+/7*} und 12^{+/8*}.

Nachfolgend wurden die Basenpaarpositionen 14^{+/6*}, 13^{+/7*}, 12^{+/8*} und 10^{+/10*} weitergehend untersucht. Dafür wurden die dort eingeführten G-U-*wobbles* invertiert (also Orientierung G^{+/U*}). Da an Basenpaarposition 12^{+/8*} Unterschiede in den Bindungsaffinitäten offenbar von der Identität der Abweichung zum Doppelstrang abhingen, wurden hier zusätzlich einige weitere Basenfehlpaarungen inseriert (siehe Abbildung 3.14 (C)). Die miR162-Varianten mit jeweils einer dieser Abweichungen wurden wie zuvor beschrieben in direkten Bindungsstudien auf ihre Bindung zu *CIRV*-p19 untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien sind in Abbildung 3.14 (C) dargestellt. Lediglich die miR162-Variante mit einem invertiertem G-U-wobble auf Position 13^{+/7*} wies dabei einen stark erhöhten K_D -Wert im Vergleich zur miR162-0 auf.

Als Fazit zu diesen Versuchen kann folgendes festgehalten werden: Die *wobbles* und Basenfehlpaarungen auf Position 14^{+/6}* wiesen einen vergleichsweise moderaten Effekt auf die Bindungsaffinitäten auf. Bei Position 13^{+/7}* schien jedwede Änderung der Nukleotide, die nicht in einem Watson-Crick-Basenpaar resultiert, einen starken Abfall der Bindungsaffinität zur Folge zu haben. Auf Position 10^{+/10}* bewirkte vor allem das Einfügen einer C/C-Basenfehlpaarung einen Abfall der Bindungsaffinität der miRNA-Variante zu *CIRV*-p19. Diese Fehlpaarung stellte einen Eingriff in den RNA-Duplex dar, welcher die Stabilität der Duplex-Struktur dieser Variante stärker beeinträchtigen könnte als andere Abweichungen vom Watson-Crick-Basenpaarungsmuster [202]. Bei Varianten mit *wobbles* und Fehlpaarungen auf der Position 12^{+/8}* kam es zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Lediglich das *wobble* der Orientierung 12^U/8^G zeigte einen stark negativen Einfluss auf die miRNA-p19-Bindung. Die Invertierung dieses Basenpaares führte zwar noch immer zu einer miR162-Variante mit signifikant erhöhtem K_D -Wert, jedoch ist diese Schwächung der miRNA-p19-Bindung bedeutend kleiner als beim 12^U/8^G-*wobble*.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Erniedrigungen der Affinitäten der miR162 Varianten zu p19 durch eine generelle Störung der Stabilität des miRNA-Doppelstranges zustande kamen, aufgrund der große Teile oder die komplette miRNA ungepaart vorlagen, wurden die miR162-Varianten mit modifizierten Basenpaarungen auf den Positionen 13^{+/7}* und 12^{+/8}* Schmelzpunktanalysen (siehe Abschnitt 2.2.2.9) unterworfen. Bei diesen Analysen konnte keine Korrelation zwischen thermodynamischer Stabilität der miRNA-Duplex-Moleküle und K_D -Werten festgestellt werden (siehe Abschnitt 7.5). Daraus wurde geschossen, dass die Verminderungen der Affinitäten der miR162-Varianten bei der Bindung an *CIRV*-p19 auf spezifische Abweichungen im Watson-Crick-Paarungsmuster des doppelsträngigen Bereiches des RNA-Duplex zurückzuführen sind, und nicht das Resultat einer Disruption des Doppelstranges darstellen. Um allgemeine Rückschlüsse auf das Bindungsverhalten von p19 an verschiedene miRNAs ziehen zu können, wurde der Einfluss der ermittelten Nukleotiddeterminanten auch in der miR168-Struktur untersucht (siehe Abschnitt 3.3.1.3).

3.3.1.3 Charakterisierung der Bedeutung der G-U-Basenpaarungen in der miR168-Struktur bei der Bindung durch p19

Im vorherigen Abschnitt wurde deutlich, dass die Basenpaarregion der Positionen 7/13 und 8/12 im miR162-Duplex-Molekül bedeutsam für die Bindung an das *CIRV*-p19 ist. Wie in Abbildung 3.15 zu erkennen ist, enthält auch der RNA-Duplex von *AtmiR168a* (*NbmiR168d,e*; im Weiteren miR168) auf diesen Positionen G-U-Paarungen: Diese befinden sich auf der Position 8^{+/12}* und auf der Position 13^{+/7}*. In beiden Fällen befindet sich das Guanin im (+)-Strang. Das *wobble* auf

Position 8⁺/12^{*} entspricht also der in Abbildung 3.14 (B) untersuchten Orientierung, wohingegen das auf Position 13⁺/7^{*} einem invertierten *wobble* nach dem in Abschnitt 3.3.1.2 gewählten Vorgehen entspricht. Um den Einfluss dieser *wobbles* auf die Bindung der miR168 zu CIRV-p19 zu untersuchen, wurden verschiedene Varianten dieser miRNA konstruiert (dargestellt in Abbildung 3.15 (A)). Bei diesen wurden die G-U-Paarungen durch Veränderungen der jeweiligen *-Stränge in G-C-Paarungen umgewandelt. So entstanden doppelsträngige miRNA-Varianten, mit jeweils einem oder keinem dieser G-U-*wobbles* (miR168-Varianten 1 bis 3). Zudem wurden Varianten konstruiert, in denen zusätzlich die Basenfehlpaarungen durch Veränderung der *-Stränge entfernt worden sind (Varianten 4 und 5) sowie eine siRNA-Variante der miR168 (Variante 6). Bei dieser kleinen RNA entsprachen alle Basenpaare dem Watson-Crick-Basenpaarungsmuster. Die so konstruierten miR168-Varianten wurden hinsichtlich ihrer Bindung an p19 charakterisiert (siehe auch Abschnitt 2.2.3.9 im Methodenteil). Die Ergebnisse dieser Studien sind in Abbildung 3.15 (B) und im Anhang unter 7.4 dargestellt.

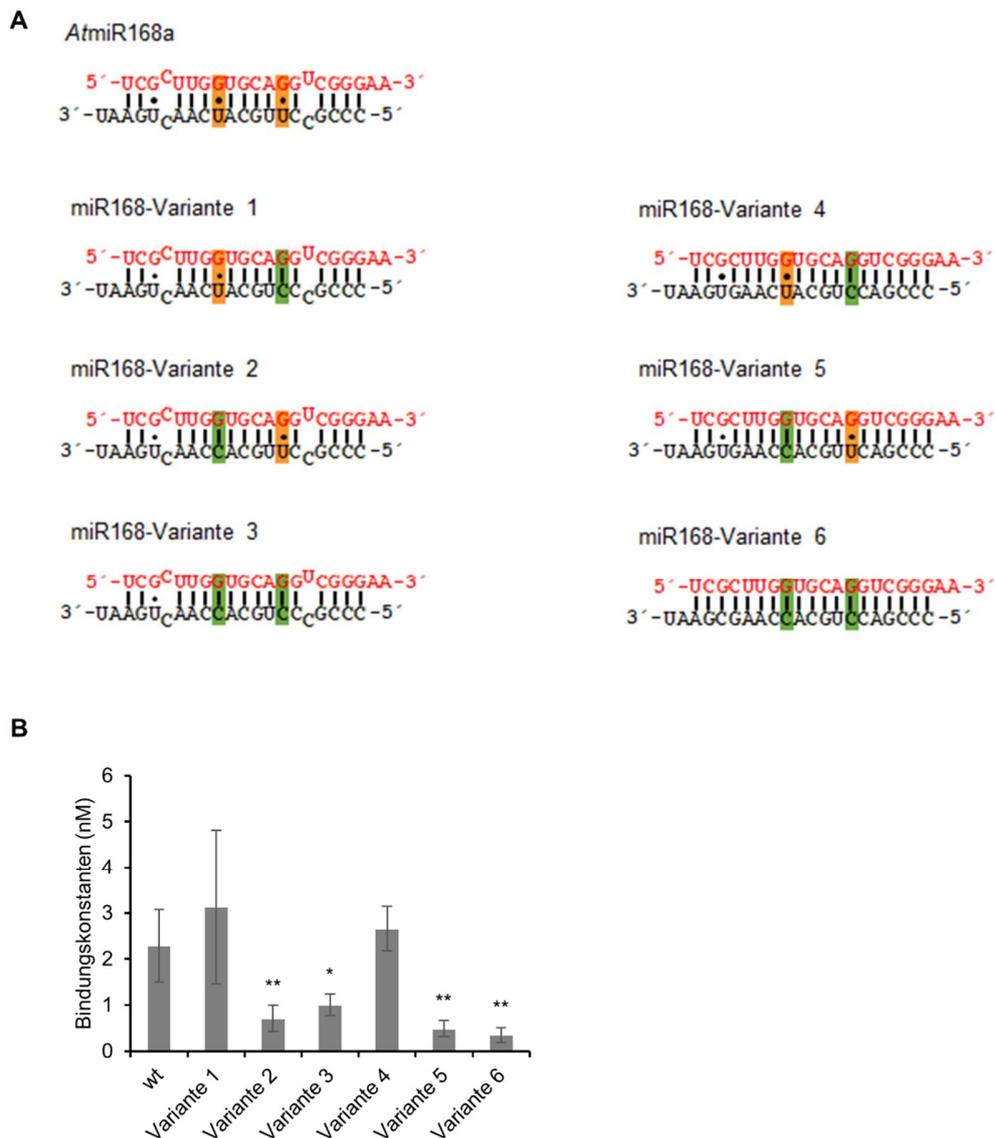


Abbildung 3.15: Darstellung der Einflüsse der zentralen G-U-wobbles in der miR168-Struktur auf die Bindung an *CIRV-p19*. (A) Schematische Darstellung der Duplex-Strukturen von miR168-Varianten. In diesen wurden durch Veränderung der *-Stränge die G-U-wobbles 8^{+/12}* und 13^{+/7}* in G-C-Paare umgewandelt. Details zum Vorgehen sind im Text aufgeführt. Orange Markierung: G-U-Paarung; Grüne Markierung: eingeführte G-C-Paarung; (B) Darstellung der Bindungskonstanten der in (A) dargestellten miRNA-Varianten bei der Bindung an *CIRV-p19*. Die Sterne zeigen signifikante Abweichungen der Affinität der miR168-Variante zu p19 von der der *AtmiR168* an (*: p≤0,05; **: p≤0,01).

Aus den in Abbildung 3.15 dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass einige der miR168-Varianten (Varianten 2, 3, 5 und 6) eine signifikant höhere Affinität zu *CIRV-p19* aufwiesen als die Wildtyp-miR168a. Allen diesen Varianten gemein ist dabei, dass bei ihnen das G-U-wobble auf Position 8^{+/12}* durch ein G-C-Paar ersetzt wurde. Das G-U-Paar auf Position 13^{+/7}* stellte kein Merkmal dar, welches den hohen K_D -Wert der miR168 bei der Bindung an p19 erklärt. Es ist

zudem bemerkenswert, dass selbst die siRNA-Variante der miR168 (Variante 6) eine deutlich niedrigere Affinität (K_D -Wert: $0,35 \pm 0,16$ nM) zu CIRV-p19 aufzeigt als die siRNA gf698. Dies deutet auf Sequenzspezifitäten von p19 bei der siRNA-Bindung hin. Der Einfluss der Nukleotid-Sequenzen einer kleinen RNA auf die CIRV-p19-Bindung konnte im Umfang dieser Arbeit jedoch nicht untersucht werden.

Um zu untersuchen, ob der beobachtete Einfluss des G-U-wobbles an Position 8^{+/12}* in der miR168-Struktur auf die Bindung zu CIRV-p19 auch auf die miR168-vermittelte RISC-Aktivität *in vitro* übertragbar war, wurden erneut Luziferase-Reporterversuche durchgeführt. Diese wurden nach dem in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Vorgehen mit der miR168-Reporter-mRNA aus Abbildung 3.6 durchgeführt. Dabei wurde die BYL-Charge 1 verwendet. Hierbei kamen verschiedene der in Abbildung 3.15 dargestellten miR168-Varianten zum Einsatz. Dies war möglich, da sich diese Varianten nur in den *-Strängen und nicht in den, speziell für die Bindung an die miRNA-Zielsequenz entscheidenden, (+)-Strängen unterschieden. Allerdings konnten aufgrund der beschränkten Menge an BYL je Charge nur die Varianten 1, 3, 4 und 6 untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

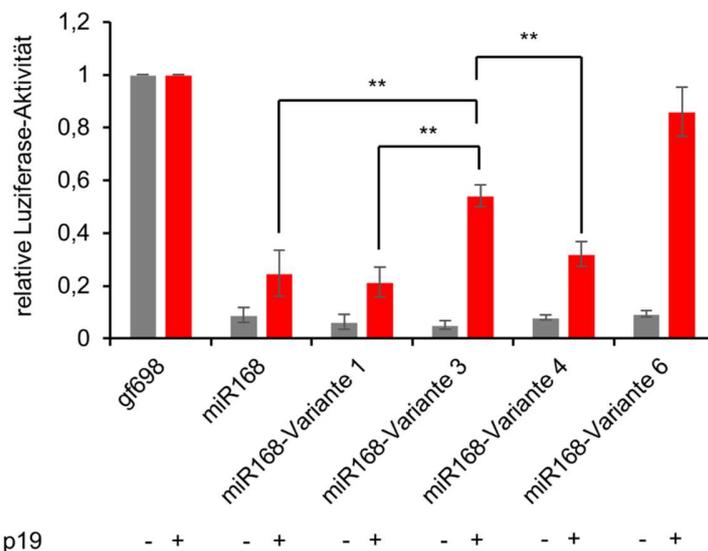


Abbildung 3.16: Luziferase-Reportereperimente zur Darstellung des Einflusses von CIRV-p19 auf die miR168-vermittelten RISC-Aktivitäten *in vitro* bei verschiedenen miR168-Varianten. Dargestellt sind die Ergebnisse von Experimenten ohne (grauer Balken) und mit (roter Balken) 0,1 μ M p19 (Dimer-Konzentration). Die verwendeten miR168-Varianten sind in Abbildung 3.15 aufgeführt. Für diese Experimente wurde die BYL-Charge 1 verwendet. Sterne: signifikant ($p \leq 0,01$) unterschiedliche Luziferase-Aktivitäten bei Anwesenheit von CIRV-p19.

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, konnten durch alle eingesetzten miR168-Varianten vergleichbar hohe RISC-Aktivitäten erzielt werden. Das bedeutet, dass sich die resultierenden Luziferase-Aktivitäten (graue Balken in Abbildung 3.16) nicht signifikant voneinander unterscheiden und zudem kleiner waren, als bei der gf698-Kontrolle. Durch Einsatz von CIRV-p19 konnten die durch die miR168-Varianten vermittelten RISC-Aktivitäten reduziert werden, was in

erhöhten Luziferase-Aktivitäten resultierte. Dies war insbesondere bei den miRNA-Varianten sehr effizient, deren Affinitäten zu *CIRV*-p19 zuvor als signifikant höher als die der Wildtyp-miRNA ermittelt wurden (miR168-Varianten 3 und 6 in diesem Experiment). Bereits bei Einsatz der miR168-Variante 3 konnte in Anwesenheit von *CIRV*-p19 *in vitro* eine signifikant höhere Luziferase-Aktivität gemessen werden, als bei Einsatz der niedrigaffin an p19 bindenden Varianten 1 und 4 sowie der Wildtyp-miRNA. Es kann also festgehalten werden, dass durch das G-U-*wobble* auf Position 8/12 in der miR168-Struktur auch die Einflüsse von *CIRV*-p19 auf die Translation der Luziferase-Reporter-mRNA moduliert wurden. Folgend zu diesen Experimenten wurden auch Aminosäuren in der p19-Primärstruktur mit zentraler Bedeutung für die miRNA-Differenzierung bestimmt, um Mechanismen dieser Differenzierung zukünftig verstehen zu können.

3.3.2 Spezifische Aminosäuren in der p19-Primärstruktur für die differentielle Bindung von miRNAs durch p19

Unter Abschnitt 3.3.1 konnte gezeigt werden, dass eine spezifische molekulare Determinante in miRNA-Duplex-Strukturen, namentlich eine G-U-Paarung auf der Basenpaarposition 8/12, maßgeblich die Affinität von miRNAs bei der Bindung an p19 erniedrigt. Diese wirkt dabei miRNA-unabhängig. Um die Unterscheidung (Diskriminierung) zwischen verschiedenen miRNAs durch p19, welche durch diese Determinante bestimmt wird, zukünftig verstehen zu können, sollten jedoch auch die entsprechenden Regionen in der Primärstruktur des Proteins ermittelt werden, welche an der differentiellen Bindung des Proteins beteiligt sind.

3.3.2.1 Ableitung von Aminosäureseitenketten für eine differentielle Bindung aus der Kristallstruktur

Als Ausgangspunkt für die Auswahl von Aminosäureseitenketten mit möglicher Funktion bei der miRNA-Diskriminierung durch *CIRV*-p19 wurde die von Vargason *et al.* (2003) [156] publizierte Kristallstruktur verwendet (PDB-Code: 1rpu). Diese beinhaltet die Struktur eines *CIRV*-p19-Dimers in Komplex mit einem RNA-Duplex-Molekül von der Größe eine siRNA. Abbildung 3.17 stellt die publizierte Struktur dar.

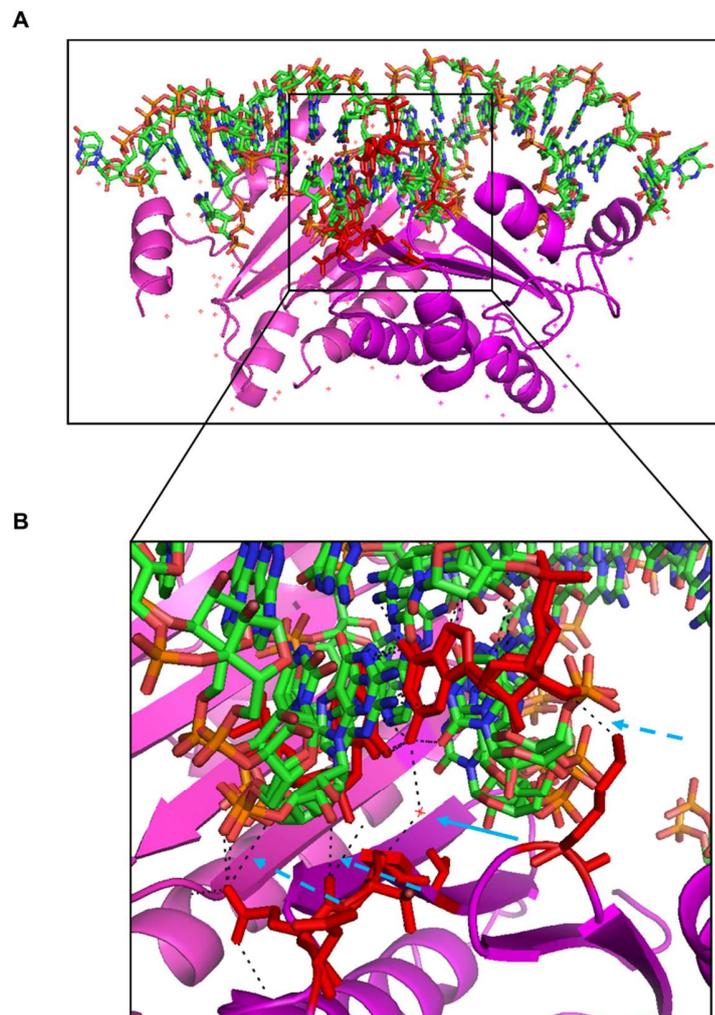


Abbildung 3.17: Ko-Kristallstruktur von CIRV-p19 mit einer siRNA aus Vargason *et al.* (2003) [156] und Darstellung der molekularen Umgebung um ein Basenpaar 8/12. (A) Gesamtdarstellung des CIRV-p19-Dimers in Komplex mit dem RNA-Duplex; (B) Vergrößerung des in (A) markierten Bildausschnittes. Rot markiert in der siRNA: das G-C-Basenpaar auf Position 8/12. Rot markiert im Protein: Aminosäureseitenketten mit polaren Kontakten zum Basenpaar 8/12 sowie Threonin 111. Blaue gestrichelte Pfeile: Hinweise auf polare Kontakte zwischen p19 und dem siRNA-Basenpaar 8/12. Der durchgezogene Pfeil zeigt den wasservermittelten Kontakt zwischen Glycin 109 und dem Guanin 8 an (siehe Text).

Da ein spezifisches G-U-*wobble* als Bindungsdeterminante fungierte war eine spezifische Erkennung der Nukleobasen durch Teile des CIRV-p19-Proteins wahrscheinlich. Studien zu Nukleobasen-Aminosäure-Interaktionen, wie beispielsweise die von de Ruyter und Zagrovic (2015) [203], legen insbesondere Interaktionen von polaren Aminosäureseitenketten, wie die von Glutamin und Asparagin, mit Guaninbasen über elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen nahe. Da im für die Bindung relevanten *wobble* eine ebensolche Base enthalten war, wurden vor allem polare oder geladene Aminosäureseitenketten in die

Betrachtungen mit einbezogen. Wie aus Abbildung 3.17 zu entnehmen ist, wurden in der publizierten Struktur einige polare Kontakte zwischen dem Protein und dem siRNA-Basenpaar 8/12 aufgezeigt. Diese betrafen insbesondere die Aminosäuren Glutamin 107 (jeweils eine polare Interaktion mit der Hauptkette und mit der Seitenkette) und Lysin 67. Zudem wurde ein wasservermittelter Kontakt zwischen dem Glycin 109 und dem 2'-Amin des Guanins 8 dargestellt. Aufgrund dieser Verbindungen wurden die Aminosäureregion 106 bis 109 (Asparagin 106, Glutamin 107, Valin 108 und Glycin 109) der *CIRV*-p19-Primärstruktur sowie das Lysin 67 einem Alanin-Scan unterzogen, um eine mögliche Beteiligung dieser Aminosäuren in der Differenzierung des Proteins zwischen verschiedenen miRNAs zu untersuchen. Zudem wurden einige polare Aminosäuren des N-Terminus, namentlich Glutamin 6 und Asparagin 8, in die Untersuchungen mit einbezogen. Der N-Terminus des Proteins ist in der Kristallstruktur nicht enthalten, jedoch in räumlicher Nähe zu der Aminosäureregion 106 bis 109. Zusätzlich fungierte das Threonin 111 als Kontrolle. Bei dieser Aminosäure konnte bereits eine Rolle in der miRNA-Differenzierung bei miRNAs mit Basenfehlpaarungen an der Position 10/10 nachgewiesen werden [163].

3.3.2.2 Untersuchung der miRNA-Bindung durch p19-Varianten im BYL

Nachdem im vorherigen Abschnitt einige Aminosäuren ausgewählt wurden, welche auf eine Beteiligung an der miRNA-Differenzierung untersucht werden sollten, wurden nun Punktmutationen in *CIRV*-p19-codierenden Sequenzen mittels ortsgerichteter Mutagenese (siehe Abschnitt 2.2.1.7.3) eingeführt. Auf diese Weise wurden die ausgewählten Aminosäuren jeweils einzeln durch Alanine ersetzt und ein Funktionsscan konnte durchgeführt werden. MRNAs, welche für diese p19-Varianten codierten, wurden durch *in-vitro*-Transkription hergestellt. Diese wurden für die Herstellung der Proteine im BYL mittels *in-vitro*-Translation verwendet. Durch Testtranslationen unter Anwesenheit von [³⁵S]-L-Methionin konnten gleichmäßige Translationseffizienzen nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 7.6).

Nach diesen Vorversuchen wurden die mRNAs der p19-Alanin-Varianten *in vitro* im BYL und die Ansätze hiernach mit [³²P]-markierten miR162 und miR168 (Konsensus-Strukturen aus 3.1.2) inkubiert. Die entstandenen sRNA-p19-Komplexe wurden mittels EMSA (siehe 2.2.3.9.3) von der freien RNA abgetrennt und die Signale der Komplexe und der freien RNA mittels Autoradiographie quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 3.18 dargestellt.

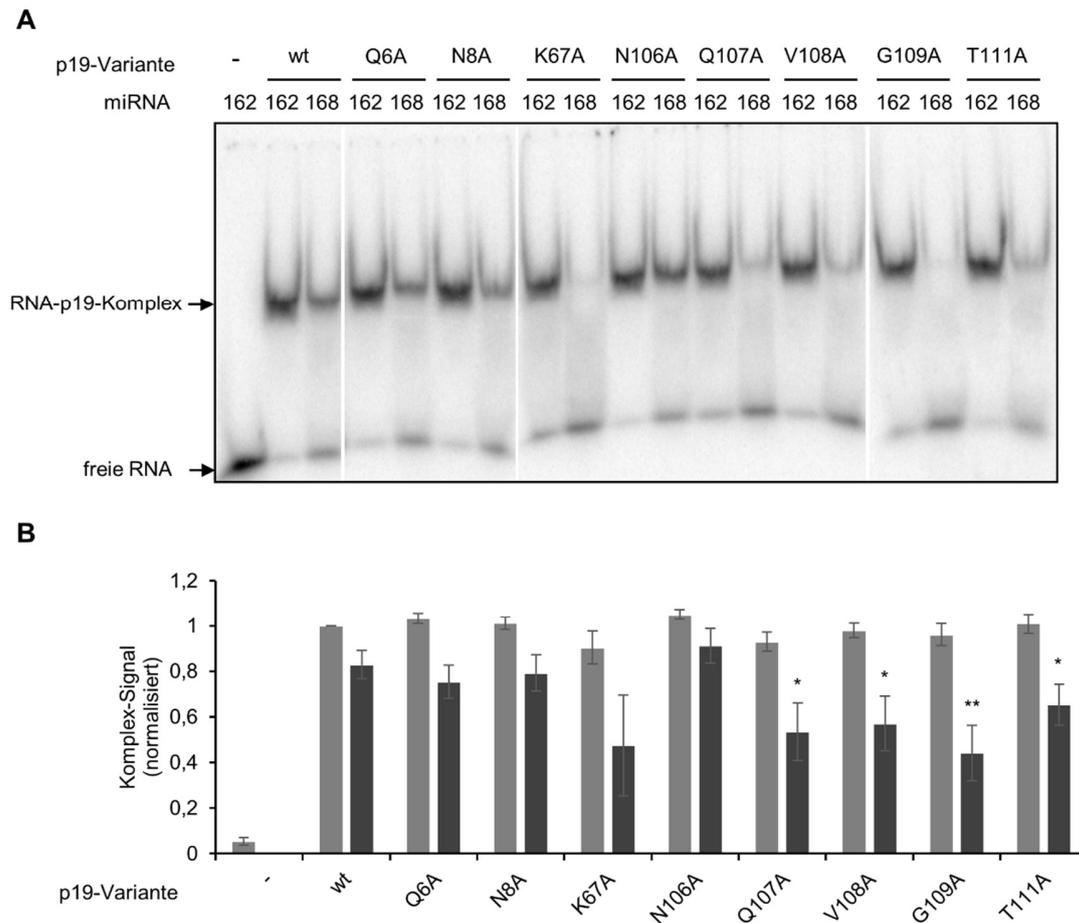


Abbildung 3.18: Bindung der p19-Alanin-Varianten an miR162 und miR168 im BYL *in vitro*. (A) Autoradiogramm eines EMSAs nach *in-vitro*-Translation der angezeigten p19-Varianten im BYL und Inkubation mit miR162/miR168; (B) Darstellung der normalisierten RNA-p19-Komplexsignale aus (A) nach drei unabhängigen Messungen. Das Signal ohne p19 stellt ein Hintergrundsignal dar. Das miR162-Signal bei *in vitro* translatiertem Wildtyp-p19 wurde dabei als Referenzsignal für die Normalisierungen verwendet. hellgrau: miR162-p19-Komplex-Signale; dunkelgrau: miR168-p19-Komplex-Signale; Fehlerbalken: Standardabweichungen; Sterne: Signifikante Änderungen des Komplex-Signals im Vergleich zum miR168-p19-Signal bei translatiertem Wildtyp-p19; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$.

Wie der Abbildung 3.18 (A) zu entnehmen ist, konnten Signale der Komplexe aus den miRNAs 162 und 168 (Konsensus-Strukturen aus 3.1.2) und *in vitro* translatierten p19-Varianten detektiert werden. Dabei traten jedoch sehr unterschiedliche Intensitäten der Komplex-Banden auf. So wurde im Vergleich zur miR168 ein wesentlich größerer Anteil der miR162 durch das Wildtyp-p19 komplexiert. Dieser Umstand reflektierte unterschiedlichen Signalstärken von miR162 und miR168 bei der Bindung an p19, welche bereits in Abschnitt 3.1.3 beschrieben wurden (siehe auch Abschnitt 7.2). Wie außerdem zu erkennen ist, zeigten auch die p19-Varianten miRNA-p19-Komplexe mit sehr unterschiedlichen Signalintensitäten. Der Anteil der komplexierten miR168

wurde teils stark verringert, zum Beispiel bei p19-G109A. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Affinitätsunterschiede dieser p19-Varianten bei Bindung an miR162 und miR168 durch die Alanin-Austausche nicht vermindert, sondern sogar verstärkt wurden. Da diese Signalstärken jedoch nicht identisch mit den Affinitäten der p19-Varianten zu den miRNAs sind, wurden diese Experimente lediglich als Indikator betrachtet und einige der Varianten für eine rekombinante Synthese, Reinigung und spätere Charakterisierung ausgewählt. Dies betraf die Varianten mit den Austauschen Q107A, V108A und G109A, mit signifikant erhöhten Unterschieden in der Komplexierung von miR162 und miR168. Die Variante T111A wurde trotz einer signifikant verminderten Fähigkeit miR168 zu binden nicht weiter untersucht, da das Threonin 111 bereits zuvor als Aminosäure mit Funktion in der miRNA-Differenzierung beschrieben wurde [163].

