

**Untersuchung des AGO- und RNase H-abhängigen
RNA-*silencings* mittels eines pflanzlichen In-vitro-Systems
zur
Etablierung eines wirksamen antiviralen Pflanzenschutzmittels**

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Cornelia Gruber

Gutachter: Prof. Sven-Erik Behrens
Prof. Gary Sawers
Prof. Christina Wege

öffentlich verteidigt am 28.09.2023

*Groß sind die Taten des HERRN,
Sie werden erforscht von allen, die Gefallen an ihnen haben.*

[Psalm 111,2]

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	v
II.	Tabellenverzeichnis	xi
III.	Abbildungsverzeichnis	xiii
IV.	Abkürzungsverzeichnis	xv
1	Einleitung.....	1
1.1	Gegenwärtige Herausforderungen der Landwirtschaft mit Pflanzenpathogenen	1
1.2	Pflanzenpathogene Wirkweise am Beispiel des Tomatenzwergebush-Virus	1
1.3	RNA-Silencing	4
1.3.1	DICER-LIKE-Endonukleasen prozessieren dsRNA	5
1.3.2	Argonaute-Proteine bilden die Hauptkomponente des RNA-induced-silencing-Komplexes	6
1.3.3	Identifikation von RISC-assoziiierenden Proteinen und effizienten vsiRNA mittels BY2-Lysat	8
1.4	Entwicklung und Funktion der RNase H-Domäne	9
1.5	RNase H.....	10
1.5.1	RNase H1.....	11
1.5.2	RNase H2.....	13
1.6	Die Wirkung von RNAi und antisense-Nukleinsäuren in der technologischen Anwendung.....	15
1.6.1	RNAi in der technologischen Anwendung.....	15
1.6.2	ASOs in der technologischen Anwendung.....	16
1.7	Zielstellung	20
2	Material.....	21
2.1	Puffer und Lösungen.....	21
2.2	Verwendet Plasmide, Vektoren und Oligonukleotide.....	23
2.3	Medien und Antibiotika.....	23
2.4	Bakterienstämme und Pflanzenkultivare	24
2.5	Verwendete Computerprogramme	24
3	Methoden.....	25
3.1	Arbeiten mit Bakterien und Pflanzen	25

3.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen und Transformation von Plasmid-DNA .	25
3.1.2	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von Plasmid-DNA in <i>A. tumefaciens</i>	25
3.1.3	Pathogen-Behandlung von Pflanzen	26
3.2	Arbeiten mit dem BY2-System.....	26
3.2.1	Herstellung des BY2-Lysats.....	26
3.2.2	Micrococcus-Nuklease-Behandlung.....	27
3.2.3	In-vitro-Translation.....	27
3.2.4	Luciferase-Assay zur Qualitätsüberprüfung von BYL	28
3.2.5	<i>Cleavage</i> -Assay.....	28
3.2.6	RNase H-Assay	28
3.2.7	RNase H-Assay mit gereinigter RNase H aus <i>E. coli</i>	29
3.3	Molekularbiologische Arbeiten mit DNA.....	29
3.3.1	Isolation von Plasmid-DNA	29
3.3.2	Isolation von genomischer DNA aus Blattmaterial.....	30
3.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	30
3.3.4	Gelelektrophorese.....	31
3.3.5	Reinigung von DNA-Fragmenten	31
3.3.6	Restriktionsverdau von DNA.....	32
3.3.7	Reinigung und Präzipitation von linearisierter Plasmid-DNA	32
3.3.8	Phosphorylierung von Oligonukleotiden.....	32
3.3.9	Ligation	33
3.3.10	Klonierung	33
3.3.11	Konzentrationsbestimmung.....	35
3.3.12	Sequenzierung.....	35
3.4	Arbeiten mit RNA.....	35
3.4.1	Isolation von RNA aus Blattmaterial	35
3.4.2	DNase I-Verdau	35
3.4.3	Hybridisierung von kleinen synthetischen Nukleinsäuren	35

3.4.4	In-vitro-Transkription	36
3.4.5	[γ - ³² P]-Adenosintriphosphat (ATP)-Markierung des <i>Low Range</i> RiboRuler (Thermo Fisher Scientific Inc.).....	36
3.4.6	Reinigung und Präzipitation von RNA.....	37
3.4.7	Denaturierendes Agarose-Gel.....	37
3.4.8	Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
3.4.9	Herstellung und Gelelektrophorese eines nativen Polyacrylamid-Gels	38
3.4.10	Autoradiographie	38
3.4.11	Isolation von Nukleinsäuren aus einem Polyacrylamid-Gel.....	38
3.4.12	3'- <i>Rapid amplification of cDNA ends</i> (RACE)	39
3.4.13	cDNA-Synthese.....	40
3.5	Proteinbiochemische Arbeiten	40
3.5.1	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität	40
3.5.2	Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blot.....	41
3.5.3	Silberfärbung.....	42
3.5.4	Immunpräzipitation (IP)	42
3.5.5	Präparation immunpräzipitierter Proteine und Durchführung der Massenspektrometrie (MS)	43
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Identifizierung von RISC-assoziierten Proteinen mittels BYL	45
4.1.1	Co-Immunpräzipitation von FLAG-AGO1 und FLAG-AGO2	45
4.1.2	Durchführung der Massenspektrometrie und Auswertung der Daten.....	47
4.1.3	Erste Auswahl der Kandidaten	47
4.1.4	Klonierung und Herstellung der Transkripte der ausgewählten Kandidatengene	49
4.1.5	Überprüfung der Interaktion zwischen FLAG-AGO1 und potenziellen Kandidaten mittels Co-Immunpräzipitation	49
4.1.6	Einfluss der Kandidaten auf die <i>cleavage</i> -Effizienz von AGO1	50

4.1.7	Entwicklung eines In-vivo-Systems zur Überprüfung des Einflusses der Kandidaten auf das RNA- <i>silencing</i>	53
4.1.8	Neubewertung der MS-Daten	59
4.2	Identifizierung und Charakterisierung einer RNase H-Aktivität im BYL	63
4.2.1	DNA-Moleküle induzieren AGO-unabhängig eine RNA-Hydrolyse im BYL....	63
4.2.2	Das 5'-Ende und die Länge der verwendeten Einzelstrang-DNA haben keinen Einfluss auf die Spalteffizienz	65
4.2.3	Die DNA-induzierte Hydrolyse ist Mg ²⁺ -Ionen abhängig	65
4.2.4	Immunpräzipitation von ssDNA-programmierten FLAG-AGOs	66
4.2.5	<i>E. coli</i> -RNase H generiert das gleiche Spaltmuster wie die BYL-interne Aktivität	68
4.2.6	Identifizierung der Spaltstellen	69
4.2.7	Ein Verkürzen des ASOs am 3'-Ende verändert die bevorzugte Spaltstelle ..	70
4.2.8	DNA:RNA:DNA- <i>targets</i> lassen zwischen einer RNase H1- und RNase H2-Aktivität unterscheiden.....	73
4.2.9	Das Einfügen einer Basenfehlpaarung 5'-seitig des Ribonukleotids verhindert die Hydrolyse der <i>target</i> -RNA	75
4.2.10	Die im BYL enthaltenen RNase H-Aktivitäten erkennen nur bedingt den Übergang von RNA zu DNA.....	76
4.2.11	Immunpräzipitation der <i>N. benthamiana</i> -RNase H2	78
4.2.12	Die im BYL vorliegende RNase H-Aktivität schneidet auch das TBSV-Genom ..	81
4.2.13	ASOs können die Pflanze vor einer Virus-Infektion schützen.....	83
4.2.14	In-vitro-Spaltaktivität modifizierter ASOs im BYL.....	85
4.2.15	Stabilität modifizierter ASOs im BYL	87
4.2.16	Modifizierte ASOs können den Schutz vor TBSV-Infektionen verbessern	88
5	Diskussion.....	93
5.1	Identifizierung von RISC-Faktoren.....	93
5.1.1	Co-Immunpräzipitation von potenziellen AGO-Interaktionspartnern	93
5.1.2	Ein Luciferase-Reporter-Assay zur Untersuchung der Beteiligung der potenziellen RISC-Faktoren im RNA- <i>silencing</i> in <i>N. benthamiana</i>	97
5.1.3	Mögliche Funktion neu ausgewählter Kandidaten im RNA- <i>silencing</i>	102

5.2	DNA-dirigierte RNA-Spaltung.....	104
5.2.1	Pflanzliche AGO-Proteine werden nicht zu einem DNA- <i>induced-silencing-complex</i> (DISC) programmiert.....	104
5.2.2	RNase H katalysiert DNA-abhängige die endonukleolytische Hydrolyse einer RNA im BYL.....	106
5.2.3	Unterscheidung zwischen RNase H1 und H2 aufgrund des Hydrolysebereichs in der <i>target</i> -RNA.....	107
5.2.4	Unterscheidung zwischen RNase H1 und H2 aufgrund der Spaltung verschiedener DNA:RNA:DNA- <i>targets</i>	111
5.2.5	Die im BYL vorhandene RNase H2 weist keine JRNase-Aktivität auf.....	113
5.2.6	Die erfolgreiche Immunpräzipitation der RNase H2-Untereinheiten.....	114
5.2.7	ASOs können als antiviraler Wirkstoff in Pflanzen verwendet werden.....	116
5.2.8	Modifikationen verbessern die Stabilität von ASOs im BYL und den Pflanzenschutz.....	117
6	Zusammenfassung.....	123
V.	Literaturverzeichnis.....	xvii
VI.	Danksagung.....	xxvii
VII.	Anhang.....	xxix
VIII.	Lebenslauf.....	xlvi
IX.	Eidstattliche Erklärung.....	xlix

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Enzyme	21
Tabelle 2.2:	Selbst hergestellte Puffer und Lösungen	21
Tabelle 2.3:	Verwendete Medien	23
Tabelle 2.4:	Verwendete Bakterienstämme.....	24
Tabelle 3.1:	Zusammensetzung der In-vitro-Translation	27
Tabelle 3.2:	Zusammensetzungen von PCR-Ansätzen.....	30
Tabelle 3.3:	Programme der Temperaturregler zur PCR	31
Tabelle 3.4:	Zusammensetzung der endständigen Einzelstrang-Markierung	33
Tabelle 3.5:	<i>Golden Gate</i> -Klonierung der Doppelstrang-Oligonukleotide in den Level I-Vektor.....	34
Tabelle 3.6:	<i>Golden Gate</i> -Klonierung der Fragmente aus den Level I-Vektoren in den Zielvektor.....	34
Tabelle 3.7:	Reaktionsansatz der In-vitro-Transkription	36
Tabelle 3.8:	Zusammensetzung eines denaturierenden Harnstoffgels	38
Tabelle 3.9:	Reaktionsansatz der Linker-Ligation an RNA	39
Tabelle 3.10:	Reaktionsansätze der cDNA-Synthese mit den unterschiedlichen <i>reverse</i> Transkriptasen	40
Tabelle 3.11:	Verwendete Mengen für Trenn- und Sammelgel	41
Tabelle 4.1:	Aus den MS-Daten ausgewählte potenzielle AGO1-Interaktionspartner. 48	
Tabelle 4.2:	Neu ausgewählte Kandidaten aus den Datensätzen FLAG-AGO1, FLAG-AGO2 und BYL	62
Tabelle 4.3:	Zusammenfassung der Spaltstellen im <i>target</i> und minimale Anzahl von Heteroduplex-Basenpaaren 5'-seitig der Spaltstelle in der <i>target</i> -RNA. ...	72
Tabelle 5.1:	Überblick über die möglichen in der Literatur beschriebenen RNase H1-Spaltmuster.	109
Tabelle 5.2:	Überblick über die möglichen in der Literatur beschriebenen RNase H2-Spaltmuster.	110
Tabelle 5.3:	Zusammenfassung der beobachteten Rangfolge der modifizierten ASOs.	120
Tabelle 6.1:	Fertigpuffer.....	xxix
Tabelle 6.2:	Verwendete Plasmide und Vektoren.....	xxix
Tabelle 6.3:	Verwendete Oligonukleotide.....	xxxii

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Darstellung einer mit TBSV infizierten <i>N. benthamiana</i> -Pflanze.	2
Abbildung 1.2: Darstellung der Genomorganisation von TBSV.	3
Abbildung 1.3: Darstellung des RNA- <i>silencing</i> und der Identifikationsstrategie von esiRNAs.	5
Abbildung 1.4: Proteindomänen von Argonaute (AGO)-Proteinen.....	8
Abbildung 1.5: Domänenstruktur von RNase H1 und RNase H2.....	11
Abbildung 1.6: RNase H1 und RNase H2 spezifische Spaltmuster	13
Abbildung 1.7: Darstellung von Beispielen einer möglichen Anwendung von <i>antisense</i> -Oligonukleotiden (ASOs) in einer Zelle.....	17
Abbildung 1.8: Ausgewählte Nukleotidmodifikationen.	19
Abbildung 4.1: Silberfärbung der immunpräzipitierten FLAG-AGO1- und FLAG-AGO2-Proteine.....	46
Abbildung 4.2: Western Blot der mit FLAG- <i>NtAGO1</i> co-immunpräzipitierten Kandidatenproteine.	50
Abbildung 4.3: Einfluss der Kandidatenproteine auf die Spaltaktivität von <i>NtAGO1</i>	52
Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des GFP-basierten <i>silencing</i> -Systems.....	55
Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des Luciferase-basierten <i>silencing</i> -Systems.	56
Abbildung 4.6: Effekte der Mutagenese der Kandidatengene auf das Luciferase- <i>silencing</i>	59
Abbildung 4.7: Darstellung der mittels MS identifizierten potenziellen RISC-Faktoren. ..	61
Abbildung 4.8: <i>Cleavage</i> einer <i>target</i> -RNA erfolgte in Abhängigkeit einer ssDNA oder dsDNA unabhängig von co-exprimiertem AGO.	64
Abbildung 4.9: Inhibition der Spaltung durch AGO1 bzw. die BYL-interne Aktivität mittels EDTA.	66
Abbildung 4.10: <i>Cleavage</i> -Assay mit immunpräzipitiertem AGO-Protein, programmiert mit ssDNA.....	67
Abbildung 4.11: <i>Cleavage</i> -Assay zum Vergleich der ssDNA-vermittelten <i>target</i> -Spaltung im BYL mit der Aktivität von <i>NbAGO1</i> und <i>E. coli</i> -RNase H.	69
Abbildung 4.12: Darstellung der durch die potenzielle RNase H-Aktivität im BYL generierten Spaltstelle in der GFP- <i>target</i> -RNA.....	70
Abbildung 4.13: Einfluss der ASO-Länge auf die Schnittstelle der potenziellen BYL-RNase H.	71
Abbildung 4.14: RNase H-Assay mit DNA:RNA:DNA/DNA-Heteroduplexen mit der im BYL vorhandenen potenziellen RNase H.	74

Abbildung 4.15: Effekte von Basenfehlpaarungen im D ₉ R ₁ D ₁₇ /DNA-Heteroduplex auf die RNase H-Aktivität.....	75
Abbildung 4.16: RNase H-Assay mit RNA:DNA-Hybrid als <i>target</i> zur Überprüfung einer JRNase-Aktivität.	77
Abbildung 4.17: Nachweis der immunpräzipitierten RNase H2 mit anschließendem RNase H-Assay.	80
Abbildung 4.18: ASOs, deren Sequenzen dem <i>guide strand</i> effizienter vsiRNAs entsprechen, induzieren eine Spaltung der TBSV- <i>target</i> -RNA <i>in vitro</i>	82
Abbildung 4.19: Die <i>in vitro</i> effizienten ASOs 209A oder 209T schützen Pflanzen vor einer TBSV-Infektion.....	84
Abbildung 4.20: Auswirkung von Nukleotidmodifikationen auf die ASO-vermittelte Hydrolyse der TBSV- <i>target</i> -RNA.....	86
Abbildung 4.21: Effekte der Nukleotidmodifikationen des ASOs auf die ASO-Stabilität.	88
Abbildung 4.22: ASO-Modifikationen verbessern den Schutz vor TBSV-Infektionen.	90
Abbildung 4.23: ASO-Behandlung der Pflanzen vor der Inokulation von TBSV-RNA schützt vor einer Infektion.	92
Abbildung 5.1: Überblick über die möglichen RNase H-Nukleinsäure-Bindungen und ihre in der Literatur beschriebenen Spaltmuster.....	107
Abbildung 5.2: Zusammenfassung der Spaltung verschiedener DNA:RNA:DNA-Substrate durch RNase H-Aktivität in BYL.	113
Abbildung 5.3: Darstellung der RNase H2 aus den Untereinheiten A, B, C mit entsprechender Immunpräzipitation und Spaltaktivität.	115
Abbildung 5.4: Sequenz der beiden effizientesten ASOs mit den Modifikationen PS2 und MOE4.	121
Abbildung 6.1: Menge der quantifizierten <i>N. tabacum</i> -Proteine in parts per million (ppm).	xl
Abbildung 6.2: Sequenz-unspezifische Stabilisierung der GFP- <i>target</i> -RNA durch PS20-modifiziertes ASO209.	xli
Abbildung 6.3: Plasmidkarten mit den klonierten CDS der potenziellen RISC-Faktoren.	xlili
Abbildung 6.4: Plasmidkarten der CRISPR/Cas-Konstrukte.	xlv
Abbildung 6.5: Plasmidkarten der CDS der RNase H2-Untereinheiten A, B und C.	xlvi

IV. Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent	JRNase	<i>Junction Ribonucleases</i>
% (w/v)	Gewichtsprozent	LB	<i>left-border</i> , Lysogeny-Broth-Medium
A	Adenin	LNA	<i>locked nucleic acid</i>
ABA	Abscisinsäure	LNA2	locked nucleic acid-Modifikation an dem ersten und letzten Nukleotid
AGO	ARGONAUTE	M	Mutante
AKIP-like	<i>Abscisic acid-activated protein kinase-interacting protein 1-like</i>	mCH	mCherry
amiRNA	artifizielle miRNA	MID	mittlere Domäne
Amp	<i>Ampicillin</i>	miRNA	<i>microRNA</i>
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>	MOE	2'-O-Methoxyethyl
APS	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	MOE2	2'-O-Methoxyethyl-Modifikation am ersten und letzten Nukleotid
ASO	<i>antisense</i> -Oligonukleotid	MOE4	2'-O-Methoxyethyl-Modifikationen an den zwei ersten und zwei letzten Nukleotiden
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	mRNA	<i>messenger RNA</i>
ATP	Adenosintriphosphat	MS	Massenspektrometrie, Murashige-Skoog
BY2	<i>Bright Yellow cultivar 2</i>	MT	Mitochondrien- <i>target</i> -Sequenz
BYL	BY2-Lysats	NaAc	Natriumacetat
C	Cytosin	Nb	<i>Nicotiana benthamiana</i>
Cas9	CRISPR-associated 9	NEB	New England Biolabs
cDNA	komplementäre DNA	NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
CDS	<i>coding sequence</i>	NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
Cpn60	Chaperonin 60/TCP-1	nt	Nukleotide
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>	Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
CTP	Cytidintriphosphat	OD600	optische Dichte 600
DCL	DICER-LIKE-Proteine	OMe	2'-O-Methyl
DISC	<i>DNA-induced silencing complex</i>	OMe2	2'-O-Methyl-Modifikation am ersten und letzten Nukleotid
dpi	<i>days post inoculation</i>	OMe4	2'-O-Methyl-Modifikationen an den zwei ersten und zwei letzten Nukleotiden
dsDNA	Doppelstrang-DNA	ORF	<i>open reading frame</i>
dsRNA	Doppelsträngige RNA-Moleküle	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PAZ	PIWI-Argonaute-Zwille
EF1A	<i>Translation Elongation Factor EF1A</i>	PCR	Polymerasekettenreaktion
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure	PIWI	<i>P-element induced wimpy testis</i>
EIF4A	eukaryotischer Initiationsfaktor 4A	PNK	Polynukleotid-Kinase
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>	Pol	RNA-Polymerase V
esiRNA	effiziente vsiRNA	pre-mRNA	precursor-mRNA
EtOH	Ethanol	pri-miRNA	primäres <i>microRNA</i> -Transkript
FBW2	F-BOX WITH WD-40 2	PS	Phosphorothioat
Fluc	Firefly-Luziferase	PS2	Phosphorothioat-Modifikation zwischen dem ersten und zweiten sowie dem vorletzten und letzten Nukleotid
G	Guanin		
GFP	Grün fluoreszierendes Protein		
HBD	Hybrid-Binde-Domäne		
HSP	<i>HEAT-SHOCK-PROTEIN</i>		
IP	Immunpräzipitation		

PS20	Phosphorothioat-Modifikation zwischen allen Nukleotiden	Spec	<i>Spectinomycin</i>
PTGS	post-transkriptionelles Gen- <i>silencing</i>	sRNA	<i>small RNA</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid	ssDNA	Einzelstrang-DNA
PVX	<i>Potato virus X</i>	TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
R	Ribonukleotid	TBSV-A	TBSV-Fragment A
RACE	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
RB	<i>right-border</i>	TFBI	Transformationspuffer I
RH2A	RNase H2-Untereinheiten A	TFBII	Transformationspuffer II
RH2B	RNase H2-Untereinheiten B	TGS	transkriptionelles Gen- <i>silencing</i>
RH2C	RNase H2-Untereinheiten C	TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>	TPR	<i>Tetratricopeptid repeat protein 7</i>
RLU/s	relative Lichteinheit pro Sekunde	TRN1	TRANSPORTIN 1
RNAi	RNA-Interferenz	U	Uracil
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat	ÜNK	Übernacktkultur
PAB	<i>Polyadenylate binding</i> -Protein	UPF1	<i>up-frameshift protein 1</i>
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur	UTR	<i>untranslated region</i>
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat	Vol	Volumen
sgRNA	<i>single guide RNA</i>	vsiRNA	<i>viral small interfering RNA</i>
siDNA	<i>small interfering DNA</i>	VSR	viraler Suppressor des RNA- <i>silencing</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>	WT	Wildtyp
		ZFP	Zink-Finger-Protein 3

1 Einleitung

1.1 Gegenwärtige Herausforderungen der Landwirtschaft mit Pflanzenpathogenen

Schon seit den Anfängen der Landwirtschaft verursachen Pflanzenpathogene wie Bakterien, Oomyceten, Pilze, Viren, Nematoden und Insekten enorme Ernteverluste. Derzeit wird der weltweite Ertragsverlust auf 30 % und die Wirksamkeit von Pflanzenschutzmitteln auf etwa 50 % geschätzt (Oerke und Dehne 2004). Durch den Schädlingsbefall verursachte Krankheitssymptome führen zu einem Absterben der Pflanzen, induzieren aber auch Nekrosen auf Blättern und Früchten oder ein verringertes Wachstum. Während gegen Bakterien, Oomyceten, Pilze, Nematoden und Insekten der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln wirksam ist, können Virusinfektionen lediglich über die Eliminierung der Insekten, die als Überträger (sog. Vektoren) fungieren, oder durch den Einsatz von resistenten Pflanzen kontrolliert werden (Nicaise *et al.* 2003). Eine häufig verwendete Strategie zur Generierung einer Virusresistenz ist die Erzeugung transgener Pflanzen durch das Einbringen einer viralen Sequenz in das Pflanzengenom, in dessen Folge eine Immunabwehr ausgelöst wird (siehe Absatz 1.6.1). Allerdings ist der Einsatz transgener Pflanzen nicht weltweit erlaubt (Aaziz und Tepfer 1999; Dangl *et al.* 2013). Für alternative Strategien ist das Erforschen des antiviralen Immunsystems der Pflanze von großer Relevanz, da auf Basis dieser Kenntnisse Schutzmaßnahmen entwickelt werden können. Zunächst ist es dazu sinnvoll, die pflanzenpathogene Wirkweise von Viren zu verstehen.

1.2 Pflanzenpathogene Wirkweise am Beispiel des Tomatenzwergbusch-Virus

Viren sind infektiöse Partikel, die im Allgemeinen aus Nukleinsäuren und einer Proteinhülle bestehen und sich nur in einer Wirtszelle vermehren können. Pflanzenviren werden nach Art des Virusgenoms in die Gruppen der DNA- und RNA-Viren eingeteilt (Lefkowitz *et al.* 2018). Das Genom von RNA-Viren kann als Einzelstrang in einer (+) -Strang-, (-) -Strang- oder (+/-) -Strang-Polarität auftreten. Das Genom der (+) -Strang-RNA-Viren dient direkt als *messenger* RNA (mRNA). Das Tomatenzwergbusch-Virus, auch als *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) bezeichnet, dient in dieser Arbeit als Modellsystem der (+) -Strang-RNA-Viren und wurde zur Untersuchung einer möglichen der Pflanzenprotektion genutzt (Scholthof *et al.* 2011; Yamamura und Scholthof 2005).

TBSV gehört zur Gattung *Tombusvirus* in der Familie *Tombusviridae*. Wirtspflanzen des Virus sind unter anderem Tomate, Aubergine, Paprika und Tabak. Krankheitssymptome sind wirtsabhängig und äußern sich durch buschiges Wachstum, Nekrosen auf Blättern und Früchten, deformierte oder eingerollte Blätter und ein gehemmtes Wachstum. Bei der australischen Tabakart *Nicotiana benthamiana* (*Nb*), die als Modellpflanze der Familie der *Solanaceae* genutzt wird, führt die Infektion, wie in Abbildung 1.1 gezeigt, zum Absterben der Pflanze (Yamamura und Scholthof 2005).

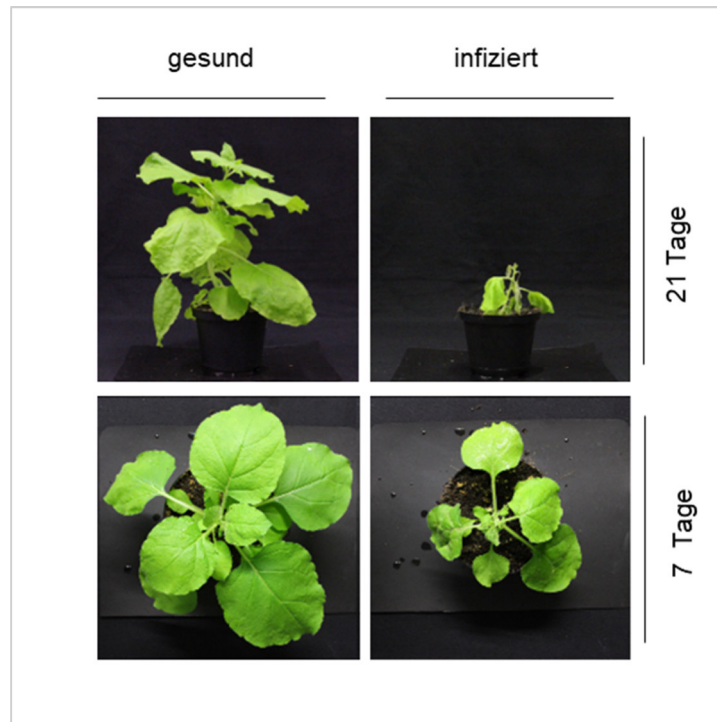


Abbildung 1.1: Darstellung einer mit TBSV infizierten *N. benthamiana*-Pflanze.

TBSV-infizierte *N. benthamiana*-Pflanzen sind 21 Tage nach Inokulation in ihrem Wachstum gehemmt und weisen nach sieben Tagen eingerollte Blätter auf.

Bei der Infektion der Pflanze ist kein Überträger-Vektor von TBSV bekannt. Höchstwahrscheinlich tritt das Virus über Wunden in die Pflanzenzelle ein. Zunächst wird das virale Genom aus der Proteinhülle freigesetzt. Das (+) -Strang-RNA-Genom des TBSV umfasst 4,8 kb, ist hoch strukturiert und codiert, wie in Abbildung 1.2 schematisch gezeigt, für fünf Proteine (Hearne *et al.* 1990; Wu *et al.* 2013). Die für die Proteine codierende Gensequenzen, die sogenannten *open reading frames* (ORFs), sind von einer 5'- und 3'-*untranslated region* (UTR) flankiert (Miller und White 2006; Wu und White 1999). Die RNA-RNA-Interaktion zwischen der 3'- und der 5'-UTR des Genoms ist essenziell, da sich nur so das RNA-Genom zu einer komplexen Struktur faltet und auch nur so die Initiation der Translation ermöglicht wird (Miller und White 2006; Wu und White 1999).

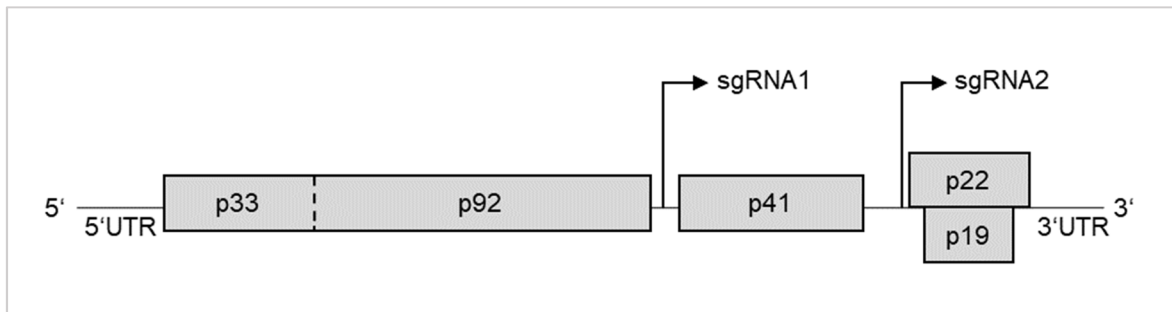


Abbildung 1.2: Darstellung der Genomorganisation von TBSV.

Organisation des Virus-Genoms (Linie) mit *open reading frames* (ORFs, dargestellt als Rechtecke), die für die folgenden Proteine codieren: p33 (Cofaktor der Polymerase), p92 (RNA-abhängige RNA-Polymerase), p41 (Hüllprotein), p22 (*movement*-Protein) und p19 (viraler Suppressor des RNA-*silencings*). Markiert sind außerdem die Startpunkte für die Transkription der subgenomischen RNA 1 (sgRNA1) und 2 (sgRNA2) und die 5'- und 3'-*untranslated region* (UTR). Modifizierte Darstellung nach Wu *et al.* 2013.

Die nach einer Infektion synthetisierten Proteine des TBSV-Genoms sind p92, p33, p41, p22 und p19. Der Co-Faktor p33 und die RNA-abhängige RNA-Polymerase p92 werden direkt vom Genom, das in diesem Fall als mRNA dient, translatiert (Hearne *et al.* 1990; Oster *et al.* 1998; Pogany *et al.* 2005). p92 entsteht durch Überlesen des Stopcodons von p33 (Hearne *et al.* 1990; Scholthof, Scholthof und Jackson 1995). Beide Proteine sind essenziell für die Replikation der viralen RNA. In der Replikation dient das (+) -Strang-Genom als Matrize für die Synthese des (-) -Strang-Intermediates. Dieser (-) -Strang wird im nächsten Schritt für die Synthese des neuen (+) -Strangs verwendet. Während der Replikation entstehen in Abhängigkeit von strukturierten Komponenten des viralen Genoms kürzere (-) -Stränge, die als Vorlage für die Transkription von zwei subgenomische RNAs dienen (Lin *et al.* 2007; Miller und Koev 2000). Das von der subgenomischen RNA 1 translatierte p41 ist Baustein der Hülle, welche das TBSV-Genom umgibt und die Verbreitung des Virus über eine größere Distanz in der Pflanze erlaubt (Olson *et al.* 1983). Die Viruspartikel werden nach dem Verpacken des Virusgenoms aus der Zelle freigesetzt. Die subgenomische RNA 2 dient als Template für die Translation der Proteine p22 und p19. Der *ORF* von p22 überspannt die codierende Sequenz von p19 (Abbildung 1.2). In Abhängigkeit des jeweiligen Startcodons erfolgt die Translation der Proteine p19 und p22. Das p19-Startcodon wird von den Ribosomen präferiert (Scholthof *et al.* 1999). p22 ist das *movement*-Protein, das für die interzelluläre Verbreitung des viralen Genoms sorgt. p19 bindet als viraler Suppressor des RNA-*silencing* (VSR) mit hoher Affinität die 21 Nukleotide (nt) langen *viral small interfering RNAs* (vsiRNAs), um deren Assoziation an den *RNA-induced silencing complex* (RISC) und dadurch die systemische Immunantwort zu verhindern, siehe Abschnitt 1.3 (Omarov *et al.* 2006; Scholthof, Scholthof, Kikkert, *et al.* 1995; Silhavy *et al.* 2002). Bei der gegen eine Virusinfektion gerichteten Immunantwort handelt es sich um den Mechanismus des RNA-*silencings*.

1.3 RNA-Silencing

Der Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) bzw. das *RNA-silencing* ermöglicht es der Pflanze, die Expression verschiedener Gene auf Ebene der RNA, wie in Abbildung 1.3 A-B schematisch dargestellt, zu regulieren. Dieser Mechanismus stellt auch eine zentrale Komponente der viralen Immunabwehr der Pflanzen dar (Abbildung 1.3C). Auf diese Weise kann die Vervielfältigung des Virus empfindlich gestört werden. Kleine RNA (*small* RNA, sRNA)-Duplexe werden in der Pflanze erzeugt, indem doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) durch DICER-LIKE-Proteine (DCL) endonukleolytisch prozessiert werden (Bologna und Voinnet 2014). Diese sRNA-Duplexe werden anschließend in die Hauptkomponente des *RNA-silencing*, dem ARGONAUTE-Protein (AGO), eingebaut, woraufhin sich der Effektorcomplex, auch als *RNA-induced silencing complex* (RISC) bezeichnet, bildet (Abbildung 1.3A-B). Während der Assemblierung des RISC wird der sogenannte *passenger strand* des gebundenen sRNA-Duplexes aus dem RISC entfernt. Der RISC erlangt durch den verbliebenen *guide strand* Affinität zu einer komplementären Nukleinsäure und reguliert deren Aktivität (Tomari und Zamore 2005). Diese Regulation kann in Form des post-transkriptionellen Gen-*silencing* (PTGS) oder des transkriptionellen Gen-*silencing* (TGS) stattfinden. Beim PTGS erfolgt die Inhibition auf Ebene der Translation entweder durch die Bindung des RISC an die mRNA oder das AGO-Protein katalysiert die endonukleolytische Hydrolyse der RNA, welche im Folgenden als RNA-Spaltung bezeichnet wird. Beim TGS erfolgt die Methylierung der DNA durch Methyltransferasen, welche durch AGO-Proteine rekrutiert werden, was zu einer Hemmung der Transkription führt (Bologna und Voinnet 2014).

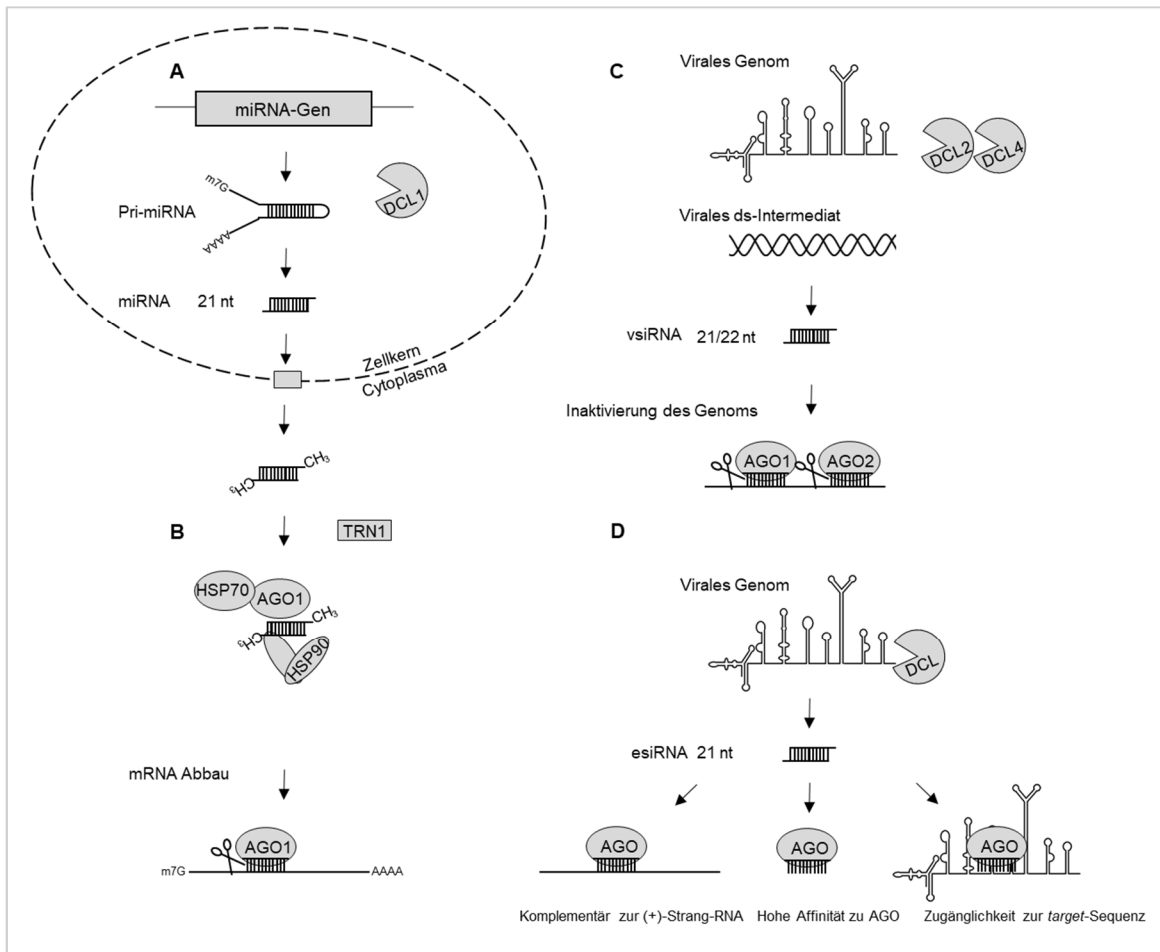


Abbildung 1.3: Darstellung des RNA-silencing und der Identifikationsstrategie von esiRNAs.

(A) *Micro* (mi)RNA-Transkripte werden von DICER-LIKE 1 (DCL1) zu miRNAs prozessiert und anschließend aus dem Zellkern transportiert. TRANSPORTIN 1 (TRN1) unterstützt die Assoziation der miRNA an AGO1. (B) Im Cytoplasma wird AGO1 unter anderem mit Hilfe der Faktoren HEAT-SHOCK-PROTEIN (HSP) 70 und HSP90 und dem CYCLOPHILIN 40 (CYP40) mit der miRNA beladen, um zur mRNA dirigiert zu werden und deren Abbau durch eine Spaltung zu induzieren. (C) Das virale Genom oder ein doppelsträngiges RNA-Intermediat des Genoms wird von DCL2/4 in *viral small interfering RNAs* (vsiRNA) prozessiert, welche von AGO1 oder AGO2 gebunden werden. Die vsiRNA dirigiert das AGO-Protein zum viralen Genom, das durch endonukleolytische Hydrolyse abgebaut wird. (D) Zur Identifizierung von effizienter vsiRNA (esiRNA) wurden drei Annahmen gemacht. EsiRNAs werden aus Virusgenom generiert und sollten komplementär zur eher zugänglicheren (+)-Strang-RNA sein, eine hohe Affinität zu AGO haben und an eine zugängliche Position im Virus-Genom binden. Darstellung modifiziert nach Bologna und Voinnet 2014; Gago-Zachert *et al.* 2019; Iki *et al.* 2012.

1.3.1 DICER-LIKE-Endonukleasen prozessieren dsRNA

Im Zuge des RNA-silencing werden lange, doppelsträngige RNA-Moleküle, welche durch Hybridisierung zweier komplementärer Sequenzen entstehen oder strukturelle Elemente von RNA-Sekundärstrukturen in kleine 21–24 nt lange sRNAs mit einem 2-Nukleotid-3'-Überhang und 5'-Monophosphat prozessiert. Dieser Prozess wird durch die sogenannten DICER-LIKE-Endonukleasen (DCLs) ausgeführt (Bologna und Voinnet 2014; Reinhart *et al.* 2002). DCLs wurden in verschiedenen höheren Pflanzen, Insekten, Nematoden und Pilzen nachgewiesen (Bartel 2004). In der Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* (*At*) sind zum Beispiel vier verschiedene DCLs codiert (Finnegan *et al.* 2003; Margis *et al.* 2006; Schauer *et al.* 2002).

DCL1 ist dafür bekannt, die *microRNA* (miRNA)-Prozessierung im Zellkern zu katalysieren, da es, wie in Abbildung 1.3A schematisch gezeigt, die primären *microRNA*-Transkripte (pri-miRNA) zu 21–22 nt lange miRNAs überführt. Auf diese Weise spielt DCL1 eine wichtige Rolle darin, die Genexpression während der Entwicklung der Pflanzen zu regulieren (Jones-Rhoades *et al.* 2006). Auch die übrigen DCLs in *A. thaliana* (DCL2, DCL3 und DCL4) übernehmen zentrale Aufgaben bei der Regulation der Genexpression insofern, als dass sie jeweils die 22, 24 und 21 nt langen *small interfering RNAs* (siRNA) aus vollständig komplementären, doppelsträngigen RNAs prozessieren (Henderson *et al.* 2006). Im Fall einer Infektion partizipieren DCL2 und DCL4 in der Abwehr viraler Infektionen, indem sie die virale dsRNA als Substrat verwenden (Abbildung 1.3C). Die 21–22 nt langen, aus dem viralen Genom prozessierten vsiRNA werden zur antiviralen Immunabwehr verwendet (Bouche *et al.* 2006; Deleris *et al.* 2006; Xie *et al.* 2004). Verschiedene, im Zuge der Immunabwehr prozessierte vsiRNAs, wirken nicht mit der gleichen Effizienz antiviral (Gago-Zachert *et al.* 2019). Auf die Identifizierung von effizienten vsiRNA soll im Abschnitt 1.3.3 eingegangen werden.

1.3.2 Argonaute-Proteine bilden die Hauptkomponente des RNA-induced-silencing-Komplexes

Die durch DCLs erzeugten kleinen RNA-Moleküle werden im RISC, dessen Hauptkomponente das AGO-Protein ist, aktiv. AGO-Proteine variieren in ihrer Anzahl in unterschiedlichen Organismen. In *A. thaliana* sind 10 AGO-Proteine mit unterschiedlichen Funktionen beschrieben (Wei *et al.* 2012).

Untersuchungen von AGO1-Mutanten von *A. thaliana* haben ergeben, dass AGO1 am PTGS beteiligt ist (Fagard *et al.* 2000; Morel *et al.* 2002; Vaucheret *et al.* 2004). Vorrangig assoziieren 21 nt lange miRNAs und siRNAs, wie in Abbildung 1.3A, B, C gezeigt, an AGO1 (Baumberger und Baulcombe 2005; Hou *et al.* 2016; Liu *et al.* 2009). Während AGO4 und AGO6 ausschließlich auf transkriptioneller Ebene wirken, wurde für AGO1, AGO2, AGO4 und AGO5 auch eine Rolle in der antiviralen Immunabwehr beschrieben. In der viralen Abwehr binden sie virale siRNA und inaktivieren das virale Genom durch endonukleolytische Spaltung (AGO1, AGO2, und AGO5) oder Methylierung der DNA (AGO4) (Alvarado und Scholthof 2011; Haley und Zamore 2004; Qi *et al.* 2006; Qu *et al.* 2008; Takeda *et al.* 2008; Zheng *et al.* 2007).

AGO-Proteine ähneln sich in ihrer Struktur und bestehen aus einer variablen N-terminalen Domäne, der *P-element induced wimpy testis* (PIWI)-Argonaute-Zwille (PAZ)-Domäne, der mittleren Domäne (MID) und der PIWI-Domäne (Abbildung 1.4), deren Funktionen im

Zusammenhang mit der sRNA-Bindung und dem RISC-Zusammenbau im Folgenden näher erklärt werden sollen.

Das *A. thaliana*-TRANSPORTIN 1 (TRN1) unterstützt die Assoziation der miRNA mit dem AGO1-Protein (Abbildung 1.3B) (Cui *et al.* 2016). Zur Beladung der AGO-Proteine mit sRNA werden die beiden Chaperone HEAT-SHOCK-PROTEIN (HSP) 70 und HSP90 benötigt, welche an die N-terminale Domäne des AGOs binden und eine ATP-abhängige Konformationsänderung induzieren (Iki *et al.* 2010; Iwasaki *et al.* 2010; Iwasaki *et al.* 2015; Naruse *et al.* 2018; Tahbaz *et al.* 2001). Während der Assemblierung des RISC erhöht CYP40 – durch die unterstützende Funktion während der Bindung von siRNA-Duplexen an AGO1 – die Menge an reifen RISCs (Iki *et al.* 2012).

Das 5'-Monophosphat des *guide strand* der sRNA wird von der MID-Domäne gebunden, während die PAZ-Domäne für die Bindung des 2 nt langen 3'-Überhangs des sRNA-Duplexes verantwortlich ist (Lingel *et al.* 2004; Schirle und MacRae 2012; Song *et al.* 2003). Die Bindungsaffinität einer siRNA an ein pflanzliches AGO-Protein wird durch die Art des 5'-Nukleotids der siRNA stark beeinflusst. Im Fall einer 21 nt langen siRNA präferieren AGO1 und AGO10 ein 5'-Uracil (U); AGO2, AGO3, AGO4 und AGO7 hingegen ein 5'-Adenin (A) und AGO5 ein 5'-Cytosin (C) (Mi *et al.* 2008; Schuck *et al.* 2013; Takeda *et al.* 2008). Für pflanzliche AGO-Proteine wurde gezeigt, dass der *passenger strand* einer siRNA durch endonukleolytische Spaltung katalysiert durch die Ribonukleaseaktivität des AGO-Proteins aus dem RISC entfernt wird (Iki *et al.* 2010). Im Fall des humanen AGO2 wurde deutlich, dass bei der Entfernung des *passenger strand* die N-terminale Domäne involviert ist (Kwak und Tomari 2012).

Die C-terminale PIWI-Domäne ähnelt einer Ribonuklease H-Domäne von RNase H und enthält ein aktives Zentrum mit einer Mg²⁺-Ionen-abhängigen katalytischen Triade, bestehend aus den zwei Aminosäuren Asparaginsäure und einem Histidin oder Lysin, welches die Spaltung der *target*-RNA katalysiert. Die endonukleolytische Hydrolyse durch AGO erzeugt ebenso wie die RNase H-abhängige endonukleolytische Hydrolyse eine 5'-Phosphatgruppe und eine 3'-Hydroxygruppe (Martinez und Tuschl 2004; Song *et al.* 2004). Dabei wird die *target*-RNA zwischen den Nukleotiden, welche komplementär zu den Positionen 10 und 11 der sRNA sind, hydrolysiert (Elbashir *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2006). Das pflanzliche F-BOX WITH WD-40 2 (FBW2)-Protein destabilisiert das AGO1 durch einen noch unbekanntem Mechanismus nach der Assemblierung des RISC und reduziert dadurch das AGO1-Proteinlevel (Earley *et al.* 2010). Die Lebensdauer des Komplexes aus AGO1/sRNA beträgt in der Pflanze vermutlich 2–3 Tage (Csorba *et al.* 2010).

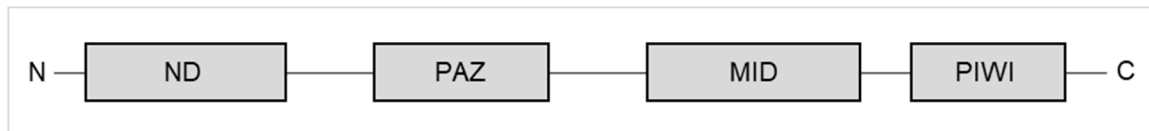


Abbildung 1.4: Proteindomänen von Argonaute (AGO)-Proteinen.

ND: N-terminale Domäne, PAZ: *P-element induced wimpy testis*-Argonaute-Zwille-Domäne, MID: mittlere Domäne, PIWI: *P-element induced wimpy testis*-Domäne (in Rechtecken). Das N- und C-terminale Ende des Proteins ist entsprechend markiert. Darstellung modifiziert nach Bologna und Voinnet, 2014.

1.3.3 Identifikation von RISC-assoziiierenden Proteinen und effizienten vsiRNA mittels BY2-Lysat

Es konnten in vorangegangenen Arbeiten RISC-assoziiierende Proteine und vsiRNA mit einer effizienten Wirkung identifiziert werden. Eine Basis für die experimentelle Identifikation dieser RISC-Komponenten und vsiRNA stellt der zytoplasmatische Extrakt des BY2-Lysat (BYL) dar. Der zytoplasmatische Extrakt wird aus entvakuolisierten Protoplasten der *Nicotiana tabacum Bright Yellow cultivar 2* (BY2)-Suspensionskulturen präpariert und hat die Kapazität exogen zugegebene mRNA-Moleküle zu translatieren. Durch die Translation von AGO-mRNA in Anwesenheit einer siRNA kann der RISC assembliert und die endonukleolytische Hydrolyse einer *target*-RNA durch das AGO-Protein untersucht werden (Gursinsky *et al.* 2009; Iki *et al.* 2010; Komoda *et al.* 2004). Er weist außerdem endogene DCL-Aktivität auf, wodurch exogen zugegebene Doppelstrang-Moleküle in kleine, 21–24 nt lange siRNA prozessiert werden (Schuck *et al.* 2013).

Durch diese Assemblierung des RISC im BYL konnten Iki *et al.* die an diesem Prozess beteiligten Interaktionspartner HSP90/70 und CYP40 identifizieren. Überdies wurden in der Arbeit mit Proteinphosphatase 5 sowie den *FK506-binding protein 62* und *65* weitere RISC-Effektoren beschrieben. Während für Erstgenanntes ein inhibierender Effekt auf die RISC-Assemblierung nachgewiesen werden konnte, gelang eine Aufklärung des Effektes der beiden *FK506-binding* Proteine auf RISC über deren Interaktion mit dem Komplex hinaus nicht (Iki *et al.* 2012). Wie durch Csorba *et al.* festgestellt wurde, handelt es sich bei dem RISC in Pflanzen um ein Multi-Protein-Komplex, wovon jedes Protein in der Lage ist, mit AGO zu interagieren (Csorba *et al.* 2010). Die Identifizierung von weiteren AGO-interagierenden Proteinen ist somit von hohem Interesse und sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, um den Mechanismus der RNAi in seiner Komplexität besser zu verstehen und entsprechende technische Anwendungsfelder zu erschließen.

Gago-Zachert *et al.* haben gezeigt, dass im Zuge der Identifikation von effizienten vsiRNA (esiRNAs) drei Annahmen berücksichtigt werden sollten (Abbildung 1.3D). Erstens werden nur jene siRNAs ausgewählt, die komplementär zur (+)-Strang-RNA des TBSV sind, da der (-)-Strang im zellulären System während der Replikation in sogenannten Membranstrukturen des Peroxisoms kompartimentiert vorliegt und aufgrund dessen eher

geringer zugänglich ist (Schuck *et al.* 2013). Zweitens hängt die Effizienz einer vsiRNA von der Affinität der Bindung des *guide strands* an AGO/RISC ab. Drittens spielt aufgrund der komplexen RNA-Struktur die Zugänglichkeit der *target*-Sequenz für den mit entsprechender siRNA beladenden RISC eine Rolle (Abbildung 1.3D). Auf Grundlage dieser drei Annahmen zeigten Gago-Zachert *et al.*, dass das TBSV-Genom im BYL durch interne DCLs prozessiert und die entstandenen siRNAs identifiziert werden können. Gago-Zachert *et al.* zeigten weiterhin, dass nach der Prozessierung des TBSV-Genoms durch die DCLs mit Hilfe des BYLs zusätzlich eine AGO-Immünpräzipitation durchgeführt und immünpräzipitierte siRNAs analysiert werden können. Somit können siRNA-Vertreter identifiziert werden, die mit einer hohen Affinität an AGO binden. Die identifizierten esiRNAs bewirken *in vivo* und *in vitro* eine entsprechende Funktionsänderung der *target*-RNA (Patent: Behrens *et al.* 2018; WO 2019001602 A1; Gago-Zachert *et al.* 2019). Demzufolge bieten esiRNAs eine vielversprechende Grundlage für die Entwicklung weiterer spezifischer Werkzeuge für eine Nukleinsäure-vermittelte Pflanzenprotektion gegen pflanzenpathogene Viren.

1.4 Entwicklung und Funktion der RNase H-Domäne

AGO-Proteine werden aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit der PIWI-Domäne zur RNase H-Domäne der Kategorie RNase H-Domäne-enthaltender Proteine zugerechnet (Moelling *et al.* 2006; Song *et al.* 2004). Eine RNase H-Domäne liegt auch in Enzymen wie der Reversen Transkriptase (RT), der Holliday Junction Resolvase und in Spliceosomproteinen vor (Majorek *et al.* 2014; Moelling *et al.* 2017). Sie katalysiert in Abhängigkeit der Präsenz einer komplementären Nukleinsäure zu einer DNA oder RNA-Sequenz, deren endonukleolytische Hydrolyse, wodurch ein 3'-OH und ein 5'-Phosphat entstehen.

Die RNase H-Domäne wird als älteste und häufigste Proteinstruktur angesehen. Ihre Entstehung wird vor dem Hintergrund der Evolutionstheorie über Retroviren auf Ribozyme zurückgeführt. Ribozyme sind katalytisch aktive RNA-Moleküle und möglicherweise Vorläufer von Retroviren. Retroviren weisen ein RNA-Genom auf, das nicht als mRNA dienen kann und deswegen zunächst mit Hilfe reverser Transkription in DNA umgeschrieben werden muss. Dabei muss die RNA in Anwesenheit der *antisense*-DNA abgebaut werden, was durch die RNase H-Domäne der Reversen Transkriptase erfolgt. Die in das Wirtsgenom integrierte DNA dient dann zur Transkription der mRNA. Ohne die RNase H-Domäne der Reversen Transkriptase wäre die Vervielfältigung der Retroviren nicht möglich. Aufgrund phylogenetischer Ähnlichkeiten vermuten Mölling *et al.*, dass sich der RNAi-Mechanismus aus der Replikationsmaschinerie von Retroviren entwickelt haben könnte, weswegen alle bekannten Immunabwehrmechanismen gegen Viren und Phagen RNase H-ähnliche Enzyme enthalten (Moelling *et al.* 2017; Moelling *et al.* 2006).