3.3.2.3 Biochemische Charakterisierung der p19-Varianten Q107A, V108A und G109A *in vitro*

Die im vorherigen Abschnitt ausgewählten p19-Varianten wurden wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben heterolog rekombinant synthetisiert und anschließend gereinigt. Die korrekte Faltung der Proteine konnte vor den Funktionsstudien mittels CD-Spektroskopie nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 7.7). Dabei wiesen die Spektren der Varianten V108A und G109A auf eine mit der Wildtyp-Variante vergleichbare Sekundärstruktur-Zusammensetzung hin, mit nur geringfügig gesteigerter Signalamplitude. Die Signalstärke des CD-Spektrums der Variante Q107A war jedoch deutlich geringer. Da sich allerdings nur die Amplitude und nicht die Form der Kurve von der Wildtyp-Variante unterschied, wurde eine ähnliche, aber nicht identische Zusammensetzung der Sekundärstrukturen ermittelt (siehe Abschnitt 7.7). Somit war anzunehmen, dass diese Proteinvariante (p19-Q107A) teilweise ungefaltet und damit inaktiv vorliegen könnte. Alle diese rekombinant synthetisierten p19-Varianten wurden im Folgenden für Bestimmungen der Bindungskonstanten (K_D -Werte, siehe 2.2.3.9.1) bei der Bindung an kleine RNAs eingesetzt. Dabei wurden die siRNA gf698 (Referenz), *At*miR162 und *At*miR168a (Konsensus-Strukturen aus 3.1.2) verwendet. Die Ergebnisse dieser Studien sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Tabelle 3.5: Dissoziationskonstanten verschiedener kleiner RNAs an die angezeigten *CIRV*-p19-Varianten; n. b.: Bindungskonstanten nicht bestimmbar, da in entsprechenden EMSA-Versuchen keine RNA-p19-Komplexbildung zu beobachten war.

sRNA	K _D -Wert (nM) bei Bindung an Wildtyp-p19	K _D -Wert (nM) bei Bindung an p19-Q107A	K _D -Wert (nM) bei Bindung an p19-V108A	K _D -Wert (nM) bei Bindung an p19-G109A
gf698 (siRNA)	0,06 ± 0,04	0,46 ± 0,30	0,23 ± 0,02	0,39 ± 0,18
AtmiR162	0,07 ± 0,03	1,52 ± 0,49	0,37 ± 0,08	0,38 ± 0,11
AtmiR168	2,29 ± 0,78	n.b. (≥ 500 nM)	n.b. (≥ 1.000 nM)	n.b. (≥ 500 nM)
relativer K_D von miR168¹	38,17	≥ 1.000	≥ 4.000	≥ 1.000
miR162-12*U/8*G	1,93 ± 0,13	-	n.b.	5,09 ± 1,73
miR168-Variante 2	0,71 ± 0,29	-	0,61 ± 0,11	0,57 ± 0,03

¹relativer K_D zu dem von gf698

Wie der Tabelle 3.5 zu entnehmen ist, waren alle p19-Varianten in der Lage die Referenz-siRNA (gf698) zu binden und wiesen bestimmbare Dissoziationskonstanten (K_D-Werte) auf. Dessen ungeachtet zeigte sich, dass durch jeden eingeführten Alanin-Austausch die Affinität des jeweiligen Proteins an die siRNA signifikant reduziert wurde. Dennoch verblieben die Affinitäten zur siRNA auf einem höherem Niveau (0,2 – 0,5 nM) als die des Wildtyp-p19 an die *AtmiR168a* (2,29 ± 0,8 nM). Da sich die weiteren Ergebnisse der p19-Varianten unterschieden, werden diese Varianten hier gesondert ausgewertet.

Das p19-Q107A zeigte, wie bereits erwähnt, eine erniedrigte Affinität (K_D-Wert: 0,46 ± 0,30 nM) zur siRNA gf698 im Vergleich zum Wildtyp-p19 (K_D-Wert: 0,06 ± 0,04 nM). Die *AtmiR162* wird mit einer noch niedrigeren Affinität (K_D-Wert: 1,52 ± 0,49 nM) an die p19-Variante gebunden. Diese p19-Variante zeigte sich also bezogen auf die Affinitäten zu kleinen RNAs allgemein weniger tolerant gegenüber Abweichungen des Watson-Crick-Paarungsmusters im RNA-Duplex-Molekül. Die Bindungskonstanten dieser Variante an die *miR168* konnten nicht bestimmt werden. Bei entsprechenden EMSA-Versuchen trat bis einschließlich 100 nM eingesetztes p19-Dimer keine für eine Konstantenbestimmung ausreichende Komplexbildung des Proteins mit der *AtmiR168a* auf. Bei höheren Konzentrationen ab 500 nM p19-Q107A wurde die Laufgeschwindigkeit der markierten RNA zudem so dramatisch reduziert, dass von der Bildung von Protein-RNA-Komplexen höherer Ordnung auszugehen ist (siehe Abschnitt 7.8). Ein entsprechender K_D-Wert kann lediglich geschätzt werden (≥ 500 nM). Das Verhältnis des Wertes dieser Konstante zu dem der Bindungskonstante der gf698 (0,46 ± 0,30 nM) konnte auf mindestens 1.000 abgeschätzt werden und lag damit deutlich höher als das gleiche Verhältnis beim Wildtyp-p19 (38,17). Dies weist auf einen deutlich größeren Unterschied in den freien Bindungsenthalpien, also auf eine

stärkere Diskriminierung dieser p19-Variante zwischen den kleinen RNAs hin. Da sich diese Variante jedoch allgemein weniger tolerant gegenüber Basenfehlpaarungen (wie in miR162) zeigte, wurde die stärkere Differenzierung der p19-Variante zwischen den miRNAs auf einen additiven Umstand zurückgeführt. Somit könnten Basenfehlpaarungen in der miR168-Struktur und G-U-*wobbles* gemeinsam die Affinität bei Bindung durch p19-Q107A verschlechtern.

Die p19-Varianten V108A und G109A wiesen jeweils ähnliche Bindungsprofile zu den miRNAs und zur gf698 auf. So zeigten die K_D -Werte für gf698 ($0,23 \pm 0,02$ nM bei V108A und $0,39 \pm 0,18$ nM bei G109A) und für *AtmiR162* ($0,37 \pm 0,08$ nM und $0,38 \pm 0,11$ nM) zwar eine allgemeine Erniedrigung der Affinität der jeweiligen Variante zu kleinen RNAs an. Jedoch interagierten diese p19-Varianten mit etwa gleich großen Affinitäten mit gf698 und *AtmiR162*. Bei Bindungsstudien mit *AtmiR168a* traten ähnliche Ergebnisse wie bei der p19-Variante Q107A ein (nicht gezeigt). Aufgrund des Auftretens von Protein-RNA-Komplexen höherer Ordnung konnten die K_D -Werte nicht exakt bestimmt, sondern lediglich abgeschätzt bzw. Minimalgrößen angegeben werden (siehe auch Tabelle 3.5). Dennoch ist auf Basis dieser Schätzungen festzustellen, dass die Verhältnisse der miR168- K_D -Werte zu denen von gf698 (≥ 1.000 bzw. ≥ 4.000) erhöht im Vergleich zum Wildtyp-p19 (38,17) vorlagen (Tabelle 3.5). Dies deutet auf größere Differenzen der freien Bindungsenthalpien der Komplexe und damit auf eine stärkere Differenzierung der p19-Varianten zwischen gf698 bzw. *AtmiR162* und *AtmiR168a* hin.

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob es sich bei der mit Hilfe der p19-Varianten ermittelten Aminosäureregion auch tatsächlich um die Komplementärregion für die miRNA-Unterscheidung anhand des G-U-*wobbles* 8/12 handelt. Dazu wurden die p19-Varianten V108A und G109A Bindungsstudien mit den miRNA-Varianten miR162-12*U/8*G (miR162 mit eingefügtem G-U-*wobble*) und miR168-Variante 2 (miR168-Variante mit fehlendem G-U-*wobble* auf Position 8/12; siehe auch Abbildung 3.15 (A)) unterzogen. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden zum Vergleich ebenso in Tabelle 3.5 dargestellt. Bei beiden p19-Varianten führte das Fehlen des *wobbles* in der miR168-Struktur zu einer Wiederherstellung der mit einer siRNA vergleichbaren Affinität. Jedoch unterscheiden sich die Ergebnisse bei miR162-12*U/8*G. Bei p19-V108A führt das Einführen des G-U-*wobbles* an der Basenpaarposition 8/12 zu einer Erhöhung der K_D -Werte bis in den nicht bestimmbar Bereich der Wildtyp-miR168. Anders stellt sich die Situation bei p19-G109A dar. Dieses Protein bindet die miR162-Variante mit einer noch deutlich messbaren Affinität (K_D -Wert: $5,09 \pm 1,73$ nM). Dies weist darauf hin, dass bei dieser p19-Variante zusätzlich zum *wobble* auch andere Eigenschaften der miRNA einen Einfluss auf die Bindungskonstante haben könnten, Dies könnten Unterschiede in der näheren Nukleotid-Sequenzumgebung der Position 8/12 sein, welche bisher im Rahmen dieses Projektes als irrelevant angesehen wurden.

Es kann also vermutet werden, dass sich bei p19-G109A auch molekulare Mechanismen der miRNA-Differenzierung im Vergleich zum Wildtyp verändert haben.

Aus den Ergebnissen der biochemischen Charakterisierungen der p19-Varianten Q107A, V108A und G109A kann folgendes zusammengefasst werden: Alle untersuchten p19-Varianten wiesen starke Unterschiede in den Affinitäten bei der Bindung an miR162 und miR168 auf. Diese Unterschiede waren deutlich ausgeprägter als beim Wildtyp-p19. Die Variante Q107A zeigte jedoch zusätzlich auch eine deutlich verminderte Affinität bei der Bindung an miR162 im Vergleich zur Referenz-siRNA. Dies wies auf eine allgemeine geringere Toleranz gegenüber anderen Abweichungen vom Watson-Crick-Paarungsmusters im miRNA-Duplex-Molekül bei der Bindung an kleine RNAs hin. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die starken Unterschiede zwischen den Affinitäten bei Bindung an miR162 und miR168 vollständig (Variante V108A) oder in großem Maße (Variante G109A) vom G-U-*wobble* an Position 8/12 abhängig war. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei der Aminosäureregion 108-109 tatsächlich um eine Region zur Differenzierung des CIRV-p19 zwischen verschiedenen miRNAs anhand des beschriebenen *wobbles* handelt.

Es ist auffällig, dass die ermittelte Komplementärregion in der Primärstruktur des CIRV-p19 für die Differenzierung zwischen sRNAs anhand des G-U-*wobbles* Aminosäuren betrifft, welche in verschiedenen p19-Orthologen hoch konserviert vorliegen [178]. Für die ebenso in Abschnitt 3.3.2.1 ausgewählten Aminosäuren N8 oder N106 gilt dies nicht, sie sind hypervariabel. Dies macht es wahrscheinlich, dass nahezu alle p19-Orthologe der Tombusviren ähnliche Unterschiede in den Affinitäten zwischen miR162 und miR168 aufweisen.

3.4 Weiterführende Studien

In den vorherigen Abschnitten wurde die Bindung von CIRV-p19 an verschiedene microRNAs untersucht. Dafür wurden die unterschiedlichen Affinitäten an ausgewählte microRNAs charakterisiert, deren Bedeutung für das PTGS aufgezeigt und molekulare Determinanten für eine Differenzierung zwischen miRNAs identifiziert. Dabei wurde insbesondere das G-U-*wobble* auf Position 8/12 mit Hilfe einer miRNA (miR162) als Determinante für eine Verminderung der Affinität einer sRNA an p19 bestimmt. Mit Hilfe der zweiten miRNA (miR168) wurde diese Determinante bestätigt und andere Abweichungen des Watson-Crick-Paarungsmusters in sRNA-Doppelsträngen wie die an Position 7/13 ausgeschlossen. Nun stellte sich die Frage, ob das G-

Diese RNA-Duplex-Moleküle wurden 5'-markiert und hybridisiert und anschließend auf ihre Bindungsaffinität zu CIRV-p19 untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6: Dissoziationskonstanten der miR6149-Isoformen an CIRV-p19; n. b.: Bindungskonstanten nicht bestimmbar.

miRNA	K _D -Wert bei Bindung an CIRV-p19 (nM)
NbmiR6149	n.b.
NtmiR6149a	9,83 ± 5,88
NtmiR6149b	5,39 ± 0,43

Die *N. tabacum*-Isoformen der miR6149 zeigten im Vergleich zu vorherigen Versuchen (ca. 0,1 nM bei hochaffiner Bindung; siehe auch Abschnitte 3.1.3 und 3.3.1) hohe Dissoziationskonstanten (ca. 5-10 nM) an CIRV-p19. Diese können mit den *wobbles* erklärt werden, welche benachbart auf den Positionen 13^{+/7*} und 14^{+/6*} liegen. Die Auswirkungen benachbarter G-U-Paarungen konnten im Verlaufe dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden. Zusätzlich konnte bei Einsatz der *N. benthamiana*-Isoform in den durchgeführten EMSA-Versuchen keine Komplexbildung mit CIRV-p19 beobachtet werden. Der Unterschied zu den *N. tabacum*-Isoformen kann mit der Anwesenheit des G-U-*wobbles* auf der Position 8^{+/12*} erklärt werden. Dass die miR6149-Isoformen aus *N. tabacum* entgegen der hier gemessenen, geringen Affinitäten in der Immunpräzipitation aus dem BYL durch CIRV-p19 angereichert werden konnten, ist demnach nicht mit den Affinitäten dieser Isoformen an das Protein zu erklären. Stattdessen könnte es andere, noch nicht annotierte Isoformen dieser erst 2012 beschriebenen [204] miRNA geben, deren Sequenzen nach der IP den bereits annotierten Isoformen zugeordnet wurden.

Insgesamt konnten die Ergebnisse dieses Abschnittes das im Verlauf der vorliegenden Arbeit ermittelte G-U-*wobble* als allgemeine Determinante für die Differenzierung von miRNAs durch CIRV-p19 bestätigen. Gleichzeitig wurde auch deutlich, dass die Betrachtung von Anreicherungen oder Abreicherungen von miRNA-Sequenzen in IP-Versuchen nicht ausreichend ist für eine Beurteilung, ob eine bestimmte miRNA im Zuge einer viralen Infektion relevant mit p19 interagiert und die entsprechende Expressionsregulation gestört wird. Dies müsste, wie am Beispiel der miR162, der miR168 und der miR403 in dieser Arbeit geschehen, durch eine gezielte Untersuchung der miRNA und ihrer Zielsequenzen während einer viralen Infektion erfolgen.

4. Diskussion

Virale Infektionen von Pflanzen rufen, wie auch bei anderen Organismen, vielfältige Krankheitsbilder und Schädigungen hervor. Vor allem bei Kulturpflanzen können beträchtliche ökonomische Schäden durch Schädigungen im Wuchs, den Früchten oder der Entwicklung der Wirtspflanzen entstehen. Daher rührt ein großes Interesse am Schutz der Pflanzen vor viralen Infektionen und an der Erforschung der pflanzlichen Immunantwort. Phytoviren wie die Tombusviren modifizieren zahlreiche zelluläre Prozesse, um die eigene Vermehrung intrazellulär zu ermöglichen, zu schützen und zu verstärken. Die vorliegende Arbeit soll im Grundsatz dazu beitragen diese Modulationen durch virale Proteine während einer Infektion besser verstehen zu können.

Als Gegenmaßnahme zum antiviralen RNA-*silencing* entwickelten viele Phytoviren virale Suppressoren des RNA-*silencings* (VSRs). Diese unterscheiden sich dabei in Struktur und oft in Funktion je nach Virus völlig, haben jedoch die effektive Inhibierung der antiviralen Immunantwort gemein. Gut untersucht ist dabei das p19-Protein der Tombusviren, welches durch Sequestrierung von siRNAs deren Inkorporation in RISCs inhibiert [156,158,160]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der RNA-Duplex-Moleküle könnte es jedoch auch microRNAs binden und sequestrieren [192].

4.1 P19 moduliert miRNA-Aktivitäten während viraler Infektionen von Pflanzen

Das miRNA-vermittelte RNA-*silencing* stellt eine in Eukaryoten weit verbreitete Form des PTGS dar [10]. Dabei überlappt es durch gemeinsam genutzte Komponenten oder Ähnlichkeiten in den Funktionsweisen mit dem antiviralen RNA-*silencing*, ist jedoch nicht damit identisch. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten könnte das miRNA-vermittelte RNA-*silencing* anfällig für eine Inhibition durch VSRs sein. Bereits im Vorfeld dieser Arbeit ließen die Studienergebnisse anderer Autoren die Vermutung zu, dass p19, der VSR der Tombusviren, mit miRNA-vermittelten *silencing*-Prozessen interferiert [183,185–187]. Dabei wurden diese Proteine zumeist in transgenen *A. thaliana* oder *N. benthamiana* produziert. Versuche dieser Art weisen den Nachteil auf, dass hier intrazellulär hohe Konzentrationen des Proteins auf eher geringe Mengen an miRNAs und anderen kleinen RNAs

treffen. Dadurch könnten miRNA-vermittelte RISC-Aktivitäten selbst dann inhibiert durch p19 werden, wenn die entsprechende miRNA im Zuge einer Infektion durch Tombusviren aufgrund einer zu geringen Affinität nicht durch diesen VSR sequestriert werden würde. Während einer viralen Infektion einer Pflanze wie *N. benthamiana* ist die intrazelluläre Situation komplexer. So liegen zu Beginn geringe Mengen an viralen siRNAs vor. Zu späteren Phasen der Infektionen (ab 4 dpi) hingegen steigen die Mengen an neu entstandenen vsiRNAs an (siehe [130] und Abschnitt 7.3). Da die Hauptfunktion von p19 in der Sequestrierung dieser siRNAs liegt, wären zusätzliche Interaktionen mit miRNAs zu diesen späten Infektionsphasen nur noch eingeschränkt möglich. Studienergebnisse von Kontra und Kollegen (2016) bestätigten, dass p19 miRNAs im Zuge viraler Infektionen von *N. benthamiana* weitaus weniger effizient als in transgenen Pflanzen sequestriert (virale Infektionen länger als 4 dpi; [192]). Mögliche Interaktionen von p19 mit miRNA-Aktivitäten von biologischer Relevanz sind also in früheren Phasen pflanzlicher Infektionen durch Tombusviren wahrscheinlich. Eine zusätzliche Schwierigkeit bei Untersuchungen viraler Infektionen nach 4 dpi und später besteht darin, dass einsetzende Veränderungen auf Transkriptionsebene wie beispielsweise die Stimulation der *AGO1*-mRNA-Transkription mögliche Veränderungen auf posttranskriptioneller Ebene überlagern könnten [191]. Im Allgemeinen wurden die Affinitäten von p19 zu allen miRNAs zudem als niedriger angenommen als die an siRNAs. So wurde *in vivo* in Einzelfällen wie für miR171 oder miR168 gezeigt, dass diese miRNAs nicht oder nur schwach mit p19 assoziieren [181]. Ziel dieser Arbeit war es ein umfassenderes Bild über Interaktionen von p19 mit miRNAs zu gewinnen und diese im biologischen Kontext der Frühphasen viraler Infektionen zu betrachten. Dafür wurde das erste Mal eine systematische *in-vitro*-Studie mit einer *in-vivo*-Studie unter normalen, nicht transgenen Bedingungen kombiniert.

In vitro konnte auf das BY-2-Lysat (BYL) zurückgegriffen werden, welches neben miRNA-vermittelten RISC-Aktivitäten [37] auch die Aktivität des *CIRV*-p19 [91] darstellen kann und sich damit als System zur Untersuchung der p19-miRNA-Interaktionen eignet. *In vivo* wurde das bereits etablierte *Cymbidium ringspot virus-N. benthamiana*-System verwendet, welches zudem den Einsatz einer replizierenden, p19-defizienten Variante des *CymRSV* (*Cym19stop*) ermöglichte [172–174]. Dank diesen Systemen kann eine Einordnung der hier gewonnenen Erkenntnisse in den Kontext von Publikationen anderer Autoren vorgenommen werden.

Neben anderen Untersuchungen musste zunächst bewertet werden, ob Interaktionen von p19 mit miRNAs während viraler Infektionen von Pflanzen überhaupt hinreichend stark sein könnten, um wirkungsvoll in das pflanzliche PTGS eingreifen zu können. Mit Hilfe einer Immunpräzipitation (IP) mit kommerziell erhältlichem *CIRV*-p19 und Gesamt-RNA aus dem BYL konnte gezeigt werden,

dass einige miRNAs stärker mit p19 assoziierten und andere nur schwache Interaktionen zeigten (siehe Abbildung 3.1). Dadurch wurde deutlich, dass Studien zu Interaktionen von p19 mit einzelnen miRNAs zu stark unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Eine damit angedeutete unterschiedliche (differentielle) Bindung von p19 an verschiedene miRNAs ist bisher nicht untersucht worden und wird in den folgenden Abschnitten diskutiert. Zudem konnte so eine Vorauswahl getroffen werden, welche miRNAs für eine nähere Untersuchung mit p19 infrage kamen. Die für die folgenden Studien ausgewählte miRNA 162 (miR162) lag nach der IP angereichert vor. Alle Isoformen dieser miRNA assoziierten mit rekombinant synthetisiertem CIRV-p19 mit einer Affinität, welche der einer siRNA gleichkam. Es konnte zudem gezeigt werden, dass mit Hilfe dieser miRNA und *in vitro* translatiertem AGO1 spezifische RISC-Aktivitäten rekonstituiert werden konnten, welche durch Einsatz von CIRV-p19 effektiv inhibiert wurden (siehe Abschnitt 3.2.1). Im Anschluss wurde nachgewiesen, dass während viraler Infektionen von *N. benthamiana*-Pflanzen p19 mit miR162 interagiert und die *DCL1*-mRNA (die Ziel-RNA der miR162) eine erhöhte Abundanz aufwies. Dies war bereits nach 2 dpi und damit vor Auftreten größerer Mengen an vsRNAs nachweisbar. Damit konnte gezeigt werden, dass das tombusvirale p19-Protein während einer viralen Infektion einer Pflanze mit dem miRNA-vermittelten RNA-*silencing* interferiert und dies einen vermutlich biologisch relevanten Einfluss auf den pflanzlichen Metabolismus darstellt. Dies steht entgegen der Ergebnisse zur p19-Interaktionen mit einzelnen miRNAs wie miR171 und miR168, welche nur schwach mit dem VSR interagierten [181]. Es geschieht zudem zeitlich vor der direkten Beeinflussung des antiviralen RNA-*silencings* durch siRNA-Sequestrierung und dem Ausbilden infektionsbegleitender Symptome der Pflanzen. Es konnte damit auch gezeigt werden, dass mit dem kombinierten experimentellen Ansatz aus systematischer *in-vitro*- und *in-vivo*-Studie der Einfluss des VSRs auf einzelne miRNA-vermittelte PTGS-Mechanismen untersucht und beurteilt werden kann.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren, welche bei p19-Synthese in transgenen Pflanzen die Ausbildung von Symptomen viraler Infektionen mit Störungen bei der Expression miRNA-regulierter Gene in Verbindung bringen [185,189]. Dennoch kann angenommen werden, dass die miRNA-Sequestrierung durch p19 eher der Modulation der antiviralen Immunantwort (siehe folgende Abschnitte) infizierter Pflanzen dient. Zukünftige Studien zur Beeinflussung des antiviralen RNA-*silencings* durch p19 sollten also die Beeinflussung von miRNA-Aktivitäten mit einschließen. Eine offene Frage ist, inwieweit VSRs anderer Viren ebenso in der Lage sind, in frühen Phasen viraler Infektionen mit miRNA-Aktivitäten zu interferieren. Im Folgenden werden die Unterschiede der Interaktionen der miRNAs 162, 168 und 403 mit p19 diskutiert.

4.2 P19 reguliert miRNA-Aktivitäten durch eine differentielle Bindung unterschiedlich

Neben der Überlappung von miRNA-vermitteltem PTGS und der antiviralen Immunantwort durch gemeinsam genutzte Komponenten besteht noch eine weitere Verbindung dieser RNA-*silencing*-Formen. So befinden sich einige Komponenten des RNA-*silencings* selbst unter regulatorischer Kontrolle durch miRNAs. Martinez de Alba und Kollegen konnten dementsprechend bereits 2011 zeigen, dass Mutationen in *Arabidopsis thaliana*, welche eine spezifische Störung des miRNA-vermittelten PTGS zur Folge hatten (z.B. Mutationen in *Dcl1*, *Se*, *Hst* und *Hyl1*), zu einem effizienteren siRNA-vermittelten RNA-*silencing* von exogener RNA führten [132]. Daher ist anzunehmen, dass ein gezielter Einfluss eines VSRs wie p19 auf das miRNA-vermittelte PTGS auch eine Wirkung auf das antivirale Immunsystem der Pflanze aufweist. Die Auswirkung muss jedoch nicht für alle miRNAs gleichartig sein. So sollten miRNAs, welche die Abundanz antiviraler Komponenten negativ regulieren (beipielsweise AGO-regulierende miRNAs), für Phytoviren vorteilhafte Aktivitäten aufweisen. MiRNAs wie miR162 müssten jedoch eine gegenteilige Rolle einnehmen (siehe auch Abschnitt 1.1.4 und nachfolgend im Abschnitt). Eine biologische Bedeutung der VSR-miRNA-Interaktionen kann also je nach miRNA verschieden sein.

In der in Abschnitt 3.1 beschriebenen IP wurden durch Anreicherungen und Abreicherungen einiger miRNAs Hinweise erhalten, dass miRNAs in der Tat sehr unterschiedliche Affinitäten zu p19 aufweisen könnten. Aus den Daten der IP wurden neben der bereits beschriebenen miR162 als angereicherte miRNA auch miR168 als miRNA mit erniedrigter Abundanz für weitere Untersuchungen ausgewählt. Beide miRNAs weisen Zielsequenzen von Bedeutung für die antivirale Immunantwort der Pflanze auf [32,51,81,82,132]. Dabei stellt miR162 einen Regulator der proviralen *DCL1*-Expression dar und weist entsprechend eine antivirale Rolle im Kontext einer viralen Infektion einer Pflanze auf. MiR168 hingegen inhibiert die antivirale *AGO1*-Expression und stellt somit eine provirale Komponente dar. Zusätzlich wurde entschieden miR403 in die Studien einzubeziehen. Diese miRNA konnte in der IP nicht detektiert werden, da für *N. tabacum* zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine annotierten Sequenzen der miR403-*precursor*-Moleküle vorlagen. Aufgrund ihrer Regulation der Translation des antiviral-wirkenden AGO2-Proteins [89] (und des nah verwandten AGO3) war für miR403 eine ähnliche Rolle wie für miR168 anzunehmen. Mit Auswahl dieser sRNAs wurde ein Modellsystem kreiert, anhand dessen der Einfluss der Bindung von p19 an miRNAs auch mit Hinblick auf die Suppression der antiviralen Immunantwort

untersucht werden konnte. Dafür wurde die bereits beschriebene Kombination aus systematischer *in-vitro*-Studie mit einer *in-vivo*-Studie unter normalen, nicht transgenen Bedingungen eingesetzt.

4.2.1 P19 zeigt unterschiedliche Affinitäten bei Bindung an miR162, miR168 und miR403

Nach der rekombinanten Produktion und Reinigung von *CIRV*-p19 konnte dieses Protein *in vitro* für Messungen zu Bindungsaffinitäten eingesetzt werden. Während alle miR162-Isoformen und die miR403-Isoformen aus *N. benthamiana* mit einer ebenso hohen Affinität wie die Referenz-siRNA durch p19 gebunden wurden, waren die K_D -Werte für alle miR168-Isoformen und die miR403-Isoform aus *A. thaliana* signifikant höher. Für *At*miR403 konnte dies damit begründet werden, dass diese Isoform im *-Strang um ein Nukleotid länger ist als im (+)-Strang (siehe Abbildung 3.2). Dadurch ergibt sich ein *bulge* in der Duplex-Struktur, welche durch eine daraus folgende Krümmung nicht mehr optimal durch p19 zu binden wäre. Die im Vergleich zur siRNA erniedrigte Affinität der miR168-Isoformen an p19 konnte nicht durch so eine Abweichung in der Form des RNA-Duplex-Moleküls erklärt werden. Als wahrscheinlichste Begründung für die hohen K_D -Werte wurden spezifische Abweichungen im Watson-Crick-Basenpaarmuster im doppelsträngigen Bereich der RNA-Duplex-Moleküle angenommen und später weitergehend untersucht. Zusätzlich wurden Bindestudien in Präsenz einer weiteren, kompetitierenden sRNA durchgeführt. Dies geschah aus zwei Gründen: Erstens können die, aus den direkten Bindestudien erhaltenen, Bindekonstanten bei komplexeren Bindemodi des Proteins durch andere Teilschritte der Komplexbildung beeinflusst werden. Dabei setzt sich der beobachtete Übergang zum Komplex nicht nur aus Assoziation und Dissoziation von Protein und RNA zusammen (sondern z.B. durch eine noch zu erfolgende Protein-Dimerisierung). Zweitens stellt diese experimentelle Situation den intrazellulären Zustand am Anfang einer viralen Infektion besser nach. Hier konkurrieren verschiedene endogene, kleine RNAs (z.B. microRNAs) um die Bindung an kleinere Mengen des p19-Proteins. In diesen Experimenten konnte die Fähigkeit des *CIRV*-p19, zwischen miRNAs mittels einer bevorzugten Bindung von miR162 gegenüber miR168 und *At*miR403 zu differenzieren, bestätigt werden. Da sich die Ergebnisse aus den direkten Messungen und denen mit kompetitiver RNA nicht unterschieden, wurden für spätere Untersuchungen der Bindung kleiner RNAs an p19 lediglich direkte Bestimmungen der K_D -Werte durchgeführt.

4.2.2 P19 beeinflusst *in vitro* die Aktivitäten von miR162, miR168 und miR403 unterschiedlich

Um den Einfluss von p19 auf verschiedene miRNA-vermittelte Mechanismen des PTGS *in vitro* zu untersuchen, wurden im BY-2-Lysat (BYL) Experimente durchgeführt, in denen RISC-Aktivitäten dargestellt werden konnten: Luziferase-Reporterexperimente und *cleavage*-Assays. Bei beiden experimentellen Ansätzen wurden zunächst NbAGO1-1L-miRNA-RISCs *in vitro* rekonstituiert und mit Hilfe einer Ziel-RNA die resultierende Aktivität ausgelesen. Bei den Luziferase-Reporterversuchen konnte nicht abgelesen werden, ob die rekonstituierte RISC-Aktivität auf endonukleolytischer Spaltung der Ziel-RNA oder auf einer *slicer*-unabhängigen Translationsinhibition beruht. Es standen hier keine Informationen über den Zustand der Reporter-mRNA zur Verfügung sondern lediglich über die Menge des entstandenen Translationsproduktes. Bei *cleavage*-Assays wurden ausschließlich *slicer*-Aktivitäten nachgewiesen.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass sämtliche eingesetzten miRNAs im BYL in beiden experimentellen Ansätzen RISC-Aktivitäten vermitteln können (siehe Abbildungen 3.6 und 3.8). Unabhängig von den für diese Studie relevanten Erkenntnissen konnte festgestellt werden, dass insbesondere miR168 im Gegensatz zu miR162 oder den *N. benthamiana*-Isoformen von miR403 keine effektive endonukleolytische RISC-Aktivität vermittelte jedoch eine effektive Translationsinhibition der Luziferase-Reporter. Es ist also anzunehmen, dass ein beträchtlicher Anteil der miR168-vermittelten AGO/RISC-Aktivität auf *slicer*-unabhängiger Translationsinhibition beruht. Dies steht in Einklang mit früheren Veröffentlichungen [130], nach denen bei erhöhter miR168-Aktivität im Zuge viraler Infektionen auch größere Mengen intakter AGO1-mRNA vorlagen, jedoch keine erhöhten Proteinmengen. Ein weiterer von der Untersuchung des p19-Proteins unabhängiger Befund ist, dass alle AGO/RISC-Komplexe mit inkorporierten miR403-Isoformen die Translation der jeweiligen Reporter-mRNA vergleichsweise ineffektiv inhibierten, jedoch die NbmiR403a im *cleavage*-Assay nach ihrer Inkorporation in NbAGO1-1L eine sehr effektive endonukleolytische RISC-Aktivität zur Folge hatte. Als wahrscheinlichste Begründung für diesen scheinbaren Widerspruch wurde die Konstruktion der Reporter-RNA für miR403 angesehen (siehe Abbildung 3.6 (B)). Bei dieser wurde, im Gegensatz zu den anderen Reporter-mRNAs, die 3'-untranslatierte-Region (3'-UTR) der AGO2-mRNA aus *N. benthamiana* stromabwärts (3') vom Luziferase-ORF eingeführt, da die UTR die miR403-Zielsequenz enthält. Iwakawa und Tomari beschrieben bereits 2013, dass die Effektivität von miRNA-Zielsequenzen im BYL auch von deren Position innerhalb einer mRNA abhängt. MiRNA-Bindestellen im 3'-Bereich von mRNAs führen demnach in Pflanzen zu eher ineffektiven Translationsinhibitionen

[37]. Offensichtlich kann selbst eine ausgeprägte *slicer*-Aktivität wie bei *NbmiR403* nicht zu einer effektiven Translationsinhibition führen, wenn die miRNA-Zielsequenz in der 3'-UTR der mRNA lokalisiert ist. Vergleiche zum Einfluss des *CIRV*-p19 auf die miR403-vermittelte RISC-Aktivität in Luziferase-Reporterexperimenten sind also lediglich bei Verwendung derselben Reporter-mRNA und verschiedener miR403-Isoformen zielführend. Vergleiche mit anderen miRNAs erscheinen dabei nicht sinnvoll.

Bei Einsatz von *CIRV*-p19 konnte in beiden Experimenten gezeigt werden, dass der VSR die miRNA-vermittelten RISC-Aktivitäten entsprechend der Affinitäten an die jeweiligen miRNAs inhibiert. Dabei wurde als Standardkonzentration des VSRs mit 0,1 μM eine Konzentration festgelegt, welche nur geringfügig höher als die der jeweils zugeführten miRNA war (Einsatz von zusätzlichen Konzentrationen in den Abbildungen gekennzeichnet). Da beide Konzentrationen in jedem Fall mindestens 50-fach höher als die K_D -Werte von p19 an die jeweilige miRNA waren und die Menge endogener miRNAs im BYL sehr viel kleiner war als die Menge exogener sRNAs, war theoretisch eine vollständige Sequestrierung der jeweiligen kleinen RNA durch p19 im BYL möglich. Die Reaktionsbedingungen waren also so gewählt, dass RISC-Aktivitäten durch p19 nur dann nicht inhibiert werden sollten, wenn die Tendenz der miRNA zur AGO-Inkorporation deutlich stärker ausgeprägt vorliegt. Dann würde p19 diese miRNA vermutlich auch *in vivo* nicht effektiv sequestrieren können. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die *in-vitro*-Experimente im BYL ausschließlich AGO1/RISC-Aktivitäten darstellten. Zukünftig könnten Experimente dieser Art auch andere AGO-Proteine, welche *in vivo* miRNAs inkorporieren, umfassen.

4.2.3 p19 zeigt eine differentielle Beeinflussung der Aktivitäten von miR162, miR168 und miR403 *in vivo*

Zur Untersuchung der biologischen Relevanz der unterschiedlichen (differentiellen) Bindung von p19 an die drei miRNAs wurde das bereits etablierte *CymRSV-N. benthamiana*-System genutzt (siehe Abschnitt 3.2.2). Zu beachten ist allerdings, dass es sich bei *CymRSV* zwar um ein Tombusvirus wie *CIRV* handelt, diese jedoch nicht identisch sind. Da es bisher keine Hinweise auf grundsätzliche Unterschiede dieser Viren hinsichtlich Infektionen von *N. benthamiana* gibt und aufgrund der Ähnlichkeiten der Primärstrukturen der p19-Proteine – die in Abschnitt 3.3.2 herausgearbeitete Aminosäureregion mit Funktion bei der miRNA-Differenzierung ist nahezu identisch – wurde angenommen, dass die Ergebnisse der Infektionsexperimente mit denen *in vitro* korrelierbar sind.

RNA-Proben wurden zunächst 2 dpi entnommen. Durch dieses Vorgehen wurde eine frühe Phase viraler Infektionen von Pflanzen zur Untersuchung ausgewählt. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden miRNAs 162 und 403, welche bereits *in vitro* durch CIRV-p19 hochaffin gebunden wurden, im Vergleich der drei miRNAs auch *in vivo* mit dem p19-Protein am stärksten interagierten. Zusätzlich fiel eine Erhöhung der Abundanz der Zielsequenzen der miRNAs 162 und 403 auf (jeweils die *DCL1*-mRNA und die *AGO2*-mRNA) jedoch nicht der der miR168-Zielsequenz (*AGO1*-mRNA) bei Einsatz der p19 exprimierenden Virus-Varianten auf. Zwar kann eine Veränderung der gemessenen Transkript-Mengen durch eine Steigerung der jeweiligen Transkription nicht ausgeschlossen werden. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die, durch *CymRSV* ausgelöste, Steigerung der *Ago1*-Transkription zu diesem Zeitpunkt der Infektion auch noch nicht stattfindet [131]. Da die miR168-vermittelte RISC-Aktivität *in vitro* nicht hauptsächlich auf einer endonukleolytischen Aktivität beruhte (siehe Abbildungen 3.6 und 3.8), konnte aus dieser konstanten mRNA-Menge jedoch nicht zweifelsfrei auf die noch verbleibende miR168-Aktivität geschlossen werden. Jedoch belegte eine Immundetektion konstante Mengen von AGO1 in beiden infizierten Pflanzengruppen (siehe Abschnitt 7.3). Eine Mengenbestimmung von *NbDCL1* und *NbAGO2* wäre zur endgültigen Bestätigung der Ergebnisse sinnvoll.

4 dpi konnte die differentielle Bindung von p19 an miR162, miR168 und miR403 ebenso nachgewiesen werden, jedoch nicht mehr damit verbundene unterschiedliche miRNA-vermittelte RISC-Aktivitäten. Eine eintretende Akkumulation der *AGO1*-mRNA bei *CymRSV*-Infektion (siehe Abbildung 3.11) wurde auf eine Akkumulation der mRNA von *NbAGO1-1H* zurückgeführt [131]. Aufgrund dieser beschriebenen Akkumulation von mRNA-Mengen (vermutlich zurückgehend auf eine gesteigerte Transkription) konnten auch die Anstiege der mRNA-Mengen der *DCL1*- und *AGO2*-mRNAs nicht eindeutig auf ein Bindungsereignis der betreffenden miRNAs mit p19 zurückgeführt werden. Es ist möglich, dass sich nach 4 dpi Transkriptions-Induktion und miRNA-Inaktivierung addieren und beide Effekte Erhöhungen der Abundanzen der Ziel-mRNAs bewirken.

Die Erkenntnis der differentiellen Bindung von miRNAs durch den VSR p19 und die damit verbundene selektive Beeinflussung der Expressionen der Ziel-RNAs wirft die Frage auf, welche Funktion diese Eigenschaft für das Virus erfüllt. Dass beispielsweise die antivirale miR162 deutlich stärker in ihrer Aktivität beeinflusst wird als die provirale miR168, lässt die Vermutung zu, dass eine gezielte Modulation der antiviralen Immunantwort durch die differentielle Bindung erreicht wird (Näheres dazu in Abschnitt 4.4). Um dies einschätzen zu können, ist zunächst ein noch umfassenderes Bild der Gesamtheit, welche miRNAs *in vivo* hochaffin mit p19 interagieren und welche nicht, sinnvoll. Durch den Fokus auf spätere Zeitpunkte viraler Infektionen durch andere

Autoren konnten Untersuchungen dazu bisher nicht erstellt werden. Für solche Studien könnten prinzipiell IP-Daten herangezogen werden, um im Allgemeinen Bindungsmuster des VSRs an miRNAs zu ermitteln. Andererseits könnten molekulare Determinanten, anhand derer die Affinität von kleinen RNAs an p19 bestimmt wird, ermittelt werden (siehe auch Abschnitt 4.3). Wird als Zielstellung der differentiellen Bindung von p19 an miRNAs die Modulation der antiviralen Immunantwort angenommen, könnten zukünftig auch neue Komponenten der Immunantwort (z.B. noch unbekannte RISC-Faktoren oder Faktoren für die *pamp triggered immune response* - PTI) ermittelt werden. Dafür könnten besonders hochaffin oder niedrigaffin an p19 bindende miRNAs und deren Zielsequenzen analysiert werden. Deren Expressionsprodukte könnten dann auf ihre Bedeutung für das pflanzliche Immunsystem untersucht werden.

Eine weitere Frage, die sich aus der Erkenntnis der differentiellen Bindung von p19 an sRNAs ergibt, ist die nach der Bedeutung und Verbreitung dieser Eigenschaft bei anderen Phytoviren. So konnte parallel zum gezeigten Projekt für das 2b-Protein des *Tomato aspermy virus* (TAV) ein ähnliches differentielles Bindungsmuster an miRNAs nachgewiesen werden wie für das tombusvirale p19-Protein [205]. Dabei handelt es sich um einen VSR, welcher keinerlei Homologie mit dem p19-Protein aufweist. Dennoch ist die Hauptfunktion dieses Proteins die Sequestrierung von vsRNAs während viraler Infektionen und damit die Inhibition des antiviralen RNA-silencings [206], jedoch mit völlig anderem Bindungsmodus als p19 [205]. Auch das 2b-Protein zeigt dabei Affinitäten zu den miR162-Isoformen, welche in etwa genauso hoch wie die an siRNAs sind. Ebenso werden alle miR168-Isoformen mit deutlich niedrigerer Affinität gebunden. Die miR403-Isoformen jedoch interagieren allesamt hochaffin mit dem VSR. Aufgrund der offensichtlichen Parallelen im Bindungsverhalten an miRNAs kann angenommen werden, dass es sich bei der Eigenschaft der differentiellen Bindung um eine verbreitete Eigenschaft von biologischer Bedeutung für mehrere Viren handelt. Jedoch stehen Untersuchungen zu Beeinflussungen der miRNA-vermittelten RISC-Aktivitäten während viraler Infektionen von TAV-Wirtsorganismen noch aus. Ebenso könnten weitere Untersuchungen zur Verbreitung und Bedeutung der differentiellen Bindung an miRNAs bei anderen Phytoviren zukünftig erfolgen.

4.3 Der molekulare Mechanismus der miRNA-Differenzierung von CIRV-p19

In Pflanzen werden die Expressionen einer Vielzahl von Genen durch unterschiedliche miRNAs und andere kleine RNAs reguliert. Prinzipiell wird dabei unterschieden in evolutionär ältere und von der Sequenz her konservierte miRNA-Familien mit großer, spezieübergreifender Verbreitung und in deutlich variabelere, weniger weit verbreitete (teilweise speziesspezifische), jüngere miRNA-Familien [39]. In vielen Pflanzen liegen miRNAs aus weit verbreiteten, konservierten Familien in hoher Abundanz vor. Dies wurde durch Cuperus und Kollegen 2011 damit begründet, dass diese miRNAs relativ viele Ziel-RNAs von hoher Bedeutung für die Zelle negativ regulieren [39]. Im Gegensatz dazu seien miRNAs jüngeren Ursprungs häufig von wesentlich geringerer Abundanz. Die Konservierung alter miRNA-Familien betrifft dabei hauptsächlich die (+)-Stränge des miRNA-Duplex-Moleküls aber auch die *-Stränge [40,41]. Es erscheint logisch, dass das festgestellte differentielle Bindungsverhalten von p19, sofern es eine gleichartige Bedeutung in mehreren Wirtsorganismen aufweist, an konservierte Merkmale der miRNA-Duplexe angepasst wurde.

Um ein generelles Muster aller durch die differentielle Bindung von p19 betroffenen miRNAs und damit die Auswirkung dieser Eigenschaft beurteilen zu können, könnte generell zwei experimentellen Ansätzen nachgegangen werden. So könnten einerseits IP-Experimente in verschiedenen Wirtsorganismen und Geweben zu frühen Zeitpunkten viraler Infektionen ausgewertet werden. Andererseits könnten durch Bestimmung allgemeiner molekularer Determinanten zur Diskriminierung auf miRNA-Ebene Vorhersagen getroffen werden, welche miRNAs in Frühphasen der viralen Infektionen durch p19 sequestriert werden könnten und welche nicht. Die IP-Versuche tragen dabei einige Nachteile. So erfordern unterschiedliche miRNA-Konzentrationen in verschiedenen Geweben für ein umfassenderes Bild entsprechend viele Versuche. Zudem existiert das Problem, dass in einigen miRNA-Familien mehrere Isoformen von miRNA-Duplex-Molekülen mit abweichender Struktur aber identischen (+)-Strängen vorliegen. Dadurch könnten miRNAs aus *input*-Datensätzen einer Isoform zugeordnet werden und nach der IP einer anderen. Dies hätte Fehldeutungen über Anreicherungen oder Abreicherungen von miRNAs durch eine IP zur Folge. Bei IP-Experimenten könnten zudem zuvor bereits in AGO-Proteine inkorporierte sRNAs, welche daher nur noch einzelsträngig vorliegen, die Ergebnisse beeinflussen. Diese kleinen RNAs wären durch p19 nicht mehr präzipitierbar, allerdings in den *input*-Datensätzen enthalten. Es ist möglich, dass die in Abschnitt 3.4 untersuchte miR6149 durch diese Nachteile fälschlicherweise als durch p19 hochaffin gebunden angesehen wurde, obwohl die gemessenen K_D -Werte dieser Interaktion dies nicht bestätigten.

Daher wurden molekulare Determinanten zur Differenzierung auf miRNA-Ebene bestimmt. Eine Identifizierung der molekularen Determinanten auf miRNA-Ebene aber auch auf Proteinseite stellt zudem einen Ausgangspunkt dar, um die Ursachen der miRNA-Differenzierung untersuchen zu können.

4.3.1 Determinanten für die differentielle Bindung von p19 an verschiedene miRNAs innerhalb der miRNA-Struktur

Für die Identifizierung der Nukleinsäure-Determinanten wurden die miRNAs 162 und 168 als Modell-RNAs herangezogen (siehe Abschnitt 3.3). Neben Gemeinsamkeiten in der Struktur – beide (+)-Stränge beginnen mit der Sequenz „UCG“ am jeweiligen 5'-Terminus und weisen mehrere G-C-Paarungen am jeweils anderen Terminus auf – sind beide miRNA-Duplex-Moleküle zu miRNA-Familien zugehörig, welche in allen Angiospermen vorhanden sind und hochkonserviert vorliegen [39,42]. Sie unterscheiden sich jedoch in der Sequenz und dem Auftreten von Basenfehlpaarungen voneinander. Zudem stellen sie Beispiele von miRNAs mit hoher Affinität (miR162) und geringer Affinität (miR168) an p19 dar.

Nach Erstellung von miR162-Varianten, unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Huang *et al.* (2009) [202], konnte gezeigt werden, dass die Nukleobasenregion 6/14 bis 8/12 eines miRNA-Duplex-Moleküls bei Abweichung vom Watson-Crick-Basenpaarungsmuster die Affinität des RNA-Dimers zu p19 negativ beeinflussen kann. Überraschend ist dabei der Einfluss des *wobbles* auf Position 12*U/8*G da eine Basenfehlpaarung an gleicher Stelle oder ein invertiertes *wobble* keine negativen Auswirkungen auf die Bindungsaffinität aufwies. Bei dieser Basenpaarposition wird die Bindung einer miRNA an CIRV-p19 also auch abhängig von der Art der Abweichung vom komplementären Basenpaarungsmuster inhibiert.

Bindungsstudien mit miR168-Varianten ergaben, dass das G-U-*wobble* auf Position 8*/12* für die hohen K_D -Werte der miR168 zu CIRV-p19 verantwortlich ist. Ein Nebenergebnis dieser Untersuchungen der miR168-Varianten ist, dass neben der Position und der Identität von Abweichungen im Watson-Crick-Paarungsmuster auch andere Merkmale der Duplex-Moleküle, Einfluss auf das Bindungsverhalten der kleinen RNA zu p19 aufweisen können. Das wird am Beispiel der miR168-Variante 6 erkennbar, welche als siRNA eine deutlich niedrigere Affinität (K_D -Wert: $0,35 \pm 0,16$ nM) zu CIRV-p19 aufzeigt als die siRNA gf698 ($0,06 \pm 0,04$ nM). Der Einfluss der Sequenzen der Einzelstränge einer siRNA auf die Bindung zu CIRV-p19 wurde im Vorfeld dieser Arbeit durch andere Autoren ausgeschlossen [156]. Dennoch zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass zukünftig auch siRNAs verschiedener Sequenzen in ihrer Bindung an

den VSR untersucht werden sollten. Für die miR168-Varianten konnte mit Hilfe von Luziferase-Reporterversuchen gezeigt werden, dass vor allem RISC-Aktivitäten von miR168-Varianten ohne G-U-*wobble* auf Position 8^{+/12}* durch CIRV-p19 inhibiert wurden. Damit konnte dieses *wobble* auch als Determinante für einen verminderten Einfluss von p19 auf die miRNA-vermittelte AGO/RISC-Aktivität *in vitro* bestimmt werden.

Dieses G-U-*wobble* wurde als Determinante für die Bindung zu p19 auch unabhängig am Beispiel der miR6149 im Abschnitt 3.4 bestätigt. Es wurde jedoch insgesamt deutlich, dass die Anreicherung der miR6149-Isoformen durch CIRV-p19 aus dem BYL nicht mit der Affinität dieser Isoformen an das Protein zu erklären ist. Ein möglicher Grund dafür sind die in Abbildung 3.19 aufgezeigten, benachbarten G-U(U-G)-*wobbles* auf den Positionen 13^{+/7}* und 14^{+/6}*. Es wurde bisher nicht untersucht, ob direkt nebeneinander liegende Abweichungen zum Watson-Crick-Basenpaarungsmuster additiv zu einer erheblichen Störung der Bindung der miRNA an CIRV-p19 führen können. Dies ist jedoch möglich. Außerdem sind noch unbekannte, nicht annotierte Isoformen der miR6149 möglich, welche keine *wobbles* aufweisen, da diese miRNA-Familie erst 2012 durch Tang *et al.* [204] beschrieben wurde.

Der Zusammenhang zwischen Bindungsaffinität des VSRs p19 an miRNAs und verschieden starker Einflüsse auf das PTGS zum Einen und einzelnen molekularen Determinanten innerhalb der Duplex-Moleküle von spezifischer Identität und Position zum Anderen wurde bisher nur von Cheng *et al.* (2011) hergestellt [163]. Dabei führte eine Basenfehlpaarung in der Mitte (Position 10/10) eines sRNA-Duplex-Moleküls zu einer erniedrigten Affinität der miRNA zu p19. Durch einen komplementären Aminosäureaustausch T111S konnte jedoch die Affinität des VSRs zu dieser miRNA wieder erhöht werden. Das hier beschriebene G-U-*wobble* war in dieser Studie jedoch noch nicht als potentielle Determinante bekannt. Kontra *et al.* (2016) [192] stellten zudem einen Zusammenhang zwischen der Sequestrierung kleiner RNAs durch CymRSV-p19 in *N. benthamiana* und deren Inkorporation in einzelne AGO-Proteine her. Nach ihren Ergebnissen sollten AGO1-spezifische virale siRNAs bevorzugt gegenüber AGO2-spezifischen siRNAs durch den VSR sequestriert werden. Zudem zeigten Zhang *et al.* (2014) [92] auf, dass miRNAs mit Basenfehlpaarungen auf der Position 11/9 (wie bei miR162) und Basenpaarungen auf 15/5 (wie bei miR168) in *A. thaliana* in einer Inkorporation in AGO1 begünstigt werden. Das hier beschriebene G-U-*wobble* stellt keines der bisher bekannten Strukturmerkmale dar, welches die AGO-Inkorporation beeinflusst. Dennoch ist es möglich, dass die von Kontra und Kollegen angedeutete Präferenz von p19 zu AGO1-spezifischen sRNAs [192] in einem Zusammenhang mit der differentiellen Bindung des VSRs an kleine RNAs steht. Um dies zu beurteilen, könnten G-U-

wobbles in miRNA-Duplex-Strukturen zukünftig auch in ihrem Einfluss auf die AGO-Inkorporation untersucht werden. Für umfassendere Ergebnisse wären dafür jedoch bisher noch fehlende Datenbanken nötig, welche die Strukturelemente aller bekannten miRNA-Duplex-Moleküle auflisten und auswertbar darstellen.

Da das G-U-*wobble* 8/12 als bedeutsames Element für die Funktion von miRNAs bisher nicht aufgetreten ist, wird jedoch angenommen, dass es sich um eine Besonderheit nur sehr weniger miRNAs wie miR168 handeln könnte. Jagtap *et al.* (2011) [42] zeigten einen hohen Konservierungsgrad des miR168-Duplex in verschiedenen pflanzlichen Organismen auf. Das bedeutende G-U-*wobble* auf Position 8⁺/12^{*} ist dabei vollständig konserviert. Ein Vergleich aller in Angiospermen konservierter miRNA-Familien in *N. tabacum* und *N. benthamiana* wies aus, dass überhaupt nur drei dieser 21 Familien auch das G-U-*wobble* 8/12 in diesen beiden Spezies vorliegen haben (Daten nicht gezeigt, Abgleich aus der miRBase und www.benthgenome.qud.edu.au): miR168, miR171 und miR399. Die zudem weite Verbreitung der miR168 und eine bindungsunabhängige Stimulation der miR168-Expression durch p19 [191] legen eine zentrale Rolle einer durch diese miRNA genau regulierten AGO1-Homöostase bei viralen Infektionen nahe. Die durch das G-U-*wobble* 8/12 vermittelte miRNA-Differenzierung durch das virale Protein könnte also dem Zweck dienen spezifisch miR168 von der Bindung durch den VSR auszuschließen. Die biologische Bedeutung einer solchen miRNA-Differenzierung wird unter Einbeziehung der Erkenntnisse aus Abschnitt 3.2 in Abschnitt 4.5 diskutiert.

4.3.2 Konservierte Aminosäureseitenketten sind in die Differenzierung von miRNAs durch p19 involviert

Im Verlaufe der Studien anderer Arbeitsgruppen zum Bindungsverhalten von p19 an kleine RNAs wurden diverse Varianten des Proteins mit einzelnen Aminosäureaustauschen beschrieben [156,157,162,163,178,207,208]. Dabei wurde jedoch zumeist keine Differenzierung kleiner RNAs durch den VSR untersucht. Davon ausgenommen sind die Studien von Cheng *et al.* 2011 ([163], siehe vorheriger Abschnitt). Für die Auswahl der Aminosäuren nutzten die Autoren in dieser Studie die Ko-Kristallstruktur von CIRV-p19 (PDB-Code: 1rpu aus [156]) und einer siRNA als Ausgangspunkt. Nach einem ähnlichen Prinzip wurde daher auch im Verlaufe dieser Arbeit vorgegangen. Dabei wurde auf das genannte G-U-*wobble* bzw. auf die entsprechende Position in der Kristallstruktur eingegangen (siehe auch Abbildung 3.17).

Wie in Abschnitt 3.3.2.1 beschrieben, ist eine spezifische Erkennung einzelner Nukleobasen durch das CIRV-p19 wahrscheinlich, denn nicht nur das *wobble* an sich, sondern auch dessen

Orientierung sind entscheidend für die miRNA-Differenzierung. Bei der Interaktion von Aminosäuren mit Nukleobasen kann zwischen zwei Typen unterschieden werden. Erstens: sogenannte Stapelwechselwirkungen (engl. *stacking interactions*) zwischen aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan oder Histidin) und den Nukleobasen. Diese beruhen auf dipol-induzierten Dipol-Wechselwirkungen und treten zumeist an lösungsmittlexponierten Nukleobasen wie den an den Termini gelegenen Nukleobasen eines Doppelstranges auf. Zweitens: Elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen. Diese verbinden einzelne Gruppen der Nukleobasen und Aminosäureseitenketten, den Carboxy-Sauerstoff oder den Amid-Wasserstoff der Peptidkette miteinander [203]. Da das G-U-*wobble* an einer Position lokalisiert ist, welche sich in der Ko-Kristallstruktur von CIRV-p19 und einer siRNA im internen, nicht lösungsmittlexponierten Bereich befindet, wurden elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen als wahrscheinlicher gesehen. Für die weiteren Versuche zur Untersuchung per Alanin-Scan wurden die Aminosäuren Glutamin 6, Asparagin 8, Lysin 67, Asparagin 106, Glutamin 107, Valin 108, Glycin 109 sowie Threonin 111 ausgewählt (siehe Abschnitt 3.3.2.1). Die T111A-Variante diente dabei als Kontrolle, deren Funktion bereits in Cheng *et al.* 2011 [163] beschrieben wurde. Sie zeigte sich in der Lage, siRNAs mit hoher Affinität zu binden, jedoch im EMSA unfähig, mit miRNAs mit Basenfehlpaarung auf Position 10/10 zu interagieren. Dieses Protein stellt also eine Variante mit verstärkter miRNA-Differenzierung anhand eines anderen Nukleotidmerkmals als des hier beschriebenen dar. Die Aminosäuren 6 und 8 wurden aufgrund der anzunehmenden räumlichen Nähe zum Basenpaar 8/12 ausgewählt, obgleich sie selbst in der Kristallstruktur nicht sichtbar sind. Die p19-Variante K67A wurde in Liu *et al.* (2012) [207] als funktional in Bezug auf die RNAi-Suppression beschrieben. Das Lysin 67 interagiert jedoch in der Kristallstruktur aus Vargason *et al.* (2003) mit dem Phosphat des Guanin 8 der siRNA [156]. Bei einer Abweichung bei Abweichung im Watson-Crick-Basenpaarungsmuster an dieser Stelle könnte diese Interaktion jedoch beeinträchtigt sein. Daher wurde Lysin 67 in die Versuche einbezogen. Auch die Aminosäuren 106 bis 109 wurden aufgrund der in der Kristallstruktur sichtbaren Kontakte zur Basenpaarung 8/12 in die Versuche involviert. Interessanterweise weisen Allison *et al.* (2016) für die Aminosäuren 105 (Alanin bei CIRV-p19) und 106 (Asparagin) des p19-Proteins der Tombusviren eine positive Selektion nach, sie sind also hypervariabel [178]. Die Aminosäuren 107 bis 109 (Glutamin, Valin und Glycin bei CIRV-p19) hingegen zeigen beim Vergleich der Tombusviren eine nahezu vollständige Konservierung. Anzumerken ist zudem, dass der in Abschnitt 3.3.2.1 beschriebene, wasservermittelte Kontakt zwischen dem Glycin 109 und dem 2'-Amin des Guanins 8 die einzig sichtbare Interaktion zwischen Protein und einer Nukleobase darstellt. Prinzipiell sind Interaktionen mit dem 2'-Amin des Guanins 8 wahrscheinlich, da

ebendieses Amin im Uracil-Guanin-*wobble* herausgestellt und damit frei für Interaktionen mit dem Protein wird (siehe Abbildung 4.1). Grundsätzlich würden zudem Interaktionen des Proteins mit dieser Nukleobase auch die niedrigen Affinitäten der miR162-Varianten mit Basenfehlpaarungen oder G-U-*wobbles* an Position 7*/13* bei Bindung an CIRV-p19 erklären können (siehe Abschnitt 3.3.1.2). So könnten auch benachbarte Abweichungen vom Watson-Crick-Basenpaarungsmuster in der miR162-Duplex-Struktur das in miR162 immer vorhandene Guanin 8 für Interaktionen mit dem VSR zugänglich machen.

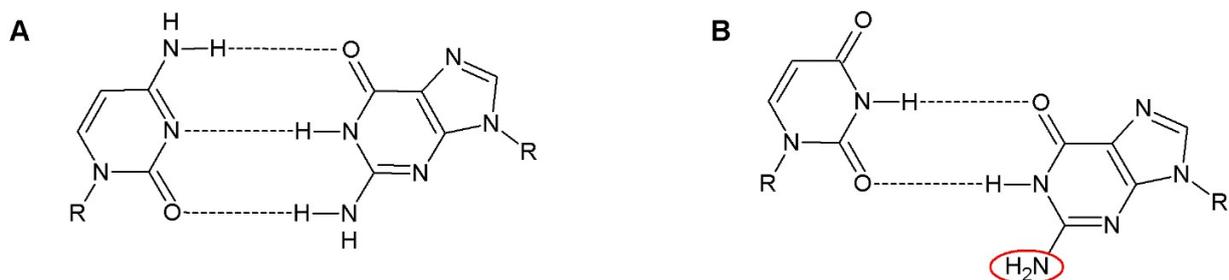


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung einer Cytosin-Guanin-Basenpaarung (A) und eines G-U-*wobbles* (B) In rot hervorgehoben ist das 2'-Amin des Guanins, welches bei G-U-*wobbles* nicht an der Wasserstoffverbrückung der Nukleobasen beteiligt ist.