Die Entwicklung der RNase H-Domäne bietet eine Erklärung dafür, dass in den vergangenen Jahren für einige prokaryotische und eukaryotische AGOs DNA-dirigierte RNA- bzw. DNA-Spaltung nachgewiesen werden konnte. Prokaryotische AGOs sorgen zum Beispiel für die Abwehr von Phagen und transposablen Elementen (Makarova *et al.* 2009). Beispiele für DNA-bindende AGOs sind das AGO aus dem Archaeon *Methanocaldococcus jannaschii* sowie die bakteriellen AGOs aus *Thermus thermophilus* und aus *Aquifex aeolicus* (Wang *et al.* 2008; Willkomm *et al.* 2016; Yuan *et al.* 2005). Das *Kluyveromyces polysporus*-AGO bildet einen Komplex mit einem 23 nt langen *antisense*-Oligonukleotid (ASO) und wird nach dessen Hybridisierung mit der passenden *target*-RNA auf ebendieser aktiv (Dayeh *et al.* 2018). Für das humane AGO2 wurde ebenfalls gezeigt, dass es mit einer Einzelstrang-DNA beladen werden kann und so die Hydrolyse eines RNA-*targets* katalysiert. Eine zelluläre Funktion von DNA-programmiertem humanem AGO2-Protein ist bisher nicht bekannt (Willkomm *et al.* 2016). Inwiefern pflanzliche AGO-Proteine mit einer DNA zu einem DNA-*induced silencing complex* (DISC) programmiert werden können, war zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit nicht bekannt.

Die RNase H-Domäne der Reversen Transkriptase ähnelt der Domäne in RNase H nicht nur strukturell, sondern auch funktionell. RNase H wirkt, wie in Abschnitt 1.5 beschrieben, ähnlich zur Reversen Transkriptase im Zusammenhang mit Einzelstrang-DNA (Moelling *et al.* 2017). Ihre Eigenschaft, RNA im Zusammenhang einer komplementären DNA zu spalten, kann zur Genregulation genutzt werden. Dies findet sowohl im humanen Bereich für therapeutische Zwecke als auch bei Pflanzen zur Regulation der Genexpression statt (Bennett und Swayze, 2010; Patent: Sammons *et al.* 2013; US 20140018241A1). Inwiefern AGO oder RNase H im Zusammenhang mit einem ASO in der Pflanze aktiv wird und zur Protektion gegen eine Virusinfektion wirken können, ist nicht vollständig geklärt.

1.5 RNase H

RNase H-Enzyme sind Metall-abhängige Endonukleasen, die namensgebend zu der Familie der RNase H-Domäne-enthaltenden Proteine gehören. RNase H ist in der zellulären DNA-Replikation und der DNA-Reparatur involviert, indem sie die endonukleolytische Hydrolyse von RNA in einem DNA/RNA-Heteroduplex, welche während dieser Prozesse entstehen, katalysieren (Hyjek *et al.* 2019). Auch andere DNA/RNA-Heteroduplexe, die durch den Einsatz eines chemisch synthetisierten einzelsträngigen DNA-Oligonukleotids mit einer Länge von 12-20 nt entstehen, indem sich das DNA-Oligonukleotid sequenzspezifisch an eine dazu komplementäre mRNA hybridisiert, stellen ein *target* für RNase H dar (siehe Absatz 1.6.2). Es gibt drei verschiedene Klassen von RNase H: RNase H1/HI (Eukaryoten/Prokaryoten), H2/HII (Eukaryoten/Prokaryoten) (Abbildung 1.5) und HIII (in Prokaryoten und Archeen), wobei RNase HIII bisher nur in Bakterien und Archeen

identifiziert wurde und strukturell der RNase HII ähnelt. Trotz großer Unterschiede in der Proteinsequenz der RNasen haben alle RNase H-Klassen eine Phosphatbindestelle zur Bindung des DNA-Strangs im aktiven Zentrum gemeinsam (Cerritelli und Crouch 2009; Hyjek *et al.* 2019). Eine allgemeine Sequenzspezifität liegt in der Gruppe der RNase H-Endonukleasen nicht vor, allerdings präferieren Vertreter dieser Endonukleasen aus unterschiedlichen Organismen je nach Herkunft verschiedene Nukleotidsequenzen oder -muster (Eder *et al.* 1993; Wu *et al.* 1999). Die Hydrolysereaktion erfolgt wie im Fall von AGO-Proteinen über einen nukleophilen Angriff. Zwei Mg^{2+} -Ionen werden durch drei Asparaginsäuren und eine Glutaminsäure im aktiven Zentrum koordiniert. Das eine Metallion aktiviert das Wassermolekül, wodurch der nukleophile Angriff vollzogen wird. Die endonukleolytische Hydrolyse resultiert in einem 5'-Phosphat- und einem 3'-OH-Ende der hydrolysierten *target*-RNA (Cerritelli und Crouch 2009; Hyjek *et al.* 2019).

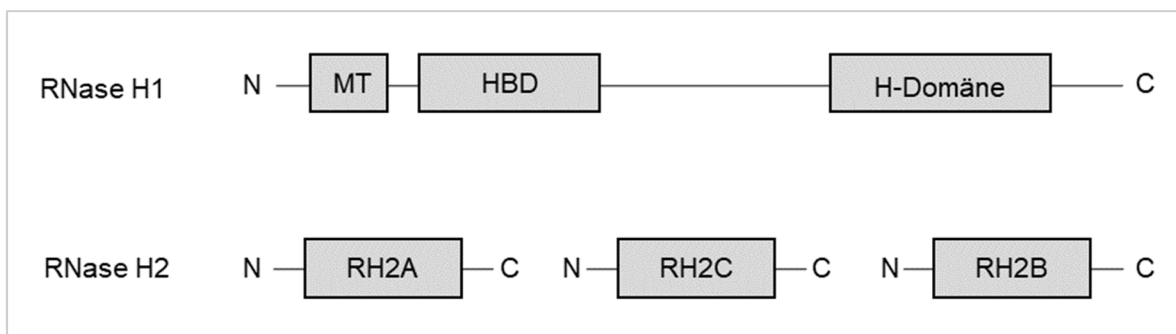


Abbildung 1.5: Domänenstruktur von RNase H1 und RNase H2.

Dargestellt sind die Proteine (Linie) mit ihrem N- und C-terminalen Ende und die einzelnen Domänen (Rechtecke). RNase H1 besteht aus einer Mitochondrien-*target*-Sequenz (MT), der Hybrid-Binde-Domäne (HBD) und der H-Domäne, welche die endonukleolytische Hydrolyse katalysiert. RNase H2 ist ein Trimer bestehend aus den Untereinheiten A (RH2A), B (RH2B) und C (RH2C), welche in der Reihenfolge RH2A, RH2C und RH2B linear angeordnet sind. Die Details sind dem Abschnitt 1.5.2 zu entnehmen. Darstellung modifiziert nach Cerritelli und Crouch, 2009.

1.5.1 RNase H1

RNase H1 kommt in allen Eukaryoten vor und ist im Zellkern, in den Mitochondrien und den Chloroplasten lokalisiert (Frank *et al.* 1998; Yang *et al.* 2017). RNase H1 ist ein Monomer. Die schematische Struktur des humanen Proteins mit einem Molekulargewicht von 32 kDa ist in Abbildung 1.5 gezeigt und besteht aus der N-terminalen Hybrid-Binde-Domäne (HBD), der C-terminalen H-Domäne und einer variablen Sequenz, die HBD und H-Domäne miteinander verbindet (Cerritelli und Crouch 2009; Lima *et al.* 2001; Wu *et al.* 1998). Die N-terminal zur HBD angeordneten Mitochondrien-*target*-Sequenz (MT), kommt jedoch nicht in allen eukaryotischen RNase H1-Varianten vor. Die Proteinstruktur der *E. coli*-RNase HI enthält im Gegensatz zur humanen RNase H1 ebenfalls keine HBD. Bei der RNase H1 aus Mensch und Hefe unterstützt die HBD die Aktivität der RNase H1 durch Erhöhung der Affinität zur RNA-DNA-Heteroduplexstruktur. Sie bindet mit einer geringen Affinität

RNA/RNA- und mit einer 25-fachen höheren Affinität RNA/DNA-Hybride. Studien mit einem 12 bp langen Heteroduplex zeigen, dass zwei aufeinanderfolgende 2'-OH-Gruppen des RNA- und drei Phosphodeoxyribose-Einheiten des DNA-Strangs, also insgesamt 5 Nukleotide, gebunden werden. Aufgrund der Domänen-Länge von ~ 30 Å werden 9 bp überspannt (Cerritelli *et al.* 1998; Evans und Bycroft 1999; Gaidamakov *et al.* 2005; Nowotny *et al.* 2008). Nach der endonukleolytischen Hydrolyse des Substrats durch die H-Domäne ist es möglich, dass die HBD am Substrat gebunden bleibt und die H-Domäne an anderen Stellen weitere Spaltungen katalysiert (Nowotny *et al.* 2008). Die zuvor erwähnte H-Domäne ist für die endonukleolytische Hydrolyse der RNA verantwortlich. Aufgrund der Struktur der H-Domäne werden von RNase H1 nur Substrate, die aus einem RNA/DNA-Heteroduplex bestehen, hydrolysiert. Die Struktur und Länge des Heteroduplexes sind ausschlaggebend für die Spezifität der H-Domäne zu diesem. Der Heteroduplex liegt in der Struktur der sogenannte A-Form vor, bei der eine Windung der Helix mehr Nukleotide im Vergleich zur B-Form enthält und die Helix dadurch eine kompakte Form aufweist. Der DNA-Strang kann nur nach einer Konformationsänderung in die B-Form durch die H-Domäne gebunden werden. Es wird ein Phosphatrest und insgesamt sieben Nukleotide des DNA-Strangs gebunden. Die Bindung des RNA-Strangs erfolgt durch die 2'-OH-Gruppen von vier aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden. Die RNase H-Domäne der humanen RNase H1 bindet insgesamt 11 Basenpaare eines 18 Basenpaar langen RNA/DNA-Heteroduplexes (Nowotny *et al.* 2005; Nowotny *et al.* 2007). Aufgrund dieser Studien ist somit von einer Mindestlänge von 11 bp eines Heteroduplexes auszugehen. Inwiefern Heteroduplexe unter 11 bp ein *target* für RNase H1 darstellen ist nicht bekannt. Der hydrolysierte Strang kann durchgehend aus Ribonukleotiden bestehen oder muss in einem DNA-Strang mindestens vier Ribonukleotide (DNA:RNA₄:DNA/DNA) enthalten (siehe Abbildung 1.6C). Für die Hydrolyse der RNA in RNA/DNA-Heteroduplexen werden in der Literatur verschiedene Spaltmuster beschrieben. So wird zusammenfassend beschrieben, dass die *target*-RNA von RNase H1 zwischen den Nukleotiden 5 bis 10 bei einem Heteroduplex mit einer Länge von 17 bis 20 bp hydrolysiert wird. Dabei erfolgt die Zählung vom 5'-Ende der RNA (Chon *et al.* 2009; Gaidamakov *et al.* 2005; Wu *et al.* 2001). In DNA:RNA₄:DNA/DNA-Strängen erfolgt, wie in Abbildung 1.6C dargestellt, die Spaltung 3'-seitig des zweiten Ribonukleotids im Heteroduplex (Nowotny *et al.* 2007; Ohtani *et al.* 1999). Pileur *et al.* konnten eine Nukleotidpräferenz für eine endonukleolytische Hydrolyse zwischen 5'-G/U-A-3' identifizieren, obwohl eine Sequenzspezifität der RNase H1 nicht bekannt ist (Pileur *et al.* 2000).

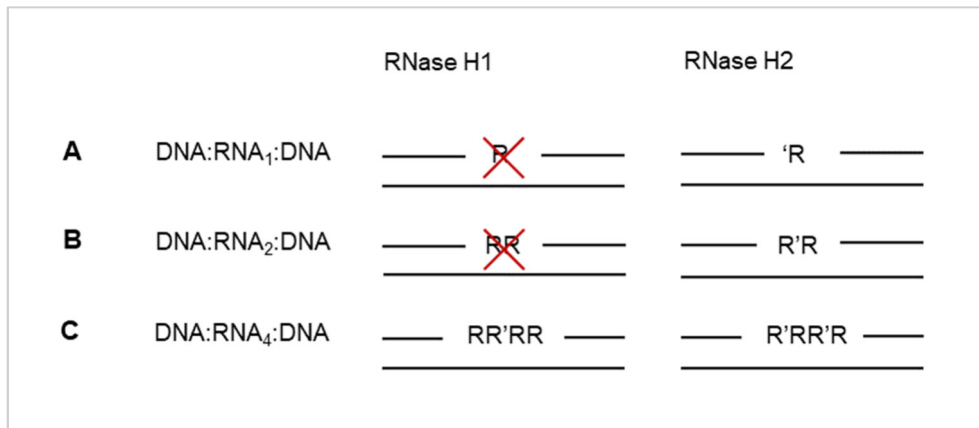


Abbildung 1.6: RNase H1 und RNase H2 spezifische Spaltmuster

Dargestellt sind Substrate, welche von RNase H1 und RNase H2 hydrolysiert werden. Die *target*-Sequenz der Substrate mit einer Mindestlänge von 12 nt enthält eins (A), zwei (B) oder vier (C) Ribonukleotide (R) und bildet den Heteroduplex mit einem *antisense*-Oligonukleotid (Balken). Nicht als Substrat dienende Heteroduplexe wurden mit einem roten Kreuz gekennzeichnet. Die RNase H1 bzw. RNase H2 spezifische Hydrolyse ist durch ein „‘“ (Apostroph) dargestellt. Darstellung modifiziert nach Cerritelli und Crouch, 2009.

Allgemein ist die Funktion der RNase H1 im Zellkern nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass RNase H1 die Stabilität des Genoms gewährleistet, indem sie die bei der Transkription entstehenden dreisträngigen Nukleinsäure-Strukturen, auch R-Loop-Struktur genannt, bestehend aus einem DNA:RNA-Hybrid und der einzelsträngigen DNA, auflöst (Broccoli *et al.* 2004; Yang *et al.* 2017). In Mitochondrien ist RNase H1 für die Entfernung der RNA-Primer bei der Replikation der mitochondrialen DNA verantwortlich (Cerritelli *et al.* 2003; Yang *et al.* 2002).

In *A. thaliana* werden vier RNase H1-Proteine synthetisiert. Sie sind jeweils sowohl im Zellkern als auch in den Mitochondrien und Chloroplasten lokalisiert. Ein Defekt der Mitochondrien- oder Chloroplasten-lokalisierten RNase H1 resultiert in einem letalen Phänotyp (Kuciński *et al.* 2019).

1.5.2 RNase H2

Die *E. coli*-RNase HII ist ein Monomer. Im Gegensatz dazu ist die RNase H2, isoliert aus *Saccharomyces*, Mensch und Maus, ein Trimer, dessen drei Untereinheiten, wie in Abbildung 1.5 schematisch gezeigt, linear angeordnet sind (Chon *et al.* 2009; Jeong *et al.* 2004; Shaban *et al.* 2010).

Die RNase H2-Untereinheit A (RH2A) weist ein Molekulargewicht von ca. 33 kDa auf, ist strukturell und funktionell ähnlich zur prokaryotischen RNase HII und katalysiert die endonukleolytische Hydrolyse des RNA-Strangs im RNA/DNA-Heteroduplex (Chon *et al.* 2009; Frank *et al.* 1994; Frank *et al.* 1998). Die Untereinheit C (RH2C) ist zentral im Proteinkomplex angeordnet und interagiert sowohl mit Untereinheit B (RH2B) als auch mit Untereinheit A (RH2A).

Die Untereinheiten A und B bilden dagegen keine Interaktionsfläche miteinander (Reijns *et al.* 2011). Allgemein ist die Erkennung einzelner Ribonukleotiden und RNA:DNA-Übergängen, die bei der Replikation entstehen, eine spezifische Funktion sowohl der prokaryotischen als auch der eukaryotischen RNase HII/2. RNA/DNA-Heteroduplexe, deren Länge für die Bindung durch RNase H2 keine Rolle spielt, in den meisten Studien eine Länge von 20 bp aufweisen, stellen für die eukaryotische RNase H2 jedoch überdies Substrate dar.

Insgesamt werden durch die RNase HII sieben Basenpaare gebunden. Strukturelle Analysen prokaryotischer RNase HII-Kristallstrukturen mit einem RNA:DNA/DNA-Heteroduplex, bei dem die Zielsequenz einen RNA:DNA-Übergang enthält, zeigen eine Bindung des 3'-Nukleotids des RNA-Anteils (letztes Ribonukleotid vor dem Übergang). RNase HII-Kristallstrukturen mit einem DNA:RNA₁:DNA/DNA-Heteroduplex zeigen eine Bindung des einzelnen Ribonukleotids. Die Bindung der beiden Substrate werden durch die Interaktion der 2'-OH-Gruppe der Ribose realisiert. Außerdem spielt die Abwesenheit der 2'-OH-Gruppe des 3'-folgenden Desoxyribonukleotids eine Rolle, um spezifisch den RNA:DNA-Übergang zu erkennen (Rychlik *et al.* 2010; Shaban *et al.* 2010). Im Fall der eukaryotischen RNase H2 ist die an dieser Interaktion beteiligte Aminosäure im Vergleich zu der Aminosäure der prokaryotischen RNase HII von den umgebenden 2'-OH-Gruppen der Ribose weiter entfernt, wodurch bei RNase HII auch RNA/DNA-Heteroduplexe als Substrate akzeptiert werden (Figiel *et al.* 2011). Eine Spaltung der RNA des RNA/DNA-Heteroduplexes mit einer Länge von 20 bp findet vor allem im vorderen (nach 6–9 nt) und hinteren (nach 13–16 nt) Bereich statt (Chon *et al.* 2009; Jeong *et al.* 2004; Pileur *et al.* 2000; Wu *et al.* 1999). Die Spaltung von 20 nt langen DNA-Strängen, die 1–4 Ribonukleotiden enthalten, erfolgt, wie in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt, 5'-seitig des Ribonukleotids (Eder und Walder 1991; Jeong *et al.* 2004). Eine durch RNase H2 katalysierte sequenzspezifische Hydrolyse ist nicht bekannt, allerdings scheint eine Nukleotidpräferenz von rA > rU > rC > rG vorhanden zu sein (Eder *et al.* 1993).

Die beiden Untereinheiten B und C besitzen keine prokaryotischen Äquivalente. Ihre genauere Funktion ist noch unklar, sie sind jedoch für die katalytische Aktivität der RNase H2A essenziell. Trotzdem war es in einigen Fällen möglich, die Aktivität der RH2A als Monomer nachzuweisen (Frank *et al.* 1994; Jeong *et al.* 2004; Qiu *et al.* 1999).

RNase H2 ist im Zellkern lokalisiert, wo sie für die Entfernung von RNA-Primern aus Okazaki-Fragmenten und von einzelnen Ribonukleotiden in der DNA während der DNA Replikation verantwortlich ist (Arudchandran *et al.* 2000; Frank *et al.* 1998; Lujan *et al.* 2013; Qiu *et al.* 1999; Sparks *et al.* 2012). In *A. thaliana* führt eine Mutation in der RNase H2-Untereinheit A auf molekularer Ebene zu einer erhöhten Inkorporation von Ribonukleotiden in die DNA während der DNA-Replikation, was zu einer Genominstabilität führt.

RNase H2 assoziiert unter Replikationsstress mit der an der Synthese von Desoxyribonukleotiden beteiligten Thymidin-Kinase und Ribonukleotid-Reduktase 1 (Kalhorzadeh *et al.* 2014).

1.6 Die Wirkung von RNAi und *antisense*-Nukleinsäuren in der technologischen Anwendung

Chemisch synthetisierte RNA- oder DNA-Moleküle können genutzt werden, um in Abhängigkeit von AGO oder RNase H in der Zelle die Expression von *target*-RNAs gezielt zu beeinflussen. Es können im Zusammenhang mit dem RNA-*silencing* bzw. AGO 21 nt lange siRNA oder 500 nt lange dsRNA, welche in der Zelle in siRNAs prozessiert werden, eingesetzt werden (Dalakouras *et al.* 2020). *Antisense*-Oligonukleotiden (ASO) können eine Länge von 12–30 nt aufweisen, um eine Wirkung in der Zelle zu erzielen (Bennett 2019). Die Wirkmechanismen von siRNAs und ASOs sind ausreichend erforscht, sodass nun daran gearbeitet werden kann, diese sowohl im Bereich der Humanmedizin als auch in der Landwirtschaft zur spezifischen Modifikation der Genexpression oder der Abwehr von Pathogenen weiterzuentwickeln. Der Entwicklungsstand soll im Folgenden zusammengefasst werden.

1.6.1 RNAi in der technologischen Anwendung

Der Einsatz von siRNAs ist weit verbreitet. Als Therapeutikum im medizinischen Bereich finden siRNAs zunehmend Anwendung, um über den RNAi-basierten Ansatz jene an der Erkrankung beteiligten mRNA-Transkripte zu hydrolysieren. Dies soll beispielsweise die sich in der klinischen Phase befindende QPI-1002-siRNA realisieren, die die p53-Expression, welche bei verzögerter Transplantatfunktion nach Nierentransplantationen relevant ist, hemmt (Crooke *et al.* 2018).

Ein weiterer Anwendungsbereich von siRNAs und dsRNAs ist der Einsatz gegen Insekten- bzw. Nematodenbefall oder gegen die Infektion von Nutzpflanzen durch Pilze oder Viren. In Pflanzen gibt es den transgenen und transienten RNAi-Ansatz (Dalakouras *et al.* 2020). Bei dem transgenen RNAi-Ansatz werden Pflanzen generiert, die Teile eines viralen Genoms, wie z.B. das Gen des Hüllproteins, oder eine dsRNA exprimieren. Durch die Produktion von siRNA aus dem Transgen wurde beispielsweise erfolgreich eine Resistenz gegen eine Infektion des Tabakmosaik-Virus (engl.: *Tobacco mosaic virus* (TMV)) oder den Mais-Wurzelwurm *Diabrotica virgifera virgifera* vermittelt (Aaziz und Tepfer 1999; Fishilevich *et al.* 2016).

Da der Anbau transgener Pflanzen zunehmend verboten wird, wird als Alternative der transiente RNAi-Ansatz untersucht, bei dem siRNA oder dsRNA exogen appliziert werden und somit keine vererbare Veränderung am Genom des Organismus erfolgt.

Die Herausforderung des transienten RNAi-Ansatzes ist die Applikation und das Einschleusen der RNA-Moleküle über die Zellmembran in die Zielzelle, was auch durch den hydrophilen Charakter der siRNA oder dsRNA erschwert ist. Die transiente Applikationsmethode des *high pressure spraying* sorgt dafür, dass die RNA-Moleküle in die Pflanzenzellen gelangen und gegen eine Virusinfektion wirken. Bei den transienten Applikationsmethoden der Blattstiel-Absorption, der Stamminjektion und dem *root soaking* verbleiben die RNA-Moleküle nur im vaskulären System und werden nicht in die Zelle, in der sie ihre *silencing*-Wirkung bewirken sollen, transportiert (Dalakouras *et al.* 2020). In diesem Fall sind Versuche, das Einschleusen in die Zelle zu erreichen, damit verbunden, die siRNA z.B. an Lipide oder Nanopartikel zu binden oder mittels Nukleotid-/Phosphatmodifikationen zu verändern (Dowdy 2017).

Die effiziente Wirkung einer siRNA hängt nach dem Einschleusen in die Zelle, wie zuvor beschrieben (siehe Abschnitt 1.3.3), von der Bindung an das AGO-Protein und die Zugänglichkeit der *target*-RNA ab. Durch die Identifikation der esiRNA und der zugänglichen *target*-Sequenzen kann eine erfolgreiche Wirkung gegen eine Virus-Infektion und somit der Pflanzenschutz erzielt werden (Patent: Behrens *et al.* 2018; WO 2019001602 A1; Gago-Zachert *et al.* 2019).

1.6.2 ASOs in der technologischen Anwendung

Die Anwendung von siRNAs als Therapeutikum ist meist teurer und aufgrund ihrer Instabilität aufwändiger als die von ASOs. Im humanen System finden ASOs weitreichende Anwendungen als Therapeutikum. Zum Beispiel kann bei der Krankheit Duchenne-Muskeldystrophie ein ASO ein Splicingelement blockieren, um den offenen Leserahmen der pre-mRNA und damit die Synthese von Dystrophin, das zum Muskelaufbau benötigt wird, wiederherzustellen (Bennett 2019). Im Bereich der Pflanzen wurden ASOs zum Zweck der gezielten Funktionsänderung der Genexpression oder zum Schutz vor Virus-Infektionen entwickelt (Patent: Sammons *et al.* 2013; US 20140018241A1).

Eine mögliche Anwendung von ASOs ist in Abbildung 1.7 dargestellt. Die Funktion einer *target*-RNA kann über deren Hybridisierung mit ASOs auf unterschiedliche Weise beeinflusst werden. Die Hybridisierung eines ASOs an eine precursor-mRNA (pre-mRNA) kann *exon skipping* verursachen. Beim *exon skipping* wird das Exon, an dem das ASO bindet, während des Spleißvorgangs übersprungen, wodurch die mRNA um ein Exon kürzer ist. Dies führt abhängig von der Beschaffenheit der pre-mRNA zur Wiederherstellung eines funktionalen Proteins oder hat die Synthese eines dysfunktionalen Proteins zur Folge

(Bennett 2019). Über die Bindung eines ASOs an eine spezifische mRNA kann deren Translation unterbunden werden (Zamecnik und Stephenson 1978). Der ASO-vermittelte Abbau einer *target*-RNA erfolgt über die Rekrutierung der RNase H, die eine aus ASO sowie pre-mRNA bzw. mRNA generierte DNA/RNA-Heteroduplexstruktur erkennt. In Folge wird die pre-mRNA oder mRNA durch endonukleolytische Hydrolyse abgebaut (Bennett 2019).

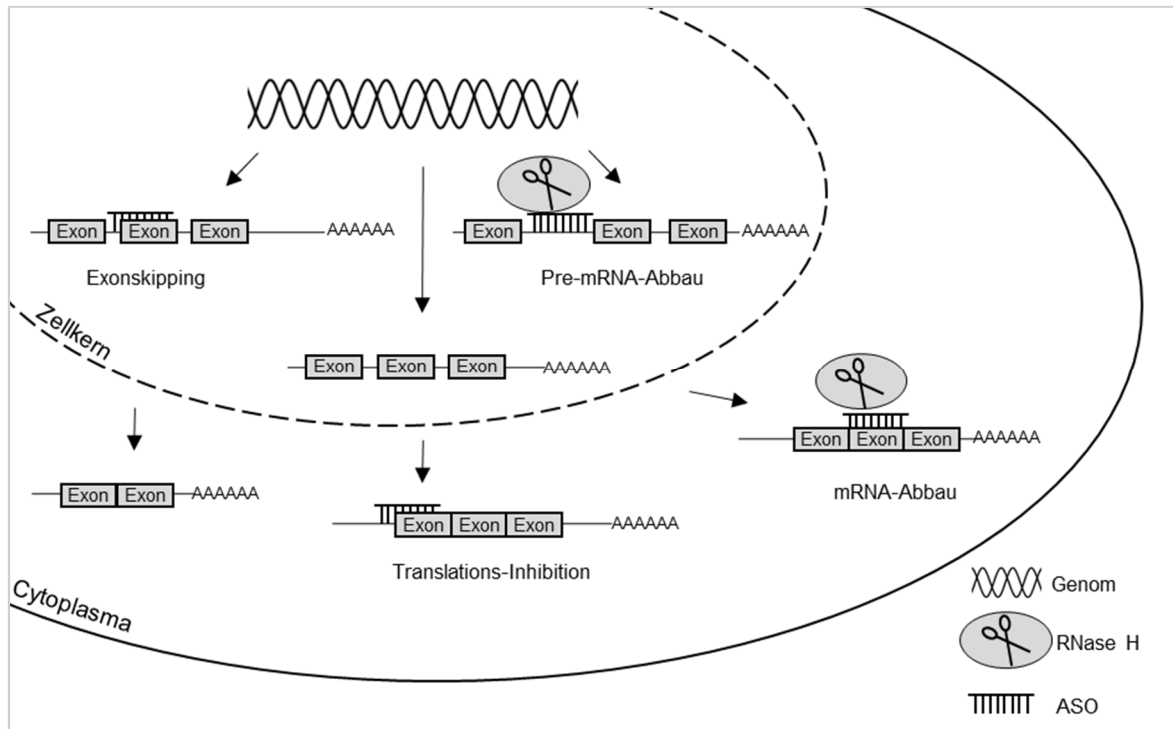


Abbildung 1.7: Darstellung von Beispielen einer möglichen Anwendung von antisense-Oligonukleotiden (ASOs) in einer Zelle.