Sämtliche CIRV-p19-Varianten, bei denen die oben genannten Aminosäuren durch Alanine ersetzt wurden, wurden nach *in-vitro*-Translation im BYL auf ihre miRNA-Bindefähigkeiten untersucht (siehe Abbildung 3.18). Mit den dabei gewonnenen Indikationen wurden die Varianten Q107A, V108A und G109A für die rekombinante Synthese, Reinigung und Charakterisierung ausgewählt. Insgesamt konnte durch die Versuche mit den Alanin-Varianten die Aminosäureregion 108-109 als komplementäre Region zum G-U-*wobble* auf Position 8/12 als Nukleinsäuredeterminante für eine differentielle Bindung von miRNAs durch p19 ermittelt werden. Die Varianten V108A und G109A zeigten neben einer verminderten allgemeinen sRNA-Bindungsaffinität ein stärker unterscheidendes (diskriminierendes) Bindungsverhalten zwischen den miRNAs. Die Ergebnisse der initialen Versuche mit den Varianten Q107A und T111A schlossen jedoch eine, tatsächlich aus mehr Aminosäuren als V108 und G109 bestehende, Komplementärregion nicht aus. Insbesondere die Variante T111A deutet überraschenderweise auch in dieser Arbeit ein verändertes differentielles Bindungsverhalten an, welches aufgrund der Vorstudien anderer Autoren aber nicht ausschließlich dem G-U-*wobble* zugeordnet werden kann [163]. Weitere Studien zur Kartierung der Komplementärregion auch mit anderen Aminosäureaustauschen sollten in Zukunft demnach durchgeführt werden. Möglich wäre dafür eine Ausdehnung der Region der untersuchten Aminosäuren auf das Cystein 110. Dieses wurde bisher durch andere Autoren zwar nicht als für die Bindung an kleine RNAs relevant eingestuft

[162], ist demnach im Rahmen der Untersuchungen zur miRNA-Differenzierung nicht beachtet worden.

Mechanistisch lassen die beiden p19-Varianten V108A und G109A schwer gemeinsame Schlüsse auf den zugrunde liegenden Differenzierungsmechanismus zu. So stellte der V108A-Austausch einen Eingriff in die p19-Primärstruktur dar, bei dem eine sterisch weniger raumgreifende Aminosäure anstelle des Valins eingeführt wurde. Die gesteigerte miRNA-Differenzierung wäre also mit einer erhöhten Zugänglichkeit der Peptidhauptkette bei Glycin 109 zu erklären. Beim G109A-Austausch hingegen wurde das im Bezug auf die ϕ - und ψ -Torsionswinkel der Hauptkette flexible Glycin durch ein weniger flexibles Alanin ausgetauscht, was zudem einen größeren Raum beanspruchte als das Glycin. Es ist möglich, dass durch diesen Aminosäureaustausch Konformationen der Hauptkette des p19 gefördert wurden, welche einen Kontakt mit dem Guanin 8 beförderten. Die CD-Messungen deuteten (siehe Abschnitt 7.7) auf in der Summe vergleichbare Sekundärstruktur-Zusammensetzungen hin wie im p19-V108A oder im wt-p19. Allerdings erlaubten die CD-Messungen keinerlei Rückschlüsse auf die Mikro-Struktur des Proteins um das Glycin 109 herum.

Unabhängig von den Überlegungen zur genauen Interpretation der Ergebnisse der p19-Varianten blieb aber die Frage offen, ob tatsächlich ein (elektrostatistischer oder Wasserstoffbrücken-) Kontakt zwischen der identifizierten Aminosäureregion und der miRNA-Base Guanin 8 zustande kommt und dieser für die miRNA-Differenzierung durch p19 relevant ist. Um diesen nachzuweisen, werden folgende Vorgehensweisen vorgeschlagen. Zum einen könnte die Einführung längerer, sterisch anspruchsvollerer Aminosäureseitenketten an den Positionen 108 und 109 in der p19-Primärstruktur eine Verbindung zur miRNA-Nukleobase unterbinden oder erschweren. Möglich wären dafür Phenylalanin oder Leucin. Zum anderen könnte auch ein Einsatz von Hypoxanthin in der miRNA-Struktur anstelle des Guanins 8 aufschlussreich sein. Diese Nukleobase kann als Guaninderivat ohne das entscheidende 2'-Amin angesehen werden. Zudem könnte nach dem in Vargason *et al.* (2003) [156] beschriebenen Vorgehen eine Ko-Kristallstruktur mit C/IRV-p19 in Komplex mit der miR168 oder einer artifiziellen miRNA mit G-U-*wobble* auf Position 8/12 ermittelt werden. Bisherige Versuche solche Molekülkomplexe zu kristallisieren waren zwar erfolgreich, die Kristalle jedoch zu klein für eine Untersuchung (nicht gezeigt). Eine Wiederholung und Verbesserung dieser Versuche sollte daher durchgeführt werden.

Bemerkenswert bei den Ergebnissen zur Bestimmung von an der miRNA-Differenzierung beteiligten Aminosäuren ist, dass die ermittelte komplementäre Region für die miRNA-Differenzierung eine hoch konservierte Aminosäureregion darstellt. So sind Glutamin 107 und

Glycin 109 (mit Ausnahme des *Maize necrotic streak virus*) bei allen elf in Allison *et al.* betrachteten p19-Proteinen vollständig konserviert [178]. Das Valin 108 tritt in anderen p19-Proteinen als Isoleucin auf. Andere untersuchte Aminosäuren wie die Asparagine 8 und 106 hingegen sind in den p19-Orthologen deutlich weniger konserviert bzw. sogar positiv selektiert. Da die beschriebene Aminosäureregion 108-109 in fast allen p19-Homologen konserviert vorliegt, kann angenommen werden, dass auch diese Tombusvirus-VSRs eine vergleichbare Differenzierung zwischen verschiedenen miRNAs während einer viralen Infektion durchführen. Gemeinsam mit der Konservierung des G-U-*wobbles* auf Position 8^{+/12}* in allen miR168-Isoformen [42] ergibt sich dabei für die miRNA-Differenzierung durch den VSR p19 das Bild einer unter Tombusviren und deren Wirtsorganismen insgesamt weit verbreiteten Eigenschaft von hoher Relevanz während viraler Infektionen.

4.4 Die biologische Bedeutung der miRNA-Diskriminierung

Im Verlauf dieser Arbeit konnte eine Unterscheidung (Diskriminierung) von miRNAs durch den tombusviralen VSR *CIRV*-p19 gezeigt werden (siehe 4.2). Dabei konnte erstmals mittels einer kombinierten Studie aus *in-vitro*-Messung und *in-vivo*-Studie in *CymRSV*-infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen unter nicht transgenen Bedingungen gezeigt werden, dass dieses differentielle Bindungsverhalten des p19 in einer ebenso differentiellen Beeinflussung der miRNA-vermittelten Regulation der Expression von mRNAs resultiert. Dabei wurden drei miRNAs auf ihre Interaktionen mit p19 untersucht. Die miRNAs 162 und 403 aus *N. benthamiana* interagierten *in vitro* und *in vivo* hochaffin mit p19. Die proviral wirkende miR168 hingegen wurde von der Sequestrierung durch p19 ausgespart. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Modell-miRNAs zum großen Anteil auf eine einzelne Abweichung vom Watson-Crick-Basenpaarungsmuster innerhalb der miRNA-Struktur zurückzuführen ist. Die Identifikation einer zu diesem G-U-*wobble* auf Position 8/12 komplementären Aminosäureregion, rundet dieses Bild ab. Die damit gebildete Hypothese zum biologischen Kontext wird im folgenden Abschnitt dargelegt.

Der Umstand, dass die miRNA-Diskriminierung im Wesentlichen auf einzelne Abweichungen im Basenpaarungsmuster des miRNA-Duplex-Moleküls zurückzuführen ist, deutet darauf hin, dass einzelne miRNAs oder kleinere miRNA-Gruppen Ziel dieser Diskriminierung durch den VSR sein

könnten bzw. von der Sequestrierung ausgespart werden können. Jagtap und Kollegen konnten 2014 einen hohen Konservierungsgrad der miR168-Familie aufzeigen, wohingegen die miR403-Familie deutlich variabler in ihrer Struktur ausgeprägt ist [42]. Es ist anzunehmen, dass eine Eigenschaft wie die differentielle Bindung des p19-Proteins auf die in ihrer Doppelstrangstruktur konserviertere miR168 ausgerichtet ist, um diese von der Sequestrierung auszusparen. Dafür sprechen noch andere Beobachtungen. So liegt die Aminosäureregion im CIRV-p19, welche komplementär zum G-U-wobble auf Position 8/12 ist, in einem bei den verschiedenen tombusviralen p19-Proteinen konservierten Bereich (vergleiche [178] Konservierung und positive Selektion benachbarter Aminosäuren). Dies deutet zusammen mit dem breiten Wirtsspektrum der Tombusviren [201] auf eine Anpassung an ein in Bedecktsamern ubiquitär vorhandenes miRNA-Struktur-Schema bzw. an ubiquitär verbreitete miRNAs hin. Zudem konnte gezeigt werden, dass neben den tombusviralen p19-Proteinen auch das 2b-Protein des *Tomato aspermy virus* (TAV, Familie: *Bromoviridae*) zwischen miR162 und miR168 via differentieller Bindung unterscheidet [205]. Beide Proteine (und die jeweiligen Viren) sind dabei strukturell jedoch nicht verwandt. Das G-U-wobble auf Position 8/12 fungiert bei 2b ebenso wie im Fall des p19-Proteins als Hauptdeterminante für die miRNA-Diskriminierung auf RNA-Ebene (Dr. Tamilarasan Selvaraj, unpubliziert, persönliche Mitteilung). Die Tatsache, dass die beiden VSRs eine an dieser Stelle sehr ähnliche Bindungseigenschaft an kleine RNAs aufweisen, unterstreicht die Bedeutung der gezielt schwachen Bindung der miR168 für die Unterstützung von viralen Infektionen. So könnten Angiospermen-infizierende Tombusviren ihre VSRs früh an die ubiquitär verbreiteten und in Bezug auf das wobble hochkonservierten miR168-Isoformen angepasst haben, um deren Aktivität im Zuge einer viralen Infektion zu unterstützen oder zu erhalten. Dieser Prozess wäre dann auch bei anderen, nicht verwandten Viren mit VSRs ähnlicher Funktion möglich oder sogar wahrscheinlich. Bei der AGO2-regulierenden miR403 ist diese Situation jedoch komplexer. Hier gibt es Organismus-spezifische Unterschiede in den Bindeaffinitäten zum p19-Protein mit hohen (*N. benthamiana*) und niedrigen (*A. thaliana*) Affinitäten. Die miR403 ist evolutionär gesehen deutlich jünger und weniger weit verbreitet als die anderen beiden Modell-RNAs [39,42]. So gibt es diese miRNA-Familie in Monokotyledonen und einigen Dikotyledonen nicht. Zudem ist sie in ihrer Struktur deutlich variabler. Die Tatsache, dass die miR403-Sequestrierung durch p19 bei *CymRSV*-infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen eine verstärkende Wirkung auf das antivirale RNA-silencing aufweist, entgegen der Einwirkungen von p19 auf die miR162- und miR168-Aktivitäten, kann auf deren zu miR168 vergleichbare Rolle zurückgeführt werden. Möglicherweise sind nach Anpassung der viralen Proteine zum schwachen Binden der miR168 neue miRNA-regulierte, antivirale AGO-Proteine oder aber neue miRNAs bzw. miRNA-Familien aufgetreten. Diese miRNAs (z.B. miR403) unterscheiden sich strukturell von der miR168 und in verschiedenen

Organismen auch voneinander [42]. Dadurch könnten Anpassungen der Bindeaffinitäten der VSRs an miRNAs umgangen werden. Das hochaffine Binden der miR403 wäre also in diesem Zusammenhang als pflanzliche Anpassung an die miRNA-Diskriminierung durch sRNA-bindende VSRs wie p19 zu verstehen. Scholthof *et al.* (2011) [209] (vergleiche [89]) beschreiben das vermutlich durch miR403 in seiner Aktivität regulierte AGO2 als hauptsächlichen antiviralen Akteur im Falle einer *TBSV*-Infektion in *N. benthamiana* sowie als eine Art „*second layer*“ der antiviralen Immunantwort nach Ausfall von AGO1. Dies ist konsistent mit dem Bild, dass während einer tombusviralen Infektion dieser Tabakspezies AGO1 nach der virusinduzierten Akkumulation der miR168 - unterstützt durch das Auslassen der Bindung der miRNA durch p19 - in seiner Funktion blockiert wird und AGO2 als zentrales Protein in der antiviralen Immunantwort verbleibt.

Damit ergibt sich für die in Abschnitt 3.2.2 gezeigten Ergebnisse einer *CymRSV*-Infektion von *N. benthamiana* folgende Interpretation: Durch Bindung und Sequestrierung der miR162 kommt es im Zuge einer tombusviralen Infektion einer Pflanze zu einer Akkumulation von DCL1. Dessen erhöhte Aktivität führt dann zu reduzierten Expressionen von DCL4 und auch DCL3 (via eines noch unbekanntem Mechanismus) [46,51,64], was eine Inhibierung der antiviralen Immunantwort zur Folge hat. Zusätzlich wirkt der miRNA-Prozessor DCL1 auch durch die vermehrte Prozessierung proviraler miRNAs wie miR168 und miR403 in einer die Infektion unterstützenden Weise. Weiterhin wird durch die nur schwach ausgeprägte Sequestrierung der miR168 durch p19 die Aktivität dieser miRNA nicht beeinflusst. Das hat zur Folge, dass die Aktivität des antiviralen AGO1-Proteins weiterhin niedrig gehalten wird. Die Bindung der antiviralen miR162 und das Auslassen der Bindung der proviralen miR168 wirken also auf eine zielgerichtete Inhibierung der antiviralen Immunantwort hin. Eine ähnliche Zielrichtung wurde in *Arabidopsis* durch Azevedo und Kollegen auch für das carmovirale p38 angenommen, welches ebenso die miR162-Aktivität und auch die AGO1-Aktivität inhibierte jedoch nicht durch direkte sRNA-Interaktion [64]. Demgegenüber steht die starke Sequestrierung von miR403 durch p19. Die Wirkung der Bindung dieser RNA besteht in der Aufhebung der negativen Regulation der AGO2-Expression. Das AGO2-Protein wirkt im Anschluss im antiviralen RNA-*silencing* als „*second layer*“ der antiviralen Immunantwort. Ein zusammenfassendes Modell der biologischen Bedeutung der differentiellen Bindung von p19 an die drei getesteten miRNAs ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

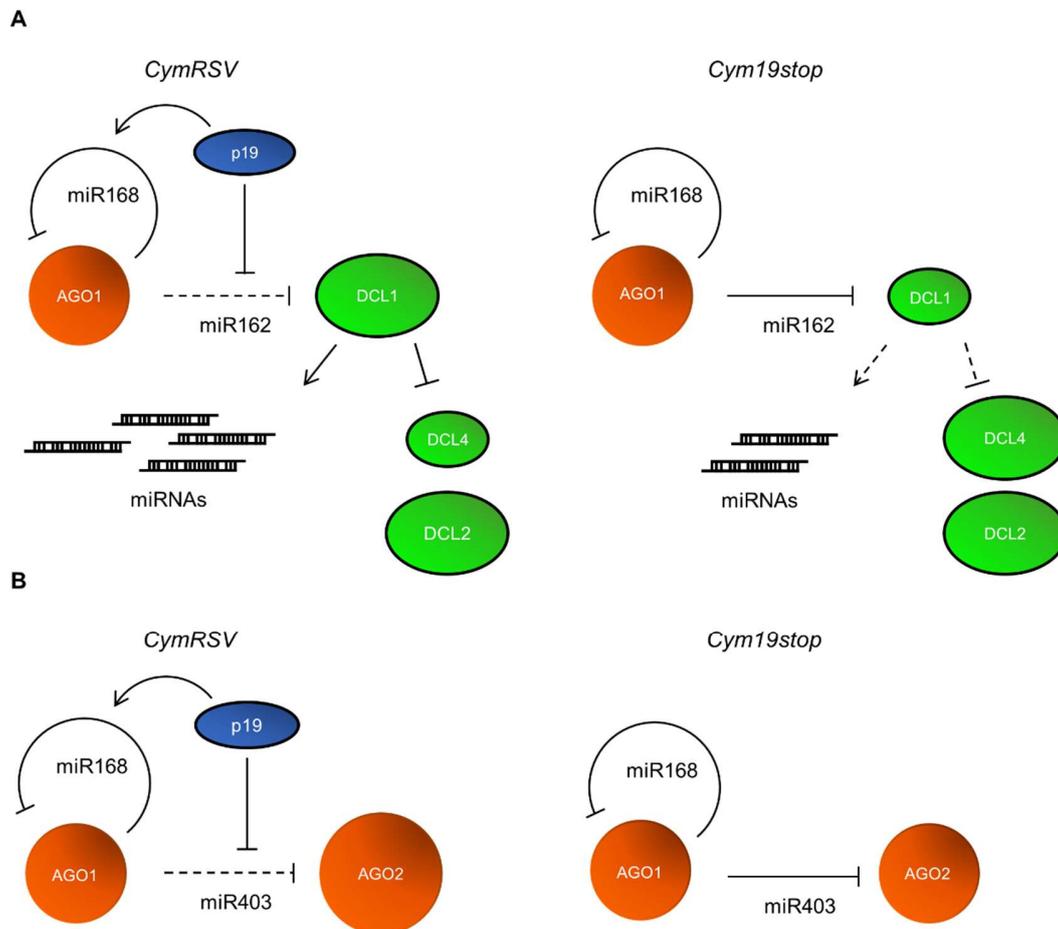


Abbildung 4.2: Modell zur Interpretation der Ergebnisse der *CymRSV*-Infektionen von *N. benthamiana*-Pflanzen: Links: *CymRSV*-Infektion; Rechts: *Cym19stop*-Infektion; (A) Einfluss des *CymRSV*-p19 auf die *DCL1*-Expression in neu infizierten Pflanzen; Durch Sequestrierung von *NbmiR162* wird die *DCL1*-Expression begünstigt. Dadurch wird die miRNA-Prozessierung gesteigert, von denen einige (wie *miR168*) proviral wirken können. Ebenso wirkt *DCL1* inhibierend auf die *DCL4*-Expression, wobei *DCL2* unbeeinflusst verbleibt [64]. Die *miR168*-vermittelte *AGO1*-Regulation wird verstärkt durch das Auslassen dieser miRNA von der Sequestrierung und durch Stimulation der Transkription des *miR168*-Vorläufer-Moleküls [130]. (B) Einfluss des *CymRSV*-p19 auf die *AGO2*-Expression in neu infizierten Pflanzen; p19 steigert durch *miR403*-Sequestrierung die *AGO2*-Expression mit antiviraler Auswirkung.

Es kann also zusammengefasst werden, dass die hier charakterisierte differentielle Bindungsfähigkeit von *CIRV*-p19 an verschiedene microRNAs vermutlich ein Resultat eines koevolutionären Prozesses zwischen Pathogen und verschiedenen Wirten ist. Eine Anpassung an für die pflanzliche Immunantwort bedeutsame, hochkonservierte miRNAs wie *miR168* durch die miRNA-Diskriminierung ermöglicht einen Angriff auf das antivirale RNA-silencing zusätzlich zur eigentlichen siRNA-Bindungsfunktion. Jedoch können strukturell deutlich variabelere miRNAs wie *miR403* als Gegenmaßnahme einiger Angiospermen gegen dieses virale Vorgehen im Ping-Pong-

Mechanismus zwischen Pflanze und Virus angesehen werden [105]. Ihre Sequestrierung läuft dann den durch die differentielle Bindung erzielten Effekten entgegen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde der tombusvirale VSR p19 bei seinen Interaktionen an verschiedene miRNAs untersucht und die biologische Bedeutung der dabei ermittelten Eigenschaften beurteilt. Bisher war bekannt, dass in transgenen Pflanzen produziertes p19 *in vivo* miRNAs sequestrieren kann. Ob dies eine Eigenschaft von biologischer Relevanz während viraler Infektionen darstellt, war bisher unbekannt. Zur Untersuchung der miRNA-Bindeeigenschaften von p19 wurde daher hier das erste Mal eine kombinierte Studie aus *in-vitro*-Messungen und *in-vivo*-Experiment unter nicht transgenen Bedingungen durchgeführt. *In vitro* wurde heterolog, rekombinant synthetisiertes CIRV-p19 in seiner Bindung an miRNAs charakterisiert und die aus den dabei ermittelten Affinitäten folgenden Einflüsse auf miRNA-vermittelte RISC-Aktivitäten beurteilt. *In vivo* konnte während einer viralen Infektion von *N. benthamiana* der Einfluss der miRNA-Sequestrierungen auf die Expression der miRNA-Zielgene untersucht und beurteilt werden. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. **P19 moduliert während einer viralen Infektion die Aktivitäten von miRNAs, deren Affinität zum VSR vergleichbar hoch der einer siRNA ist.** Dies führt auch zu einer Modulation der entsprechenden Expression der Ziel-RNA. Zudem geschieht es unabhängig von der Sequestrierung einer Vielzahl viraler siRNAs, da die Interaktionen mit miRNAs zeitlich davor liegend stattfinden.
2. **P19 zeigt deutliche Unterschiede in der Bindung an verschiedene miRNAs und in Konsequenz auch Unterschiede in der Modulation ihrer Aktivitäten.** Anhand der miRNAs 162 (hochaffine Bindung), 168 (niedrigaffine Bindung) und 403 (unterschiedlich je nach Herkunftsspezies der Isoform) konnte diese Eigenschaft *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Es wurde deutlich, dass zumindest einige miRNAs gezielt von einer biologisch relevanten Sequestrierung ausgeschlossen werden könnten. Die Unterscheidung zwischen den miRNAs durch p19 wird in dieser Arbeit miRNA-Diskriminierung oder differentielle Bindung genannt.
3. **Die miRNA-Diskriminierung durch p19 findet anhand einer definierten Basenpaarregion innerhalb des miRNA-Duplex statt und beinhaltet auf Seiten des Proteins eine hoch konservierte Region von Aminosäuren.** Innerhalb des miRNA-Duplex-Moleküls stellt vor allem ein G-U-wobble der Orientierung 8G/12U eine Determinante für eine Erniedrigung der Affinität an p19 dar. Dabei handelt es sich um eine in den miR168-Isoformen vieler Pflanzenspezies hoch konservierte Abweichung

vom Watson-Crick-Basenpaarungsmuster. Vermutlich weisen auch alle Wirtsorganismen der Tombusviren eine entsprechende miR168-Isoform auf. Die komplementär dazu an der miRNA-Diskriminierung beteiligte Aminosäureregion (Valin 108 und Glycin 109) ist zudem mit einer Ausnahme in allen p19-Orthologen vorhanden. Daher ist eine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf andere Tombusviren möglich.

- 4. Die differentielle Bindung des Proteins an verschiedene miRNAs stellt vermutlich eine Eigenschaft dar, deren Zweck die Inhibierung des antiviralen RNA-silencings ist.** Dabei wird insbesondere angenommen, dass die evolutionäre Anpassung dieser Eigenschaft durch das Virus an die Eigenschaften eher alter, hochkonservierter miRNAs wie miR162 und miR168 vorgenommen wurde. Die Sequestrierung bestimmter Isoformen der deutlich variableren miR403 hingegen kann als Gegenmaßnahme einiger Angiospermen im ko-evolutionären Ping-Pong-Mechanismus zwischen Virus und Wirt betrachtet werden.

Aus den genannten Ergebnissen könnten sich in Zukunft weitere Untersuchungen an diese Arbeit anschließen. Neben den bereits in der Diskussion vorgeschlagenen Experimenten könnten zwei hauptsächliche Ziele definiert werden. Zum einen sollten auch andere Phytoviren und deren VSRs und Wirtsorganismen auf eine gezielte Modulation von miRNA-Aktivitäten untersucht werden. Insbesondere bei siRNA-sequestrierenden VSRs sollten diese Untersuchungen folgen, da die differentielle Bindung an miRNAs bisher nur hier für p19 und (wenn auch vorerst ohne Untersuchungen *in vivo*) für das TAV-2b-Protein beschrieben wurden. So wurden simultan zu dieser Arbeit bereits das carmovirale p38 und ein potyvirales HcPro-Protein auf differentielle Bindungsfähigkeiten an miRNAs untersucht (Dr. Raph-Peter Golbik und Dr. Tamilarasan Selvaraj; jeweils AG Mikrobielle Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg, persönliche Mitteilung). Zum anderen sollten die bislang ermittelten molekularen Determinanten für eine miRNA-Diskriminierung als Ausgangspunkt für weitere Studien verwendet werden, um das Verständnis für diesen Vorgang zu fördern. Ein Interesse an diesem Verständnis besteht auch aufgrund der technischen Anwendungen von p19. So kann der VSR als miRNA-Detektionsmolekül, als Transfektionsagens oder zur Inhibition des RNA-silencings bei der gezielten Expression von Genen in transgenen Pflanzen eingesetzt werden [6,7,158,163,171]. Das Wissen um die Limitierungen des Proteins im Bezug auf die *silencing*-Inhibition oder bei anderen Aufgaben könnte dazu beitragen diese Anwendungen zukünftig weiter zu effektivieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Dangl, J.L., Horvath, D.M., Staskawicz, B.J. (2013) Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, **341**, 746–751.
2. Anderson, P.K., Cunningham, A.A., Patel, N.G., Morales, F.J., *et al.* (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol.*, **19(10)**, 535–544.
3. Ramegowda, V., Mysore, K.S., Senthil-Kumar, M. (2014) Virus-induced gene silencing is a versatile tool for unraveling the functional relevance of multiple abiotic-stress responsive genes in crop plants. *Front. Plant Sci.*, **5**, 323.
4. Peyret, H., Lomonosoff, G.P. (2015) When plant virology met *Agrobacterium*: the rise of the deconstructed clones. *Plant Biotechnol J.*, **13(8)**, 1121–1135.
5. Lico, C., Chen, Q., Santi, L. (2008) Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J. Cell Physiol.*, **216(2)**, 366–377.
6. Jin, J., Cid, M., Poole, C.B., McReynolds, L.A. (2010) Protein mediated miRNA detection and siRNA enrichment using p19. *Biotechniques*, **48(6)**, xvii–xxiii.
7. Danielson, D.C., Sachraja, N., Wang, W., Filip, R., Pezacki, J.P. (2016) A novel p19 fusion protein as a delivery agent for short-interfering RNAs. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **5**, e303.
8. Scholthof, K.G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., *et al.* (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.*, **12(9)**, 938–954.
9. Boualem, A., Dogimont, C., Bendahmane, A. (2016) The battle for survival between viruses and their host plants. *Curr. Opin. Virol.*, **17**, 32–38.
10. tenOever, B.R. (2013) RNA viruses and the host microRNA machinery. *Nat. Rev. Microbiol.*, **11(3)**, 169–180.
11. Weiberg, A., Bellinger, M., Jin, H. (2015) Conservations between kingdoms: small RNAs. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **32**, 207–215.
12. Weiberg, A., Jin, H. (2015) Small RNAs--the secret agents in the plant-pathogen interaction. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **26**, 87–94.
13. Pumplin, N., Voinnet, O. (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 745–760.
14. Bronkhorst, A.W., van Rij, R.P. (2014) The long and short of antiviral defense: small RNA-based immunity in insects. *Curr. Opin. Virol.*, **7**, 19–28.
15. Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., *et al.* (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, **425(6955)**, 257–263.
16. Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., *et al.* (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, **110**, 513–520.
17. Law, J.A., Jacobsen, S.E. (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.*, **11(3)**, 204–220.

18. Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., *et al.* (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.*, **2(5)**, 642–652.
19. Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Beknazariants, D., *et al.* (2006) Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 6233–6246.
20. Rogers, K., Chen, X. (2013) Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell*, **25**, 2383–2399.
21. Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001) RNA interference is mediated by 21 and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.*, **15**, 188–200.
22. Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., Tuschl, T. (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, **110**, 563–574.
23. Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., Chen, X. (2005) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End uridylation activity in Arabidopsis. *Curr. Biol.*, **15**, 1501–1507.
24. Zhai, J., Zhao, Y., Simon, S.A., Huang, S., *et al.* (2013) Plant microRNAs display differential 3' truncation and tailing modifications that are ARGONAUTE1 dependent and conserved across species. *Plant Cell*, **25**, 2417–2428.
25. Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., *et al.* (2005) Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, **307(5711)**, 932–935.
26. Zhao, Y., Yu, Y., Zhai, J., Ramachandran, V., *et al.* (2012) HESO1, a nucleotidyl transferase in Arabidopsis, uridylates unmethylated miRNAs and siRNAs to trigger their degradation. *Curr. Biol.*, **22(8)**, 689–694.
27. Ramachandran, V., Chen, X. (2008) Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science*, **321(5895)**, 1490–1492.
28. Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., Bartel, D.P. (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev.*, **16**, 1616–1626.
29. Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., Chen, X. (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Curr. Biol.*, **12(17)**, 1484–1495.
30. Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Bartel, B. (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 19–53.
31. Flynt, A.S., Lai, E.C. (2008) Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nat. Rev. Genet.*, **9(11)**, 931–842.
32. Xie, Z., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. (2003) Negative feedback regulation of Dicer-like 1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr. Biol.*, **13**, 784–789.
33. Kurihara, Y., Takashi, Y., Watanabe, Y. (2006) The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA*, **12**, 206–212.
34. Baumberg, N., Baulcombe, D.C. (2005) Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *PNAS*, **102**, 11928–11933.

35. Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., *et al.* (2008) Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5'-terminal nucleotide. *Cell*, **133**, 116–127.
36. Cuperus, J.T., Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., *et al.* (2010) Unique functionality of 22 nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in *Arabidopsis*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17(8)**, 997–1003.
37. Iwakawa, H.O., Tomari, Y. (2013) Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. *Mol. Cell*, **52**, 591–601.
38. Lanet, E., Delannoy, E., Sormani, R., Floris, M., *et al.* (2009) Biochemical evidence for translational repression by *Arabidopsis* microRNAs. *Plant Cell*, **21**, 1762–1768.
39. Cuperus, J.T., Fahlgren, N., Carrington, J.C. (2011) Evolution and functional diversification of *MIRNA* genes. *Plant Cell*, **23**, 431–442.
40. Fahlgren, N., Jogdeo, S., Kasschau, K.D., Sullivan, C.M., *et al.* (2010) MicroRNA gene evolution in *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **22**, 1074–1089.
41. Ma, Z., Coruh, C., Axtell, M.J. (2010) *Arabidopsis lyrata* small RNAs: transient *MIRNA* and small interfering RNA loci within the *Arabidopsis* genus. *Plant Cell*, **22**, 1090–1103.
42. Jagtap, S., Shivaprasad, P.V. (2014) Diversity, expression and mRNA targeting abilities of Argonaute-targeting miRNAs among selected vascular plants. *BMC Genomics*, **15**, 1049.
43. Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., Carrington, J.C. (2005) MicroRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, **121**, 207–221.
44. Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., Zhu, J. (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, **123(7)**, 1279–1291.
45. Fahlgren, N., Montgomery, T.A., Howell, M.D., Allen, E., *et al.* (2006) Regulation of *AUXIN RESPONSE FACTOR3* by *TAS3* ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.*, **16(9)**, 939–944.
46. Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., *et al.* (2006) Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science*, **313**, 68–71.
47. Borges, F., Martienssen, R.A. (2015) The expanding world of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16(12)**, 727–741.
48. Ding, S.W., Voinnet, O. (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, **130(3)**, 413–426.
49. Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., Baulcombe, D.C. (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.*, **21(17)**, 4671–4679.
50. Parent, J., Bouteiller, N., Elmayan, T., Vaucheret, H. (2015) Respective contributions of *Arabidopsis* *DCL2* and *DCL4* to RNA silencing. *Plant J.*, **81**, 223–232.
51. Qu, F., Ye, X., Morris, T.J. (2008) *Arabidopsis* *DRB4*, *AGO1*, *AGO7*, and *RDR6* participate in a *DCL4*-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by *DCL1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14732–14737.

52. Schwach, F., Vaistij, F.E., Jones, L., Baulcombe, D.C. (2005) An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol.*, **138**, 1842–1852.
53. Wang, H., Jiao, X., Kong, X., Hamera, S., *et al.* (2016) A signaling cascade from miR444 to RDR1 in rice antiviral RNA silencing pathway. *Plant Physiol.*, **170**, 2365–2377.
54. Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., *et al.* (2010) *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and Dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during *Turnip Mosaic Virus* infection. *Plant Cell*, **22**, 481–496.
55. Ronemus, M., Vaughn, M.W., Martienssen, R.A. (2006) MicroRNA-targeted and small interfering RNA-mediated mRNA degradation is regulated by Argonaute, Dicer, and RNA-dependent RNA polymerase in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **18**, 1559–1574.
56. Aliyari, R., Ding, S.W. (2009) RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. *Immunol. Rev.*, **227(1)**, 176–188.
57. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409(6818)**, 363–366.
58. Margis, R., Fusaro, A.F., Smith, N.A., Curtin, S.J., *et al.* (2006) The evolution and diversification in plants. *FEBS letters*, **580**, 2442–2450.
59. Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., Filipowicz, W. (2004) Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell*, **118**, 57–68.
60. Gu, S., Jin, L., Huang, F., Zhang, F., Kay, M.A. (2012) Slicing-Independent RISC Activation Requires the Argonaute PAZ Domain. *Curr. Biol.*, **22(16)**, 1536–1542.
61. Matzke, M.A., Mosher, R.A. (2014) RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.*, **15(6)**, 394–408.
62. Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H.L., Poethig, R.S. (2004) SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, **18**, 2368–2379.
63. Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M.Y., Poethig, R.S. (2005) A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, **19**, 2164–2175.
64. Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., *et al.* (2010) Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev.*, **24**, 904–915.
65. Wei, K.F., Wu, L.J., Chen, J., Chen, Y.F., Xie, D.X. (2012) Structural evolution and functional diversification analyses of argonaute protein. *J. Cell Biochem.*, **113(8)**, 2576–2585.
66. Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., *et al.* (1998) AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J.*, **17(1)**, 170–180.
67. Meister, G. (2013) Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.*, **14**, 447–459.
68. Ma, J., Yuan, Y.R., Meister, G., Pei, Y., *et al.* (2005) Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. **434(7033)**, 666–670.

69. Boland, A., Tritschler, F., Heimstätt, S., Izaurralde, E., Weichenrieder, O. (2010) Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. *EMBO Rep.*, **11(7)**, 522–527.
70. Frank, F., Sonenberg, N., Nagar, B. (2010) Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature*, **465(7299)**, 818–822.
71. Parker, J.S. (2010) How to slice: snapshots of Argonaute in action. *Science*, **1**, 3.
72. Parker, J.S., Roe, S.M., Barford, D. (2004) Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J.*, **23**, 4727–4737.
73. Yuan, Y.R., Pei, Y., Ma, J., Kuryavyi, V., *et al.* (2005) Crystal structure of *A. aeolicus* Argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol. Cell*, **19(3)**, 405–419.
74. Sheng, G., Zhao, H., Wang, J., Rao, Y., *et al.* (2014) Structure-based cleavage mechanism of *Thermus thermophilus* Argonaute DNA guide strand-mediated DNA target cleavage. *PNAS*, **111(2)**, 652–657.
75. Ma, J., Ye, K., Patel, D.J. (2004) Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, **429(6989)**, 318–322.
76. Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., *et al.* (2008) Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature*, **456(7224)**, 921–926.
77. Faehnle, C.R., Elkayam, E., Haase, A.D., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L. (2013) The making of a slicer: activation of human Argonaute-1. *Cell Rep.*, **3(6)**, 1901–1909.
78. Kwak, P.B., Tomari, Y. (2012) The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19(2)**, 145–151.
79. Hauptmann, J., Dueck, A., Harlander, S., Pfaff, J., *et al.* (2013) Turning catalytically inactive human Argonaute proteins into active slicer enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20(7)**, 814–817.
80. Hunter, C., Sun, H., Poethig, R.S. (2003) The Arabidopsis heterochronic gene ZIPPY is an ARGONAUTE family member. *Curr. Biol.*, **13**, 1734–1739.
81. Vaucheret, H., Mallory, A.C., Bartel, D.P. (2006) AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Mol. Cell*, **22**, 129–136.
82. Vaucheret, H., Vazquez, F., Créte, P., Bartel, D.P. (2004) The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev.*, **18**, 1187–1197.
83. Cartolano, M., Castillo, R., Efremova, N., Kuckenberg, M., *et al.* (2007) A conserved microRNA module exerts homeotic control over *Petunia hybrida* and *Antirrhinum majus* floral organ identity. *Nat. Genet.*, **39(7)**, 901–905.
84. Combier, J., Frugier, F., Billy, F. de, Boualem, A., *et al.* (2006) MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev.*, **20**, 3084–3088.
85. Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., *et al.* (2008) Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell*, **133**, 128–141.

86. Liu, Q., Yao, X., Pi, L., Wang, H., *et al.* (2009) The ARGONAUTE10 gene modulates shoot apical meristem maintenance and establishment of leaf polarity by repressing miR165/166 in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **58**, 27–40.
87. Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., *et al.* (2011) *Arabidopsis* Argonaute 10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell*, **145(2)**, 242–256.
88. Mallory, A.C., Hinze, A., Tucker, M.R., Bouché, N., *et al.* (2009) Redundant and specific roles of the ARGONAUTE proteins AGO1 and ZLL in development and small RNA-directed gene silencing. *PLoS Genet.*, **5(9)**, e1000646.
89. Carbonell, A., Carrington, J.C. (2015) Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **27**, 111–117.
90. Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., Watanabe, Y. (2008) The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol.*, **49**, 493–500.
91. Schuck, J., Gursinsky, T., Pantaleo, V., Burgyán, J., Behrens, S.E. (2013) AGO/ RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant *in vitro* system. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 5090–5103.
92. Zhang, X., Niu, D.D., Carbonell, A., Wang, A., *et al.* (2014) ARGONAUTE PIWI domain and microRNA duplex structure regulate small RNA sorting in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.*, **5**, 5468.
93. Aukerman, M.J., Sakai, H. (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, **15**, 2730–2741.
94. Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., *et al.* (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, **305**, 1437–1441.
95. Zhang, X., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S., *et al.* (2006) *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.*, **20**, 3255–3268.
96. Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P., Zamore, P.D. (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.*, **17**, 49–63.
97. Moissiard, G., Parizotto, E.A., Himber, C., Voinnet, O. (2007) Transitivity in *Arabidopsis* can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA*, **13**, 1268–1278.
98. Willmann, M.R., Endres, M.W., Cook, R.T., Gregory, B.D. (2011) The functions of RNA-dependent RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book*, **9**, e0146.
99. Zong, J., Yao, X., Yin, J., Zhang, D., Ma, H. (2009) Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene*, **447(1)**, 29–39.
100. Voinnet, O. (2008) Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci.*, **13(7)**, 317–328.
101. Donaire, L., Barajas, D., Martínez-García, B., Martínez-Priego, L., *et al.* (2008) Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *J. Virol.*, **82(11)**, 5167–5177.

102. Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., *et al.* (2000) *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, **101**, 533–542.
103. Yang, S., Carter, S.A., Cole, A.B., Cheng, N., Nelson, R.S. (2004) A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *PNAS*, **101(16)**, 6297–6302.
104. Ding, S.W. (2010) RNA-based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, **10**, 632–644.
105. Jones, J.D.G., Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. **444(16)**, 323–329.
106. Denison, M.R. (2008) Seeking membranes: positive-strand RNA virus replication complexes. *PLoS Biol.*, **6(10)**, e270.
107. Wu, B., Grigull, J., Ore, M.O., Morin, S., White, K.A. (2013) Global organization of a positive-strand RNA virus genome. *PLoS Pathog.*, **9(5)**, e1003363.
108. Novoa, R.R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., *et al.* (2005) Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol. Cell*, **97**, 147–172.
109. Molnar, A., Csorba, T., Lakatos, L., Várallyay, É., *et al.* (2005) Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J. Virol.*, **79(12)**, 7812–7818.
110. Wang, X.B., Jovel, J., Udomporn, P., Wang, Y., *et al.* (2011) 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*, **23**, 1625–1638.
111. Garcia-Ruiz, H., Carbonell, A., Hoyer, J.S., Fahlgren, N., *et al.* (2015) Roles and programming of *Arabidopsis* ARGONAUTE proteins during turnip mosaic virus infection. *PLoS Pathog.*, **11(3)**, e1004755.
112. Zhang, X., Singh, J., Li, D., Qu, F. (2012) Temperature-dependent survival of Turnip Crinkle Virus-infected *Arabidopsis* plants relies on an RNA silencing-based defense that requires DCL2, AGO2, and HEN1. *J. Virol.*, **86(12)**, 6847–6854.
113. Ahlquist, P. (2002) RNA-dependent RNA polymerases, Viruses, and RNA silencing. *Science*, **296**, 1270–1273.
114. Yu, D., Fan, B., MacFarlane, S.A., Chen, Z. (2003) Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **16(3)**, 206–216.
115. Moissiard, G., Voinnet, O. (2004) Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol. Plant Pathol.*, **5(1)**, 71–82.
116. Ratcliff, F., Harrison, B.D., Baulcombe, D.C. (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, **276**, 1558–1560.
117. Voinnet, O. (2005) Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.*, **6(3)**, 206–220.
118. Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., *et al.* (2005) Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiol.*, **138**, 2145–2154.

119. Kim, Y.J., Zheng, B., Yu, Y., Won, S.Y., *et al.* (2011) The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.*, **30**, 814–822.
120. Han, M., Goud, S., Song, L., Fedoroff, N. (2004) The *Arabidopsis* double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *PNAS*, **101(4)**, 1093–1098.
121. Mateos, J.L., Bologna, N.G., Chorostecki, U., Palatnik, J.F. (2010) Identification of MicroRNA processing determinants by random mutagenesis of *Arabidopsis* MIR172a precursor. *Curr. Biol.*, **20**, 49–54.
122. Song, L., Axtell, M.J., Fedoroff, N. (2010) RNA secondary structural determinants of miRNA precursor processing in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.*, **20**, 37–41.
123. Werner, S., Wollmann, H., Schneeberger, K., Weigel, D. (2010) Structure determinants for accurate processing of miR172a in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.*, **20**, 42–48.
124. Park, M.Y., Wu, G., Gonzales-Sulser, A., Vaucheret, H., Poethig, R.S. (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *PNAS*, **102(10)**, 3691–3696.
125. Bologna, N.G., Iselin, R., Abriata, L.A., Sarazin, A., *et al.* (2018) Nucleo-cytosolic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway. *Mol. Cell*, **69**, 709–719.
126. Rose, L.E., Overdijk, E.J.R., van Damme, M. (2019) Small RNA molecules and their role in plant disease. *Eur. J. Plant Pathol.*, **153**, 1–14.
127. Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J., Bartel, D.P. (2006) A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.*, **20**, 3407–3425.
128. Ben Amor, B., Wirth, S., Merchan, F., Laporte, P., *et al.* (2009) Novel long non-protein coding RNAs involved in *Arabidopsis* differentiation and stress responses. *Genome Res.*, **19(1)**, 57–69.
129. Vazquez, F., Blevins, T., Ailhas, J., Boller, T., Meins Jr., F. (2008) Evolution of *Arabidopsis* MIR genes generates novel microRNA classes. *Nucleic Acids Res.*, **36(20)**, 6429–6438.
130. Várallyay, É., Válóczy, A., Agyi, A., Burgyán, J., Havelda, Z. (2010) Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO J.*, **29**, 3507–3519.
131. Gursinsky, T., Pirovano, W., Gambino, G., Friedrich, S., *et al.* (2015) Homeologs of the *Nicotiana benthamiana* antiviral ARGONAUTE1 show different susceptibilities to microRNA168-mediated control. *Plant Physiol.*, **168**, 938–952.
132. Martínez de Alba, A.E., Jauvion, V., Mallory, A.C., Bouteiller, N., Vaucheret, H. (2011) The miRNA pathway limits AGO1 availability during siRNA-mediated PTGS defense against exogenous RNA. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9339–9344.
133. Csorba, T., Kontra, L., Burgyán, J. (2015) Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, **479-480**, 85–103.
134. Csorba, T., Bovi, A., Dalmay, T., Burgyán, J. (2007) The p122 subunit of *Tobacco mosaic virus* replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *J. Virol.*, **81(21)**, 11768–11780.

135. Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T., Masuta, C. (2007) Characterization of silencing suppressor 2b of *Cucumber mosaic virus* based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol.*, **48**, 1050–1060.
136. Silhavy, D., Molnár, A., Lucioli, A., Szittya, G., *et al.* (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.*, **21**, 3070–3080.
137. Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., *et al.* (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.*, **25**, 2768–2780.
138. Merai, Z., Kerényi, Z., Kertész, S., Magna, M., *et al.* (2006) Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J. Virol.*, **80(12)**, 5747–5756.
139. Cuellar, W.J., Kreuze, J.F., Rajamäki, M., Cruzado, K.R., *et al.* (2009) Elimination of antiviral defense by viral RNase III. *PNAS*, **106(25)**, 10354–10358.
140. Giner, A., Lakatos, L., García-Chapa, M., López-Moya, J.J., Burgyán, J. (2010) Viral protein inhibits RISC activity by Argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathog.*, **6(7)**, e1000996.
141. Szabó, E.Z., Manczinger, M., Göblös, A., Kemény, L., Lakatos, L. (2012) Switching on RNA silencing suppressor activity by restoring Argonaute binding to a viral protein. *J. Virol.*, **86(15)**, 8324–8327.
142. Csorba, T., Lózsa, R., Hutvágner, G., Burgyán, J. (2010) Polerovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant J.*, **62**, 463–472.
143. Karran, R.A., Sanfaçon, H. (2014) Tomato ringspot virus coat protein binds to ARGONAUTE 1 and suppresses the translation repression of a reporter gene. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **27(9)**, 933–943.
144. Chiu, M.H., Chen, I.H., Baulcombe, D.C., Tsai, C.H. (2010) The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol. Plant Pathol.*, **11(5)**, 641–649.
145. Várallyay, É., Havelda, Z. (2013) Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Mol. Plant Pathol.*, **14(6)**, 567–575.
146. Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., *et al.* (2008) Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *PNAS*, **105(1)**, 157–161.
147. Okano, Y., Senshu, H., Hashimoto, M., Neriya, Y., *et al.* (2014) In planta recognition of a double-stranded RNA synthesis protein complex by a potexviral RNA silencing suppressor. *Plant Cell*, **26**, 2168–2183.
148. Zhang, X., Du, P., Lu, L., Xiao, Q., *et al.* (2008) Contrasting effects of HC-Pro and 2b viral suppressors from Sugarcane mosaic virus and Tomato aspermy cucumovirus on the accumulation of siRNAs. *Virology*, **374**, 351–360.
149. Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W., Ji, L., *et al.* (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.*, **17(22)**, 6739–6746.

150. Molnár, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., *et al.* (2010) Small silencing RNAs in plants are Mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*, **328**, 872–875.
151. Guo, H.S., Ding, S.W. (2002) A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J.*, **21(3)**, 398–407.
152. Hogle, J.M., Maeda, A., Harrison, S.C. (1986) Structure and assembly of turnip crinkle virus. I. X-ray crystallographic structure analysis at 3.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **191(4)**, 625–638.
153. Russo, M., Burgyán, J., Martelli, G.P. (1994) Molecular biology of tombusviridae. *Adv. Virus Res.*, **44**, 381–428.
154. Hillman, B.I., Hearne, P., Rochon, D., Morris, T.J. (1989) Organization of tomato bushy stunt virus genome: characterization of the coat protein gene and the 3' terminus. *Virology*, **169(1)**, 42–50.
155. Qu, F., Morris, T.J. (2002) Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **15(3)**, 193–202.
156. Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyán, J., Hall, T.M.T. (2003) Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell*, **115**, 799–811.
157. Omarov, R.T., Sparks, K., Smith, L., Zindovic, J., Scholthof, H.B. (2006) Biological Relevance of a Stable Biochemical Interaction between the Tombusvirus-encoded P19 and short interfering RNAs. *J. Virol.*, **80(6)**, 3000–3008.
158. Danielson, D.C., Pezacki, J.P. (2013) Studying the RNA silencing pathway with the p19 protein. *FEBS letters*, **587**, 1198–1205.
159. Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., *et al.* (2010) Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science*, **328(5980)**, 912–906.
160. Ye, K., Malinina, L., Patel, D.J. (2003) Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature*, **426**, 874–878.
161. Cheng, J., Sagan, S.M., Jakubek, Z.J., Pezacki, J.P. (2008) Studies of the interaction of the viral suppressor of RNA silencing protein p19 with small RNAs using fluorescence polarization. *Biochemistry*, **47**, 8130–8138.
162. Cheng, J., Koukikolo, R., Kieliszkiwicz, K., Sagan, S.M., Pezacki, J.P. (2009) Cysteine residues of Carnation italian ringspot virus p19 suppressor of RNA silencing maintain structural integrity and stability for siRNA binding. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1794(8)**, 1197–1203.
163. Cheng, J., Danielson, D.C., Naseri, N., Singaravelu, R., Pezacki, J.P. (2011) Enhanced specificity of the viral suppressor of RNA silencing protein p19 toward sequestering of human microRNA-122. *Biochemistry*, **50(36)**, 7745–7755.
164. Koukikolo, R., Sagan, S.M., Pezacki, J.P. (2007) Effects of pH and salt concentration on the siRNA binding activity of the RNA silencing suppressor protein p19. *FEBS letters*, **581**, 3051–3056.
165. Law, S.M., Zhang, B.W., Brooks, C.L. (2013) pH-sensitive residues in the P19 RNA silencing suppressor protein from carnation Italian ringspot virus affect siRNA binding stability. *Protein Sci.*, **22(5)**, 595–604.

166. Rawlings, R.A., Krishnan, V., Walter, N.G. (2011) Viral RNAi suppressor reversibly binds siRNA to outcompete Dicer and RISC via multiple turnover. *J. Mol. Biol.*, **408**, 262–276.
167. Xia, Z., Zhu, Z., Zhu, J., Zhou, R. (2009) Recognition mechanism of siRNA by viral p19 suppressor of RNA silencing: a molecular dynamics study. *Biophys. J.*, **96**, 1761–1769.
168. Danielson, D.C., Filip, R., Powdrill, M.H., O'Hara, S., Pezacki, J.P. (2015) Suppressing RNA silencing with small molecules and the viral suppressor of RNA silencing protein p19. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **463(4)**, 1135–1140.
169. Ramnani, P., Gao, Y., Ozsoz, M., Mulchandani, A. (2013) Electronic detection of microRNA at attomolar level with high specificity. *Anal. Chem.*, **85(17)**, 8061–8064.
170. Sagan, S.M., Koukietolo, R., Rodgers, E., Goto, N.K., Pezacki, J.P. (2007) Inhibition of siRNA binding to a p19 viral suppressor of RNA silencing by cysteine alkylation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **46(12)**, 2005–2009.
171. Liu, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Liu, D., *et al.* (2015) Functional analysis of RNAi suppressor P19 on improving baculovirus yield and transgene expression in Sf9 cells. *Biotechnol. Lett.*, **37**, 2159–2166.
172. Szittyá, G., Molnár, A., Silhavy, D., Hornyik, C., Burgyán, J. (2002) Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *Plant Cell*, **14**, 359–372.
173. Pantaleo, V., Szittyá, G., Burgyán, J. (2007) Molecular bases of viral RNA targeting by viral small interfering RNA-programmed RISC. *J. Virol.*, **81**, 3797–3806.
174. Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., Burgyán, J. (2004) Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J.*, **23**, 876–884.
175. Dalmay, T., Rubino, L., Burgyán, J., Kollár, A., Russo, M. (1993) Functional analysis of Cymbidium ringspot virus genome. *Virology*, **194**, 697–704.
176. Scholthof, H.B., Scholthof, K.G., Kikkert, M., Jackson, A.O. (1995) Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology*, **213**, 425–438.
177. White, K.A., Nagy, P.D. (2004) Advances in the molecular biology of Tombusviruses: gene expression, genome replication, and recombination. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **78**, 187–226.
178. Allison, J.R., Lechner, M., Hoepfner, M.P., Poole, A.M. (2016) Positive selection or free to vary? Assessing the functional significance of sequence ChangeUsingMolecularDynamics. *PLoS One*, **11(2)**, e0147619.
179. Uhrig, J.F., Canto, T., Marshall, D., MacFarlane, S.A. (2004) Relocalization of nuclear ALY proteins to the cytoplasm by the Tomato bushy stunt virus p19 pathogenicity protein. *Plant Physiol.*, **135**, 2411–2423.
180. Park, J., Faure-Rabasse, S., Robinson, M.A., Desvoyes, B., Scholthof, H.B. (2004) The multifunctional plant viral suppressor of gene silencing p19 interacts with itself and an RNA binding host protein. *Virology*, **323**, 49–58.

181. Lózsa, R., Csorba, T., Lakatos, L., Burgyán, J. (2008) Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins. *Nucleic Acids Res.*, **36(12)**, 4099–4107.
182. Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., *et al.* (2003) P1/HC-Pro, a Viral Suppressor of RNA Silencing, Interferes with Arabidopsis Development and miRNA Function. *Dev. Cell*, **4(2)**, 205–217.
183. Chapman, E.J., Prokhnevsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V., Carrington, J.C. (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.*, **18**, 1179–1186.
184. Lewsey, M., Surette, M., Robertson, F.C., Ziebell, H., *et al.* (2009) The role of the *Cucumber mosaic virus 2b* protein in viral movement and symptom induction. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **22(6)**, 642–654.
185. Jay, F., Wang, Y., Yu, A., Taconnat, L., *et al.* (2011) Misregulation of AUXIN RESPONSE FACTOR 8 underlies the developmental abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in *Arabidopsis*. *PLoS Pathog.*, **7(5)**, e1002035.
186. Dunoyer, P., Lecellier, C., Parizotto, E.A., Himber, C., Voinnet, O. (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell*, **16**, 1235–1250.
187. Schott, G., Mari-Ordonez, A., Himber, C., Alioua, A., *et al.* (2012) Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. *EMBO J.*, **31(11)**, 2553–2565.
188. Iki, T., Cléry, A., Bologna, N.G., Sarazin, A., *et al.* (2018) Structural Flexibility Enables Alternative Maturation, ARGONAUTE Sorting and Activities of miR168, a Global Gene Silencing Regulator in Plants. *Mol. Plant*, 1–16.
189. Stav, R., Hendelman, A., Buxdorf, K., Arazi, T. (2010) Transgenic expression of tomato bushy stunt virus silencing suppressor P19 via the pOp/LhG4 transactivation system induces viral-like symptoms in tomato. *Virus Genes*, **40**, 119–129.
190. Chu, M., Desvoyes, B., Turina, M., Noad, R., Scholthof, H.B. (2000) Genetic dissection of Tomato bushy stunt virus p19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic invasion. *Virology*, **266**, 79–87.
191. Várallyay, É., Oláh, E., Havelda, Z. (2013) Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity. *Nucleic Acids Res.*, **42(1)**, 599–608.
192. Kontra, L., Csorba, T., Tavazza, M., Lucoli, A., *et al.* (2016) Distinct effects of p19 RNA silencing suppressor on small RNA mediated pathways in plants. *PLoS Pathog.*, **12(10)**, e1005935.
193. Pantaleo, V., Vitali, M., Boccacci, P., Miozzi, L., *et al.* (2016) Novel functional microRNAs from virus-free and infected *Vitis vinifera* plants under water stress. *Sci. Rep.*, **6**, 20167.
194. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, **25**, 402–408.
195. Riechmann, L., Lavenir, I., Bono, S., de Winter, G. (2005) Folding and stability of a primitive protein. *J. Mol. Biol.*, **348(5)**, 1261–1272.

196. Nesterenko, M.V., Tilley, M., Upton, S.J. (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys.*, **28(3)**, 239–242.
197. Komoda, K., Naito, S., Ishikawa, M. (2004) Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1863–1867.
198. Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M.C., *et al.* (2010) *In vitro* assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol. Cell*, **39**, 282–291.
199. Gursinsky, T., Schulz, B., Behrens, S.E. (2009) Replication of *Tomato bushy stunt virus* RNA in a plant *in vitro* system. *Virology*, **390**, 250–260.
200. Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A., Lommel, S.A. (2008) *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **21(8)**, 1015–1026.
201. Cherif, C., Spire, D. (1983) Identification du virus de rabougrissement buissoneux de la tomate (tomato bushy stunt virus) en Tunisie sur tomate, piment et aubergine: Quelques caractéristiques de la souche tunisienne. *Agronomie*, **3**, 701–706.
202. Huang, H., Qiao, R., Zhao, D., Zhang, T., *et al.* (2009) Profiling of mismatch discrimination in RNAi enabled rational design of allele-specific siRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 7560–7569.
203. Rüter, A. de, Zagrovic, B. (2015) Absolute binding-free energies between standard RNA/DNA nucleobases and amino-acid sidechain analogs in different environments. *Nucleic Acids Res.*, **43(2)**, 708–718.
204. Tang, S., Wang, Y., Li, Z., Gui, Y., *et al.* (2012) Identification of wounding and topping responsive small RNAs in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *BMC Plant Biol.*, **12**, 28.
205. Pertermann, R., Tamilarasan, G., Gursinsky, T., Gambino, G., *et al.* (2018) A viral suppressor modulates the plant immune response early in infection by regulating microRNA activity. *mBio*, **9**, e00419-18.
206. Chen, H.Y., Yang, J., Lin, C., Yuan, Y.A. (2008) Structural basis for RNA-silencing suppression by *Tomato aspermy virus* protein 2b. *EMBO Rep.*, **9(8)**, 754–760.
207. Liu, X., Houzet, L., Jeang, K. (2012) Tombusvirus p19 RNA silencing suppressor (RSS) activity in mammalian cells correlates with charged amino acids that contribute to direct RNA-binding. *Cell and Biosci.*, **2**, 41.
208. Hsieh, Y., Omarov, R.T., Scholthof, H.B. (2009) Diverse and newly recognized effects associated with short interfering RNA binding site modifications on the Tomato bushy stunt virus p19 silencing suppressor. *J. Virol.*, **83(5)**, 2188–2200.
209. Scholthof, H.B., Alvarado, V.Y., Vega-Arreguin, J.C., Ciomperlik, J.J., *et al.* (2011) Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.*, **156**, 1548–1555.

7. Anhang

7.1 Immunpräzipitation von sRNAs aus dem BYL durch p19 mit Zusatz von *TBSV*-RNA

Analog zu der in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Immunpräzipitation kleiner RNAs aus dem BYL wurde eine weitere IP unter Zusatz von genomischer RNA des *TBSV* durchgeführt. Im Vorfeld der RNA-Extraktion aus dem BYL wurden je 0,5 µg genomische RNA des Virus 20 µl Lysat zugesetzt und für 2 h bei 25 °C inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach der in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Methodik.

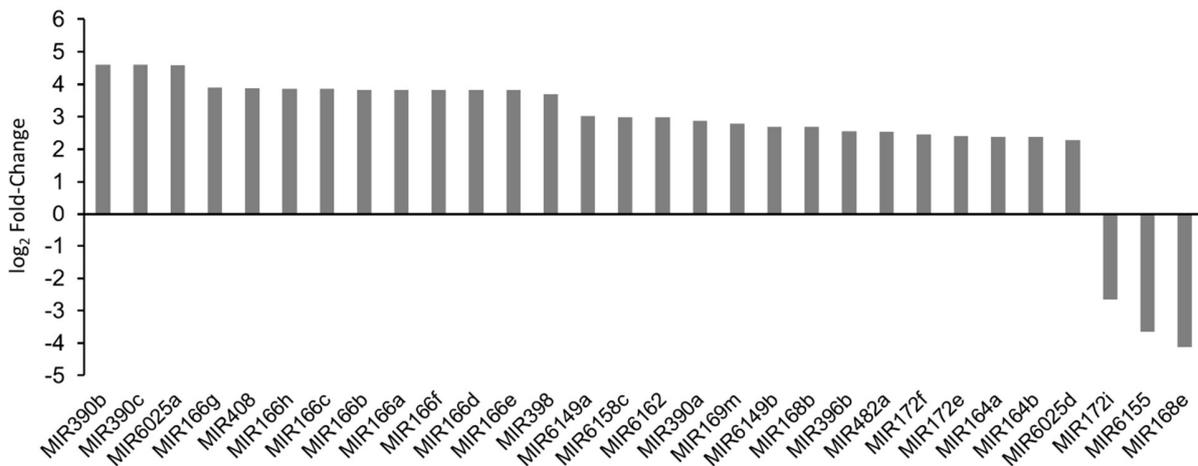


Abbildung 7.1: Ergebnisse der p19-Immunpräzipitation (IP) aus dem BYL unter Zusatz von *TBSV*-RNA. Die sequenzierten kleinen RNAs wurden zu *precursor*-Sequenzen von miRNAs aus *N. tabacum* zugeordnet und anschließend quantifiziert. Nach Vergleich dieser Zuordnungen nach der IP mit den *input*-Sequenzen ergaben sich Anreicherungen sowie weniger abundante Sequenzen. Dargestellt sind alle Abundanzveränderungen, welche durch Bestimmung der *false discovery rate* (FDR) als signifikant (FDR<0,05) gekennzeichnet wurden. Das Experiment wurde mit drei Chargen des BYL durchgeführt. Aus 162 annotierten und zugeordneten Sequenzen lagen 27 angereichert und 3 weniger abundant nach der IP vor.