ASOs können im Zellkern *exon skipping* verursachen oder im Cytoplasma die Translation von mRNAs inhibieren. Katalysiert durch RNase H kann in Abhängigkeit eines ASOs die prä-mRNA im Zellkern oder die mRNA im Cytoplasma durch endonukleolytische Hydrolyse abgebaut werden (Darstellung in Form einer Schere). Darstellung modifiziert nach Bennett, 2019.

Die unterschiedlichen Wirkmechanismen fanden bereits in Pflanzen eine Anwendung. Das Monsanto-Patent von Sammons *et al.* beschreibt eine Anwendung von einzelsträngiger DNA zum *silencing* der 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase in Glyphosat-tolerantem *Amaranthus palmeri* (Patent: Sammons *et al.* 2013; US 20140018241A1). Unter Verwendung von ASOs wurden Gene, die beim Wachstum des Pollenschlauchs involviert sind, identifiziert (Moutinho *et al.* 2001). Im Hinblick auf die Entwicklung eines Pflanzenschutzmittels gegen Viren konnte in *Rabbit Reticulocyte Lysate* und Krebs-2 Aszites Tumorextrakt die Inhibition der viralen RNA von TMV und von *Potato virus X* (PVX) durch RNase H-unabhängige Translationsinhibition und RNase H-abhängige Spaltung gezeigt werden (Crum *et al.* 1988; Miroshnichenko *et al.* 1988). Nowak *et al.* setzten erfolgreich lange und kurze doppelsträngige DNA zum Schutz von *Nicotiana tabacum* (Nt) gegen TMV ein. Kurze *antisense*-Oligonukleotide hingegen bewirkten keine Immunität

gegen TMV (Nowak *et al.* 2009). Auf Grundlage des derzeitigen Kenntnisstands über die Zugänglichkeit von *target*-Sequenzen im hochstrukturierten RNA-Genom war es in dieser Arbeit von Interesse herauszufinden, ob auch kurze *antisense*-Oligonukleotide eine Immunität gegen eine Virus-Infektion bewirken können.

Der Transfer von ASOs in die Zelle ist, ähnlich zu siRNA oder dsRNA, aufgrund des hydrophilen Charakters problematisch. Ungeladene, hydrophobe Moleküle kleiner als 1 kDa gelangen spontan durch die Zellmembran. ASOs sind dagegen 4–10 kDa groß und werden durch Endocytose in die Zelle transportiert. Die Aufnahme des ASOs in die Zelle kann durch einen an die Zelloberfläche bindenden Liganden verbessert werden (Juliano *et al.* 2014). Weiterhin eignet sich der Mechanismus des Transports von Zuckermoleküle für den Transfer von ASOs über die pflanzliche Zellmembran im Gerstenblatt (Sun *et al.* 2007). Chemisch am Phosphatrest modifizierte ASOs, die durch die Modifikation eine hydrophobe Eigenschaft erhalten, können über den im Detail noch unbekanntes Gymnosis-Mechanismus in die Zelle aufgenommen werden (Dowdy 2017; Juliano *et al.* 2014).

ASOs können außerdem durch eine Modifikation der Nucleoside oder im Phosphatrückgrat vor Nucleasen geschützt werden, um eine effizientere therapeutische Wirkung zu erzielen. Manche Modifikationen, die im Folgenden genauer beschrieben werden, verhindern eine Unterscheidung der RNase H zwischen dem modifizierten Desoxyribonucleotid und dem Ribonucleotid, wodurch bestimmt werden kann, ob der Heteroduplex ein Substrat für RNase H darstellt oder die *target*-RNA RNase H-unabhängig inhibiert wird. Einige gebräuchliche Modifikationen sind in Abbildung 1.8 dargestellt. Modifikationen am 2'-Kohlenstoff der Desoxyribose führen zu einer Erhöhung der Resistenz gegenüber Exonucleasen, der Schmelztemperatur des ASO/*target*-RNA-Hybrids sowie der Reduktion der Unterscheidung zwischen dem modifizierten Desoxyribonucleotid und dem Ribonucleotid. Dadurch stellen Heteroduplexe, die diese Nucleotide enthalten, kein Substrat für RNase H dar. Unter diese Modifikationen fallen die 2'-O-Methoxyethyl (MOE)-Modifikation und die 2'-O-Methyl (OMe)-Modifikation (Prakash und Bhat 2007). Andere Modifikationen, wie die *locked nucleic acid* (LNA)-Modifikation, bei der es sich um ein Ribonucleotid mit einer Methylen-Brücke zwischen dem 2'-Sauerstoffatom der Ribose und dem 4'-Kohlenstoff, handelt, weisen eine erhöhte Bindungsaffinität des ASOs zur *target*-RNA auf, wodurch eine bessere Spaltung induziert wird. In humanem Serum sind sie im Vergleich zu unmodifizierten ASOs deutlich stabiler (Kurreck *et al.* 2002). Die Phosphorothioat (PS)-Modifikation enthält ein Schwefelatom anstelle eines Sauerstoffatoms im Phosphatrückgrat, wodurch eine Resistenz gegenüber Phosphodiesterasen entsteht. Sie führt dazu, dass das Molekül in zwei Stereoisomeren

vorliegt. Dadurch wird die Stabilität im Serum positiv und die RNase H-Aktivität negativ beeinflusst (Iwamoto *et al.* 2017). Aufgrund ihrer Hydrophobizität werden ASOs mit PS-Modifikationen durch Gymnosis, also ohne Endocytose, durch die Zellmembran aufgenommen (Dowdy 2017).

Durch die chemischen Modifikationen können somit die Eigenschaften von ASOs beeinflusst und die Wirkungsweise bestimmt und verbessert werden.

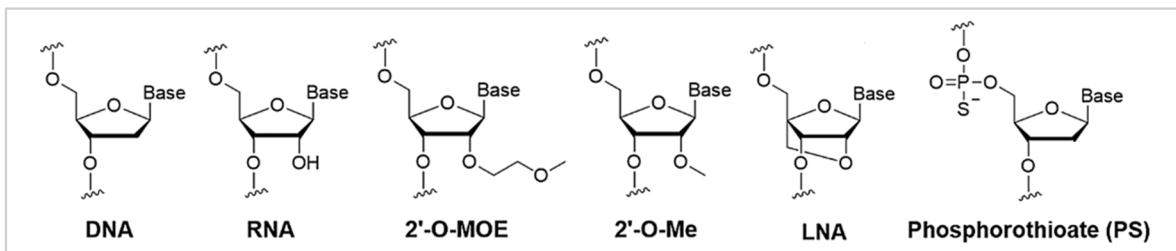


Abbildung 1.8: Ausgewählte Nukleotidmodifikationen.

Dargestellt ist die (Desoxy-)Ribose (DNA/RNA). Modifikationen des 2'-Kohlenstoffatoms wie die 2'-O-Methoxyethyl- (MOE), die 2'-O-Methyl- (OMe) und die *locked nucleic acid* (LNA)-Modifikation mit einer Methylenbrücke zwischen 2'-O und 4'-C führen zu einer RNA-ähnlicheren Struktur. Die Phosphorothioat (PS)-Modifikation enthält am Phosphatrückgrat anstelle eines Sauerstoffatoms ein Schwefelatom, wodurch diese Modifikation in zwei Stereoisomere resultiert. Die Abbildung wurde aus Shen und Corey, 2018, entnommen.

1.7 Zielstellung

Die fehlende Verfügbarkeit eines umweltfreundlichen und zuverlässigen Pflanzenschutzmittels gegen Viren hat einen enormen Einfluss auf die Landwirtschaft. Einige Viren lassen sich lediglich durch Pflanzenschutzmittel, die gegen den übertragenden Vektor gerichtet sind, bekämpfen. Weiterhin ist der Anbau von transgenen, gegenüber Viren resistenten Pflanzen aufgrund gesetzlicher Bestimmungen nicht weltweit erlaubt (Nicaise 2014). Die Verwendung von RNA-Molekülen gegen eine Virus-Infektion ist ein möglicher transienter Ansatz, einen Pflanzenschutz zu erzeugen (Dalakouras *et al.* 2020). Es ist essenziell, Methoden zu entwickeln, welche die Bekämpfung von Viren in Nutzpflanzen mit transient verabreichten Nukleinsäuren ermöglichen. Dazu ist ein besseres Verständnis des antiviralen *silencing*-Systems und die Wirkung von RNase H, welche in Abhängigkeit von DNA RNA hydrolysiert, in Pflanzen grundlegend.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten zunächst weitere Interaktionspartner von AGO1 und AGO2 identifiziert werden, um dieses Verständnis zu vertiefen. Zu diesem Zweck soll das In-vitro-System BYL genutzt werden (Komoda *et al.* 2004). Dabei soll für die identifizierten Kandidaten *in vitro* ermittelt werden, inwieweit sie an der durch AGO katalysierten endonukleolytischen Hydrolyse einer *target*-RNA beteiligt sind. Diese Befunde sollen zusätzlich *in vivo* bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurde ein *in planta*-Reportersystem erzeugt, das auf dem CRISPR/Cas9-System basiert und mithilfe dessen der Einfluss des transienten *knockdowns* dieser Kandidaten auf das *silencing* eines Reportergens untersucht werden soll.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte ein möglicher Ansatz verfolgt werden, durch die Verwendung von DNA-Molekülen einen Pflanzenschutz gegen eine Virus-Infektion zu erzeugen. Dieser DNA-abhängige Pflanzenschutz könnte über die Funktion von AGO-Proteine oder RNase H realisiert werden. Im pflanzlichen Bereich ist die Programmierung eines DIS-Komplexes für AGO nicht eindeutig geklärt (Dayeh *et al.* 2018; Nowak *et al.* 2009). Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls herausgefunden werden, ob einzelsträngige oder doppelsträngige DNA-Moleküle die RNA-Spaltung vermitteln können und inwiefern diese durch AGO katalysiert wird. Die Beteiligung einer RNase H an dem Prozess der ASO-vermittelten RNA-Spaltung ist ebenfalls denkbar. Mit Hilfe unterschiedlicher RNA:DNA-*targets* sollte die katalysierende Aktivität im BYL näher untersucht werden. Nach Aufklärung der Funktion im BYL sollte das Potenzial von DNA-Molekülen, einen Schutz gegen eine TBSV-Infektion auszubilden, ermittelt werden.

2 Material

2.1 Puffer und Lösungen

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt, D), Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, USA), Carl Roth Co. KG (Karlsruhe, D), Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D), Diagonal GmbH & Co. KG (Münster, D), Duchefa Biochemie B.V (Haarlem, Niederlande), MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren, D), Merck KGaA (Darmstadt, D), Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA), Promega Corporation (Madison, USA), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D) und Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, D) kommerziell in höchstmöglicher Reinheit bezogen.

Kommerziell erhältliche Enzyme stammten von Thermo Fisher Scientific Inc. und New England Biolabs GmbH (NEB) sowie solche in Tabelle 2.1 angegeben.

Es wurden die vom Hersteller mitgelieferten in Tabelle 6.1 angegebenen Fertigpuffer verwendet.

Tabelle 2.1: Enzyme

Enzyme	Hersteller
Protease-Inhibitor <i>complete</i> RNase-frei	Roche
Pectolyase Y23	Duchefa
Cellulase Onozuka RS	Duchefa
Creatine-Kinase	Roche

Die Zusammensetzung der selbst hergestellten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2.2 angegeben.

Tabelle 2.2: Selbst hergestellte Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Transformationspuffer I (TFBI)	100 mM RbCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 30 mM KOAc 10 mM CaCl ₂ 15 % (w/v) Glycerin pH 5,8	Transformationspuffer II (TFBII)	10 mM MOPS 10 mM RbCl ₂ 75 mM CaCl ₂ 15 % (w/v) Glycerin pH 6,8
TE	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA	1 x TAE	40 mM Tris-HCl pH 8,3 5 mM NaOAc 1 mM EDTA
MOPS	199 mM MOPS 49 mM NaOAc 10 mM Na ₂ EDTA	1 x TBE	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA

Material

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
TNES	10 mM Tris-HCL pH 7,5 0,1 % (w/v) SDS 300 mM NaCl 1 mM EDTA pH 7,5	Plasmid-Minipröp-Lösung I	25 mM Tris-HCl pH 7,9 50 mM Glukose 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Plasmid-Minipröp-Lösung II	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS	Plasmid-Minipröp-Lösung III	2,55 M KOAc pH 4,8
DNA-Extraktionspuffer	50 mM Tris pH 8 10 mM EDTA pH8 100 mM NaCl 1 % (w/v) SDS 0,007 % (v/v) β-Mercaptoethanol	Bio101-Lösung III	3 M KOAc 11,5 % (v/v) Essigsäure
6x DNA-Ladepuffer	10 mM Tris-HCl pH 7,4 60 % (v/v) Glycerin 60 mM EDTA 0,03 % Bromphenolblau 0,03 % Xylencyanol FF	2x RNA-Ladepuffer (Polyacrylamid-Harnstoffgel)	10 mM Tris-HCl pH 7,4 90 % (v/v) deionisiertes Formamid 2 mM EDTA 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol FF
4x Sammelgel-puffer	250 mM Tris-HCl pH 6,8 0,2 % (w/v) SDS	4x Trenngel-puffer	1,5 mM Tris-HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
1x Transfer-puffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 1,3 mM SDS 20 % (v/v) Methanol	Laemli-Puffer	25 mM Tris-HCl 0,1 % (w/v) SDS 192 mM Glycin
TBS	2 mM Tris-HCl, pH 7,5 15 mM NaCl	TBST	20 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20
Silber-Lösung I	50 % (v/v) Aceton 1,25 % (w/v) TCA 25 µl Formaldehyd (37 %)	Silber-Lösung II	0,19 % (w/v) AgNO ₂ 0,6 ml Formaldehyd (37 %)
Silber-Lösung III	1,2 g Na ₂ CO ₃ 25 µl Formaldehyd (37 %) 0,008 % (w/v) NaSCN	4 x SDS-Probenpuffer	20 mM Tris-HCl 12 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerin 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol
RapiGest-Lösung	0,1 % (w/v) RapiGest 25 mM NH ₄ HCO ₃	AmBic	25 mM NH ₄ HCO ₃
Reduzierungs-lösung	10 mM DTT 25 mM NH ₄ HCO ₃	Alkylierungs-lösung	30 mM Iodacetamid 25 mM NH ₄ HCO ₃
IPB150/300	20mM HEPES-KOH pH 7,4 150/300mM NaCl 0,1 % (v/v) NP-40	Enzymlösung	0,312 % (w/v) Cellulase Onozuka RS 0,1 % (w/v) Pectolyase Y23
0 %-70 % Percoll-Lösung	5 mM PIPES-KOH pH 7,0 0-70 % (v/v) Percoll 0,7 M Mannitol 20 mM MgCl ₂	Protoplasten-Waschpuffer	12,5 mM NaOAc 5 mM CaCl ₂ 0,37 M Mannitol pH 5,8
4 x TR	120 mM HEPES-KOH pH 7,4 400 mM KOAc 7,2 mM MgOAc 2 mM DTT 4 x Protease-Inhibitor	10x TM	7,5 mM ATP 1 mM GTP 250 mM Creatinphosphat 0,8 mM Spermin

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Infiltrations-medium	10 mM MES pH 7,6 10 mM MgCl ₂ 150 µM Acetosyringon	2x Inokulations-puffer	50 mM K ₂ HPO ₄ 50 mM Glycin pH 7,9
5x Ligationspuffer (<i>miRNA cloning linker</i>)	250 mM Hepes/KOH pH 8,3 50 mM MgCl ₂ 16,5 mM DTT 50 µg/ml BSA 41,5 % (v/v) Glycerin	5x siRNA-Annealingpuffer	30 mM HEPES-KOH pH 7,4 100 mM KOAc 2 mM MgOAc
5x Nativer Loading Dye	50 mM Tris-HCl pH 7,4 50 % (v/v) Glycerin 10 mM EDTA 0,03 % Bromphenolblau 0,03 % Xylencyanol FF	Protein-Extraktions-puffer	300 mM KH ₂ PO ₄ 0,3 % Triton X 100 10 % Glycerin 1 mM EDTA 7 mM DTT

2.2 Verwendet Plasmide, Vektoren und Oligonukleotide

Die verwendeten Plasmide und Vektoren sowie Oligonukleotide sind im Anhang in Tabelle 6.2 bzw. Tabelle 6.3 angegeben.

2.3 Medien und Antibiotika

Tabelle 2.3: Verwendete Medien

Medium	Zusammensetzung	Organismus
Lysogeny-Broth-Medium (LB)	1 % (w/v) Bakto-Trypton 0,5 % (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt 1 % (w/v) NaCl 1 mM NaOH	<i>Escherichia coli</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Murashige-Skoog (MS)-Medium	1 x 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 KH ₂ PO ₄ pH 5,8	BY2-Zellen

Die Kultivierung der Bakterien und Pflanzen erfolgte mittels der in Tabelle 2.3 aufgeführten Medien. Das LB-Festmedium enthält 1,5 % Agar. LB-Medium wurde zur Selektion von transformierten Bakterien entsprechend des Selektionsmarkers in einer Endkonzentration von 100 µg/ml mit *Ampicillin*, 50 µg/ml mit *Kanamycin*, 10 µg/ml *Rifampicin*, 75 µg/ml *Spectinomycin* oder 25 µg/ml *Gentamycin* versetzt.

2.4 Bakterienstämme und Pflanzenkultivare

Tabelle 2.4: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)		
Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> – <i>hsdRMS</i> – <i>mcrBC</i>)φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara</i> – <i>leu</i>)7697 <i>gal/Uga/KrpsL</i> (Str ^R) <i>endA1nupG</i> λ ⁻	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
GV3101	Stamm zur transienten Expression von Genen in <i>N. benthamiana</i>	Van Larebeke <i>et al.</i> 1974

Die Kultivierung von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte bei 200 rpm (Universalschüttler SM 30 A) in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agar-Platten unter aeroben Bedingungen bei 37 °C bzw. 30 °C über Nacht. Die Kultivierung von 2 ml *Nicotiana tabacum* BY2-Suspensionkultur erfolgte in 48 ml MS-Medium für 7 Tage bei 120 rpm (Infors Multitron) und 23 °C im Dunkeln.

Die Anzucht der *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen erfolgte durch das Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, im Gewächshaus zwischen 3 und 5 Wochen bei einer Lichtperiode von 5.00 bis 21.00 Uhr (Tag: 25 °C, 60 % relative Luftfeuchtigkeit; Nacht: 19 °C, 40 % relative Luftfeuchtigkeit). Nach Behandlung der Pflanzen wurden diese in einer Percival-Pflanzenzuchtkammer (E41L2, Percival Scientific) für 14 h bei 23 °C mit Licht und für 10 h bei 21 °C Dunkelheit kultiviert.

2.5 Verwendete Computerprogramme

Zum Design der Klonierungsstrategien und Auswahl der sogenannten *single guide* RNA wurde das Programm „ApE- A plasmid Editor v2.0.51“ verwendet. Die Auswahl der *single guide* RNA basierte in diesem Programm auf dem Algorithmus von Doench (Doench *et al.* 2014).

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Bakterien und Pflanzen

3.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation von Plasmid-DNA

Zur Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli* wurden chemisch kompetente Zellen des Stammes Top10 (Thermo Fisher Scientific Inc.) hergestellt. Dazu wurden 100 ml Hauptkultur mit 1 ml Übernachtskultur (ÜNK) versetzt und bei 37 °C angezogen. Bei einer optischen Dichte 600 (OD_{600}) zwischen 0,4–0,55 wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und für 10 min bei 3.000 g und 4 °C zentrifugiert (Rotina 38R, Hettich). Das Pellet wurde in 30 ml TFB1 aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei gleichen Bedingungen und die Aufnahme des Pellets in 4 ml TFBII. Je 50 µl Zellen wurden in 1,5 ml-Gefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Die Plasmid-DNA wurde mittels Hitzeschock in die chemisch kompetenten Zellen transformiert. Es wurden 3–10 µl Plasmid-DNA zu 50 µl Zellen hinzugefügt und die Zellen für 90 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Nach einer Inkubation von 2 min bei 4 °C wurde der Transformationsansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 100 µl des Ansatzes auf selektivem LB-Medium ausplattiert.

3.1.2 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von Plasmid-DNA in *A. tumefaciens*

Zur Transformation der Plasmid-DNA in *A. tumefaciens* wurden chemisch kompetente Zellen des Stammes GV3101 hergestellt. Dazu wurden 100 ml Hauptkultur mit einer ÜNK auf eine OD_{600} von 0,06 angeimpft. Bei einer OD_{600} von 0,6 wurden die Zellen für 20 min bei 3.000 g und 4 °C zentrifugiert (Rotina 38R, Hettich). Das Pellet wurde in 10 ml kaltem TE-Puffer gewaschen und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Aufnahme des Pellets erfolgte in 20 ml LB-Medium. Die Zellen wurden in einem Volumen von 500 µl in 1,5 ml-Gefäßen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden 5 µg Plasmid-DNA zu 500 µl Zellen hinzugefügt, für 5 min auf Eis und anschließend für 5 min in flüssigem Stickstoff inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 5 min bei 37 °C. Danach wurden 1 ml LB-Medium zum Ansatz hinzugefügt und die Zellen für 2–4 h bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 min bei 3400 g zentrifugiert (Mikro 200, Hettich) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl LB-Medium aufgenommen, das gesamte Volumen auf selektivem LB-Nähragar ausplattiert und für 3 Tage bei 28 °C inkubiert.

3.1.3 Pathogen-Behandlung von Pflanzen

3.1.3.1 Transformation von Pflanzen mit *A. tumefaciens*

Zur Untersuchung der Genexpression eines exogenen Gens wurde die Methode der Agrobakterien-vermittelten Transformation verwendet. Der mit dem spezifischen Plasmid transformierte Agrobakterien-Stamm wurde auf LB-Festmedium für zwei Tage angezogen. Die gewachsenen Zellen wurden im Infiltrationsmedium resuspendiert, auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und für 2 h bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. Mit einer 1-ml-Spritze (BD Plastikpak Tuberkulinspritze) wurden die Agrobakterien in die Blattunterseite des dritten oder vierten Blattes (gezählt von oben) von 6 Wochen alten *N. benthamiana*-Pflanzen gespritzt.

3.1.3.2 Infektion mit TBSV-RNA

Die Infektion von Pflanzen mit TBSV-RNA erfolgte nach der *rub-in*-Methode. Dazu wurde die Blattoberseite des dritten und vierten Blattes von 4 Wochen alten Pflanzen mit Siliziumcarbid betupft und 5 µl des Inokulationsansatzes, bestehend aus 1x Inokulationspuffer, 5 – 10 µg TBSV-RNA und 150 pmol/ 900 pmol/ 400 pmol siRNA/ASO/siDNA, pro Blatthälfte aufgetropft. Anschließend wurde der Tropfen in die Blatthälfte mit einer Pipettenspitze eingerieben. Das Siliziumcarbid wurde anschließend mit H₂O abgespritzt.

3.2 Arbeiten mit dem BY2-System

3.2.1 Herstellung des BY2-Lysats

Das BY2-Lysat ist ein cytoplasmatischer Extrakt aus *Nicotiana tabacum* BY2-Suspensionskulturen. Es wurde eine *N. tabacum*-BY2-Suspensionskultur aus 47 ml MS-Medium und 3 ml dicht bewachsenen BY2-Zellen für 5 Tage bei 120 rpm schüttelnd (Infors Multitron) kultiviert. Die Enzymlösung wurde 1 Tag vorher vorbereitet und über Nacht bei 4 °C zum Lösen inkubiert. Zur Präparation des Extrakts werden die BY2-Zellen protoplastiert, entvakuolisiert und die Zellkerne entfernt. Dazu wurden die Zellen für 1 min bei 72 g (Beschleunigung 3, Bremse 0, Rotina 38R, Hettich) zentrifugiert und 50–55 ml Pellet in 100 ml mittels 0,45 µm-Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Filter-filtrierte Enzymlösung aufgenommen. Die Protoplastierung erfolgte für 1,5–3 h bei 26 °C und 100 rpm (Infors Multitron) im Dunkeln. Der Grad der Protoplastierung wurde unter dem Lichtmikroskop (Primover, Zeiss) überprüft. Nach ausreichender Protoplastierung wurden die Protoplasten in 30 ml Protoplastenwaschpuffer dreimal für 5 min bei 72 g (Beschleunigung 3, Bremse 0, Rotina 38R, Hettich) gewaschen. Nach dem Waschschrift wurde das Pellet in 2 ml

Protoplastenwaschpuffer aufgenommen. Das aufgenommene Pellet wurde auf sechs Gradienten in Ultrazentrifugationsröhrchen (Beckman Coulter™ Ultra-Clear Centrifuge Tubes) aufgeteilt. In den Röhrchen wurden zuvor Gradienten aus 1,9 ml 70%iger, 2,1 ml 40%iger und 6 ml 0–30%iger Percollösung hergestellt. Die Zentrifugation erfolgte in einer Ultrazentrifuge L8-M mit einem SW40Ti-Rotor für 1 h bei 23 °C und 7500 rpm (Beschleunigung 1, Bremse 0). Anschließend wurden die Mini-Protoplasten zwischen der 40 %igen und 70 %igen Percoll-Schicht isoliert. Zu den Mini-Protoplasten wurde das zweifache Volumen Protoplastenwaschpuffer hinzugefügt und erneut für 5 min bei 72 g (Beschleunigung 3, Bremse 0, Rotina 38R, Hettich) zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet zweimal in 10 ml Protoplastenwaschpuffer gewaschen und im vierfachen Volumen 1x TR-Puffer aufgenommen. Die Protoplasten wurden mittels 7 ml Dounce-Homogenisator auf Eis durch insgesamt 80 Stöße mit einer Frequenz von 10 Stößen und 30 s Pause aufgeschlossen. Das entstandende Lysat wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 850 g und 4 °C (Eppendorf Zentrifuge 5242R) von Zelltrümmern getrennt und der Überstand in 500 µl-Aliquots bei -80 °C eingefroren.