7.2 Signalamplituden der Bindeexperimente von *CIRV*-p19 an *gf698*, *miR162*, *miR168* und *miR403*

Neben den in Abschnitt 3.1.3 beschriebenen unterschiedlichen Affinitäten der verschiedenen Modell-RNAs an *CIRV*-p19 unterschieden sich in diesen Experimenten ebenso die dabei erreichten maximalen Signalstärken (Amplituden) voneinander (siehe Abbildung 7.2). Damit gemeint ist also das gemessene Signal für die maximal erreichte, relative Bandenintensität einer RNA-p19-Bande in der jeweiligen EMSA-Messung (siehe auch Abschnitt 2.2.3.9.4).

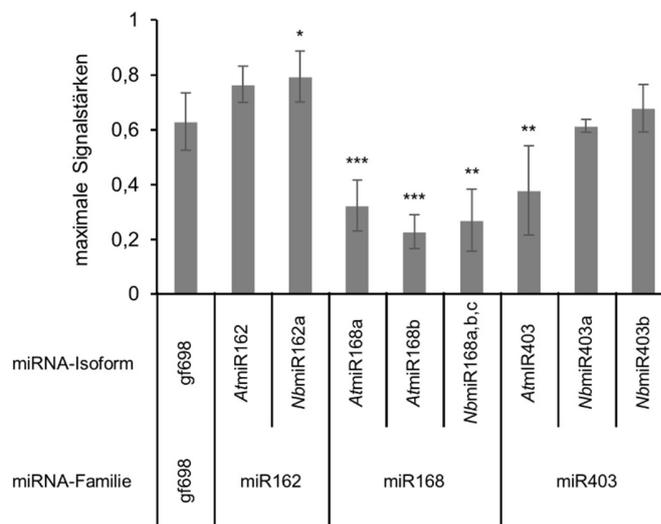


Abbildung 7.2: Maximale Signalstärken verschiedener miRNA-Isoformen bei Bindung an *CIRV*-p19. Aufgetragen sind die maximalen Signalstärken aus den Bindeexperimenten (siehe Abbildung 3.4). Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zum Referenz-Signal der *gf698* assoziiert an *CIRV*-p19 (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). Das *NbmiR162a*-Signal ist dabei signifikant größer, alle anderen gekennzeichneten signifikant kleiner.

Auffällig ist, dass alle miRNAs stark erniedrigter Affinität zu *CIRV*-p19 auch signifikant kleinere Amplituden im Vergleich zu der der *gf698*-Referenz aufwiesen. Bei allen miRNA-Isoformen mit hoher Affinität zu p19 wurden Amplituden von mindestens gleicher Höhe gemessen. Die *NbmiR162a*-Isoform wies dabei eine erhöhte maximale Signalstärke auf. Die unterschiedlichen Signalstärken in direkten Bindestudien von *CIRV*-p19 mit verschiedenen miRNAs bildeten die Grundlage für die Experimente im BYL in Abschnitt 3.3.2.2.

7.3 Weitere Mengenbestimmungen von RNA-Molekülen und AGO1 in *CymRSV*-infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen

In Abschnitt 3.2.2 wurden Versuchen *in vivo* durchgeführt, bei denen *N. benthamiana*-Pflanzen mit *CymRSV* infiziert wurden. Dabei wurden 2 dpi und 4 dpi miRNA-Mengen und mRNA-Mengen quantifiziert. Außerdem wurden auch die Mengen an viraler genomischer RNA und vsiRNAs quantifiziert. Dies geschah über qRT-PCR (virales Genom) oder Northern-Blot (vsiRNAs) zu beiden Zeitpunkten der Probenahme (siehe Abbildung 7.3). Zum Beurteilen der Auswirkungen von Sequestrierungen von miRNAs durch *CymRSV*-p19 auf die Genexpression ist es sinnvoll, die Mengen der durch die regulierten Gene codierten Proteine zu bestimmen. Jedoch waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit keinerlei Antikörper für *NbDCL1* oder *NbAGO2* verfügbar. Daher konnte lediglich die *NbAGO1*-Mengen durch Immundetektion quantifiziert werden (siehe Abbildung 7.3).

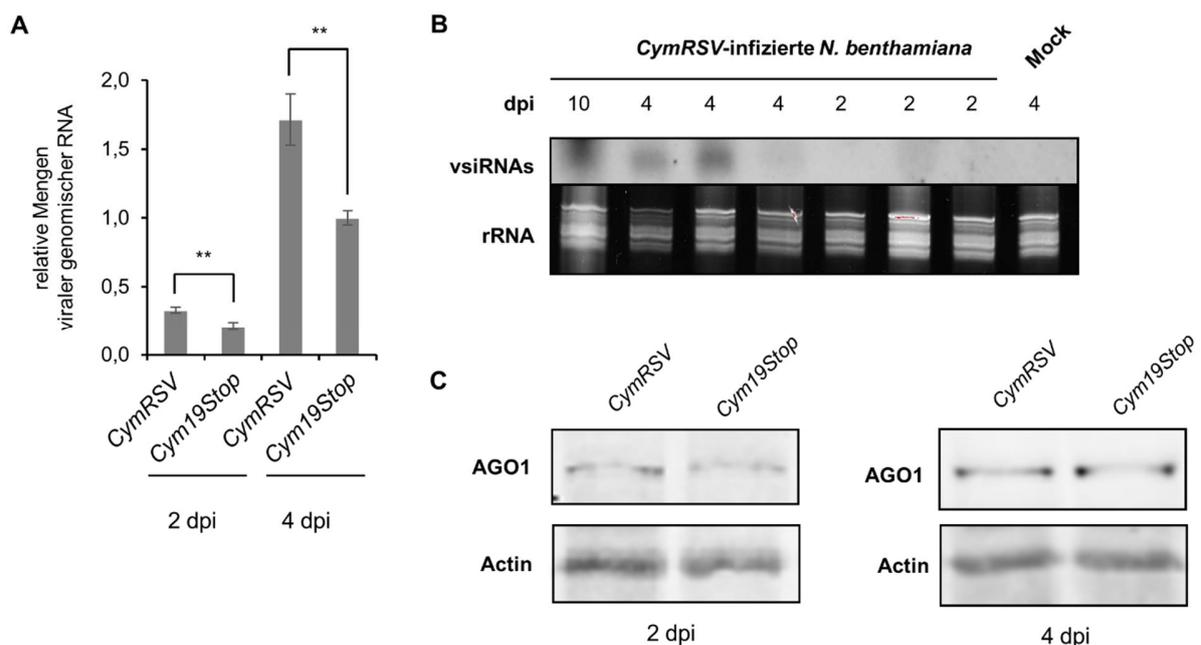


Abbildung 7.3: Mengenbestimmungen von viralen RNAs und AGO1 in *CymRSV*-infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen 2 dpi und 4 dpi. Dargestellt sind die Ergebnisse verschiedener Quantifizierungen aus den in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Infektionsexperimenten, welche als Kontrollbestimmungen Relevanz aufweisen. (A) Ermittlung der relativen Abundanz der viralen genomischen RNA in den Infektionsexperimenten zu beiden Zeitpunkten per qRT-PCR. Die Bestimmung erfolgte wie die der mRNA-Mengen im gleichen Abschnitt. Als Referenzgen wurde Cyclophilin (CPH) verwendet. Die Sterne kennzeichnen signifikante ($p \leq 0,01$) Unterschiede in den RNA-Mengen. (B) Northern-Blot-Analysen der vsiRNA-Mengen in den Infektionsexperimenten nach 2, 4 und 10 dpi. Die Ladekontrollen stellen ribosomale RNAs dar. (C) Immunnachweise von *NbAGO1-1* während der Infektionsexperimente 2 dpi und 4 dpi. Die entsprechenden, quantifizierten Signale sind jeweils in etwa identisch.

Wie in Abbildung 7.3 (A) zu sehen ist, lag zu jeder Probennahme mehr genomische, virale RNA in *CymRSV*-infizierten als in *Cym19Stop*-infizierten Pflanzen vor. Dieses Missverhältnis war nach 4 dpi stärker ausgeprägt (Verhältnis der Mengen der genomischen RNA *CymRSV/Cym19Stop*: 1,57 2 dpi und 1,72 4 dpi). Erst zu diesem späten Zeitpunkt sind Akkumulationen von endogenen mRNAs aufgrund Verstärkungen der Transkription beschrieben, welche mit der Abundanz der viralen RNA in Verbindung stehen [131]. 2 dpi war die Gesamtmenge an viraler, genomischer RNA sehr gering im Vergleich zu 4 dpi (jeweils ca. 20 %). Zudem konnten 2 dpi vsiRNAs nicht regelmäßig nachgewiesen werden (Abbildung 7.3 (B)), sodass auch deren Einfluss auf das experimentelle Ergebnis als minimal angenommen wird. Abbildung 7.3 (C) zeigt zudem die in [130] beschriebene stabile Abundanz der *NbAGO1*-Proteine. Damit wurde auch deutlich, dass die in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Steigerungen der *AGO2*- und *DCL1*-mRNA-Mengen nicht durch die unterschiedlichen *AGO1*-Mengen, sondern durch die Menge an frei verfügbaren miRNAs erhalten wurden.

7.4 Daten der Charakterisierungen der miRNA-Varianten bei der Bindung durch *CIRV*-p19

Die Ermittlung von Determinanten für die Diskriminierung von verschiedenen miRNAs durch *CIRV*-p19 wurde in den Abschnitten 3.3.1.2 und 3.3.1.3 in Form von Säulendiagrammen (Abbildungen 3.14 und 3.15) dargestellt. Um diese Daten genauer bewerten zu können, erfolgt hier eine Neudarstellung dieser Daten in tabellarischer Form.

Tabelle 7.1: Bindeaffinitäten der artifiziellen miR162-Varianten an *CIRV*-p19 (entspricht den Daten aus Abbildung 3.14).

miRNA-Name	Position der Veränderung zu miR162-0	Basenpaar in miR162-0	neues Basenpaar	K _D (nM)
miR162 (wt, <i>At</i>)	-	-	-	0,07 ± 0,03
miR162-0	-	-	-	0,15 ± 0,06
miR162-19 ⁺ C/1 [*] C	19 ⁺ /1 [*]	C ⁺ /G [*]	C ⁺ /C [*]	0,34 ± 0,15
miR162-19 ⁺ U/1 [*] G	19 ⁺ /1 [*]	C ⁺ /G [*]	U ⁺ /G [*]	0,15 ± 0,12
miR162-18 ⁺ C/2 [*] C	18 ⁺ /2 [*]	C ⁺ /G [*]	C ⁺ /C [*]	0,12 ± 0,08
miR162-18 ⁺ U/2 [*] G	18 ⁺ /2 [*]	C ⁺ /G [*]	U ⁺ /G [*]	0,13 ± 0,03
miR162-17 ⁺ U/3 [*] C	17 ⁺ /3 [*]	U ⁺ /A [*]	U ⁺ /C [*]	0,30 ± 0,17
miR162-17 ⁺ U/3 [*] G	17 ⁺ /3 [*]	U ⁺ /A [*]	U ⁺ /G [*]	0,09 ± 0,04
miR162-16 ⁺ A/4 [*] G	16 ⁺ /4 [*]	A ⁺ /U [*]	A ⁺ /G [*]	0,38 ± 0,13
miR162-16 ⁺ U/4 [*] G	16 ⁺ /4 [*]	A ⁺ /U [*]	U ⁺ /G [*]	0,17 ± 0,05
miR162-15 ⁺ C/5 [*] C	15 ⁺ /5 [*]	C ⁺ /G [*]	C ⁺ /C [*]	0,23 ± 0,08

miR162-15 ⁺ U/5 [*] G	15 ⁺ /5 [*]	C ⁺ /G [*]	U ⁺ /G [*]	0,10 ± 0,01
miR162-14 ⁺ G/6 [*] A	14 ⁺ /6 [*]	G ⁺ /C [*]	G ⁺ /A [*]	0,86 ± 0,49
miR162-14 ⁺ U/6 [*] G	14 ⁺ /6 [*]	G ⁺ /C [*]	U ⁺ /G [*]	0,45 ± 0,08
miR162-14 ⁺ G/6 [*] U	14 ⁺ /6 [*]	G ⁺ /C [*]	G ⁺ /U [*]	0,16 ± 0,09
miR162-13 ⁺ U/7 [*] C	13 ⁺ /7 [*]	U ⁺ /A [*]	U ⁺ /C [*]	1,01 ± 0,10
miR162-13 ⁺ U/7 [*] G	13 ⁺ /7 [*]	U ⁺ /A [*]	U ⁺ /G [*]	1,83 ± 0,38
miR162-13 ⁺ G/7 [*] U	13 ⁺ /7 [*]	U ⁺ /A [*]	G ⁺ /U [*]	1,53 ± 0,49
miR162-12 ⁺ C/8 [*] C	12 ⁺ /8 [*]	C ⁺ /G [*]	C ⁺ /C [*]	0,28 ± 0,24
miR162-12 ⁺ G/8 [*] G	12 ⁺ /8 [*]	C ⁺ /G [*]	G ⁺ /G [*]	0,07 ± 0,04
miR162-12 ⁺ C/8 [*] A	12 ⁺ /8 [*]	C ⁺ /G [*]	C ⁺ /A [*]	0,16 ± 0,03
miR162-12 ⁺ U/8 [*] G	12 ⁺ /8 [*]	C ⁺ /G [*]	U ⁺ /G [*]	1,93 ± 0,13
miR162-12 ⁺ G/8 [*] U	12 ⁺ /8 [*]	C ⁺ /G [*]	G ⁺ /U [*]	0,31 ± 0,09
miR162-11 ⁺ U/9 [*] C	11 ⁺ /9 [*]	U ⁺ /A [*]	U ⁺ /C [*]	0,22 ± 0,03
miR162-11 ⁺ U/9 [*] G	11 ⁺ /9 [*]	U ⁺ /A [*]	U ⁺ /G [*]	0,15 ± 0,13
miR162-10 ⁺ C/10 [*] C	10 ⁺ /10 [*]	C ⁺ /G [*]	C ⁺ /C [*]	1,73 ± 0,57
miR162-10 ⁺ C/10 [*] A	10 ⁺ /10 [*]	C ⁺ /G [*]	C ⁺ /A [*]	0,35 ± 0,24
miR162-10 ⁺ U/10 [*] G	10 ⁺ /10 [*]	C ⁺ /G [*]	U ⁺ /G [*]	0,63 ± 0,21

Tabelle 7.2: Bindeaffinitäten der artifiziellen miR168-Varianten an *CIRV*-p19 (entspricht den Daten aus Abbildung 3.15).

miR168-Variante	Veränderungen zur miR168 (wt, <i>Afa</i>)	K _D (nM)
<i>AtmiR168a</i>	-	2,29 ± 0,78
miR168-Variante 1	Austausch 13 ⁺ G/7 [*] U gegen G ⁺ /C [*]	3,13 ± 1,68
miR168-Variante 2	Austausch 8 ⁺ G/12 [*] U gegen G ⁺ /C [*]	0,70 ± 0,29
miR168-Variante 3	Austausche 13 ⁺ G/7 [*] U und 8 ⁺ G/12 [*] U gegen G ⁺ /C [*]	1,00 ± 0,24
miR168-Variante 4	Austausch 13 ⁺ G/7 [*] U gegen G ⁺ /C [*] ; Eliminierung der Basenfehlpaarungen auf Positionen 4 ⁺ /16 [*] und 15 ⁺ /5 [*]	2,66 ± 0,49
miR168-Variante 5	Austausch 8 ⁺ G/12 [*] U gegen G ⁺ /C [*] ; Eliminierung der Basenfehlpaarungen auf Positionen 4 ⁺ /16 [*] und 15 ⁺ /5 [*]	0,49 ± 0,17
miR168-Variante 6	siRNA-Variante der <i>AtmiR168a</i>	0,35 ± 0,16

7.5 Stabilitätsmessungen einiger miRNA-Varianten durch Schmelzkurvenbestimmung

In Abschnitt 3.3.1.2 konnte durch Bindestudien von *CIRV*-p19 an artifizielle miR162-Varianten unter anderem die Basenpaarregion 7/13 bis 8/12 im Allgemeinen und ein G-U-*wobble* der Orientierung 8G/12U im Speziellen als molekulare Determinanten zur miRNA-Diskriminierung durch *CIRV*-p19 ermittelt werden. Um ausschließen zu können, dass durch Erstellen der artifiziellen miR162-Varianten instabile RNA-Duplex-Moleküle, bei denen große Teile des Doppelstranges ungepaart vorliegen, kreierte wurden und diese dann zu den beobachteten schwächeren Bindungen führen, wurden die miR162-Varianten mit Nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen an den Positionen 13⁺/7^{*} und 12⁺/8^{*} Schmelzpunktanalysen (siehe Abschnitt

2.2.2.9) unterworfen. Dabei wurde eine miRNA-enthaltende Lösung von 20 °C auf 90 °C erhitzt und die Absorption bei 268 nm dokumentiert (Denaturierungsvorgang, Schmelzkurve). Im Anschluss wurde die Probenlösung mit derselben Geschwindigkeit abgekühlt und die Absorption ebenso dokumentiert (Renaturierungsvorgang, Hybridisierungskurve). Aus den so erhaltenen Graphen (Auftragungen der Absorption gegen die Temperatur) ließen sich thermodynamische Parameter errechnen (siehe Abschnitt 2.2.2.9). Die ermittelten Graphen wiesen dabei einen zweiphasigen Verlauf auf (siehe Abbildung 7.4 (A)). Da empirische Messungen ergaben, dass lediglich die Transitionen niedriger Temperaturen eine Variabilität aufwiesen (nicht gezeigt), wurde angenommen, dass diese die unterschiedlichen Doppelstrangstabilitäten bei unterschiedlichen miR162-Varianten widerspiegeln. Unter Annahme einer hier unimolekularen Entfaltung/Faltung konnten für diese Übergänge die Schmelztemperaturen (T_M ; siehe Abbildung 7.4 (B)) und Faltungs-/Entfaltungs-Enthalpien (ΔH , siehe Abbildung 7.4 (C)) ermittelt werden.

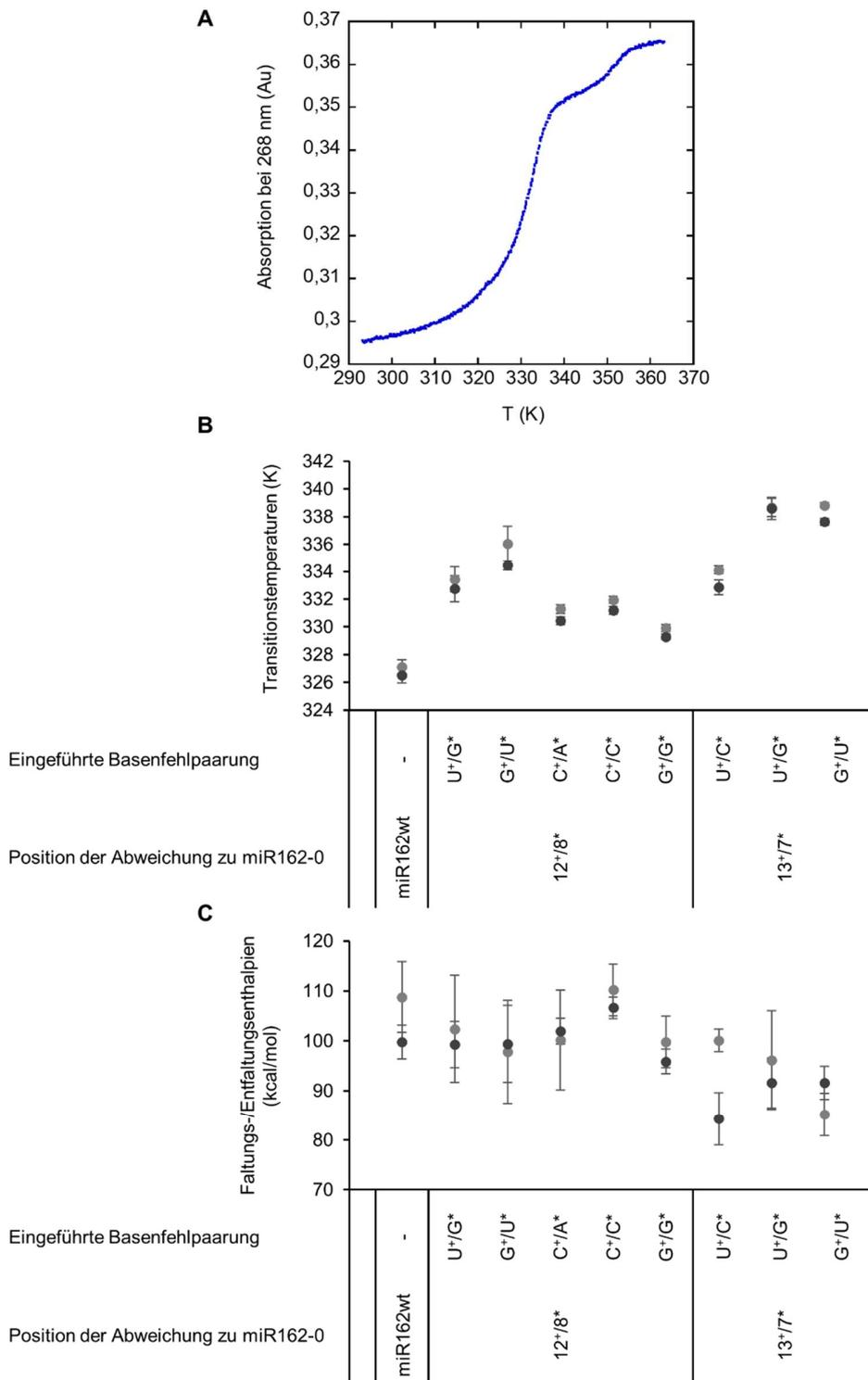


Abbildung 7.4: Darstellung der Ergebnisse der Schmelzpunktanalysen mir artifiziiellen miR162-Varianten. (A) Beispielhafte Darstellung einer zweiphasigen Denaturierungskurve einer artifiziiellen miRNA (hier: miR162-12⁺U/8^{*}G). (B) Ermittelte Transitionstemperaturen bei Denaturierungsmessungen (hellgrau) und Renaturierungsmessungen (dunkelgrau) einiger miRNAs. Aufgetragen sind jeweils die Schmelztemperaturen der Transition der niedrigeren Temperatur. (C) Die zu (B) zugehörigen ermittelten Faltungs-/Entfaltungsenthalpien (ΔH). Die Fehlerbalken stehen für Standardabweichungen nach mindestens drei Messungen.

Wie in Abbildung 7.4 zu erkennen ist, waren Unterschiede in den Daten aus Entfaltungs- und Faltungsvorgängen zu beobachten. Diese waren jedoch im Vergleich zu den Unterschieden der Datensätze zwischen verschiedenen miR162-Varianten zumeist klein und wurden daher nicht als relevant eingestuft. Es konnte kein Zusammenhang zwischen einer Destabilisierung von miR162-Duplex-Molekülen und einer erniedrigten Affinität an *CIRV*-p19 festgestellt werden. Die hier getesteten Varianten der miR162 mit einem K_D -Wert oberhalb von 1 nM (miR162-12^U/8^G, miR162-13^U/7^G, miR162-13^G/7^U und miR162-13^U/7^C) wiesen keine erniedrigten Schmelztemperaturen im Vergleich zu den anderen Varianten auf (siehe Abbildung 7.4 (B)). Für die ermittelten Enthalpien der Schmelz- oder Hybridisierungsübergänge konnte aufgrund der großen Streuung der Daten kein eindeutiges Bild ermittelt werden. Niedrige Werte, welche auf instabile RNA-Duplex-Moleküle hindeuten, konnten zwar für alle Varianten mit verändertem Basenpaar auf Position 13^U/7^{*} ermittelt werden, jedoch waren diese wegen der großen Varianz der Daten nicht signifikant verschieden voneinander. Auf eine anschließende Berechnung der Entropieänderungen an den Schmelzpunkten wurde aufgrund der Streuung der Werte verzichtet.

7.6 *In-vitro*-Translationen der p19-Varianten im BYL

Um die in Abschnitt 3.3.2 bearbeiteten Varianten des *CIRV*-p19 indikativ auf ihr Bindungsverhalten an verschiedene miRNAs zu untersuchen, wurden diese im BYL *in vitro* translatiert und auf ihre Interaktion mit [³²P]-markierten miR162 und miR168 untersucht (siehe Abschnitt 3.3.2.2). Die so gewonnenen Ergebnisse sind jedoch nur aussagekräftig bei vergleichbaren Mengen an bereitgestellten *CIRV*-p19-Varianten im BYL. Durch Testtranslationen unter Anwesenheit von [³⁵S]-L-Methionin sollten gleichmäßige Translationseffizienzen nachgewiesen werden. Die so erhaltenen BYL-Reaktionsansätze mit [³⁵S]-L-Methionin-markierten p19-Varianten wurden daraufhin einer SDS-PAGE unterzogen und die Signalstärken mittels Autoradiographie quantifiziert (siehe Abbildung 7.5). Es ist zu erkennen, dass alle p19-Varianten mit gleichmäßiger Abundanz in den Reaktionsansätzen vorlagen.

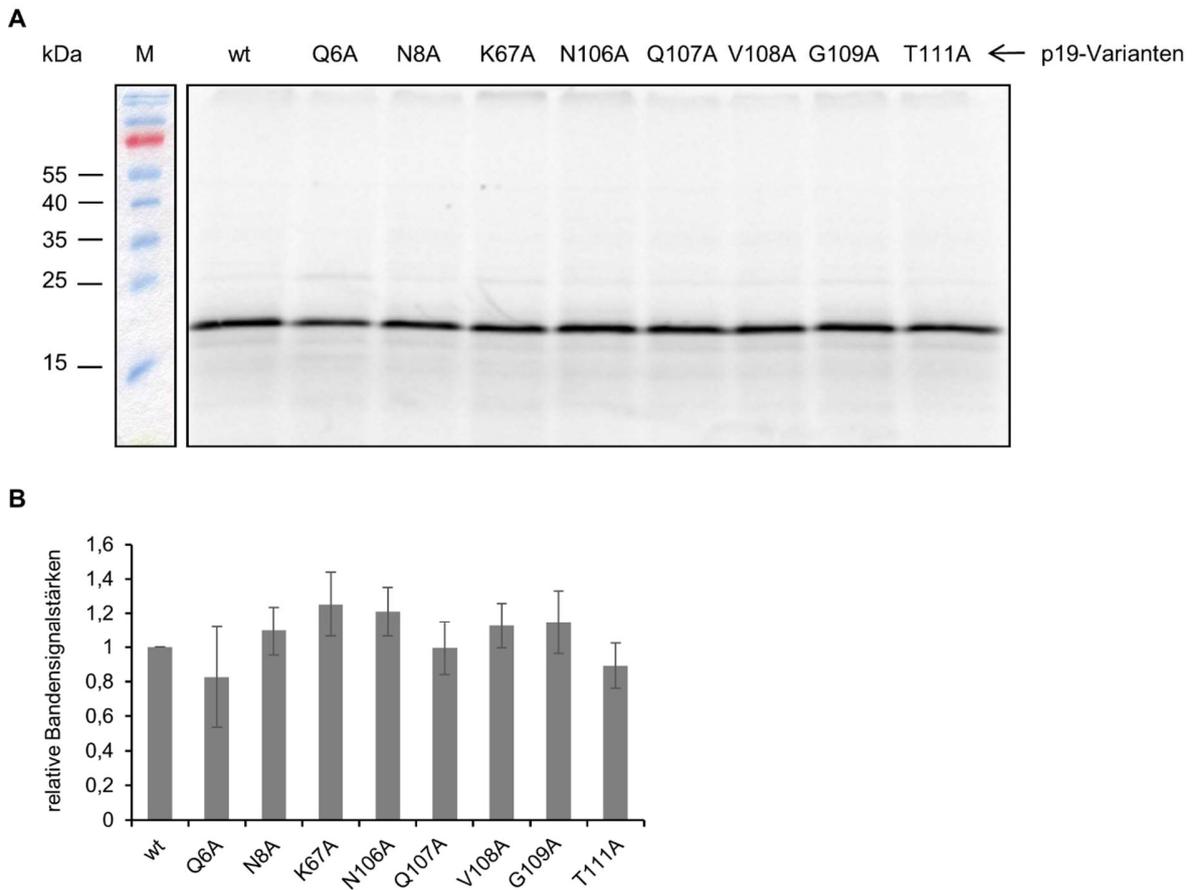


Abbildung 7.5: *In-vitro*-Translation der p19-Varianten im BYL. (A) Beispielhafte Darstellung eines Autoradiogramms der *in vitro* translatierten p19-Varianten im BYL nach der SDS-PAGE. (B) Diagramm zur Darstellung der ermittelten Signalstärken aus Autoradiogrammen wie in (A) nach drei Versuchen mit Standardabweichungen. Dabei wurde das p19-wt-Signal in jeder Durchführung auf 1 gesetzt. Es gab keine signifikanten Abweichungen in den Signalstärken der Banden zueinander.

7.7 Circular dichroismus-Messungen von p19-Varianten

In Abschnitt 3.3.2.3 wurden einige p19-Varianten mit Alanin-Austauschen in der Primärstruktur *in vitro* biochemisch untersucht. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, ist es jedoch unabdingbar sicherzustellen, dass diese Veränderungen in der Primärstruktur keinen Einfluss auf die strukturelle Stabilität des p19-Proteins ausüben. Dafür wurden die rekombinant produzierten p19-Varianten nach der Reinigung Circular dichroismus-Messungen (CD-Messungen) unterworfen (siehe Abschnitt 2.2.3.7), um die jeweiligen Anteile der Sekundärstrukturen vergleichend zu überprüfen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 7.6 dargestellt.

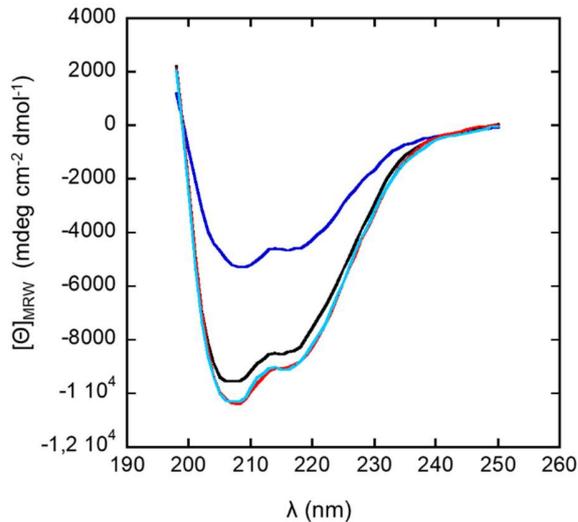


Abbildung 7.6: CD-Spektren der p19-Varianten: Q107A (Blau), V108A (Rot), G109A (Cyan) und Wildtyp (Schwarz). Dargestellt sind gemittelte Werte von jeweils drei bis vier unabhängig aufgenommenen Datensätzen pro p19-Variante.

Wie zu erkennen ist, weisen alle p19-Varianten mit Ausnahme der Variante Q107A ähnliche CD-Spektren wie die Wildtyp-Variante des *CIRV*-p19 auf. Tabelle 7.3 enthält die aus diesen CD-Spektren mittels des „BeStSel“-online-Werkzeugs (<http://bestsel.elte.hu/>) errechneten Zusammensetzungen der Sekundärstrukturen der p19-Varianten.

Tabelle 7.3: Zusammensetzungen der Sekundärstrukturen der p19-Varianten ermittelt mit Hilfe von „BeStSel“ aus den in Abbildung 7.6 dargestellten CD-Spektren

<i>CIRV</i> -p19-Variante	α -helicaler Anteil in %	β -Faltblatt-Anteil in %	β -turn-Anteil in %
wt	10,6	28,4	11,1
p19-Q107A	8,2	35,8	12,3
p19-V108A	15,6	28,0	10,5
p19-G109A	10,9	28,9	10,9

Die Anwendung des „BeStSel“-Algorithmus ergab für alle p19-Varianten ähnliche Anteile der Sekundärstrukturen. Abweichungen dabei wurden, jedoch mit Ausnahme der von p19-Q107A, dessen Signalamplitude des CD-Spektrums sich stark von denen der anderen Varianten unterschied, als irrelevant angenommen. So schien zwar bei den α -helicalen Anteilen die stärkste Abweichung bei p19-V108A vorzuliegen. Jedoch war deren CD-Kurve nahezu identisch mit p19-G109A (siehe Abbildung 7.6).

7.8 miRNA-EMSA-Versuche mit p19-Varianten

Im Verlaufe der in Abschnitt 3.3.2.3 ausgewerteten Experimente wurden Bindungsstudien der p19-Varianten an die Modell-miRNAs durchgeführt. Dabei wurde auch festgestellt, dass die Bindungskonstanten an miR168 nicht exakt bestimmt werden konnten. Bei entsprechenden EMSA-Versuchen trat zunächst keine messbare Komplexbildung der *At*miR168a mit der p19-Variante auf. Jedoch konnten teilweise bei höheren p19-Konzentrationen Verlangsamungen der miR168-Migration detektiert werden, welche auf Komplexe höherer Ordnung hindeuten. In Abbildung 7.7 ist ein so beschriebenes Autoradiogramm exemplarisch dargestellt.

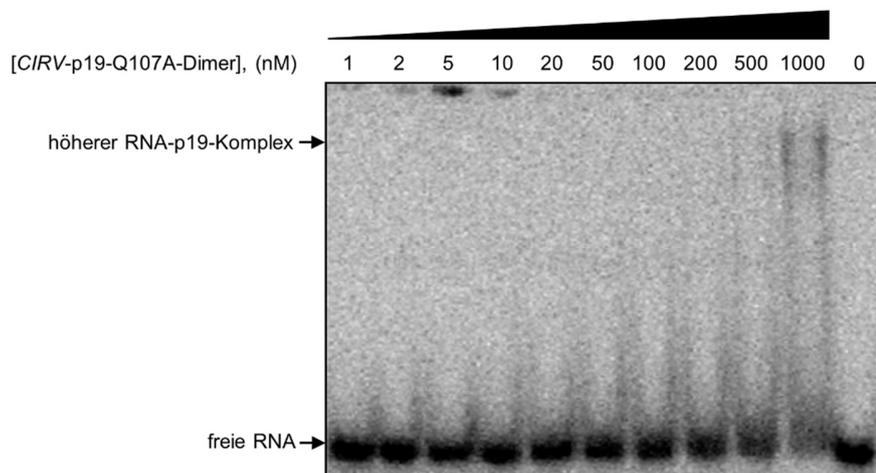


Abbildung 7.7: Exemplarische Darstellung eines Autoradiogrammes nach Bindungsstudie von p19-Q107A an *At*miR168a.

7.9 Auflistungen

7.9.1 Chemikalienliste

Aceton	VWR International, Darmstadt, D
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese 40 (19:1)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Agarose low EEO	AppliChem, Darmstadt, D
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumacetat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, D
Ampicilin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Bacto-Agar	Becton, Dickinson & Co., MD, USA
Bacto-Hefe-Extrakt	Becton, Dickinson & Co., MD, USA
Bacto-Trypton	Becton, Dickinson & Co., MD, USA
Bacto-Pepton	Becton, Dickinson & Co., MD, USA
Borsäure	AppliChem, Darmstadt, D
Bradford, Protein assay dye reagent	Bio-Rad, Hercules, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Cap-Analagon	Jena Bioscience, Jena, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
Coomassie- Brilliant-Blau G-250	Carl Roth, Karlsruhe, D
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Jena Bioscience, Jena, D
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, 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
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	AppliChem, Darmstadt, D
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Formamid (deionisiert)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, D
Glukose	Merck, Darmstadt, D
Glycerin (wasserfrei)	AppliChem, Darmstadt, D
Glycin	AppliChem, Darmstadt, D
Guanidiniumthiocyanat	AppliChem, Darmstadt, D
Harnstoff	AppliChem, Darmstadt, D
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfon-säure (HEPES)	AppliChem, Darmstadt, D
Isoamylalkohol	VWR International, Darmstadt, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Kreatinphosphat	AppliChem, Darmstadt, D
L-Glutathion	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
„Luciferase Assay Reagent“	Promega, Mannheim, D
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Mangan(II)-chlorid	AppliChem, Darmstadt, D

Mannitol	AppliChem, Darmstadt, D
β -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Methanol	VWR International, Darmstadt, D
Mineralöl	Carl Roth, Karlsruhe, D
Murashige & Skoog Basal Medium	Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL
Myo-Inositol	Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt,
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	AppliChem, Darmstadt, D
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, D
γ -[³² P]-ATP	Hartmann Analytic, Braunschweig, D
Percoll	GE Healthcare, München, D
Phenol (TE-gesättigt)	AppliChem, Darmstadt, D
Phenol (wassergesättigt, stabilisiert)	AppliChem, Darmstadt, D
Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	AppliChem, Darmstadt, D
Protease-Inhibitor (complete Mini, EDTA free)	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Ribonukleosidtriphosphate	Jena Bioscience, Jena, D
Rubidiumchlorid	AppliChem, Darmstadt, D
[³⁵ S]-L-Methionin	Hartmann Analytic, Braunschweig, D
Saccharose	Merck, Darmstadt, D
Salzsäure	VWR International, Darmstadt, D
Silbernitrat	Thermo Scientific, Bonn, D
Spermin	Carl Roth, Karlsruhe, D

Thiaminhydrochlorid	Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL
Trichloressigsäure (TCA)	J. T. Baker Chemicals, Phillipsburg, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tris(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween-20	Merck, Darmstadt, D
Wasser (Nuklease-frei)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Xylencyanol	AppliChem, Darmstadt, D

Alle Puffer und Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt und gegebenenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert.

7.9.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

5415R (Zentrifuge)	Eppendorf, Hamburg, D
Äkta-Purifier	GE Healthcare, Neu-Isenburg, D
Avanti J-20 (Zentrifuge)	Beckman Coulter, Krefeld, D
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, D
Biostat ED-Reaktor	Sartorius Stedim, Göttingen, D
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, D
Corning® 15mL PP Centrifuge Tubes	Corning, New York, USA
Corning® 50mL PP Centrifuge Tubes	Corning, New York, USA
Dounce Homogenizer (tight fit)	KONTES GLASS, Vineland, USA
Einmalküvetten PLASTIBRAND	Carl Roth, Karlsruhe, D
Elektrophorese Power Supply Consort EV233	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Elektrophoresekammern	OWL Separation Systems, Portsmouth, USA
Eppendorf Safe-Lock Tubes (nuklease-frei), 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorf Safe-Lock Tubes (nuklease-frei), 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, D

Feinwaage ABJ 120-4M	KERN & SOHN GmbH, Balingen, D
GAULIN Homogenizator	APV Homogeniser GmbH, Lübeck, D
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
GeneJET™ PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
Gradientenmischer	Hoefer, Holliston, USA
GSTrap FF-Affinitätssäule	GE Healthcare, Neu-Isenburg, D
Hellma® absorption cuvettes (verschiedene)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Illustra microspin G-25 columns	GE Healthcare, Neu-Isenburg, D
Infors Multitron II HT	Infors, Bottmingen, CH
Isotemp 125D	Fisher Scientific, Waltham, USA
J-810 Spectropolarimeter	Jasco GmbH, Schaafheim, D
Jasco v-550 Spektrometer	Jasco GmbH, Schaafheim, D
Gel-Dokumentationsanlage EDAS 290	Kodak, Rochester, USA
Lichtmikroskop	Thermo Scientific, Bonn, D
Magnetrührer IKA	Reo basic C IKA, Staufen, D
Mastercycler personal (Thermocycler)	Eppendorf, Hamburg, D
MicroRNA detection kit	New England Biolabs, Ipswich, USA
MIKRO 200 (Zentrifuge)	Hettich, Tuttlingen, D
MIKRO 200 R (Zentrifuge)	Hettich, Tuttlingen, D
Mono Q 5/50 GL-Säule	Amersham Biosciences, Uppsala, S
pH-Meter pH 209 benchtop	HANNA instruments, Woonsocket, USA
PowerSupply Pack P25	Biometra, Göttingen, D

PurePak PCR micro tubes	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega, Madison, USA
Resource Q-Säule	Amersham Biosciences, Uppsala, S
Rotina 38R (Zentrifuge)	Hettich, Tuttlingen, D
Rotor SW40Ti	Beckman Coulter, Krefeld, D
Rotor 45 Ti	Beckman Coulter, Krefeld, D
Schüttler KS 260 basic	IKA, Staufen, D
Schüttler SM30	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D
Schüttler Typ 3005	GFL, Burgwedel, D
Schüttler VIBRAX VXR basic	IKA, Staufen, D
SERVAPOR®-Dialysierschlauch (MWCO:12.000-14.000)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, D
Sirius Luminometer	Berthold detection systems, Bad Wildbad, D
SORVALL (RC6+) (Zentrifuge)	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
Spin-X UF Concentrator	Corning, New York, USA
Storage Phosphor Screen S 230	GE Healthcare, Neu-Isenburg, D
Storm 860-Phosphorimager	Molecular Dynamics, Krefeld, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Ultrazentrifuge L8-M	Beckman Coulter, Krefeld, D
Uni-Geldryer 3545D	Bio-Rad, Hercules, USA
UVette	Eppendorf, Hamburg, D
UVP UVsolo touch	Analytik Jena, Jena, D
Waage accu-622	Fisher Scientific, Waltham, USA
Whatman™ Blotting-Papier, Grad GB003	GE Healthcare, Neu-Isenburg, D
Zentrifugenröhrchen Ultra clear (14 x 95mm)	Beckman Coulter, Krefeld, D

7.9.3 Enzyme

7.9.3.1 Restriktionsendonukleasen

Die zu den hier aufgeführten Restriktionsendonukleasen eingesetzten Puffer entsprachen den Herstellerempfehlungen. Bei Einsatz mehrerer Endonukleasen wurde auf den „Buffer Tango“ (Thermo Fisher Scientific) zurückgegriffen.

BamHI (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Ipswich, USA
EcoRI (10 U/μl)	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
NcoI (10 U/μl)	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
NotI (10 U/μl)	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
SmaI (10 U/μl)	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
SmiI (10 U/μl)	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D

7.9.3.2 Sonstige Enzyme und Proteine

Cellulase Onozuka RS	Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL
DpnI	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
DNaseI	Roche Diagnostics, Mannheim, D
DreamTaq-Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kreatinphosphatkinase	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Mikrokokkus-Nuklease	Roche Diagnostics, Mannheim, D

„p19 siRNA binding protein“	New England Biolabs, Ipswich, USA
Pectolyase Y23	Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL
Phusion High-Fidelity-DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
PreScission™-Protease	GE Healthcare, Neu-Isenburg, D
RiboLock-RNase-Inhibitor	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
SP6-RNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D
T4 Polynukleotid-Kinase	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, D

7.9.4 Oligonukleotidliste

7.9.4.1 DNA-Oligonukleotide

Nachfolgend aufgelistet sind alle DNA-Oligonukleotide (Primer), welche im Rahmen dieser Dissertation für PCR-Reaktionen (Kolonie-PCR, PCR im Zuge von Klonierungen und Mutagenese-PCR) und zu Sequenzierungszwecken verwendet wurden. Alle eingesetzten DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) bezogen.

.Tabelle 7.4: Auflistung aller hier verwendeten DNA-Oligonukleotide

Primernamen	Nukleotidsequenz (5´-3´)	Zweck des Primers
p19pGEXf	GCGGATCCATGGAACGAGCTATAC AAGGAAAC	PCR-Primer für p19-Klonierung in pGEX-6P-1 (vorwärts)
p19pGEXr	TCCCCCGGGGAATTACTCGCTTTC TTTCTTGAAGGTTTC	PCR-Primer für p19-Klonierung in pGEX-6P-1 (revers)
pSP64SQ1f	GAGAGATGATAGGGTCTGCTTC	Sequenzierprimer für alle pSP64-basierenden Plasmide (pLF2_p19 und Mutanten; Luziferase-Plasmide)

		Sequenzierprimer für alle pGEX-6P-1-basierenden Plasmide
pGEXSEQ	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	AAGCCACGTTTGGTG
p19Q6Afw	GCCATGGAACGAGCTATAgcAGGA AACGACACTAGGG	Mutageneseprimer für den Q6A-Austausch in der p19-Sequenz
p19Q6Arev	CCCTAGTGTCGTTTCTgcTATAGC TCGTTCCATGGC	Mutageneseprimer für den Q6A-Austausch in der p19-Sequenz
p19N8Afw	GGAACGAGCTATAACAAGGAgcCGA CACTAGGGAACAAGC	Mutageneseprimer für den N8A-Austausch in der p19-Sequenz
p19N8Arev	GCTTGTTCCCTAGTGTCGgcTCCTT GTATAGCTCGTTCC	Mutageneseprimer für den N8A-Austausch in der p19-Sequenz
p19K67Afw	GCTGGGGTTTCGGGgcAGTTGTAT TTAAGAGATATCTCAG	Mutageneseprimer für den K67A-Austausch in der p19-Sequenz
p19K67Arev	CTGAGATATCTCTTAAATACAAGTg cCCCGAAACCCAGC	Mutageneseprimer für den K67A-Austausch in der p19-Sequenz
p19N106Afw	CGATTTCTCGGTGCCgcCCAGGTC GGATGTACC	Mutageneseprimer für den N106A-Austausch in der p19-Sequenz
p19N106Arev	GGTACATCCGACCTGGgcGGCACC GAGAAATCG	Mutageneseprimer für den N106A-Austausch in der p19-Sequenz
p19Q107Afw	CGATTTCTCGGTGCCAACgctGTCG GATGTACCTATAGTATTCG	Mutageneseprimer für den Q107A-Austausch in der p19-Sequenz
p19Q107Arev	CGAATACTATAGGTACATCCGACag cGTTGGCACCCGAGAAATCG	Mutageneseprimer für den Q107A-Austausch in der p19-Sequenz
p19V108Afw	CTCGGTGCCAACCAGGcCGGATGT ACCTATAGTATTCGG	Mutageneseprimer für den V108A-Austausch in der p19-Sequenz
p19V108Arev	CCGAATACTATAGGTACATCCGgC CTGGTTGGCACCCGAG	Mutageneseprimer für den V108A-Austausch in der p19-Sequenz
p19G109Afw	CGGTGCCAACCAGGTCGcATGTAC CTATAGTATTCGGTTTCG	Mutageneseprimer für den G109A-Austausch in der p19-Sequenz
p19G109Arev	CGAAACCGAATACTATAGGTACATg CGACCTGGTTGGCACCCG	Mutageneseprimer für den G109A-Austausch in der p19-Sequenz
p19T111Afw	CAACCAGGTCGGATGTgCCTATAG TATTCGGTTTCGAG	Mutageneseprimer für den T111A-Austausch in der p19-Sequenz
p19T111Arev	CTCGAAACCGAATACTATAGGcACA TCCGACCTGGTTG	Mutageneseprimer für den T111A-Austausch in der p19-Sequenz

miR162fwd	CATGGGCAATGAGCTGGATGCAGA GGTTGTATTATCGATGTCTATGG	DNA-Oligonukleotid mit miR162- Zielsequenz (vorwärts) zur Klonierung des Reporterkonstruktes für miR162
miR162rev	CCATAGACATCGATAATACAACCTC TGCATCCAGCTCATTGCC	DNA-Oligonukleotid mit miR162- Zielsequenz (rückwärts) zur Klonierung des Reporterkonstruktes für miR162

7.9.4.2 RNA-Oligonukleotide

Nachfolgend sind alle im Rahmen dieser Dissertation verwendeten RNA-Oligonukleotide aufgelistet. Diese wurden ohne 5'-Phosphat von der Firma Biomers (Ulm, D) bezogen und für spätere Phosphorylierungsreaktionen und Hybridisierungsreaktionen eingesetzt. Da aus jeweils zwei einzelnen RNA-Oligonukleotiden ein sRNA-Duplex-Molekül hybridisiert werden konnte und einige der RNA-Stränge dabei mehrfach Verwendung fanden, wurden die geprüften RNA-Duplex-Strukturen hiernach ebenso aufgeführt.

Tabelle 7.5: Auflistung aller verwendeten RNA-Oligonukleotide.

Name	Nukleotidsequenz	Beschreibung des RNA-Oligonukleotids
gf698 gs	uag uuc auc cau gcc aug ugu	<i>guide</i> -Strang der gf698-siRNA
gf698 ps	aca ugg cau gga uga acu aua	<i>passenger</i> -Strang der gf698-siRNA
AtmiR162+	ucg aua aac cuc ugc auc cag	<i>guide</i> -Strang der AtmiR162 (Isoformen a und b) und NbmiR162 (Isoform a)
AtmiR162*	gga ggc agc ggu uca ucg auc	<i>passenger</i> -Strang der AtmiR162 (Isoformen a und b) und NbmiR162 (Isoform a)
NbmiR162b*	gga ggc agc ggu uua ucg auc	<i>passenger</i> -Strang der NbmiR162 (Isoform b)
miR162+-10u	ucg aua aac uuc ugc auc cag	modifizierter <i>guide</i> -Strang von AtmiR162 mit der Mutation C10U
miR162+-12g	ucg aua aac cug ugc auc cag	modifizierter <i>guide</i> -Strang von AtmiR162 mit der Mutation C12G
miR162+-12u	ucg aua aac cuu ugc auc cag	modifizierter <i>guide</i> -Strang von AtmiR162 mit der Mutation C12U
miR162+-13g	ucg aua aac cuc ggc auc cag	modifizierter <i>guide</i> -Strang von AtmiR162 mit der Mutation U13G
miR162+-14u	ucg aua aac cuc uuc auc cag	modifizierter <i>guide</i> -Strang von AtmiR162 mit der Mutation G14U

miR162+-15u	ucg aua aac cuc ugu auc cag	modifizierter <i>guide</i> -Strang von <i>AtmiR162</i> mit der Mutation C15U
miR162+-16u	ucg aua aac cuc ugc uuc cag	modifizierter <i>guide</i> -Strang von <i>AtmiR162</i> mit der Mutation A16U
miR162+-18u	ucg aua aac cuc ugc auu cag	modifizierter <i>guide</i> -Strang von <i>AtmiR162</i> mit der Mutation C18U
miR162+-19u	ucg aua aac cuc ugc auc uag	modifizierter <i>guide</i> -Strang von <i>AtmiR162</i> mit der Mutation C19U
miR162*-0	gga ugc aga ggu uca ucg auc	modifizierter <i>passenger</i> -Strang von <i>AtmiR162</i> mit den Mutationen G4U und C9A
miR162*-1c	cga ugc aga ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung G1C
miR162*-2c	gca ugc aga ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung G2C
miR162*-3c	ggc ugc aga ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung A3C
miR162*-3g	ggg ugc aga ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung A3G
miR162*-4g	gga ggc aga ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung U4G
miR162*-5c	gga ucc aga ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung G5C
miR162*-6a	gga uga aga ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung C6A
miR162*-6g	gga ugg aga ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung C6G
miR162*-6u	gga ugu aga ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung C6U
miR162*-7c	gga ugc cga ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung A7C
miR162*-7g	gga ugc gga ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung A7G
miR162*-7u	gga ugc uga ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung A7U
miR162*-8a	gga ugc aaa ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung G8A
miR162*-8c	gga ugc aca ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung G8C
miR162*-8u	gga ugc aua ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung G8U
miR162*-9c	gga ugc agc ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung A9C
miR162*-9g	gga ugc agg ggu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung A9G
miR162*-10c	gga ugc aga cgu uca ucg auc	modifizierte Version von miR162*-0 mit der Abweichung G10C
<i>AtmiR168+</i>	ucg cuu ggu gca ggu cgg gaa	<i>guide</i> -Strang von <i>AtmiR168</i> (Isoformen a und b) und <i>NbmiR168</i> (Isoformen d und e)

<i>AtmiR168a*</i>	ccc gcc uug cau caa cug aau	<i>passenger</i> -Strang von <i>AtmiR168</i> (Isoform a) und <i>NbmiR168</i> (alle Isoformen)
<i>AtmiR168b*</i>	ccc guc uug uau caa cug aau	<i>passenger</i> -Strang von <i>AtmiR168</i> (Isoform b)
<i>NbmiR168a,b,c+</i>	ucg cuu ggu gca ggu cgg gac	<i>guide</i> -Strang von <i>NbmiR168</i> (Isoformen a,b und c)
miR168*V1	ccc gcc cug cau caa cug aau	modifizierte Version von <i>AtmiR168a*</i> mit der Abweichung U7C
miR168*V2	ccc gcc uug cac caa cug aau	modifizierte Version von <i>AtmiR168a*</i> mit der Abweichung U12C
miR168*V3	ccc gcc cug cac caa cug aau	modifizierte Version von <i>AtmiR168a*</i> mit den Abweichungen U7C und U12C
miR168*V4	ccc gac cug cau caa aug aau	modifizierte Version von <i>AtmiR168a*</i> mit den Abweichungen C5A, U7C und C16G
miR168*V5	ccc gac uug cac caa gug aau	modifizierte Version von <i>AtmiR168a*</i> mit den Abweichungen C5A, U12C und C16G
miR168*V6	ccc gac cug cac caa gcg aau	modifizierte Version von <i>AtmiR168a*</i> mit den Abweichungen C5A,U7C, U12C, C16G und U17C
<i>AtmiR403+</i>	uua gau uca cgc aca aac ucg	<i>guide</i> -Strang von <i>AtmiR403</i> und <i>NbmiR403</i> (alle Isoformen)
<i>AtmiR403*</i>	ugu uuu gug cuu gaa ucu aau u	<i>passenger</i> -Strang von <i>AtmiR403</i>
<i>NbmiR403a*</i>	ugu uug ugc gug aau cug aca	<i>passenger</i> -Strang von <i>NbmiR403</i> (Isoform a)
<i>NbmiR403b*</i>	ugu uug ugc gug aau cug aca	<i>passenger</i> -Strang von <i>NbmiR403</i> (Isoform b)

Tabelle 7.6: Schemata aller untersuchten Wildtyp-miRNA-Duplex-Strukturen und der siRNA gf698.

Name und Duplex-Schema	Beschreibung
gf698 <pre> 5'-UAGUUCAUCCAUGCCAUGUGU-3' 3'-AUAUCAAGUAGGUACGGUACA-5'</pre>	gf698-siRNA
<i>AtmiR162a,b</i> <pre> 5'-UCGAU^AAACC^UCUGC^AUCCAG-3' 3'-CUAGCUA_CUUGG_CGACG_GAGG-5'</pre>	miRNA 162 aus <i>A. thaliana</i> Isoformen a und b
<i>NbmiR162a</i> <pre> 5'-UCGAU^AAACC^UCUGC^AUCCAG-3' 3'-CUAGCUAUUUGG_CGACG_GAGG-5'</pre>	miRNA 162 aus <i>Nicotiana benthamiana</i> Isoform a

Tabelle 7.7: Darstellung der eingesetzten, artifiziellen miR162-Duplex-Strukturen.

Name und Duplex-Schema	Position des Nicht-Watson-Crick-Basenpaares	Eingeführtes Basenpaar	Name der hybridisierten RNA-Moleküle
miR162-0 <pre> 5'-UCGAU^AAAACCUUGCAUCCAG-3' 3'-CUAGCU^AUUGGAGACGUAGG-5' </pre>	-	-	AtmiR162+ miR162*-0
miR162-19+C/1*C <pre> 5'-UCGAU^AAAACCUUGCAUCC^CAG-3' 3'-CUAGCU^AUUGGAGACGUAG^C-5' </pre>	1*/19+	(+)-Strang: C *-Strang: C	AtmiR162+ miR162*-1c
miR162-18+C/2*C <pre> 5'-UCGAU^AAAACCUUGCAU^CCCAG-3' 3'-CUAGCU^AUUGGAGACGU^AAG^C-5' </pre>	2*/18+	(+)-Strang: C *-Strang: C	AtmiR162+ miR162*-2c
miR162-17+U/3*C <pre> 5'-UCGAU^AAAACCUUGCA^UCCAG-3' 3'-CUAGCU^AUUGGAGACGU^CGG-5' </pre>	3*/17+	(+)-Strang: U *-Strang: C	AtmiR162+ miR162*-3c
miR162-16+A/4*G <pre> 5'-UCGAU^AAAACCUUGCA^AUCCAG-3' 3'-CUAGCU^AUUGGAGACG^AAGG-5' </pre>	4*/16+	(+)-Strang: A *-Strang: G	AtmiR162+ miR162*-4g
miR162-15+C/5*C <pre> 5'-UCGAU^AAAACCUUG^CAUCCAG-3' 3'-CUAGCU^AUUGGAGAC^CUAGG-5' </pre>	5*/15+	(+)-Strang: C *-Strang: C	AtmiR162+ miR162*-5c
miR162-14+G/6*A <pre> 5'-UCGAU^AAAACCUUG^GCAUCCAG-3' 3'-CUAGCU^AUUGGAG^AGUAGG-5' </pre>	6*/14+	(+)-Strang: G *-Strang: A	AtmiR162+ miR162*-6a
miR162-13+U/7*C <pre> 5'-UCGAU^AAAACCU^UGCAUCCAG-3' 3'-CUAGCU^AUUGGAG^CGUAGG-5' </pre>	7*/13+	(+)-Strang: U *-Strang: C	AtmiR162+ miR162*-7c
miR162-12+C/8*C <pre> 5'-UCGAU^AAAACCU^CUGCAUCCAG-3' 3'-CUAGCU^AUUGG^AACGUAGG-5' </pre>	8*/12+	(+)-Strang: C *-Strang: C	AtmiR162+ miR162*-8c

miR162-11+U/9*C	<pre> 5'-UCGAU^AAACCUCUGCAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGG_CGACGUAGG-5' </pre>	9*/11+	(+)-Strang: U *-Strang: C	AtmiR162+ miR162*-9c
miR162-10+C/10*C	<pre> 5'-UCGAU^AAAC^CUCUGCAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUG_CAGACGUAGG-5' </pre>	10*/10+	(+)-Strang: C *-Strang: C	AtmiR162+ miR162*-10c
miR162-19+U/1*G	<pre> 5'-UCGAU^AAACCUUGCAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGGAGACGUAGG-5' </pre>	1*/19+	(+)-Strang: U *-Strang: G	miR162+-19u miR162*-0
miR162-18+U/2*G	<pre> 5'-UCGAU^AAACCUUGCAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGGAGACGUAGG-5' </pre>	2*/18+	(+)-Strang: U *-Strang: G	miR162+-18u miR162*-0
miR162-17+U/3*G	<pre> 5'-UCGAU^AAACCUUGCAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGGAGACGUAGG-5' </pre>	3*/17+	(+)-Strang: U *-Strang: G	AtmiR162+ miR162*-3g
miR162-16+U/4*G	<pre> 5'-UCGAU^AAACCUUGCUUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGGAGACGGAGG-5' </pre>	4*/16+	(+)-Strang: U *-Strang: G	miR162+-16u miR162*-4g
miR162-15+U/5*G	<pre> 5'-UCGAU^AAACCUUGUAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGGAGACGUAGG-5' </pre>	5*/15+	(+)-Strang: U *-Strang: G	miR162+-15u miR162*-0
miR162-14+U/6*G	<pre> 5'-UCGAU^AAACCUUUCAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGGAGAGGUAGG-5' </pre>	6*/14+	(+)-Strang: U *-Strang: G	miR162+-14u miR162*-6g
miR162-13+U/7*G	<pre> 5'-UCGAU^AAACCUUGCAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGGAGGCGUAGG-5' </pre>	7*/13+	(+)-Strang: U *-Strang: G	AtmiR162+ miR162*-7g
miR162-12+U/8*G	<pre> 5'-UCGAU^AAACCUUUGCAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGGAGACGUAGG-5' </pre>	8*/12+	(+)-Strang: U *-Strang: G	miR162+-12u miR162*-0

miR162-11+U/9*G	<pre> 5'-UCGAU^AAAACUCUGCAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGGGGACGUAGG-5' </pre>	9*/11+	(+)-Strang: U *-Strang: G	AtmiR162+ miR162*-9g
miR162-10+U/10*G	<pre> 5'-UCGAU^AAAACUUCUGCAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGGAGACGUAGG-5' </pre>	10*/10+	(+)-Strang: U *-Strang: G	miR162+-10u miR162*-0
miR162-14+G/6*U	<pre> 5'-UCGAU^AAAACUCUGCAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGGAGAUGUAGG-5' </pre>	6*/14+	(+)-Strang: G *-Strang: U	AtmiR162+ miR162*-6u
miR162-13+G/7*U	<pre> 5'-UCGAU^AAAACUCGGCAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGGAGUCGUAGG-5' </pre>	7*/13+	(+)-Strang: G *-Strang: U	miR162+-13g miR162*-7u
miR162-12+G/8*G	<pre> 5'-UCGAU^AAAACCU^GUGCAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGGA_GACGUAGG-5' </pre>	8*/12+	(+)-Strang: G *-Strang: G	miR162+-12g miR162*-0
miR162-12+C/8*A	<pre> 5'-UCGAU^AAAACCU^CUGCAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGGA_AACGUAGG-5' </pre>	8*/12+	(+)-Strang: C *-Strang: A	AtmiR162+ miR162*-8a
miR162-12+G/8*U	<pre> 5'-UCGAU^AAAACCU^GUGCAUCCAG-3 3'-CUAGCUA_CUUGGAUACGUAGG-5' </pre>	8*/12+	(+)-Strang: G *-Strang: U	miR162+-12g miR162*-8u

Tabelle 7.8: Darstellung der eingesetzten, artifiziiellen miR168-Duplex-Strukturen.