3.2.2 Micrococcus-Nuklease-Behandlung

Die im BYL enthaltene RNA wurde mittels Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung abgebaut, um die Effizienz der In-vitro-Translation zu erhöhen. Einem 500 µl-BYL-Ansatz wurden 0,5 mM CaCl₂ und 37,5 U Mikrokokkus-Nuklease (Roche Diagnostics GmbH) hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 15 min bei 20 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 3 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure (EGTA).

3.2.3 In-vitro-Translation

Zur Synthese von Proteinen im BYL wurde ein Translationsansatz aus den in Tabelle 3.1 angegebenen Komponenten angesetzt und dieser für 2,5 h bei 25 °C inkubiert.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der In-vitro-Translation

Komponenten	Mengen
BYL (MN-verdaut)	10 µl
Creatin-Kinase (10 mg/ml)	0,4 µl
4x TR*	2 µl
10x TM	2 µl
mRNA	0,5 pmol
H ₂ O	ad 20 µl

3.2.4 Luciferase-Assay zur Qualitätsüberprüfung von BYL

Es wurde eine In-vitro-Translation (siehe 3.2.3) mit 25 ng Firefly-Luciferase-mRNA angesetzt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 25 °C wurden 5 µl Translationsansatz mit 20 µl Luciferase-Assay-Substrat (Promega) versetzt. Das bei dieser Reaktion emittierte Licht wurde in einem Zeitraum von 20 s als relative Lichteinheit pro Sekunde (RLU/s) mit dem Röhren-Luminometer Sirius (Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, D) gemessen.

3.2.5 Cleavage-Assay

Zur Überprüfung der endonukleolytischen Hydrolyse eines spezifischen *targets* katalysiert durch AGO wurden 0,5 pmol AGO-mRNA im BYL in Anwesenheit einer synthetischen siRNA translatiert (siehe 3.2.3). Nach 2,5 h Translation wurden 2 µg Luciferase-mRNA als Kompetitor-RNA hinzugefügt. Anschließend wurden 20.000 cpm ³²P-markierte *target*-RNA hinzugefügt und die Spaltreaktion für 15 min bei 25 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 0,5 % (w/v) SDS, 20 µg Proteinase K (Thermo Fisher Scientific Inc.) und eine 30-minütige Inkubationszeit bei 37 °C. Anschließend wurde der Ansatz mit 100 µl Wasser aufgefüllt und mit 1 Volumen (Vol) Chloroform versetzt. Nach dem Mischen wurde die Probe für 10 min bei 16.000 g zentrifugiert. 90 µl der wässrigen Phase wurden in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt und mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 20 µg Hefe-tRNA von GE Healthcare und 2,9 Vol 100 % Ethanol (EtOH) versetzt. Die Präzipitation der RNA erfolgte über Nacht bei -20 °C. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min bei 16.000 g und 4 °C (Eppendorf Zentrifuge 5242R) und ein Waschschrift mit 70 % EtOH. Das trockene Pellet wurde in 30 µl 1x RNA-Ladepuffer (Polyacrylamid-Harnstoffgel) gelöst. Die Auftrennung der Spaltfragmente erfolgte durch ein Polyacrylamid-Harnstoffgel (siehe 3.4.8) und die Analyse der ³²P-markierten RNA durch Autoradiographie (siehe 3.4.10).

Immer dann, wenn als *target*-RNA das TBSV-Genom verwendet wurde, wurden das RNA-Pellet in 20 µl 1x *RNA Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific Inc.) gelöst, 5 µl isolierte RNA auf ein denaturierendes Agarose-Gel (siehe 3.4.7) aufgetragen und die Fragmente nach den Vorschriften der Gelelektrophorese (siehe 3.3.4) aufgetrennt.

3.2.6 RNase H-Assay

Der RNase H-Assay wurde mit dem gleichen Translationsansatz des *cleavage*-Assays (3.2.5) allerdings ohne mRNA und siRNA bzw. *small interfering* DNAs (siDNA) angesetzt. Es wurde 20.000 cpm ³²P-markierte *target*-RNA mit 0,1 µM oder 1 µM einzelsträngiger, 21 nt langer, synthetischer DNA gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Der Translationsansatz wurde mit 2 µg Luciferase-mRNA als Kompetitor-RNA versetzt und es erfolgte die Zugabe des *target*-DNA-Gemischs ohne eine vorherige 2,5-stündige

Translations-Inkubationszeit. Die Spaltreaktion erfolgte nun für 15 min bei 25 °C. Die Inaktivierung und Reinigung der RNA wurden, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, durchgeführt. Die ³²P-markierten Spaltfragmente wurden mittels Polyacrylamid-Harnstoffgel (siehe 3.4.8) oder eines denaturierenden Agarose-Gels (siehe 3.4.7) aufgetrennt und durch Autoradiographie (siehe 3.4.10) analysiert.

3.2.7 RNase H-Assay mit gereinigter RNase H aus *E. coli*

Es wurde ein RNase H-Assay mit der gereinigten RNase H aus *E. coli* durchgeführt (New England Biolabs GmbH). Dazu wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Abweichend davon wurden in den Ansatz nur 2,5 units eingesetzt. Die *target*-RNA wurde als Gemisch, bestehend aus 0,1–1 µM einzelsträngiger, 21 nt langer, synthetischer DNA und 20.000 cpm ³²P-markierter *target*-RNA, hinzugefügt. Es wurden 10 µl des Ansatzes ohne Fällung der Gesamt-RNA auf ein Polyacrylamid-Harnstoffgel (siehe 3.4.8) aufgetragen, die Spaltfragmente aufgetrennt und mittels Autoradiographie (siehe 3.4.10) analysiert.

3.3 Molekularbiologische Arbeiten mit DNA

3.3.1 Isolation von Plasmid-DNA

Die klassische Plasmid-DNA-Isolation erfolgte aus 2 ml ÜNK mit entsprechendem Antibiotikum. Diese wurde für 2 min bei 16.000 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl Plasmid-Minipräp-Lösung I resuspendiert und mit 200 µl Plasmid-Minipräp-Lösung II zur Lysis gemischt. Anschließend wurde die Probe auf Eis gestellt und es erfolgte die Zugabe von 150 µl Plasmid-Minipräp-Lösung III. Nach 5 min Inkubation erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 16.000 g (Mikro 200, Hettich). Es wurden 420 µl Überstand in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 0,7 Vol Isopropanol versetzt. Die DNA wurde für 5 min bei RT mit einem anschließenden Zentrifugationsschritt für 15 min bei 16.000 g (Mikro 200, Hettich) präzipitiert. Nach einem Waschschrift mit 70 % EtOH wurde das DNA-Pellet getrocknet, in 30 µl H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit höherer Reinheit erfolgte mit dem *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc.) aus 3 ml ÜNK mit entsprechendem Antibiotikum. Es wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Die Plasmid-DNA wurde in 35 µl H₂O eluiert und bei -20 °C gelagert.

Zur Isolation von größeren Mengen Plasmid-DNA wurde das System PureYield™ Plasmid Midiprep (Promega Corporation) genutzt. Die Isolation erfolgte aus einer ÜNK von 100 ml. Dabei wurde das Protokoll nach den Volumenangaben von 50–100 ml ÜNK befolgt.

Die DNA-Reinigung und Elution in 400 µl H₂O wurde mittels Vakuum-Protokoll des Herstellers durchgeführt.

3.3.2 Isolation von genomischer DNA aus Blattmaterial

Die Isolation der genomischen DNA erfolgte aus 15 mg *N. benthamiana*-Blattmaterial. Dieses Blattmaterial wurde in gefrorenem Zustand gemörsert und mit 750 µl DNA-Extraktionspuffer versetzt. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt für 10 min bei 65 °C. Nach Zugabe von 150 µl Bio101-Lösung III wurde die Probe für 20 min auf Eis inkubiert und für 5 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5242R). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, invertiert und erneut für 10 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5242R). Das DNA-Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 50 µl sterilem H₂O aufgenommen.

3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Als Template-DNA für die Polymerasekettenreaktion wurde cDNA oder Plasmid-DNA verwendet. Die Länge und der GC-Gehalt der Oligonukleotide bestimmen die Anlagerungstemperatur X. Die Elongationszeit Y hängt von der Länge des zu amplifizierenden Fragments ab. Die Reaktion lief im Temperatursteuerungsgerät (Analytik Jena GmbH) ab. Die Dream-*Taq*-Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.) wurde für analytische Zwecke verwendet. Sie amplifiziert ca. 1 kb pro Minute. Die *Phusion*-Polymerasen amplifizieren 1 kb pro 15–30 Sekunden und wurden zur Synthese genutzt, wenn Fragmente zur Klonierung verwendet werden sollten.

Die verwendeten Mengen und Programme der PCR-Ansätze sind in Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3 angegeben.

Tabelle 3.2: Zusammensetzungen von PCR-Ansätzen.

Dream- <i>Taq</i> -PCR		<i>Phusion</i> -Polymerase-PCR	
10x Dream <i>Taq</i> Puffer	1x	5x HF Puffer	1x
dNTPs	200 µM	dNTPs	200 µM
Oligonukleotid 1	500 nM	Oligonukleotid 1	500 nM
Oligonukleotid 2	500 nM	Oligonukleotid 2	500 nM
Polymerase	0,03 U/µl	Polymerase	0,02 U/µl
Template	> 60 ng/µl	Template	10-20 ng
	ad 25 µl H ₂ O		ad 50 µl H ₂ O

*Die Polymerasen stammten von Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 3.3: Programme der Temperatursteuerungsgerät zur PCR

PCR-Programm		Dream-Taq PCR		Phusion-Polymerase PCR	
1	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	98 °C	2 min
2	Denaturierung	94 °C	20 sec	98 °C	10 sec
3	Anlagerung	X °C	20 sec	X °C	20 sec
4	Elongation	72 °C	Y min	72 °C	Y min
5	Finale Elongation	72 °C	5 min	72 °C	5 min
	Zyklen von Schritt 2-4		30		30

Die Anlagerungstemperatur X wurde entsprechend der Länge und des GC-Gehalts der Oligonukleotide ausgewählt. Die Elongationszeit Y hängt von der Länge des zu amplifizierenden Fragments ab.

3.3.4 Gelelektrophorese

Für die Durchführung der Gelelektrophorese wurden die aufzutrennenden DNA-Fragmente mit 1x DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein 1–2 %iges (w/v) Agarosegel mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE für 20–45 min bei einer Spannung von 80–140 V. Es wurde der Marker *GeneRuler™ 50 bp, 100 bp oder 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific Inc.) als Größenstandard eingesetzt. Das Ethidiumbromid emittiert bei UV-Bestrahlung (260–360 nm) Licht mit einer Wellenlänge von 560 nm, wenn dieser mit der DNA interkaliert. Die Visualisierung der DNA erfolgte mit der *UV Solo touch* von Analytik Jena.

3.3.5 Reinigung von DNA-Fragmenten

3.3.5.1 Direkt vom PCR-Ansatz

PCR-Ansätze wurden mit dem *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc.) gereinigt. Dazu wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Die gewonnene DNA wurde in 40 µl H₂O eluiert.

3.3.5.2 Gelextraktion

Entstanden bei der PCR oder bei einem Restriktionsverdau mehrere DNA-Fragmente, wurde das entsprechende DNA-Fragment aus einem Agarosegel extrahiert. Dazu wurden die Herstellerangaben des *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc.) befolgt. Die DNA wurde in 40 µl H₂O eluiert.

3.3.6 Restriktionsverdau von DNA

Zur Klonierung von Protein-codierende Sequenzen (*coding sequence*, CDS) für den in In-vitro-Transkription verwendeten Vektor pSPLF2 wurden mittels PCR Restriktionsschnittstellen zu der CDS hinzugefügt. Diese gereinigten PCR-Fragmente wurden mit den spezifischen Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben in einem 100 µl-Ansatz endonukleolytisch hydrolysiert. Bevor die Fragmente in der Ligation eingesetzt wurden, wurden diese wie in Kapitel 3.3.5.1 beschrieben, gereinigt.

Zur Überprüfung der in der Klonierung entstandenen Plasmide wurden 100–200 ng Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit Plasmid-spezifischen Restriktionsenzymen nach Angaben des Herstellers endonukleolytisch hydrolysiert.

Zur Linearisierung von Plasmid-DNA für die In-vitro-Translation wurden 30 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 200 µl mit dem für das Plasmid vorgesehenen Enzym nach Angaben des Herstellers endonukleolytisch hydrolysiert.

Anschließend wurden die entstandenen Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt, um die Größe zu überprüfen.

3.3.7 Reinigung und Präzipitation von linearisierter Plasmid-DNA

Die linearisierte Plasmid-DNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert. Dazu wurde die DNA mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; in TE-Puffer äquilibriertes Phenol) versetzt, gemischt und für 3 min bei 16.000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml-RNase-freies Gefäß überführt, mit 1 Vol Chloroform vermischt und erneut für 3 min bei 16.000 g zentrifugiert (Mikro 200, Hettich). Nach Überführen der wässrigen Phase in ein neues 1,5 ml RNase-freies Gefäß wurde die DNA mit 1 µl Glycogen (20 mg/ml, Roche), 0,1 Vol 3 M Natriumacetat (NaOAc) (pH5,2) und 2,5 Vol 99 % EtOH versetzt, 10 min bei RT und 10 min auf Eis inkubiert sowie durch einen Zentrifugationsschritt für 15 min bei 16.000 g (Eppendorf Zentrifuge 5242R) präzipitiert. Das Waschen des DNA-Pellets erfolgte mit 70 % EtOH. Anschließend wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 50 µl RNase-freiem H₂O gelöst.

3.3.8 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Doppelsträngige Oligonukleotide wurden zur Klonierung in einen Vektor phosphoryliert. Die Phosphorylierung von Oligonukleotiden erfolgte durch die T4-Polynukleotidkinase (PNK) (Thermo Fisher Scientific Inc.) nach Angaben des Herstellers. Die Reaktion wurde anschließend auf 0,25 pmol/µl DNA verdünnt und zur Klonierung verwendet.

Zur endständigen Markierung eines einzelsträngigen Oligonukleotides, das in einem RNase H-Assay (siehe 3.2.6) als *target* dienen sollte, wurden alle in Tabelle 3.4 angegeben

Komponenten gemischt. Die Reaktion wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der PNK erfolgte für 10 min bei 75 °C. Anschließend wurde der Ansatz nach dem Protokoll des *Monarch*[®] *RNA Cleanup Kits* von NEB gereinigt.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der endständigen Einzelstrang-Markierung

Komponenten	Mengen
PNK-Puffer	1x
Oligonukleotid	50 pmol
[$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (3.000 Ci/mmol)	10 μCi
ATP	1 μM
T4-PNK	10 U
H ₂ O	ad 20 μl

3.3.9 Ligation

Gereinigte DNA-Fragmente (siehe 3.3.5) oder hybridisierte Oligonukleotide wurden mittels Ligation in einen Vektor kloniert. Ein Ligationsansatz mit einem Volumen von 20 μl , bestehend aus 1x DNA-Ligase-Puffer und 0,25 U T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific Inc.), 100 ng linearisiertem Vektor und dem Fragment im 3-fachen molaren Überschuss gegenüber dem Vektor wurde für 2 h bei 22 °C inkubiert. Nach der Ligation wurden 5 μl Ligationsansatz in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (siehe 3.1.1).

3.3.10 Klonierung

3.3.10.1 *Golden Gate*

Die *Golden Gate*-Klonierung beruht auf dem Prinzip, bei dem Fragmente „baukastenartig“ aneinandergereiht werden. Durch die Verwendung von Typ IIS-Restriktionsendonukleasen, die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden, entstehen Fragmente mit spezifisch ausgewählten vier Nukleotide langen 5'-Überhängen, die im weiteren Schritt unidirektional in den Zielvektor eingebaut und nicht erneut geschnitten werden können.

Zur Generierung eines Level I-Vektors musste zunächst das Insert aus zwei einzelsträngigen Oligonukleotiden hergestellt werden. Die Hybridisierung von zwei Oligonukleotiden (10 μM) erfolgte in einem Ansatz von 50 μl H₂O für 5 min bei 98 °C und einem langsamen Abkühlen auf 37 °C. Das hybridisierte Oligonukleotid-Duplex enthält die für den Level I-Vektor spezifischen Überhänge. Durch die Klonierung und den Restriktionsverdau des Level I-Vektors wurden passende Überhänge für die Klonierung des Level II- bzw. des Zielvektors generiert. Die für die Level II-/ Zielvektorklonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen befanden sich in dem Vektor-Rückgrat des

Level I-Vektors, um das Fragment auszuschneiden, und in dem Insert des Level II-Vektors, an dessen Position die Fragmente kloniert werden sollten. Es wurden je ein Fragment aus sechs Level I-Vektoren durch Restriktionsverdau ausgeschnitten und alle sechs Fragmente in den Zielvektor kloniert. Ansatz und Programm wurden wie folgt ausgewählt:

Tabelle 3.5: Golden Gate-Klonierung der Doppelstrang-Oligonukleotide in den Level I-Vektor

Ansatz		Programm		
Vektor	20 fmol	37 °C	2 min	30 Zyklen
Doppelstrang-Oligonukleotid	50 fmol	20 °C	5 min	
Ligase-Puffer	1x	37 °C	5 min	
T4-DNA-Ligase	0,25 U	50 °C	10 min	
<i>BpiI</i>	0,5 U	80 °C	10 min	
H ₂ O	ad 10 µl			

Tabelle 3.6: Golden Gate-Klonierung der Fragmente aus den Level I-Vektoren in den Zielvektor

Ansatz		Programm		
Zielvektor	20 fmol	37 °C	2 min	50 Zyklen
Fragment 1	50 fmol	20 °C	5 min	
Fragment 2	50 fmol	37 °C	5 min	
....	50 °C	10 min	
Ligase-Puffer	1x	80 °C	10 min	
<i>BsaI</i>	0,5 U			
T4-DNA-Ligase	0,25 U			
H ₂ O	ad 20 µl			

Anschließend wurden 7 µl des Ansatzes in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und auf Selektivmedium ausplattiert (siehe 3.1.1).

3.3.10.2 pGEM-T Easy-Klonierung

Der pGEM-T Easy-Vektor (Promega Corporation) wurde für die Klonierung von Spaltfragmenten der RISC-vermittelten RNA-Spaltung genutzt. Die Dream-*Taq*-Polymerase hängt Template-unabhängig ein Desoxyadenosin an das 3'-Ende des in der Dream-*Taq*-PCR generierten DNA-Fragments an. Dieses Fragment wurde in den linearisierten pGEM-T Easy-Vektor, der passend zu dem DNA-Fragment ein 3'-Thymidin-Überhang hat, kloniert. In der PCR wurden ein genspezifisches *forward*-Oligonukleotid und ein zum *universal miRNA cloning*-Linker (New England Biolabs GmbH) spezifisches

reverse-Oligonukleotid verwendet. Die Ligation wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die Angaben der in den Ligationsansatz einzusetzende Menge der Fragmente und des Vektors befolgt.

3.3.11 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der isolierten Nukleinsäuren wurde mittels NanoDrop One Microvolume UV-Vis-Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) gemessen.

3.3.12 Sequenzierung

Die Ermittlung der Sequenz der DNA erfolgte mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Die zu sequenzierenden Proben wurden mit einem Volumen von 15 µl in einer Konzentration von 40–100 ng/µl im Fall von Plasmid-DNA und 22 ng pro 100 bp im Fall von PCR-Fragmenten an die Firma Microsynth Seqlab (Göttingen, D) geschickt.

3.4 Arbeiten mit RNA

3.4.1 Isolation von RNA aus Blattmaterial

Die RNA aus *N. benthamiana* wurde mit *NucleoZOL* (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die Isolation erfolgte aus 60–100 mg gemörsertem Blattmaterial. Das RNA-Pellet wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Die RNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop One (siehe 3.3.11) bestimmt. Die RNA-Integrität wurde mittels Agarosegel überprüft (3.3.4).

3.4.2 DNase I-Verdau

Um genomische DNA abzubauen, wurde die RNA mit DNase I, *recombinant RNase-free* (Roche Diagnostics GmbH) behandelt. In den DNase I-Verdau, mit einem Ansatz von 20 µl, wurden 5–10 µg RNA, 1x DNase I-Puffer und 25 U DNase I hinzugefügt und dieser bei 37 °C für 30 min inkubiert und das Enzym nach Zugabe von Ethylendiamintetraacetat (EDTA) mit einer Endkonzentration von 1,25 mM für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

3.4.3 Hybridisierung von kleinen synthetischen Nukleinsäuren

Zur Generierung von Nukleinsäure-Duplexen wurden zwei 21–24nt lange synthetische Oligonukleotide durch Erhitzen und langsames Abkühlen aneinandergelagert. Es wurden 20–35 µM pro Duplex-Einzelstrang mit 1x siRNA-Annealingpuffer in einem Gesamtvolumen

von 50 µl oder 100 µl gemischt und für 1 min bei 90 °C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

3.4.4 In-vitro-Transkription

Die Herstellung von markierter und unmarkierter RNA erfolgte durch die *run-off* In-vitro-Transkription. Als Template-DNA diente linearisierte Plasmid-DNA oder ein durch PCR generiertes DNA-Fragment. Template-spezifisch wurde die T7-Polymerase (Agilent Technologies Inc.) oder die SP6-Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.) verwendet. Wurde die RNA ohne cap-Analogon synthetisiert, wurde dieses Volumen mit H₂O ersetzt und ein rNTP-Mix mit gleicher molarer Masse aller Nukleotide verwendet. Bei der Synthese mit cap-Analog wurde der G-Anteil im rNTP-Mix auf 0,5 mM reduziert.

Die verwendeten Mengen des Reaktionsansatzes für ein Volumen von 100 µl sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Tabelle 3.7: Reaktionsansatz der In-vitro-Transkription
In-vitro-Transkription

5x Transkriptionspuffer	1x
rNTPs	2 mM
m ⁷ GpppG-cap-Analogon	1,6 mM
DNA-Fragment	2 µg
RiboLock RNase-Inhibitor	20 U
SP6/T7 RNA-Polymerase	60/50 U
H ₂ O	ad. 100 µl

Die Markierung der RNA mit [α -³²P]-Cytidintriphosphat (CTP) erfolgte in einem 50 µl Transkriptions-Ansatz mit 25 µCi [α -³²P]-CTP (3.000 Ci/mmol, Hartmann Analytic) und Ribonukleosidtriphosphat (rNTP)-Konzentrationen von je 1 mM A, U und G sowie 0,1 mM C. Nach einer Inkubation von 2,5 h bei 37 °C wurde die DNA mittels 10 U DNase I, *recombinant* Rnase-free (Roche Diagnostics GmbH) für 30 min bei 37 °C hydrolysiert.

3.4.5 [γ -³²P]-Adenosintriphosphat (ATP)-Markierung des *Low Range* RiboRuler (Thermo Fisher Scientific Inc.)

Die endständige Markierung des *Low Range Ribo Ruler* (Thermo Fisher Scientific Inc.) erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie die endständige Markierung von Einzelstrang-Oligonukleotiden, beschrieben in Kapitel 3.3.8.

3.4.6 Reinigung und Präzipitation von RNA

Nach der In-vitro-Transkription musste die RNA von Puffern und Enzymen gereinigt und präzipitiert werden. Die Reinigung von nicht markierter RNA erfolgte durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Der 100 µl Transkriptionsansatz wurde auf 400 µl mit H₂O aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamyl (25:24:1; wassergesättigtes Phenol) versetzt. Nach dem Mischen wurde die Probe für 3 min bei 16.000 g zentrifugiert (Mikro 200, Hettich), die wässrige Phase in ein neues RNase-freies Gefäß überführt und erneut mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt. Nach dem Mischen wurde die Probe für 3 min bei 16.000 g zentrifugiert (Mikro 200, Hettich) und die wässrige Phase erneut in ein neues RNase-freies Gefäß überführt. Das Volumen wurde auf 400 µl aufgefüllt und die RNA mit 72 µl 6 M Ammoniumacetat und 944 µl 99 % EtOH, einem Inkubationsschritt von 10 min bei RT und einem Zentrifugationsschritt von 15 min bei 16.000 g (Eppendorf Zentrifuge 5242R) präzipitiert. Anschließend wurde das RNA-Pellet zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und nach dem Trocknen in 35 µl RNase-freiem H₂O aufgenommen.

Markierte RNA wurde nach den Angaben des Herstellers des *GeneJET RNA Purification Kits* (Thermo Fisher Scientific Inc.) gereinigt. Die Elution der RNA erfolgte in 50 µl RNase-freiem H₂O.

3.4.7 Denaturierendes Agarose-Gel

Aus Pflanzenproben isolierte RNA, In-vitro-transkribierte RNA oder im *cleavage*-Assay entstandene, ³²P-markierte Spaltfragmente größer als 800 nt wurde auf die RNA-Integrität oder ihre Größe untersucht. Dazu wurden 1–5 µl RNA auf ein Volumen von 5 µl mit RNase-freiem H₂O aufgefüllt, mit 2x RNA-Loading-Dye (Thermo Fisher Scientific Inc.) versetzt und für 5 min bei 75 °C erhitzt. Die RNA-Probe wurde auf ein denaturierendes 1,5 %iges (w/v) Agarosegel aufgetragen. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 1,5 g Agarose in 88 ml H₂O aufgekocht, mit 10 ml 10x MOPS-Puffer und 2,5 ml 37%igem Formaldehyd versetzt und in die entsprechende Apparatur gegossen. Der RiboRuler *Low/High-Range RNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific Inc.) wurde als Größenstandard eingesetzt. Die Gelelektrophorese wurde, wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben, durchgeführt.

3.4.8 Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die im *cleavage*-Assay entstandenen ³²P-markierten Spaltfragmente kleiner als 800 nt wurden zur Überprüfung auf einem denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Harnstoff wurde nach den Mengen in Tabelle 3.8 in H₂O und TBE durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen erfolgte die Zugabe der weiteren Komponente Acrylamid

und die Polymerisierung durch Zugabe von Adenosinphosphosulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED).

Tabelle 3.8: Zusammensetzung eines denaturierenden Harnstoffgels

Komponenten	Konzentration	Menge für 15 ml Gel
Harnstoff	8 M	7,2 g
5x TBE	1x	3 ml
Wasser		4 ml
40 % Acrylamid-Bisacrylamid 19:1	5 % (v/v)	1,875
TEMED		30 µl
10 % APS	0,05 %	75 µl

Vor dem Beladen des RNA-Gels wurden die RNA-Proben für 5 min bei 70 °C erhitzt. Die Gelelektrophorese erfolgte in 0,5x TBE-Puffer bei 350 V.

3.4.9 Herstellung und Gelelektrophorese eines nativen Polyacrylamid-Gels

Zur Reinigung kleiner Nukleinsäure-Duplexe von nicht angelagerten Einzelstrang-Nukleinsäuren wurden die hybridisierten Duplexe (siehe 3.4.3) auf einem nativen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Bis auf den Harnstoff und die Erhöhung der Acrylamidkonzentration auf 15 % wurden die Komponenten wie in Tabelle 3.8 angegeben eingesetzt. Die Proben wurden mit 5x nativem Ladepuffer versehen und direkt auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 0,5x TBE bei 100 V für 3 h.

3.4.10 Autoradiographie

Zur Detektion radioaktiv markierter RNA wurde die Autoradiographie verwendet. Nachdem das Gel mit den radioaktiv markierten Proben unter Vakuum getrocknet worden war, wurde es auf einem *Storage Phosphor Screen* von GE Healthcare über Nacht zur Exposition inkubiert. Der Screen wurde mit dem Phosphorimager Typhoon TRIO⁺ Variable Mode Imager von GE Healthcare eingescannt.