Name und Duplex-Schema	Beschreibung	Name der hybridisierten RNA-Moleküle
miR168-Variante 1 	Variante 1 der miRNA 168 aus <i>A. thaliana</i>	AtmiR168+ miR168*V1
miR168-Variante 2 	Variante 2 der miRNA 168 aus <i>A. thaliana</i>	AtmiR168+ miR168*V2
miR168-Variante 3 	Variante 3 der miRNA 168 aus <i>A. thaliana</i>	AtmiR168+ miR168*V3
miR168-Variante 4 	Variante 4 der miRNA 168 aus <i>A. thaliana</i>	AtmiR168+ miR168*V4
miR168-Variante 5 	Variante 5 der miRNA 168 aus <i>A. thaliana</i>	AtmiR168+ miR168*V5
miR168-Variante 6 	Variante 6 der miRNA 168 aus <i>A. thaliana</i>	AtmiR168+ miR168*V6

7.9.5 miRNA-precursor-Sequenzen

Im Zuge dieser Studien wurden auch miRNA-Duplex-Strukturen aus *Nicotiana benthamiana* untersucht. Zum Zeitpunkt der hier aufgeführten Studien waren die benötigten miRNA-Sequenzen jedoch nicht annotiert worden. Daher wurden die entsprechenden miRNA-precursor-Sequenzen (als DNA-Sequenzen) nach der in Abschnitt 3.1.2 dargestellten Vorgehensweise ermittelt und sind im Folgenden aufgeführt. Entsprechende (+)-Strang-Sequenzen sind dabei gelb hinterlegt.

NbmiR162a-precursor:

TGGTTGGTTAAGAACACTGGAGGCAGCGGTTTATCGATCTGTTCCCTGAAAAGCGATAAAC
AAAATATAGCAACAGGAATCGGTTCGATAAACCTCTGCATCCAGCGGTTAACCCCCTTCT

Lokalisierung im Genom: > Niben101Scf11303Ctg014:3301-4500

NbmiR162b-precursor:

TTCTTTTGGTTGGTTAAAAACACTGGAGGCAGCGGTTTCATCGATCTGTTCCCTGAAAGGCG
ATAACAAAAATATAGCAACAGGAATCGGTTCGATAAACCTCTGCATCCAGCGCTTAACCCCCT
TCTCTCT

Lokalisierung im Genom: >Niben101Scf01764Ctg011:2801-4000 (-1)

NbmiR168a-precursor:

TGTCTCTAATTCGCTTGGTGCAGGTCGGGACTAATTCGCCGGCGACGGCGGCAATCACGA
CGACGGTGATTGTTATTTAATGGAGTTTAGACGTACGAAGTTATCAACATTTTTTTGTTTTGC
AGCGAAATTTGTCCCGCCTTGCATCAACTGAATTGGAGACTGC

Lokalisierung im Genom: >Niben101Scf10054Ctg018:1201-2400

NbmiR168b-precursor:

CTCTAATTCGCTTGGTGCAGGTCGGGACTAATTCGCCGGCGGCGGCAATCACGACGGCGG
TGATTGTTATTAATGGAGTTAAGATGTACGAAGTTATCAACTTTTTTTGTTTTGCGGCGAAA
TTTGTCCCGCCTTGCATCAACTGAATTAGAGACTGC

Lokalisierung im Genom: > Niben101Scf10307Ctg006:2101-3300

NbmiR168c-1-precursor:

GTCTCTCATTCGCTTGGTGCAGGTCGGGACTGCTTTGTGCGGCGACAATGACGTCAGCTGA
CGGTGACGGTGGCATATCGATAGATATACATGTTTATGACGAAGTTTGGGTCCCGCCTTGC
ATCAACTGAATCGGAGACTGCGGCGAAT

Lokalisierung im Genom: >Niben101Scf04636Ctg025:701-1900

NbmiR168c-2-precursor:

GGTCTCTCAT **TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAC** CTGTCTCGCCGGCGACAATGACGTCAGCT
GACGGTTACGGTGCCGTATCGATAGATATACATGTTGTTTATGACGAAGTTTGGGTCCCGC
CTTGCATCAACTGAATCGGAGACTGCGGT

Lokalisierung im Genom: >Niben101Scf07765Ctg021:44501-45800 (-1)

NbmiR168d-precursor:

GGTCTCTAAT **TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA** CTGACTCGCCGGTGACGCTGTCCGCGCCG
GAATCGGCGCCCTTAGTTTCATTGATATTTTGTGTTACATGTACCGATGTTTAGAGAGCTCTCT
TTTGGACTTATTTGTTAGTAATTTTTGTTGTTGAAAATAACTTGATATATGTATAGCTAAGTAG
AGAGTGTGTTACCCACGGTTAGTTAAGTAATAGATACTATGTAGAGAGTGTGTTACCACGGTTG
GTTAGGTAATGGATATGTAGAGAGTTCATGTTTTTAATAGATTAGTTATGAATGAAAGTGCG
CCTCGTAAATGGCTAAGTTTGTCCCGCCTTGCATCAACTGAATTGGTGACCGC

Lokalisierung im Genom: >Niben101Scf08513Ctg014:21401-22800 (-1)

NbmiR168e-precursor:

CTCTAAC **TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA** CTGACTCGCCGGTGACGCTGTCCGCGCCGGAA
TCGGCGCCCTTAGTCTCAATCATTTTTTGTGTTATATGCATCGATATTCAGAGAGCTCTCATT
GGACTTATTTGTTAGTAATTTTTTGTGTTGAAATTAACTTGATATATGTATAGATAAGTAGAG
AGTGTGTTACCCCGGTTGGTTAAGTAATAGATATGTAGAGACTGTTTGCCACGGTTGGTTC
CACGGTTGGTTAAGTAATGGATATGTAGAGAGTTCAATTTTTTTAATAGATTAGTTATGAAT
GAAATTGCGCCTCGTCAATGGCTAAGTTTGTCCCGCCTTGCATCAACTGAATCGGTGACC
GC

Lokalisierung im Genom: >Niben101Scf07340Ctg008:19901-21400

NbmiR403a-precursor:

AAAGAGTCATATTTACGTTTGTGCGTGAATCTGACAACCCTTTTTATCATTTTTATCTCATG
GGTTGTGTTTG **TTAGATTCACGCACAACTCG** CAATATGTCTTTTCT

Lokalisierung im Genom: >Niben101Scf00793Ctg034:3501-4700

NbmiR403b-precursor:

TCTGAAAGAGGCATATTTACGTTTGTGCGTGATTCTGACAACCATTTTTTCATCATTAAATTT
 ATTTTTATCTCATTGGTTGTGTTTGTAGATTACGCACAAACTCGTAATATGACTTTTCCTC
 ATCT

Lokalisierung im Genom: >Niben101Scf06412Ctg035:201-1400

7.9.6 Plasmidkonstruktionen und virale Sequenzen

Folgende kommerziellen Plasmidvektoren wurden im Zuge dieser Arbeiten verwendet.

Tabelle 7.9: Auflistung aller in dieser Dissertation verwendeten Ausgangsplasmide

Vektor	Bezugsfirma	Zweck
pSP64-Poly(A)	Promega, Madison, USA	Vektorrückgrat für den p19-ORF für <i>in-vitro</i> -Transkriptionsreaktionen
pSP-luc	Promega, Madison, USA	Ausgangsvektor für die Konstruktion der Luziferasekonstruktionen
pGEX-6P-1	GE Healthcare, Neu-Isenburg, D	Vektorrückgrat für den p19-ORF für die rekombinante Synthese von p19

Nachfolgend werden alle für dieses Projekt relevanten Plasmide namentlich aufgelistet. Entsprechende Plasmidkarten wurden analog und digital unter diesen Namen in der Abteilung „Mikrobielle Biotechnologie“ des Institutes für Biochemie und Biotechnologie (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) hinterlegt.

pSPLF2_CIRVp19 (QS): Dieses Plasmid basiert auf dem pSP64-Poly(A)-Vektor und codiert für den ORF von *CIRV*-p19. Es wurde freundlicherweise durch Dr. Torsten Gursinsky zur Verfügung gestellt und diente nach Smil-Linearisierung als *template* für *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen.

pSPLF2_CIRVp19-Q6A: Dieses Plasmid stellt eine modifizierte Version von pSPLF2_CIRVp19 dar. Es codiert für ein mutiertes *CIRV*-p19 mit Aminosäureaustausch Q6A. Es wurde durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe der Primer p19Q6Afwd und p19Q6Arev aus pSPLF2_CIRVp19 erzeugt.

pSPLF2_CIRVp19-N8A: Dieses Plasmid stellt eine modifizierte Version von pSPLF2_CIRVp19 dar. Es codiert für ein mutiertes *CIRV*-p19 mit Aminosäureaustausch N8A. Es wurde durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe der Primer p19N8Afwd und p19N8Arev aus pSPLF2_CIRVp19 erzeugt.

pSPLF2_CIRVp19-K67A: Dieses Plasmid stellt eine modifizierte Version von pSPLF2_CIRVp19 dar. Es codiert für ein mutiertes *CIRV*-p19 mit Aminosäureaustausch K67A. Es wurde durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe der Primer p19K67Afwd und p19K67Arev aus pSPLF2_CIRVp19 erzeugt.

pSPLF2_CIRVp19-N106A: Dieses Plasmid stellt eine modifizierte Version von pSPLF2_CIRVp19 dar. Es codiert für ein mutiertes *CIRV*-p19 mit Aminosäureaustausch N106A. Es wurde durch

ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe der Primer p19N106Afd und p19N106Arev aus pSPLF2_CIRVp19 erzeugt.

pSPLF2_CIRVp19-Q107A: Dieses Plasmid stellt eine modifizierte Version von pSPLF2_CIRVp19 dar. Es codiert für ein mutiertes *CIRV*-p19 mit Aminosäureaustausch Q107A. Es wurde durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe der Primer p19Q107Afd und p19Q107Arev aus pSPLF2_CIRVp19 erzeugt.

pSPLF2_CIRVp19-V108A: Dieses Plasmid stellt eine modifizierte Version von pSPLF2_CIRVp19 dar. Es codiert für ein mutiertes *CIRV*-p19 mit Aminosäureaustausch V108A. Es wurde durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe der Primer p19V108Afd und p19V108Arev aus pSPLF2_CIRVp19 erzeugt.

pSPLF2_CIRVp19-G109A: Dieses Plasmid stellt eine modifizierte Version von pSPLF2_CIRVp19 dar. Es codiert für ein mutiertes *CIRV*-p19 mit Aminosäureaustausch G109A. Es wurde durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe der Primer p19G109Afd und p19G109Arev aus pSPLF2_CIRVp19 erzeugt.

pSPLF2_CIRVp19-T111A: Dieses Plasmid stellt eine modifizierte Version von pSPLF2_CIRVp19 dar. Es codiert für ein mutiertes *CIRV*-p19 mit Aminosäureaustausch T111A. Es wurde durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe der Primer p19T111Afd und p19T111Arev aus pSPLF2_CIRVp19 erzeugt.

pGEX_p19: Dieses Plasmid stellt ein auf pGEX-6P-1 basierendes Plasmid dar, welches den *CIRV*-p19-ORF enthält. Durch PCR-Reaktion mit Hilfe der Primer p19pGEXf und p19pGEXr wurde der p19-ORF aus pSPLF2_CIRVp19 amplifiziert und nach BamHI/SmaI-Restriktion in den BamHI/SmaI-linearisierten pGEX-6P-1-Vektor einligiert.

pGEX_p19-Q6A: Dieses Plasmid stellt eine Modifizierung des Plasmids pGEX_p19 dar. Dabei wurde der *CIRV*-p19-Q6A-ORF analog zum Vorgehen bei pGEX-p19 aus pSPLF2_CIRVp19-Q6A per PCR überführt.

pGEX_p19-N8A: Dieses Plasmid stellt eine Modifizierung des Plasmids pGEX_p19 dar. Dabei wurde der *CIRV*-p19-N8A-ORF analog zum Vorgehen bei pGEX-p19 aus pSPLF2_CIRVp19-N8A per PCR überführt.

pGEX_p19-K67A: Dieses Plasmid stellt eine Modifizierung des Plasmids pGEX_p19 dar. Dabei wurde der *CIRV*-p19-K67A-ORF analog zum Vorgehen bei pGEX-p19 aus pSPLF2_CIRVp19-K67A per PCR überführt.

pGEX_p19-N106A: Dieses Plasmid stellt eine Modifizierung des Plasmids pGEX_p19 dar. Dabei wurde der *CIRV*-p19-N106A-ORF analog zum Vorgehen bei pGEX-p19 aus pSPLF2_CIRVp19-N106A per PCR überführt.

pGEX_p19-Q107A: Dieses Plasmid stellt eine Modifizierung des Plasmids pGEX_p19 dar. Dabei wurde der *CIRV*-p19-Q107A-ORF analog zum Vorgehen bei pGEX-p19 aus pSPLF2_CIRVp19-Q107A per PCR überführt.

pGEX_p19-V108A: Dieses Plasmid stellt eine Modifizierung des Plasmids pGEX_p19 dar. Dabei wurde der *CIRV*-p19-V108A-ORF analog zum Vorgehen bei pGEX-p19 aus pSPLF2_CIRVp19-V108A per PCR überführt.

pGEX_p19-G109A: Dieses Plasmid stellt eine Modifizierung des Plasmids pGEX_p19 dar. Dabei wurde der *CIRV*-p19-G109A-ORF analog zum Vorgehen bei pGEX-p19 aus pSPLF2_CIRVp19-G109A per PCR überführt.

pGEX_p19-T111A: Dieses Plasmid stellt eine Modifizierung des Plasmids pGEX_p19 dar. Dabei wurde der *CIRV*-p19-T111A-ORF analog zum Vorgehen bei pGEX-p19 aus pSPLF2_CIRVp19-T111A per PCR überführt.

pSP-lucM5pA: Modifizierung von pSP-luc mit verlängerter Poly(A)-Sequenz. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise durch Dr. Torsten Gursinsky zur Verfügung gestellt.

pSP-miR162-luc: Plasmid mit codiertem Reporterkonstrukt zum Nachweis der miR162-Aktivität *in vitro*. Zur Klonierung wurde ein Doppelstrang-DNA-Fragment (hybridisierte Fragmente miR162fwd/ miR162rev) in ein NcoI-geschnittenes Plasmid pSP-lucM5pA einligiert.

pSP-Ago1-luc (Zc5): Plasmid mit codiertem Reporterkonstrukt zum Nachweis der miR168-Aktivität *in vitro*. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise durch Dr. Torsten Gursinsky zur Verfügung gestellt.

pSP-luc-Ago2 (ZZ4): Plasmid mit codiertem Reporterkonstrukt zum Nachweis der miR403-Aktivität *in vitro*. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise durch Dr. Torsten Gursinsky zur Verfügung gestellt.

pSPLF2_NbAgo1-1L: Plasmid, welches für *NbAGO1-1L* codiert. Nach Smil-Linearisierung, kann es als *template* für *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen dienen. Es wurde freundlicherweise durch Dr. Torsten Gursinsky zur Verfügung gestellt.

Die genomischen Sequenzen der in Abschnitt 3.2.2 eingesetzten Viren (*CymRSV* und *Cym19Stop*) entsprechen den in [172] beschriebenen Virenvarianten.

Abbildungsverzeichnis

1.1 Darstellung einer Einteilung von sRNAs in Pflanzen, modifiziert nach Borges und Martienssen (2015).....	4
1.2 Schematische Darstellung des antiviralen RNA- <i>silencings</i> in Pflanzen.....	10
1.3 Schematische Darstellung der im Text beschriebenen, miRNA-vermittelten, posttranskriptionellen Genregulation.....	12
1.4 Darstellung des tombusviralen p19-Proteins und dessen Codierung.....	16
3.1 Ergebnisse der p19-Immunpräzipitation (IP) aus dem BYL.....	50
3.2 Duplex-Strukturen der microRNAs 162, 168 und 403 aus <i>A. thaliana</i> und <i>N. benthamiana</i>	52
3.3 Dokumentation des Reinigungserfolgs des <i>CIRV</i> -p19.....	53
3.4 Beispielhafte Darstellung einer Bindungsstudie von p19 mit einer siRNA.....	54
3.5 Beispielhafte Darstellung eines Konkurrenzexperimentes von p19 mit 5'-markierter gf698 und unmarkierter gf698.....	56
3.6 Luziferase-Reporterexperimente zur Darstellung der miRNA-vermittelten RISC-Aktivitäten <i>in vitro</i>	59
3.7 Luziferase-Reporterexperimente zur Darstellung des Einflusses von <i>CIRV</i> -p19 auf die miRNA-vermittelten RISC-Aktivitäten <i>in vitro</i>	61
3.8 <i>Cleavage</i> -Assays zur Darstellung des Einflusses von <i>CIRV</i> -p19 auf die miRNA-vermittelten <i>slicer</i> -Aktivitäten <i>in vitro</i>	64
3.9 Aminosäure- <i>alignment</i> von <i>CIRV</i> -p19 und <i>CymRSV</i> -p19.....	66
3.10 Darstellung der Transkript-Mengen von <i>DCL1</i> , <i>AGO1</i> und <i>AGO2</i> 2 dpi.....	68
3.11 Darstellung der Transkript-Mengen von <i>DCL1</i> , <i>AGO1</i> und <i>AGO2</i> 4 dpi.....	69
3.12 Piktogramm zum generellen Aufbau von kleinen RNAs und Bezeichnung der Basenpaare.....	71
3.13 Schematische Darstellung der Gestaltung artifizierender miR162-Varianten zur systematischen Untersuchung des Einflusses von Basenfehlpaarungen in der miRNA-Struktur auf die Bindung an p19.....	72
3.14 Systematische Untersuchung der Einflüsse von Basenfehlpaarungen und G-U-Paarungen in miR162-Varianten auf die Bindung zu p19.....	74
3.15 Darstellung der Einflüsse der zentralen G-U- <i>wobbles</i> in der miR168-Struktur auf die Bindung an <i>CIRV</i> -p19.....	78
3.16 Luziferase-Reporterexperimente zur Darstellung des Einflusses von <i>CIRV</i> -p19 auf die miR168-vermittelten RISC-Aktivitäten <i>in vitro</i> bei verschiedenen miR168-Varianten.....	79

3.17 Ko-Kristallstruktur von <i>CIRV</i> -p19 mit einer siRNA aus Vargason <i>et al.</i> (2003) und Darstellung der molekularen Umgebung um ein Basenpaar 8/12.....	81
3.18 Bindung der p19-Alanin-Varianten an miR162 und miR168 im BYL <i>in vitro</i>	83
3.19 Struktur-Schemata von miRNA-Duplex-Strukturen aus der miR6149-Familie.....	88
4.1 Schematische Darstellung einer Cytosin-Guanin-Basenpaarung und eines G-U-wobbles.....	104
4.2 Modell zur Interpretation der Ergebnisse der <i>CymRSV</i> -Infektionen von <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen.....	109
7.1 Ergebnisse der p19-Immunpräzipitation (IP) aus dem BYL unter Zusatz von <i>TBSV</i> -RNA.....	126
7.2 Maximale Signalstärken verschiedener miRNA-Isoformen bei Bindung an <i>CIRV</i> -p19.....	127
7.3 Mengenbestimmungen von viralen RNAs und AGO1 in <i>CymRSV</i> -infizierten <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen 2 dpi und 4 dpi.....	128
7.4 Darstellung der Ergebnisse der Schmelzpunktanalysen mit artifiziellen miR162-Varianten.....	132
7.5 <i>In-vitro</i> -Translation der p19-Varianten im BYL.....	134
7.6 CD-Spektren der p19-Varianten: Q107A, V108A, G109A und Wildtyp.....	135
7.7 Exemplarische Darstellung eines Autoradiogrammes nach Bindungsstudie von p19-Q107A an <i>AtmiR168a</i>	136

Tabellenverzeichnis

2.1 Allgemeines Pipettierschema einer PCR zu Klonierzwecken.....	25
2.2 Temperaturprofil für die PCR zu Klonierzwecken.....	26
2.3 Allgemeines Pipettierschema einer Kolonie-PCR.....	26
2.4 Temperaturprogramm für die Kolonie-PCR.....	26
2.5 Allgemeines Pipettierschema einer <i>in-vitro</i> -Transkription.....	30
2.6 Allgemeines Pipettierschema einer 5'-Phosphorylierungsreaktion kleiner RNAs.....	32
2.7 Zusammensetzungsschema von diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelen (10 cm x 10 cm x 1 mm) für die SDS-PAGE.....	34
2.8 Protokoll der Silberfärbung von SDS-Gelen.....	35
2.9 Reaktionsansatz für eine <i>in-vitro</i> -Translation im BYL.....	45
3.1 Dissoziationskonstanten der miRNAs 162, 168 und 403 sowie der siRNA „gf698“ bei der Bindung an <i>CIRV</i> -p19.....	55
3.2 Apparente Bindungskonstanten der Kompetitor-RNAs <i>AtmiR162a,b</i> ; <i>AtmiR168a</i> und <i>AtmiR403</i> , sowie gf698 mit markierter gf698 und <i>CIRV</i> -p19.....	56
3.3 Die <i>*/+/-</i> -Verhältnisse der untersuchten miRNAs in <i>N. benthamiana</i> 2 dpi nach <i>CymRSV</i> - bzw. <i>Cym19Stop</i> -Infektionen.....	67
3.4 Die <i>*/+/-</i> -Verhältnisse der untersuchten miRNAs in <i>N. benthamiana</i> 4 dpi nach <i>CymRSV</i> - bzw. <i>Cym19Stop</i> -Infektionen.....	67
3.5 Dissoziationskonstanten verschiedener kleiner RNAs an <i>CIRV</i> -p19-Varianten.....	85
3.6 Dissoziationskonstanten der miR6149-Isoformen an <i>CIRV</i> -p19.....	89
7.1 Darstellung der Bindeaffinitäten der artifiziellen miR162-Varianten an <i>CIRV</i> -p19.....	129
7.2 Darstellung der Bindeaffinitäten der artifiziellen miR168-Varianten an <i>CIRV</i> -p19.....	130
7.3 Zusammensetzungen der Sekundärstrukturen der p19-Varianten ermittelt mit Hilfe von „BeStSel“ aus den in Abbildung 7.6 dargestellten CD-Spektren.....	135
7.4 Auflistung aller hier verwendeten DNA-Oligonukleotide.....	144
7.5 Auflistung aller hier verwendeten RNA-Oligonukleotide.....	146
7.6 Schemata aller untersuchten Wildtyp-miRNA-Duplex-Strukturen und der siRNA gf698.....	148
7.7 Darstellung der eingesetzten, artifiziellen miR162-Duplex-Strukturen.....	150
7.8 Darstellung der eingesetzten, artifiziellen miR168-Duplex-Strukturen.....	153
7.9 Auflistung aller in dieser Dissertation verwendeten Ausgangsplasmide.....	156

Publikationsliste

Publikationen im Rahmen dieser Arbeit:

Pertermann R, Tamilarasan S, Gursinsky T, et al. (2018) A viral suppressor modulates the plant immune response early in infection by regulating microRNA activity. *mBio*, **9**: e00419-18.

Publikationen in Bearbeitung:

Pertermann R, Tamilarasan S, Schwien L, Golbik RP, and Behrens SE Differential binding of miRNAs by the viral suppressor of RNA silencing p19 is mediated by defined RNA and protein determinants. (in Vorbereitung, noch nicht eingereicht)

Tagungsteilnahmen:

„27th Annual Meeting of the Society for Virology (GfV)“

22.03.2017 – 25.03.2017, Marburg, Germany

Autorenschaft (Vortrag):

Pertermann R, Tamilarasan S, Gursinsky T, Gambino G, Schuck J, Schwien L, Lilie H, Golbik R, Pantaleo V, and Behrens SE. „Differential interactions of a virus suppressor of RNA silencing with miRNAs modulate plant gene expression and antiviral measures early in infection.“

„26th Annual Meeting of the Society for Virology (GfV)“

06.04.2016 – 09.04.2016, Münster, Deutschland

Posterpräsentation, Titel:

Pertermann R, Tamilarasan S, Gursinsky T, Schuck J, and Behrens SE. „A viral suppressor of RNA silencing specifically affects cellular RNA silencing in plants.“

Publikationen zum Zeitpunkt, aber außerhalb des Themas dieser Arbeit:

Spinka M, Seiferheld S, Zimmermann P, Bergner E, Blume AK, Schierhorn A, Reichenbach T, **Pertermann R**, Ehart C, and König S (2017) „Significance of Individual Residues at the Regulatory Site of Yeast Pyruvate Decarboxylase for Allosteric Substrate Activation.“ *Biochemistry*, **56 (9)**, 1285-1298.

Danksagung

Wie jeder gute Prozess ist auch eine Promotion zwar das Projekt eines Einzelnen, kann jedoch nur in einer konstruktiven Arbeitsatmosphäre gelingen und steht in seinem Erfolg oftmals in Zusammenhang mit guten Ratschlägen und Unterstützungen vieler Kollegen. An dieser Stelle möchte ich mich daher bei den Personen bedanken, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Das wäre zum Ersten Herr Professor Prof. Dr. Sven-Erik Behrens, der mir ermöglichte diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen und dessen Unterstützungen und Anregungen maßgeblich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Robert Gary Sawers und Frau Prof. Dr. Laura E. Rose danke ich für die freundliche Übernahme der Zweit- und Drittgutachten dieser Arbeit.

Ich möchte mich auch bei Dr. Tamaras Selvaraj bedanken. Sein steter Optimismus, seine Hilfsbereitschaft und die gute Laune beim Arbeiten nebeneinander im Labor mit verschiedenen VSRs haben mir so manches Mal den Glauben an den Erfolg der Arbeit zurückkehren lassen.

Mein Dank gilt auch PD Dr. habil. Ralph-Peter Golbik für seine fast schon unglaubliche fachliche Kompetenz und für seine Unterstützung nach meinem Raumwechsel.

Ich möchte mich hiermit auch bei allen Mitgliedern der Abteilung „Mikrobielle Biotechnologie“ bedanken für das freundschaftliche und warme Arbeitsklima, und auch für die große Hilfe bei Problemen im Projekt oder bei Vorträgen und für die vielen aufmunternden Worte.

Allen Kollegen, die mein Projekt tatkräftig mit unterstützten, möchte ich ebenso meinen Dank aussprechen, insbesondere Dr. Claus Weinholdt, Dr. Jana Schuck, PD Dr. Knut Krohn, Dr. Angelika Schierhorn, PD Dr. Hauke Lilie, Dr. Torsten Gursinsky, Dr. Vitantonio Pantaleo, Dr. Giorgio Gamino und viele mehr.

Außerdem möchte ich mich beim GRK1591 bedanken, meine Daten regelmäßig in einer angenehmen wissenschaftlichen Atmosphäre präsentieren und diskutieren zu können. Hervorzuheben sind hierbei auch die Mitglieder meines „*thesis committees*“, welche durch kritisches Nachfragen und Anregen diverse Impulse bei mir setzen konnten.

Zu guter Letzt möchte ich mir zudem bei meinem privaten Umfeld bedanken, für die viele Geduld das Verständnis und für das Zuhören, wenn mal Frust aufkam. Ich danke euch allen.

Lebenslauf

Name: M. Sc. Robert Heinz Gerhard Pertermann

Geburt: 04. April, 1989

Arbeitserfahrung

16.10. 2013 – heute Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Biochemie und Biotechnologie
Doktorand: „Untersuchungen zur Funktion eines viralen Suppressors des RNA-*silencing* bei der Regulation der Aktivität von microRNAs“
Laborzeit (dazu): 16. Oktober 2013 – 15. Juni 2017

Weiterbildung

08. 04.2019 – 06.09.2019 ATV GmbH
Fachseminar „Life Science Management“

26.03.2018 – 15.06.2018 Habmann-Aufstiegsakademie
GMP-Kurs “Experte Qualität + GMP” (TÜV-zertifiziert)

Studium

01.10.2011 – 15.10.2013 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Biochemie und Biotechnologie
MSc. Biochemie; Abschlussnote: 1,5

01.10.2008 – 30.09.2011 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Biochemie und Biotechnologie
BSc. Biochemie; Abschlussnote: 1,8

Schulbildung

1999-30.06.2007 Werner-Heisenberg-Schule (Gymnasium), 04159 Leipzig
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

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.

Halle (Saale), 04.04.2019

Robert Pertermann