3.4.11 Isolation von Nukleinsäuren aus einem Polyacrylamid-Gel

Zur Isolation von Spaltfragmenten oder Nukleinsäure-Duplexen aus einem Polyacrylamid-Gel wurden die Fragmente mittels UV-Licht (254 nm) über einer Fluoreszenzindikator-beschichteten DC-Karte (Kieselgel 60 F254, Riedel-de Haën, Seelze, D) sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Über Nacht wurden die Gel-Stücke in 500 µl TNES inkubiert. Der Nukleinsäure-enthaltende Überstand wurde in ein 1,5 ml-Gefäß

überführt. Abhängig von der Nukleinsäureart wurden die Protokolle für die Reinigung und Präzipitation für DNA in Kapitel 3.3.7 bzw. RNA in Kapitel 3.4.6 befolgt.

Im Fall der RNA-Spaltfragmente erfolgte die Präzipitation für 10 min bei RT und für 4 h bei -20 °C. Das Pellet wurde in 25 µl H₂O gelöst.

Im Fall der Nukleinsäure-Duplexe wurde das Pellet nach Präzipitation in 50 µl H₂O aufgenommen, die Probe über eine Gelfiltrationssäule Illustra™ MicroSpin™ G-25-Columns (GE Healthcare GmbH, USA) gereinigt, erneut präzipitiert und das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen. Das Pellet wurde dann in 20 µl H₂O gelöst.

3.4.12 3'-Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

Die Methode 3'-RACE dient der Identifizierung des unbekanntes 3'-Endes eines 5'-Spaltfragments. Die gereinigte RNA wird mit einem Linker ligiert, der als Bindestelle für einen Primer zur komplementären DNA (cDNA)-Synthese genutzt wird. Anschließend wird die cDNA durch PCR vervielfältigt und in einen Vektor kloniert, der anschließend zur Identifizierung des 3'-Endes sequenziert wird.

Die aus dem Polyacrylamid-Gel gereinigten RNA-Fragmente wurden mit dem *universal miRNA cloning*-Linker (New England Biolabs GmbH) ligiert. Die Zusammensetzung der Reaktion ist in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Tabelle 3.9: Reaktionsansatz der Linker-Ligation an RNA

Komponenten	Mengen
Ligationspuffer (<i>miRNA-cloning</i> -Linker)	1x
<i>universal miRNA cloning</i> -Linker	1 µg
T4-RNA-Ligase	10 U
Spaltfragment	5 µl
H ₂ O	ad.10 µl

Die Ligation des Linkers erfolgte für 2 h bei 22 °C. Anschließend wurde die RNA mit 20 µg Glycogen, 0,1 Vol NaOAc und 2,5 Vol EtOH für 3 h bei -20 °C gefällt und das Pellet nach einem Waschschrift mit 70 % EtOH in 10 µl H₂O aufgenommen. Die cDNA-Synthese wurde mit der AMV Reversen Transkriptase (Promega Corporation) durchgeführt (siehe 3.4.13). Der genutzte *reverse*-Primer bindet an den *universal miRNA cloning*-Linker (New England Biolabs GmbH). Es folgte die Vervielfältigung der DNA durch eine *Taq*-PCR (siehe 3.3.3), bei der ein *forward*-Oligonukleotid genutzt wurde, dass im bekannten 5'-Bereich des Fragments liegt. Das *reverse*-Oligonukleotid bindet im Bereich des miRNA-Linker. Die PCR-Produkte wurden in den pGEM-T Easy-Vektor (Promega Corporation) kloniert

(siehe 3.3.10.2). Nach der Klonierung wurden mittels Sequenzierung (siehe 3.3.12) die entstandenen Produkte auf das 3'-Ende analysiert.

3.4.13 cDNA-Synthese

RNA wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde RNase-freies H₂O mit RNA und Oligonukleotiden wie in Tabelle 3.10 beschrieben gemischt und für 5 min bei 65 °C im Fall der RevertAid Reversen Transkriptase (Thermo Fisher Scientific Inc.) oder bei 75 °C im Fall der *Avian Myeloblastosis Virus* (AMV) Reversen Transkriptase (Promega Corporation) im Temperatursteuerungsgerät (Analytik Jena GmbH) inkubiert. Nach Abkühlen der Probe auf Eis wurde ein Mastermix aus den übrigen Komponenten in einem Gesamtvolumen von 20 µl zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz der reversen Transkription mit der RevertAid Reversen Transkriptase (Thermo Fisher Scientific Inc.) für 10 min bei 25 °C, 60 min bei 42 °C und 10 min bei 70 °C und mit der AMV Reversen Transkriptase (Promega Corporation) für 1 h bei 42 °C und 5 min bei 85 °C im Temperatursteuerungsgerät (Analytik Jena GmbH) erhitzt. Die cDNA diente in der PCR-Reaktion als Template.

Tabelle 3.10: Reaktionsansätze der cDNA-Synthese mit den unterschiedlichen reversen Transkriptasen
Reverse Transkription (Thermo Fisher Scientific Inc.) Reverse Transkription (Promega Corporation)

Komponente	Menge	Komponente	Menge
RNA	1 µg	Ligationsprodukt aus 5'-Spaltfragment und <i>universal miRNA cloning</i> -Linker	6 µl
Random Primer Hexamer/ Poly-T-Oligonukleotiden	5 µM	Primer rev	1 µM
H ₂ O	ad. 12,5 µl	H ₂ O	ad. 13 µl
Reaktions-Puffer für reversen Transkription	1x	Reaktions-Puffer für AMV reversen Transkription	1x
dNTP-Mix	1 mM	dNTP-Mix	1 mM
RiboLock RNase-Inhibitor	20 U	RiboLock RNase-Inhibitor	20 U
RevertAid Reverse Transkriptase	200 U	AMV Reverse Transkriptase	10 U

3.5 Proteinbiochemische Arbeiten

3.5.1 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität im Blattmaterial von *N. benthamiana* sollte Aufschluss über die Synthese des Luciferaseproteins geben. 30 mg gemörsertes

Blattmaterial wurden in 300 µl Proteinextraktionspuffer aufgenommen und eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 16.000 g und 4 °C (Eppendorf Zentrifuge 5242R) wurden 5 µl Extrakt mit 20 µl Luciferase-Assay-Substrat von Promega gemischt und das emittierte Licht in einem Zeitraum von 20 s als relative Lichteinheit pro Sekunde (RLU/s) in dem Röhren-Luminometer Sirius (Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, D) detektiert.

3.5.2 Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blot

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit Hilfe eines SDS-Polyacrylamid-Gels. Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Es wurde ein SDS-Gel in die dafür vorgesehenen Glasplatten gegossen. Das SDS-Gel bestand aus einem Trenn- und Sammelgel wie in Tabelle 3.11 angegeben. Es wurde 1 ml Isopropanol auf das Trenngel gegeben, um eine planare Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel zu erzeugen. Das Isopropanol wurde vor dem Gießen des Sammelgels wieder entfernt.

Tabelle 3.11: Verwendete Mengen für Trenn- und Sammelgel

Komponenten	12,5 % Trenngel	4 % Sammelgel
30 % Acrylamid	4,16 ml	550 µl
H ₂ O	3,33 ml	2,41 ml
4x Trenngelpuffer	2,5 ml	
4x Sammelgelpuffer		1 ml
TEMED	10 µl	10 µl
10 % APS	100 µl	100 µl

Auf das SDS-Gel wurden 5–10 µl der Proteinproben aufgetragen und die Proteine in 1x Lämmli-Puffer für 10 min bei 20 mA und 90 min bei 25 mA aufgetrennt. Der PageRuler (Thermo Fisher Scientific Inc.) diente als Größenstandard.

Anschließend wurden die Proteine vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran nach dem Western Blot-*semi-dry*-Verfahren übertragen, um diese immunologisch nachzuweisen. Dazu wurden Whatman-Papier und die Membran in Transferpuffer äquilibriert. Der Blot wurde in der Reihenfolge Whatman-Papier, Membran, SDS-Gel, Whatman-Papier aufgebaut. Der Transfer erfolgte für 90 min bei 12 V.

Die Membran wurde in 1x TBST mit 7,5 % Milchpulver (Sucofin) für 1 h blockiert, anschließend wurde die Milchpulver-TBST-Lösung mit dem primären Antikörper Anti-FLAG (Agilent, monoklonal, M2/Antibody, 2 mg/ml, 1:5.000) oder Anti-c-Myc (Santa Cruze

Biotechnology, monoklonal, 200 µg/ml; IgG, 1:500) versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit 1x TBST und einmaligem Waschen mit 1x TBS fand die Inkubation der Membran für 1 h mit dem sekundären Antikörper (IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody LI-COR; 1:10.000) statt. Der vorherige Waschschrift wurde wiederholt und die Proteine wurden mittels Odyssey-Infrarot-Scanner von LI-COR (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) detektiert.

3.5.3 Silberfärbung

Um Proteine zu detektieren, für die keine Antikörper zur Verfügung standen oder die in geringen Mengen vorlagen, wurde eine Silberfärbung des SDS-Gels durchgeführt. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese für 5 min in Lösung I inkubiert und anschließend 3x für 5 s, 1x 5 min und erneut 3x 5 s mit H₂O gewaschen. Nach dem Waschschrift wurde das Gel für 5 min in 50 % (v/v) Aceton und für 1 min in 0,03 % (w/v) Natriumcyanat inkubiert. Nachdem die Proteine im Gel fixiert worden waren, wurde das Gel erneut 3x für 5 sec in H₂O gewaschen. Das Gel wurde in der Silbernitrat-haltigen Lösung II für 8 min inkubiert und 3x für 5 sec in H₂O gewaschen. In der Lösung III wurden die Silberionen reduziert, bis die erwarteten Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde die Reaktion in 1%iger Essigsäure abgestoppt.

3.5.4 Immunpräzipitation (IP)

Die Immunpräzipitation wurde zur Identifizierung und Überprüfung von Protein-Protein-Interaktionen oder zur Überprüfung der Spaltaktivität des translatierten AGO-Proteins genutzt.

Ein Volumen von 20 µl ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich) wurde zunächst kalibriert. Dazu erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 5.000 g und 4 °C (Eppendorf Zentrifuge 5242R). Der Überstand, in dem die Agarose gelagert sind, wurde abgenommen und die Agarose in 10-fachem Vol IPB150 mit gekürzter Pipettenspitze resuspendiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und die Beads in 10-fachem Vol IPB150 aufgenommen.

Es wurden mit einem FLAG-tag versehene AGO-Proteine in einem 50 µl Translationsansatz (siehe 3.2.3) synthetisiert und anschließend vier Translationsansätze mit 200 µl kalibrierten Beads gemischt. Nach einer Inkubation über Nacht, drehend bei 4 °C, wurden die Proben für 1 min bei 5.000 g und 4 °C zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5242R), der Überstand verworfen und mit IPB150 3x gewaschen. Es folgte ein stringenterer Waschschrift mit dem Puffer IPB300, bei dem die NaCl-Konzentration auf 300 mM erhöht wurde, um schwach oder unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Nach einem weiteren Waschschrift mit dem IPB150 wurden die Beads mit einem Volumen von 60 µl 1x TBS mit 3 µg

3x FLAG-Peptid von Sigma-Aldrich für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die eluierten Proteine mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung (siehe 3.5.3), Western Blot (siehe 3.5.2) oder mittels *cleavage*-Assay (siehe 3.2.5) überprüft.

3.5.5 Präparation immunpräzipitierter Proteine und Durchführung der Massenspektrometrie (MS)

Nach der Immunpräzipitation wurden die Proteine durch Massenspektrometrie identifiziert. Die Proteine wurden mit 1 Volumen Methanol und 8 Volumen Aceton versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 16.000 g und 4 °C (Eppendorf Zentrifuge 5242R). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 10 % Methanol und 80 % Aceton aufgenommen und durch einen Vortex gemischt. Nach dreimaligem Wiederholen dieses Waschschritts wurde das Pellet getrocknet. Anschließend erfolgte der Trypsinverdau. Durch eine Inkubation von 10 min bei 80 °C in 12,5 µl RapiGest-Lösung wurden die Proteine für den Verdau vorbereitet. Anschließend erfolgte die Zugabe von 98 µl AmBic und eine weitere Inkubation für 10 min bei 80 °C. Der Ansatz wurde mit 6,25 µl Reduzierungslösung versetzt und für 10 min bei 70 °C erhitzt. Nach der Zugabe von 6,25 µl Alkylierungslösung wurden die Proben für 30 min bei RT im Dunkeln geschüttelt. Es folgte die Zugabe von 2 µg Trypsin mit einem Inkubationsschritt über Nacht bei 37 °C. Der Verdau wurde durch Zugabe von 37 %iger HCl bis zu einem pH-Wert < 2 abgestoppt.

Die Proteinproben wurden freundlicherweise von Dr. Dirk Dobritsch (Abteilung Pflanzenbiochemie, Institut für Biochemie & Biotechnologie) mittels *high definition*-MS^E mit dem SYNAPT G2-S Massenspektrometer von Waters gemessen und ausgewertet. Die Datenanalyse wurde durch den ProteinLynx Global Server (PLGS 3.0.1, Apex3D algorithm v. 2.128.5.0, 64 bit von Waters) mit automatisierter Bestimmung der chromatographischen Peakbreite sowie der TOF-MS-Auflösung durchgeführt. Bei der Datenbank-Suchanfrage (PLFS workflow) war die Peptid- und Fragment-Toleranz automatisch und sie wurde nach der 2-5-Regel, bei der zwei Fragment-Ionen pro Peptid und fünf Fragment-Ionen pro Protein identifiziert werden müssen, ausgewertet. Die *false discovery rate* wurde auf 4 % des Proteinlevels gesetzt. Die MS^E-Daten wurden mit den Datenbanken von *Nicotiana tabacum* (Edwards *et al.* 2017) und *Nicotiana benthamiana* (Bombarely *et al.* 2012) verglichen. Ein interner Standard diente zur Quantifizierung der Proteinmengen. Die Quantifizierung erfolgte basierend auf der Intensität der häufigsten proteotypischen Peptide. In einem späteren Refinement der automatisierten Auswertung wurde zusätzlich manuell überprüft, dass in dem Datensatz ausschließlich Proteine gelistet waren, die durch drei proteotypische Peptide identifiziert wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung von RISC-assoziierten Proteinen mittels BYL

Es sollten im Rahmen dieser Arbeit bisher unbekannte Interaktionspartner des AGO-Proteins identifiziert werden, die entweder an dem Aufbau des RISC beteiligt sind oder mit dem RISC interagieren und somit seine Funktionalität modifizieren. Ziel war es, damit wissenschaftliche Grundlagen für verbesserte Werkzeuge zum Pflanzenschutz zu schaffen. In der vorangegangenen Arbeit von Iki *et al.* 2012 wurde gezeigt, dass sich das BYL, der zytoplasmatische Extrakt aus entvakuolisierten *Nicotiana tabacum*-Protoplasten, dazu eignet, im RISC involvierte Proteine zu identifizieren (siehe Abschnitt 1.3.3). Einige der im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden im BYL durchgeführt.

4.1.1 Co-Immunpräzipitation von FLAG-AGO1 und FLAG-AGO2

Dr. Jana Schuck konnte nach der Immunpräzipitation des translatierten FLAG-*Nt*AGO1-Proteins weitere an das AGO-Protein assoziierte Proteine mittels PAGE und anschließender Silberfärbung detektieren (Promotionsarbeit, Dr. Jana Schuck). In Anlehnung an diese Studien erfolgte in der aktuellen Studie ebenfalls die Präzipitation der AGO-Proteine über einen N-terminalen FLAG-*tag*, um weitere mögliche Interaktionspartner zu identifizieren.

Entsprechend der Vorarbeiten wurden alle notwendigen Komponenten vereint, um einen mit einem FLAG-*tag* versehenen RISC *in vitro* zu assemblieren. Der modifizierte Vektor pSP64-Poly(A), in dem die codierende Sequenz von *FLAG-AGO1* oder *FLAG-AGO2* aus *N. tabacum* enthalten ist, wurde von Dr. Torsten Gursinsky zur Verfügung gestellt. Die zur Translation im zellfreien System notwendige mRNA von *FLAG-AGO1* und *FLAG-AGO2* wurde von diesen Vektoren transkribiert (siehe 3.4.4). Die Translation der AGO-Proteine und die Formierung des RISC erfolgte im BYL durch die Zugabe der *FLAG-AGO1*- oder *FLAG-AGO2*-mRNA in Anwesenheit einer siRNA (siehe 3.2.3). Die 21 nt lange gf698-siRNA – eine effizient wirkende, gegen die mRNA des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) gerichtete siRNA (Iki *et al.* 2010; Schuck *et al.* 2013) – wurde mit einem für AGO1-spezifischen 5'-Uracil und AGO2-spezifischen 5'-Adenin verwendet. Als Kontrolle diente das jeweilige AGO-Protein ohne N-terminalen FLAG-*tag*. Nach der Durchführung der Immunpräzipitation (siehe 3.5.4) wurde ein Teil der Probe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine wurden mittels Silberfärbung (siehe 3.5.3) sichtbar gemacht, um die erfolgreiche Immunpräzipitation (IP) zu überprüfen.

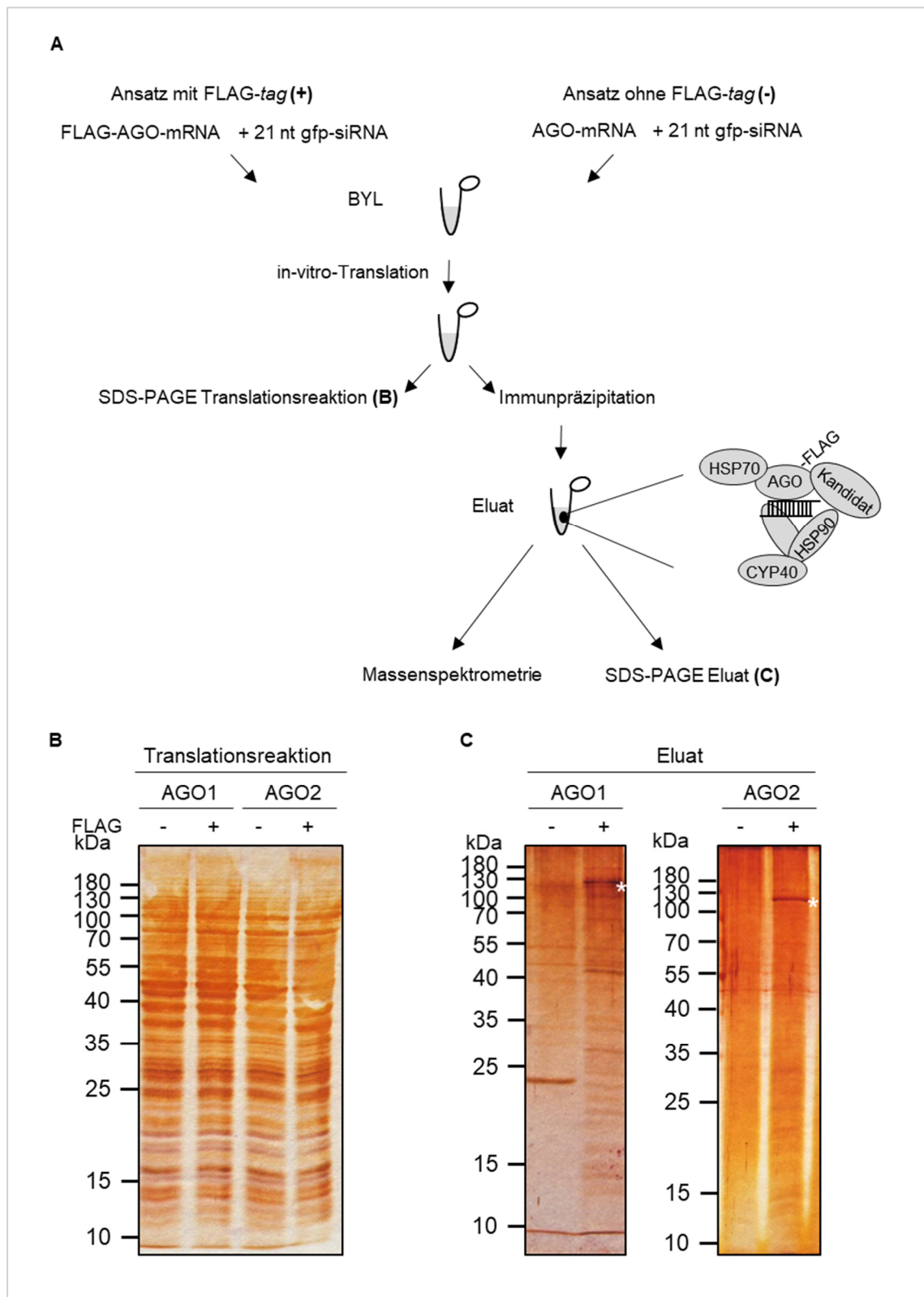


Abbildung 4.1: Silberfärbung der immunpräzipitierten FLAG-AGO1- und FLAG-AGO2-Proteine.

(A) Schematische Darstellung der zwei experimentellen Ansätze der Immunpräzipitation mit und ohne FLAG-tag. Es wurden AGO1 und AGO2 jeweils mit (+) und ohne (-) FLAG-tag in Anwesenheit der 21 nt langen gfp698-siRNA im BYL translatiert und die Proteine wurden ohne weitere Aufbereitung mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert (B). Aus den Ansätzen wurde ebenfalls jeweils eine Immunpräzipitation mittels Anti-FLAG-M2-affinity-gel durchgeführt. Schematisch dargestellt ist das Eluat, in dem das mit einem FLAG-tag versehene und mit siRNA beladene AGO-Protein mit seinen Interaktionspartnern HSP70, HSP90 und CYP40 und einem potenziellen Kandidaten interagiert. Die erhaltenen Proteine (Eluat) wurden mittels Massenspektrometrie oder mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. FLAG-AGO1- und FLAG-AGO2-Proteine wurden mit * markiert (C).

Aus Abbildung 4.1B wird ersichtlich, dass die Gesamtheit der Proteine des Translationsansatzes von AGO1 und AGO2 (mit oder ohne FLAG-tag) gleichermaßen detektiert werden konnten. Es konnte kein Unterschied in der Intensität der detektierten Proteine zwischen den vier Proben beobachtet werden.

Abbildung 4.1C zeigt, dass FLAG-AGO1/-AGO2 aus den In-vitro-Ansätzen angereichert werden konnte. Die IP der AGO-Proteine erfolgte nur bei Anwesenheit des FLAG-tags. In der Negativkontrolle wurde kein AGO-Protein bei 120 kDa detektiert (siehe Abbildung 4.1C, AGO1 -; AGO2 -). In den Proben, in denen zuvor die mRNA von FLAG-AGO1 und FLAG-AGO2 translatiert wurde, konnten die AGO-Proteine bei ~120 kDa detektiert werden (siehe Abbildung 4.1C, AGO1 +; AGO2 +). Neben den FLAG-AGO1- und FLAG-AGO2-Proteinen konnten weitere Proteine detektiert werden, die nicht in der Negativkontrolle (AGO-Proteine ohne N-terminales FLAG-tag; AGO1 -; AGO2 -) detektiert werden konnten. Im Gegensatz zu den in der Translationsreaktion detektierten Proteinen (siehe Abbildung 4.1B) konnten durch die Immunpräzipitation von FLAG-AGO einige Proteine mit angereichert werden.

4.1.2 Durchführung der Massenspektrometrie und Auswertung der Daten

Die mit dem FLAG-AGO co-immunpräzipitierten Proteine wurden nach Trypsinverdau mittels Massenspektrometrie (siehe 3.5.5; freundlicherweise durchgeführt von Dr. Dirk Dobritsch, CF MS) identifiziert. Zur Identifizierung der Proteine wurden die Peptide mit dem Proteom von *N. tabacum* und *N. benthamiana* verglichen (Bombarely *et al.* 2012; Edwards *et al.* 2017). Die Proben, in denen die AGO-Proteine ohne FLAG-tag translatiert wurden, dienten als Negativkontrolle. Die in diesen Proben identifizierten Proteine wurden in die Auswertung der Daten nicht mit einbezogen.

Es wurden 1084 *N. tabacum*-Proteine und 988 *N. benthamiana*-Proteine der Probe FLAG-AGO1 identifiziert, einige dieser Proteine konnten aufgrund hinreichender Menge auch quantifiziert werden. Von den *N. tabacum*-Proteinen konnten 469 Proteine, von den *N. benthamiana*-Proteinen konnten 567 Proteine quantifiziert werden. In den Proben FLAG-AGO2 wurden 732 *N. tabacum*-Proteine und 635 *N. benthamiana*-Proteine identifiziert und von diesen 319 bzw. 255 Proteine quantifiziert.

4.1.3 Erste Auswahl der Kandidaten

Die mittels MS identifizierten Proteine wiesen eine Interaktion mit AGO1 bzw. AGO2 auf. Um die Spezifität der Interaktion zu überprüfen, wurden zunächst Proteine ausgewählt, die mit einer hohen Stoffmenge im Eluat der AGO1-IP vorlagen und bei denen RNA-bindende Eigenschaften bereits in der Literatur beschrieben worden sind. Die aussichtsreichsten

Kandidaten der identifizierten *N. tabacum*- und *N. benthamiana*-Proteine sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Aus den MS-Daten ausgewählte potenzielle AGO1-Interaktionspartner.

Angegeben sind die Solgenomics-Datenbank-Nummern, der Name des Kandidaten mit der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzung und die pro 2 µl gemessener Probe bestimmte Stoffmenge in fmol.

Datenbank-Nummer	Kandidat	Abkürzung	fmol/2µl
Niben101Ctg15635g00003.1	Zink-Finger-Protein 3	<i>NbZFP</i>	34,0
Niben101Scf01848g05002.1	eukaryotischer Initiationsfaktor 4A	<i>NbEIF4A</i>	5,8
Nitab4.5_0001802g0030.1	Translation Elongation Factor 1A	<i>NtEF1A</i>	16,8
Nitab4.5_0000041g0130.1	Chaperonin Cpn60/TCP-1	<i>NtCpn60</i>	4,4
Nitab4.5_0004376g0010.1	<i>Polyadenylate-binding protein</i>	<i>NtPAB</i>	4,5
Nitab4.5_0002915g0070.1	<i>RNA-binding protein AKIP1-like</i>	<i>NtAKIP-like</i>	-

Aufgrund der hohen Abundanz wurde das *N. benthamiana*-Zink-Finger-Protein 3 (*NbZFP*) ausgewählt, um dessen Interaktion mit AGO1 zu überprüfen. Zink-Finger-Proteine sind meistens Transkriptionsfaktoren, können allerdings auch RNA binden (Ciftci-Yilmaz und Mittler 2008). Der *N. benthamiana* eukaryotische Initiationsfaktor 4A (*NbEIF4A*) bzw. die ATP-abhängige RNA-Helikase eIF4A war ein interessanter Kandidat, weil dieser an der Initiation der Translation beteiligt ist. Die Aufgabe von eIF4A ist die Auflösung von mRNA-Sekundärstrukturen in der 5'UTR der zu translatierenden mRNA (Sonenberg und Hinnebusch 2009). Ein weiterer Faktor, der an der Translation beteiligt ist, ist der *N. tabacum*-Translation Elongation Factor 1A (*NtEF1A*). Chaperonin, wie vermutlich auch das Chaperonin 60/TCP-1 (*NtCpn60*), unterstützt im Allgemeinen die Faltung von Proteinen (Saibil und Ranson 2002). Das *Polyadenylate binding*-Protein (*NtPAB*) ist aufgrund der Poly-A-Schwanz-Bindung möglicherweise relevant (Tarun *et al.* 1997). Das RNA-bindende Protein *Abscisic acid-activated protein kinase-interacting protein 1-like* (*NtAKIP-like*) ist an der post-transkriptionellen Regulation in Abhängigkeit von Abscisinsäure (ABA) in *Nuclear Speckles* beteiligt und ebenfalls aufgrund der RNA-Bindung von großem Interesse (Li *et al.* 2002).

Für die Kandidaten *NbEIF4A*, *NtEF1A* und *NtCpn60* konnten jeweils *N. tabacum*- bzw. *N. benthamiana*-Homologe unter den quantifizierten Proteinen gefunden werden. Es wurde kein dem *NbZFP* entsprechendes *N. tabacum*-Protein in den MS-Daten identifiziert. Das *N. benthamiana*-Homolog des *NtPAB* lag in einer geringeren Stoffmenge vor. *NtAKIP-like* schließlich wurde zuvor aus einer MS-Analyse von Dr. Jana Schuck ausgewählt und sollte im Folgenden ebenfalls weiter untersucht werden.

4.1.4 Klonierung und Herstellung der Transkripte der ausgewählten Kandidatengene

Die Interaktion zwischen den ausgewählten Proteinen und FLAG-AGO1 sollte mittels eines *pull down*-Experiments überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde die codierende Sequenz der Kandidaten in den modifizierten pSP64-Poly(A)-Vektor zur Herstellung von In-vitro-Transkripten kloniert. Es erfolgte die Amplifikation der codierenden Sequenz mittels PCR aus cDNA von *N. tabacum* oder *N. benthamiana* (siehe 3.3.3), wobei eine *Xma*I-Schnittstelle an das 3'-Ende des PCR-Fragments zur weiteren Klonierung angefügt wurde. Zur Detektion der translatierten Proteine wurden diese mit einem N-terminalen MYC-tag versehen. Die Klonierung der Sequenz des MYC-tags erfolgte über die Hybridisierung von zwei komplementären Oligonukleotiden. Die beiden Fragmente wurden in den mit den Restriktionsenzymen *Xma*I und *Xba*I endonukleolytisch gespaltenen, modifizierten pSP64-Poly(A)-Vektor kloniert (siehe 3.3.6 und 3.3.9). Nach erfolgreicher Klonierung der Gene erfolgte die In-vitro-Transkription (siehe 3.4.4).

4.1.5 Überprüfung der Interaktion zwischen FLAG-AGO1 und potenziellen Kandidaten mittels Co-Immunpräzipitation

Um die Interaktion der ausgewählten Kandidaten mit FLAG-AGO1 zu überprüfen, erfolgten im nächsten Schritt Co-Immunpräzipitationsstudien. Während das *A. thaliana*-*Tetratricopeptid repeat protein 7* (*AtTPR*), das bekannterweise mit FLAG-AGO1 interagiert (Iki *et al.* 2012), als Positivkontrolle verwendet wurde, diente das Protein Firefly-Luciferase (Fluc) als Negativkontrolle, da es keinen Einfluss auf die Spaltaktivität von AGO1 hat. Zunächst erfolgte für 1,5 h die getrennte Translation der Kandidaten-mRNA (*NbZFP*, *NbEIF4A*, *NtEF1A*, *NtCpn60*, *NtPAB*, *NtAKIP-like*) und FLAG-AGO1-mRNA bzw. AGO1-mRNA, gefolgt von einer Inkubationszeit von 30 min, in der die Ansätze der Kandidaten und des FLAG-AGO1 bzw. AGO1 vereint wurden, und der anschließenden Immunpräzipitation (siehe 3.5.4). Da das *AtTPR* auch in der Negativkontrolle (AGO1 ohne FLAG-tag) detektiert werden konnte, war zunächst die Etablierung eines Waschschruttes während der Co-Immunpräzipitation notwendig, um unspezifische Interaktionen mit *AtTPR* zu minimieren (Iki *et al.* 2012). In Kontrolleexperimenten erfolgte der Einsatz von verschiedenen Puffern mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (Daten nicht gezeigt). Da ein stringenter Waschschrut mit 300 mM NaCl die Interaktion von FLAG-AGO1 mit *AtTPR* störte, wurde auf diesen Waschschrut in dieser Immunpräzipitation verzichtet und nur der Puffer mit 150 mM NaCl verwendet (Daten nicht gezeigt). Am Ende der Immunpräzipitation wurden die Proteine mittels FLAG-Peptid eluiert, mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und immunologisch mit einem Anti-Myc-Antikörper nachgewiesen (siehe 3.5.2).

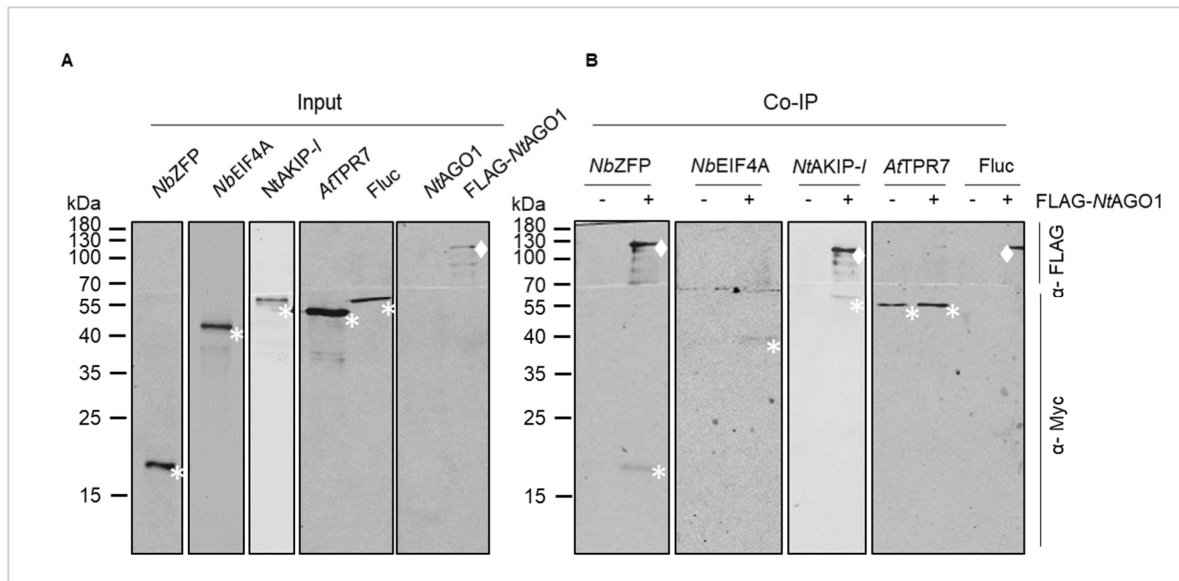


Abbildung 4.2: Western Blot der mit FLAG-*NtAGO1* co-immunpräzipitierten Kandidatenproteine.

(A) Es wurden FLAG-*NtAGO1*-mRNA oder *NtAGO1*-mRNA in Anwesenheit der 21 nt langen gf698-siRNA und die verschiedenen Kandidaten *NbZFP*, *NbEIF4A*, *NtAKIP-like*, *AftTPR* und *Fluc* im BYL translatiert. Die Auftrennung der Proteine von 5 % (10 µl) des Translationsansatzes (Input) erfolgte durch eine SDS-PAGE. Die entsprechenden Zielproteine wurden mittels anti-FLAG-Antikörper bzw. anti-Myc-Antikörper im Western Blot detektiert. (B) Anschließend wurde eine Co-Immünpräzipitation mittels Anti-FLAG-M2-affinity-gel von FLAG-AGO1 bzw. AGO1 mit den Kandidaten durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine von 50 % (15 µl) der Co-Immünpräzipitation (Co-IP) erfolgte durch SDS-PAGE, und die Detektion erfolgte mittels anti-FLAG-Antikörper bzw. anti-Myc-Antikörper. Das erfolgreich immunpräzipitierte FLAG-AGO1 und die mit einem Myc-tag versehenen potenziellen Interaktionspartner sind mit (◆) bzw. (*) markiert. In Spuren mit (+) wurde FLAG-*NtAGO1* und in Spuren mit (-) dagegen nur *NtAGO1* translatiert.

Der immunologische Nachweis der Kandidaten *NbZFP*, *NbEIF4A* und *NtAKIP-like* nach der In-vitro-Translation war erfolgreich. Bei den Kandidaten *NtPAB* war eine Translation im BYL nur in einer geringen Menge, bei *NtEF1A* und *NtCpn60* gar nicht möglich (Daten teilweise gezeigt in Abbildung 4.2A). In Abbildung 4.2B ist zu sehen, dass nach der Immunpräzipitation mit FLAG-AGO1 Signale in den Proben der Kandidaten *NbZFP*, *NbEIF4A* und *NtAKIP-like* sowie der Kontrolle mit dem *AftTPR* im Western Blot detektiert werden konnten. Diese Kandidaten, mit Ausnahme einer schwächeren Detektion der *AftTPR*-Kontrolle, wurden nicht in der Negativkontrolle (AGO1 ohne FLAG-tag) detektiert. Somit konnten diese Kandidatenproteine mit AGO co-immunpräzipitiert werden und es konnte gezeigt werden, dass sie mit AGO eine Interaktion eingehen. Die Kandidaten *NtEF1A*, *NtCpn60* und *NtPAB* sowie die *Fluc*-Negativkontrolle konnten nach einer Immunpräzipitation mit FLAG-AGO1 nicht immunologisch nachgewiesen werden.

4.1.6 Einfluss der Kandidaten auf die *cleavage*-Effizienz von AGO1

Zu untersuchen war, ob die neu identifizierten und co-assoziiierenden Kandidaten einen Einfluss auf die Spaltaktivität von AGO1 haben. Die Formierung des RISC im BYL erfolgt durch Zugabe der siRNA zur In-vitro-Translationsreaktion der AGO1-mRNA. Nach

Assemblierung des RISC kann die endonukleolytische Hydrolyse der zum *guide*-Strang spezifischen *target*-RNA mittels *cleavage*-Assay (siehe 3.2.5) untersucht werden.

Es sollten zwei Möglichkeiten des Einflusses auf die Spaltaktivität überprüft werden. Einerseits sollte überprüft werden, ob der Kandidat die Aktivität des programmierten RISC beeinflusst (Abbildung 4.3Aa). Andererseits sollte überprüft werden, ob der Kandidat einen Einfluss auf die Beladung von *NtAGO1* mit der siRNA hat (Abbildung 4.3Ab). Das Protein *NbCYP40* diene als Positivkontrolle, da eine zusätzliche Translation von CYP40 in BYL zur erhöhten Spaltaktivität im *cleavage*-Assay führte (Iki *et al.* 2012). Das Protein Fluc diene wie in den zuvor beschriebenen Interaktionsstudien als Negativkontrolle (s 4.1.5).

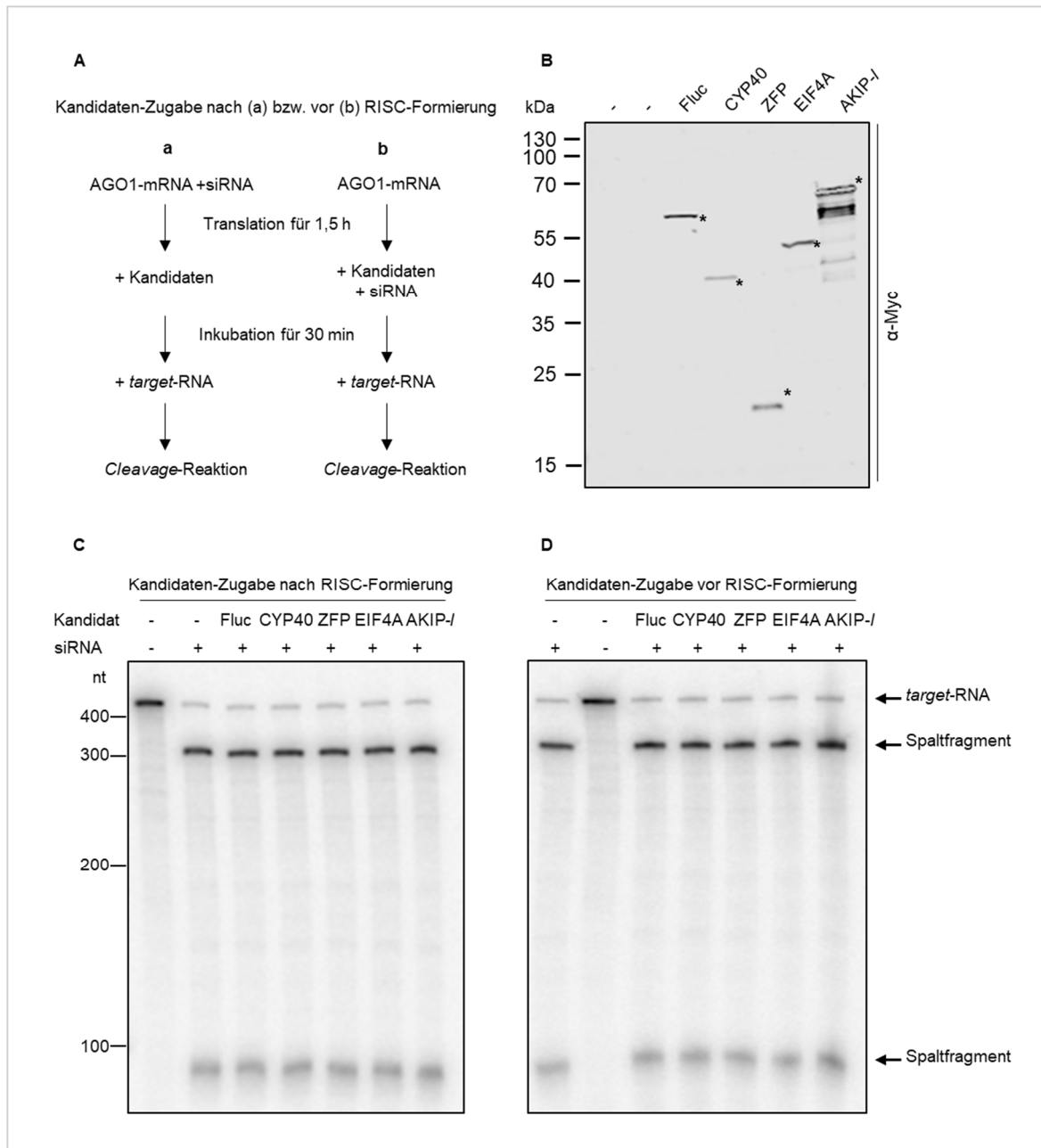


Abbildung 4.3: Einfluss der Kandidatenproteine auf die Spaltaktivität von *NtAGO1*.

(A) Schematische Darstellung der zwei experimentellen Ansätze des *cleavage*-Assays, bei denen die In-vitro-Translation der AGO1-mRNA mit (a) oder ohne (b) 21 nt langen gf698-siRNA (+ siRNA), die anschließender Zugabe der in-vitro-translatierten Kandidaten (+ Kandidaten) ohne (a) bzw. mit 21 nt langen gf698-siRNA (b) und die Untersuchung der *cleavage*-Reaktion nach Zugabe der *target*-RNA (+ *target*-RNA) erfolgte. Gekennzeichnet sind außerdem die Inkubationszeiten der In-vitro-Translation von 1,5 h und 30 min. (B) Die Synthese der Kandidatenproteine wurden mittels Western Blot überprüft. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine 12,5 %ige SDS-PAGE und die Detektion mit einem anti-Myc-Antikörper. (C) Der *cleavage*-Assay der GFP-*target*-RNA nach dem in Abbildung 4.3Aa beschriebenen Vorgang. Die Spaltung der *target*-RNA erfolgte bei allen Kandidatenproteinen mit vergleichbarer Effizienz. (D) Der *cleavage*-Assay der GFP-*target*-RNA nach dem in Abbildung 4.3Ab beschriebenen Vorgang. Die Spaltung der *target*-RNA erfolgte auch bei diesem Ansatz bei allen Kandidatenproteinen mit ähnlicher Effizienz. Die RNA wurde mittels denaturierendem 5 %igem Polyacrylamidgel und Autoradiographie analysiert. Die detektierten Signale der *target*-RNA und der Spaltfragmente sind entsprechend gekennzeichnet.

Um beide Möglichkeiten zu untersuchen, wurden Assays auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt. In dem einen Ansatz erfolgte die Formierung des RISC durch Translation von *NtAGO1* mit der 21 nt langen gf698-siRNA für 1,5 h (Abbildung 4.3Aa). In dem anderen

Ansatz erfolgte die Translation von *NtAGO1* ohne siRNA für 1,5 h (Abbildung 4.3Ab). Die Proteine Fluc, *NbCYP40*, *NbZFP*, *NbEIF4A*, *NtAKIP-like* wurden im BYL separat synthetisiert (siehe 3.2.3). Anschließend wurde zu dem *NtAGO1*-Translationsansatz der jeweilige Ansatz mit dem Kandidatenprotein (Abbildung 4.3Aa) bzw. der Ansatz mit dem Kandidatenprotein sowie die 21 nt langen *gf698*-siRNA (Abbildung 4.3Ab) zugegeben und für 30 min inkubiert. Danach wurde ein *cleavage*-Assay mit der *GFP-target*-RNA durchgeführt (siehe 3.2.5).

Alle Kandidaten-mRNAs konnten erfolgreich im BYL translatiert werden (Abbildung 4.3B). Eine Verbesserung der Spaltaktivität durch die Zugabe der Kandidatenproteine nach (Abbildung 4.3C) oder vor (Abbildung 4.3D) der Formierung des RISC konnte jedoch in keinem Fall gezeigt werden. Auch die Supplementierung mit *NbCYP40*, die als Positivkontrolle diente, führte nicht zu einer erhöhten Spaltaktivität und beeinflusste somit nicht die Formierung des RISC (siehe Abbildung 4.3C und D). Eine Verringerung der Konzentration der 21 nt langen *gf698*-siRNA auf 5 nM zeigte ebenfalls keinen positiven Einfluss der Kandidaten auf die Spaltaktivität (Daten nicht gezeigt).

4.1.7 Entwicklung eines In-vivo-Systems zur Überprüfung des Einflusses der Kandidaten auf das *RNA-silencing*

Mit dem im Folgenden beschriebenen In-vivo-Reportersystem sollte getestet werden, ob die *in vitro* über Assoziation an *NtAGO1* identifizierten Kandidaten an RNAi beteiligt sind. Dieses System sollte auf zwei Mechanismen basieren, dem *RNA-silencing* und dem CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/CRISPR-associated 9 (Cas9)). Beim Mechanismus des *RNA-silencings* sollte ein Reportergen durch eine miRNA negativ reguliert werden. Mittels CRISPR/Cas9 soll künstlich eine Mutation in die DNA eingefügt werden. Führt die durch CRISPR/Cas9 generierte Mutation zur Depletion des Kandidatenproteins, das am *silencing* des Reportergens beteiligt ist, würde dieses *silencing* aufgehoben und die Expression des Reportergens detektierbar sein (Abbildung 4.4). Das Reportersystem sollte mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation ins Pflanzengenom von *N. benthamiana* integriert und die Expression des Reportergens untersucht werden. Durch diese Vorgehensweise kann herausgefunden werden, ob die durch IP und MS identifizierten Proteine zur RISC-Aktivität beitragen.

Für den Teil des Reportersystems, der das *RNA-silencing* betrifft, sollte zunächst eine Methodik zur effizienten Messbarkeit der RNAi-Aktivität entwickelt werden. Dazu wurde als Reportergen in initialen Studien die kodierende Sequenz für das GFP mit der entsprechenden miRNA untersucht. Der GFP-Reporter enthielt die codierende Sequenz

des GFPs und eine auf der gf698-siRNA beruhende artifizielle miRNA. Die GFP-mRNA wird durch die artifizielle miRNA negativ reguliert (Abbildung 4.4 Konstrukt 1). Beide Gene stehen unter der Kontrolle des *cauliflower mosaic virus* 35S-Promotors. Als Transformationskontrolle enthielt das Konstrukt zusätzlich die codierende Sequenz des mCherry-Proteins, kontrolliert durch einen *cassava vein mosaic virus*-Promotor. Weiterhin enthielt das Reportersystem die codierende Sequenz des Cas9 unter der Kontrolle des 35S-Promotors (Abbildung 4.4 Konstrukt 1). In Zusammenarbeit mit Dr. Johannes Stuttmann (Institut für Biologie, Martin-Luther-Universität) wurde eine transgene *N. benthamiana*-Pflanze generiert, welche das GFP-basierte Reportersystem codiert. Bei diesen Pflanzen wurde das Gen des GFPs konstitutiv exprimiert, allerdings durch die artifizielle miRNA negativ reguliert, sodass ein Signal des GFPs mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht detektierbar war (Daten nicht gezeigt).

Für den CRISPR/Cas9-basierten Teil des Reportersystems wurde ein weiteres Konstrukt kloniert und transient mittels *A. tumefaciens*-vermittelter Transformation appliziert. Dieses Konstrukt enthielt die Sequenz für acht *single guide* RNA (sgRNA), die durch den *A. thaliana*-U6-Promotor kontrolliert wurden (Abbildung 4.4 Konstrukt 2). Die sgRNA dirigierte nach ihrer Bindung an Cas9 dieses zu einem Zielgen. Das Transkript, das die sgRNAs codiert, wurde spezifisch zur Zielsequenz eines potenziellen RISC-Faktors, der durch IP und MS identifiziert wurde, ausgewählt. Nach Bindung des Cas9-Proteins an die Zielsequenz induzierte es die Hydrolyse der *target*-DNA drei Nukleotide stromaufwärts eines aus den drei Nukleotiden „NGG“ bestehenden Motivs (Bhaya *et al.* 2011; Hsu *et al.* 2014). Die Cas9-Endonuklease generierte somit einen Doppelstrangbruch, der durch das zellinterne Reparatursystem repariert wurde. Aufgrund einer fehlerhaften Reparatur entstanden an dieser Stelle Mutationen. Ein Ausschalten des potenziellen RISC-Faktors auf diese Weise hätte eine Reduktion des *silencings* der GFP-mRNA zur Folge, woraus ein erhöhtes GFP-Signal resultieren würde. Das Aufheben des *silencing* des GFP-Reporters mittels Cas9-vermittelter Kandidaten-Mutagenese konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, da in den initialen Studien mit dem *A. tumefaciens*-basierten GFP-Reportersystem kein eindeutiges GFP-Signal mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

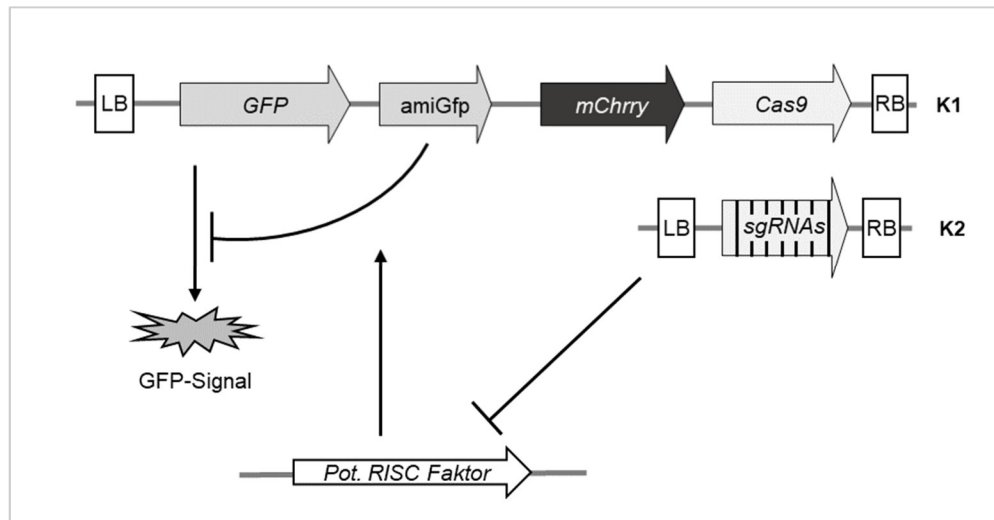


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des GFP-basierten *silencing*-Systems.

Auf dem Konstrukt 1 (K1) sind die codierenden Sequenzen für GFP und mCherry enthalten. Die GFP-mRNA wird durch eine künstliche miRNA (amiRNA), die auch auf dem Konstrukt codiert wird (amiGfp), inaktiviert (-). Das mCherry dient als Transformationskontrolle. Auf dem Konstrukt 2 (K2) sind acht *sgRNAs*, welche potenzielle RISC-Faktoren mutagenisieren und damit negativ regulieren (-), codiert. Sind diese Faktoren am RNAi beteiligt, führt das Ausschalten dieser Faktoren zur Verringerung des RNA-*silencing* der GFP-mRNA, was in ein erhöhtes GFP-Signal resultiert. Der Bereich innerhalb der *left- und right-border* (LB, RB) wird mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation in das Pflanzen-genom integriert.

Aufgrund dessen, dass die transgene Expression der amiRNA vermutlich zu einem irreversiblen *silencing* des Reporters führte und die experimentelle Detektion des GFP-Signals nicht effizient war, wurde ein vollständig transienter Ansatz untersucht. Ziel war es weiterhin herauszufinden, ob die in der IP und MS identifizierte Proteine an der RISC-Aktivität beteiligt sind. Für den RNAi-basierten Teil des Luciferase-Reportersystems (Abbildung 4.5A, Konstrukt 1) identifizierte Enrico Ehrhardt in seiner Masterarbeit eine Firefly-Luciferase-siRNA (E. Ehrhardt, S.-E. Behrens; unpubliziert). Diese siRNA induzierte in Verbindung mit pflanzlichem AGO1 eine effiziente Hydrolyse der Luciferase-*target*-mRNA. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in Kooperation mit Enrico Ehrhardt und Johannes Stuttmann auf Basis dieser Resultate ein transientes *A. tumefaciens*-basiertes System etabliert, bei dem die Firefly-Luciferase-mRNA durch eine auf dieser siRNA beruhenden künstlichen miRNA negativ reguliert wurde. Beide genannten Gene standen wie zuvor für den GFP-Reporter beschrieben unter der Kontrolle eines *cauliflower mosaic virus* 35S-Promotors. Das Konstrukt enthielt zusätzlich die codierende Sequenz der Renilla-Luciferase, kontrolliert durch einen *cassava vein mosaic virus*-Promotor. Die Renilla-Luciferase diente somit als Transformationskontrolle der Agrobakterien und als interner Standard nach Extrakt-Herstellung (Abbildung 4.5A, Konstrukt 1). Für den CRISPR/Cas9-basierten Teil des Reportersystems wurde ebenfalls ein weiteres Konstrukt kloniert. Dieses Konstrukt enthielt die codierende Sequenz von Cas9, kontrolliert durch einen 35S-Promotor und die Sequenz für acht *sgRNA*, die durch den *A. thaliana*-U6-Promotor kontrolliert werden. Der durch die Cas9-Endonuklease generierte Doppelstrangbruch konnte durch

das zellinterne Reparatursystem nur fehlerhaft repariert werden, wodurch an dieser Stelle Mutationen entstanden. Diese Mutation sollte zum Ausschalten des potenziellen RISC-Faktors führen und somit das *silencings* der Firefly-Luciferase reduzieren, woraus eine erhöhte Firefly-Luciferase-Aktivität resultieren würde (Abbildung 4.5A). Die hier beschriebene experimentelle Vorgehensweise würde Aussagen darüber erlauben, ob die durch IP und MS identifizierte Proteine zur RISC-Aktivität beitragen oder nur unspezifisch binden.

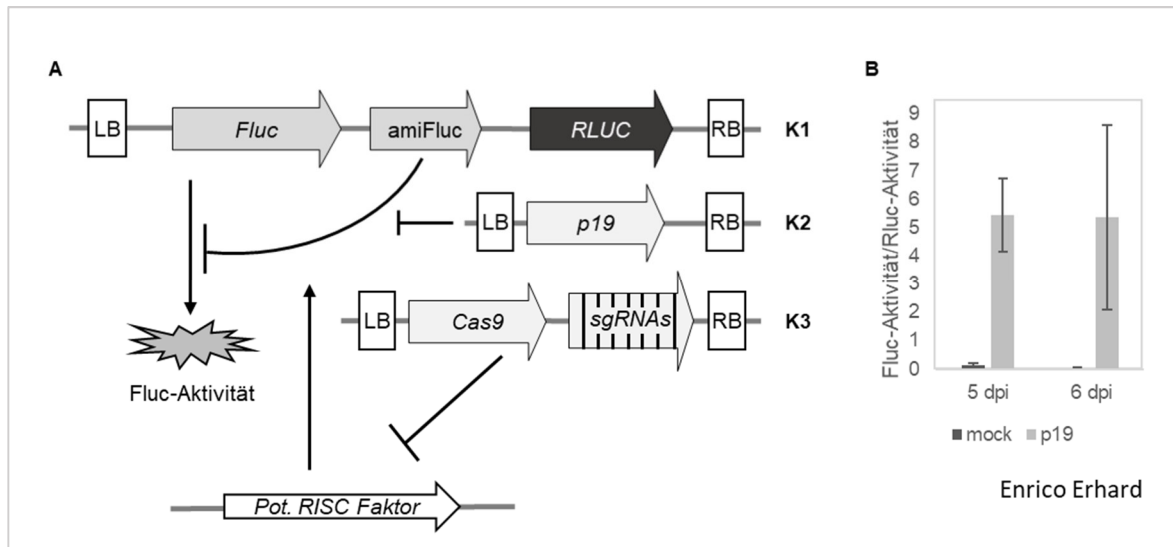


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des Luciferase-basierten *silencing*-Systems.

(A) Auf dem Konstrukt 1 (K1) sind die codierten Sequenzen für die Firefly- (Fluc) und Renilla-Luciferase (RLUC) enthalten. Die Firefly-Luciferase mRNA wird durch eine artifiziale miRNA (amiRNA), die auch auf dem Konstrukt codiert wird (amiFluc), inaktiviert (-). Die Renilla-Luciferase dient als interner Standard nach der Extrakt-Herstellung. Auf dem Konstrukt 2 (K2) ist p19, der virale Suppressor von TBSV, codiert. P19 verhindert durch die Bindung von miRNA das *silencing* der Firefly-Luciferase-mRNA. Auf dem Konstrukt 3 (K3) sind Cas9 und acht *sgRNAs*, welche potenzielle RISC-Faktoren mutagenisieren und damit negativ regulieren (-), codiert. Sind diese Faktoren am RNAi beteiligt, führt das Ausschalten dieser Faktoren zur Verringerung des RNA-*silencing* der Firefly-Luciferase-mRNA, was in eine erhöhte Luciferase-Aktivität resultiert. Der Bereich innerhalb der LB und RB wird mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation in das Pflanzengenom integriert. **(B)** Es wurde die relative Luciferase-Aktivität nach 5 und 6 *days post inoculation* (dpi) gemessen. Das unter (A) beschriebene Luciferase-Konstrukt wurde mittels Agrobakterium-vermittelter Transformation in die Pflanzen zusammen mit einem Agrobakterien-Stamm, der als Mock-Lösung dient oder der das p19-codierende Konstrukt (K2) enthält, co-inokuliert. Die Firefly-Luciferase-Aktivitäten wurden auf die der Renilla-Luciferase-Aktivitäten bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von drei Replikaten. Die Messung wurde von E. Ehrhardt durchgeführt.

Zunächst wurde durch E. Ehrhardt unter Betreuung der Autorin überprüft, ob nach der Applikation der Agrobakterien, die das Luciferase-Konstrukt enthalten, die Luciferase-mRNA durch die artifiziale miRNA (amiRNA) in der Pflanzenzelle negativ reguliert wird (siehe 3.1.3.1). Es wurde nach fünf und sechs *days post inoculation* (dpi) aus dem Blattmaterial von 4 Pflanzen ein Pflanzen-Extrakt hergestellt und die Firefly- sowie die Renilla-Luciferase-Aktivität gemessen (siehe 3.5.1). Es wurde eine sehr geringe Firefly-Luciferase-Aktivität detektiert. Die Renilla-Aktivität konnte hingegen als interne Kontrolle mit hoher Intensität detektiert werden. Parallel wurden Agrobakterien, die das Luciferase-

Konstrukt enthielten, zusammen mit Agrobakterien, die ein p19-codierendes Konstrukt enthielten, co-inokuliert. P19 ist der von TBSV exprimierte Suppressor des RNA-*silencing*. Durch die Co-Inokulation des Agrobakterium-Stamms, der das p19-codierende Konstrukt enthielt, konnte nach fünf und sechs dpi in allen vier Pflanzen das *silencing* der Firefly-Luciferase-mRNA reduziert und eine deutlich erhöhte Firefly-Luciferase-Aktivität relativ zur Renilla-Luciferase-Aktivität gemessen werden (Abbildung 4.5B). Mit diesen Experimenten wurde somit eine grundsätzliche Messbarkeit der RNAi-Aktivität in der Pflanze über das eingefügte Reportersystem demonstriert.

In einem nächsten Schritt sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob ein *silencing* der Firefly-Luciferase-mRNA aufgehoben würde, wenn das AGO1, ein zentraler Faktor im RNA-*silencing*-Prozess, auf Genebene ausgeschaltet würde. Dazu wurden *sgRNAs* komplementär zu den Genen *AGO1-H* (Niben101Scf01571g04001.1) und *AGO1-L* (Niben101Scf05146g06007.1), die sich in einer Insertion von 18 Nukleotiden in *AGO1-H* unterscheiden, ausgewählt (Gursinsky *et al.* 2015). Für jedes Gen wurden je vier komplementäre *sgRNAs* mittels *Golden-Gate*-Klonierung (siehe 3.3.10.1) in den Vektor pDGE1, der freundlicherweise von Johannes Stuttmann zur Verfügung gestellt wurde, kloniert. Dieser Vektor enthält die codierende Sequenz von Cas9 und dient als *backbone*-Konstrukt der acht *sgRNAs* (Abbildung 4.5A: K3). Als Negativkontrolle wurden *sgRNAs* ausgesucht, die im Gen *mCherry* (*mCH*) binden, das nicht in Pflanzen vorkommt. Es ist bekannt, dass die Transformation und die Expression der Konstrukte mittels Agrobakterien zwei bis drei Tage dauert (Wydro *et al.* 2006). Da die Stabilität der Proteine nicht bekannt ist und der AGO1-siRNA-Komplex eine Lebensdauer von 2–3 Tagen hat, ist denkbar, dass eine Mutation erst nach einiger Zeit einen Effekt auf Proteinebene und auf die Aktivität des RISC zeigt (Csorba *et al.* 2010). Aus diesem Grund wurden die Agrobakterien, die das Luciferase-codierende Konstrukt enthielten (K1), fünf Tage nach der Applikation der Agrobakterien, die das CRISPR-Cas9-codierende Konstrukt enthielten, inokuliert (siehe 3.1.3.1). Nach weiteren fünf Tagen erfolgte die Ernte der Blattproben, die Extrakt-Herstellung und die Firefly- und Renilla-Luciferasemessung (siehe 3.5.1). Wenn die Agrobakterien, die das Luciferase-codierende Konstrukt enthielten, in zuvor behandelte Blätter inokuliert wurden, wurde eine niedrigere Renilla-Luciferase-Aktivität gemessen als in den initialen Studien, bei denen das Konstrukt bei der ersten Inokulation verwendet wurde (Daten nicht gezeigt). Somit wurde mit den hier beschriebenen Systemen angezeigt, dass das Ausschalten von *AGO1* keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf die relative Luciferase-Aktivität hatte (Abbildung 4.6A). Die durch Cas9 generierte Mutation in *AGO1* wurde mittels PCR über den Bereich *upstream* und *downstream* der *sgRNA-target*-Sequenzen mit einer aus den Blattproben extrahierten DNA überprüft. Durch das Einsetzen

der gleichen Mengen an DNA kann aufgrund der geringeren Signalstärke im Vergleich zur Kontrolle auf die erfolgreiche Cas9-*knockout*-Mutagenese geschlossen werden (Abbildung 4.6 B).

Die Paraloge *AGO1-L* und *AGO1-H* dienten zur initialen Untersuchung der Messbarkeit der RNAi-Aktivität über das eingefügte Reportersystem. Die acht *sgRNAs* des *sgAGO1*-Konstrukts adressierten nur die Gene *AGO1-L* und *AGO1-H* (Niben101Scf05146g06007.1, Niben101Scf01571g04001.1), nicht jedoch die beiden weiteren *AGO1*-Paraloge (Niben101Scf08137g02022.1.1, Niben101Scf00887g01007.1). Es wurde im nächsten Schritt ein neues *pDGE1*-Konstrukt, im Folgenden als *sgAGO1-2* bezeichnet, generiert, welches alle bekannten *AGO1*-Homologe und -Paraloge einschließt. Nach analoger Transformation der zwei Agrobakterienkulturen in fünf Pflanzen konnte in Blattextrakten eine zwölfmal höhere Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden (Abbildung 4.6A). Die Mutation in den *AGO1-2*-Paralogen wurde ebenfalls über die Abnahme der Signalstärke des PCR-Produkts im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Über das Ausschalten der *AGO1-2*-Paraloge wurde somit eine grundsätzliche Verwendbarkeit des Systems indiziert.

Zur weiteren Verifizierung des Systems wurden zwei bekannte Kandidaten ausgewählt, die mit dem RISC assoziieren: das *N. benthamiana*-Homolog des *A. thaliana*-*TRN1*, das für miRNA-vermitteltes *silencing* in *A. thaliana* notwendig ist, und das bereits beschriebene *CYP40* (Cui *et al.* 2016; Iki *et al.* 2012). Außerdem wurde der Effekt der Cas9-*knockout*-Mutagenese der Gene *ZFP*, *EIF4A* und *AKIP-like* auf die Luciferase-Aktivität überprüft. Für jedes Kandidatengen wurden acht *sgRNAs* so ausgewählt, dass in allen paralogenen Genen mindestens eine *sgRNA* bindet. Nach Inokulation der Agrobakterien, Ernte der Blattproben und Herstellung des Blattextrakts konnte, sowohl für die beiden zusätzlichen Kontrollen als auch für die weiteren Kandidaten keine im Vergleich zur Kontrolle (*sgmCh*) erhöhte relative Luciferase-Aktivität gemessen werden (Abbildung 4.6A).

Die Cas9-vermittelte Mutation in den Kandidatengen wurde, wie zuvor beschrieben, mittels PCR über den Bereich *upstream* und *downstream* der *sgRNA-target*-Sequenzen mit einer aus den Blattproben extrahierten DNA überprüft. Aufgrund der geringeren Signalstärke oder der kleineren Fragmentgröße im Vergleich zur Kontrolle – bei Einsatz der gleichen Menge an DNA – konnte auf die erfolgreiche Cas9-vermittelte *knockout*-Mutagenese geschlossen werden (Abbildung 4.6B). Bei allen Proben, bis auf *TRN1*, konnte eine geringere Signalstärke im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Bei *TRN1* war das PCR-Fragment in den mit CRISPR-Cas9 behandelten Proben kleiner, vermutlich lag eine Deletion vor. Außerdem wurde die Sequenz der PCR-Fragmente mittels Sequenzierung überprüft. Bei allen Proben konnten im Vergleich zu der Probe *mCh* im Bereich der Spaltstelle mehrere unterschiedliche Nukleotide an der gleichen Position der Sequenz

identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Dadurch konnte gezeigt werden, dass in jeder Zelle ein anderes Mutationsereignis stattfand, wenn das Blatt mit dem Kandidatengenspezifischen Cas9-Konstrukt behandelt wurde.

Trotz Nachweis der Cas9-vermittelten *knockout*-Mutagenese in den Kandidatengenen konnte kein signifikanter Einfluss der bewiesenermaßen am RNAi beteiligten Proteine TRN1 und CYP40 sowie der Kandidatenproteine auf das *silencing* der Firefly-Luciferase-mRNA gezeigt werden.

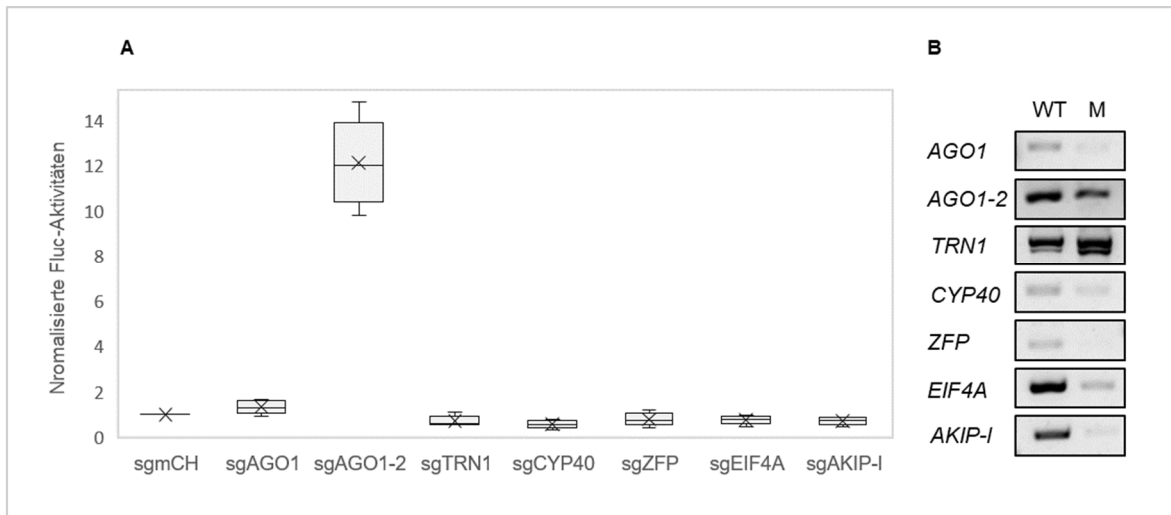


Abbildung 4.6: Effekte der Mutagenese der Kandidatengene auf das Luciferase-silencing.

(A) Nach Inokulation der zwei Agrobakterien-Kulturen mit dem CRISPR-Cas9- und dem Luciferase-Konstrukt in einem Abstand von fünf Tagen wurde nach weiteren fünf Tagen der Blattextrakt hergestellt und die Aktivität der Firefly- und Renilla-Luciferase gemessen. Mittels Boxplotdarstellung ist die auf die Renilla-Luciferase normierte Firefly-Luciferase-Aktivität für die jeweiligen potenziellen Interaktionspartner aufgetragen. Gezeigt werden die Werte von fünf individuell aufgearbeiteten Blattproben. **(B)** Die Überprüfung der Mutagenese erfolgte mittels PCR über den *sgRNA-target*-Bereich mit isolierter DNA aus dem mit *sgRNA*-mCH-Konstrukt (Wildtyp, WT) bzw. mit den verschiedenen CRISPR-Cas9-Konstrukten (Mutante, M) behandelten Blattmaterial von zwei Pflanzen. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus zwei Experimenten.

4.1.8 Neubewertung der MS-Daten

Auf Grundlage der zuvor beschriebenen Resultate wurde eine Präzisierung der in 4.1.3 gewählten Variantenproteine durchgeführt, um jene Interaktionspartner zu identifizieren, die eine stärkere Interaktionskapazität vermuten lassen. Die Präzisierung erfolgte, indem Proteine ausgewählt wurden, denen mindestens drei proteotypische Peptide zugeordnet waren. Des Weiteren wurden Proteine im BYL identifiziert und diese als weiterer Datensatz in die Auswertung integriert. Die Identifizierung der Proteine im BYL diente dazu, die Anreicherung der Proteine durch die Co-IP zu untersuchen. Die Auswertung erfolgte wie zuvor mit einem Abgleich gegen die *N. tabacum*- und die *N. benthamiana*-Datenbank und ist graphisch in der Abbildung 4.7A für *N. tabacum* und in Abbildung 4.7B für *N. benthamiana* dargestellt. In der Abbildung 4.7A ist zu sehen, dass 221 *N. tabacum*-Proteine nach Immunpräzipitation von FLAG-*NtAGO1*, 192 *N. tabacum*-Proteine nach

Immunpräzipitation von FLAG-*NbAGO2* und 90 *N. tabacum*-Proteine im BYL identifiziert wurden. Die 90 identifizierten *N. tabacum*-Proteine in der BYL-Probe sind ausschließlich Proteine, die in den AGO-IPs identifiziert wurden. Alle Proteine, die in mindestens einer der Kontroll-IPs (AGOs ohne FLAG-tag) detektiert wurden, wurden aus den FLAG-IP-Datensätzen für die weitere Auswertung ausgeschlossen. Auf diese Weise entstanden sechs Datensätze, unter denen es potenzielle RISC-Faktoren geben könnte (Abbildung 4.7, rote Zahlen). Bei dem Vergleich der Peptide mit dem Proteom von *N. tabacum* wurden 52 Proteine sowohl im BYL als auch in den FLAG-AGO-IPs (Abbildung 6.1A) und 43 Proteine in beiden FLAG-AGO-IPs (Abbildung 6.1B) identifiziert. Ausschließlich in der FLAG-*NtAGO1*-IP wurden 82 Proteine und ausschließlich in der FLAG-*NbAGO2*-IP 68 Proteine identifiziert. Im BYL und der FLAG-*NtAGO1*-IP wurden 26 Proteine, im BYL und der FLAG-*NbAGO2*-IP hingegen vier Proteine identifiziert.

Ebenso wurden 192 und 140 *N. benthamiana*-Proteine nach Immunpräzipitation von FLAG-*NtAGO1* bzw. FLAG-*NbAGO2* und 80 *N. benthamiana*-Proteine im BYL identifiziert (Abbildung 4.7B). Entsprechend der zuvor erwähnten sechs Datensätze konnten 37 Proteine sowohl im BYL als auch in den FLAG-AGO-IPs und 32 Proteine in beiden FLAG-AGO-IPs identifiziert werden (Abbildung 4.7B). Außerdem ergaben sich eine Anzahl von 79 *N. benthamiana*-Proteine, die ausschließlich in der FLAG-*NtAGO1*-IP oder 49 *N. benthamiana*-Proteine, die ausschließlich in der FLAG-*NbAGO2*-IP identifiziert wurden. Es wurden 28 Proteine gemeinsam in den Proben des BYLs und der FLAG-*NtAGO1*-IP und drei Proteine gemeinsam in den Proben des BYLs und der FLAG-*NbAGO2*-IP identifiziert (Abbildung 4.7B).

Von den zuvor ausgewählten Kandidaten kamen aufgrund der neuen Kriterien nur noch das *NbZFP* und das Chaperonin in Betracht. Das *NbZFP* wurde unter den 79 Kandidaten des *N. benthamianas* FLAG-*NtAGO1*-Datensatzes gefunden (Abbildung 4.7B) und das *NtCpn60* unter den 52 Kandidaten des Datensatzes FLAG-AGO1/2, BYL (Abbildung 4.7A). Die anderen Kandidaten wurden zwar ebenfalls massenspektrometrisch detektiert, jedoch lagen hier nur ein bis zwei proteotypische Peptide vor, wodurch diese nicht die neu gesetzten Auswahlkriterien erfüllten.

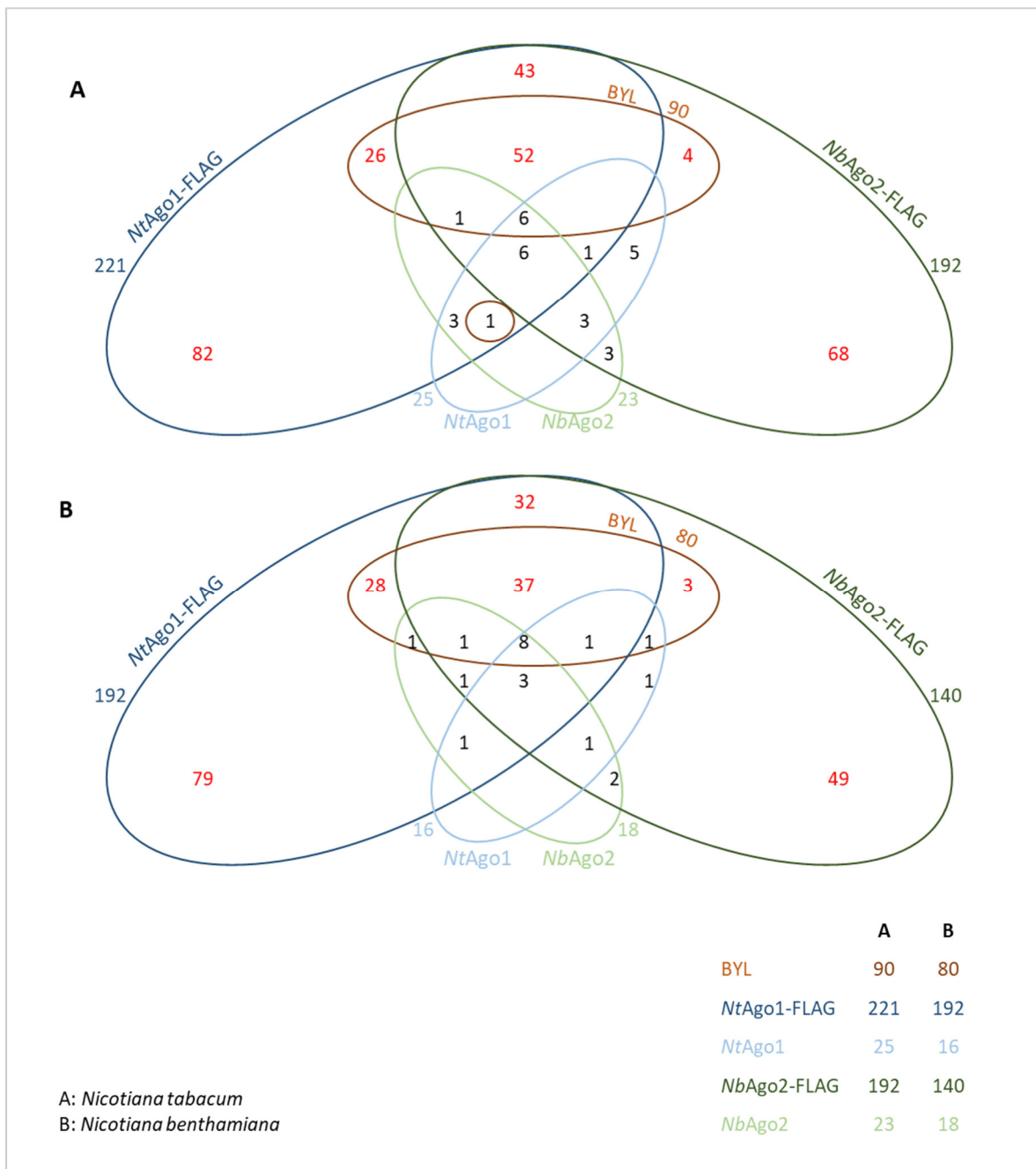


Abbildung 4.7: Darstellung der mittels MS identifizierten potenziellen RISC-Faktoren.

Dargestellt in Ellipsen sind die verschiedenen Ansätze FLAG-*NtAGO1*, FLAG-*NbAGO2*, *NtAGO1*, *NbAGO2* und BYL mit der Anzahl der jeweils identifizierten Proteine aus den Datenbanken von *N. tabacum* (A) und *N. benthamiana* (B). Die in mehreren Kategorien (Kategorie: BYL, FLAG-AGO1, FLAG-AGO2; BYL, FLAG-AGO1; BYL, FLAG-AGO2; FLAG-AGO1, FLAG-AGO2) vorkommenden Kandidaten wurden durch die Überlappung der Ellipsen dargestellt. Die Farben entsprechen der in der Legende angegebenen Kategorien.

Es wurden viele Nukleinsäure-bindende Proteine identifiziert. Eine stichprobenartige Überprüfung der Funktion einiger Proteine ergab, dass viele Proteine in Verbindung mit Abscesinsäure, Ubiquitin oder dem Proteasom, der Transkription oder der Translation stehen. Eine Auswahl besonders interessanter Kandidaten ist mit der Zuordnung zu den Datensätzen in Tabelle 4.2 angegeben.

Tabelle 4.2: Neu ausgewählte Kandidaten aus den Datensätzen FLAG-AGO1, FLAG-AGO2 und BYL

Datenbank-Nummer	Kandidat	Datensatz
Nitab4.5_0001831g0090.1	<i>WD40-repeat-containing domain, IKI3</i>	F-AGO1, F-AGO2
Nitab4.5_0000307g0250.1	RNA-Polymerase V	F-AGO1, F-AGO2
Nitab4.5_0003481g0090.1	Ankyrin repeat-containing domain, Zinc finger	F-AGO1, F-AGO2
Nitab4.5_0008709g0020.1	<i>P-loop-containing nucleoside triphosphate hydrolase</i>	F-AGO1, F-AGO2
Nitab4.5_0005487g0030.1	<i>RNA helicase UPF1, UPF2-interacting domain</i>	F-AGO1, F-AGO2
Nitab4.5_0000150g0090.1	<i>WD40-repeat-containing domain</i>	F-AGO1, F-AGO2, BYL
Nitab4.5_0000477g0030.1	<i>small ubiquitin-related modifier</i>	F-AGO1

Durch die Präzisierung der Variantenproteinauswahl konnten neue potenzielle Interaktionspartner identifiziert werden, die aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiterverfolgt werden konnten.

4.2 Identifizierung und Charakterisierung einer RNase H-Aktivität im BYL

Die beiden Endonukleasen AGO und RNase H gehen evolutionär vermutlich auf einen RNase H-ähnlichen Vorläufer zurück (Moelling *et al.* 2017). Während eukaryotische AGOs vorrangig mit einer siRNA assoziieren, binden prokaryotische AGOs vorrangig einzelsträngige DNA-Moleküle. Im Fall der RNase H erfolgt die Bindung eines Heteroduplexes aus einem antisense DNA-Oligonukleotids (ASO) und der *target*-RNA. Beide Nukleasen katalysieren die endonukleolytische Hydrolyse der *target*-RNA. ASOs könnten eine interessante Variante für eine Nukleinsäure-medierte Pflanzenprotektion gegen pflanzenpathogene Viren sein. Das zur Verfügung stehende In-vitro-System BYL sollte genutzt werden, um diese Möglichkeit in Abhängigkeit von AGO oder RNase H zu überprüfen.

4.2.1 DNA-Moleküle induzieren AGO-unabhängig eine RNA-Hydrolyse im BYL

Eine aussagekräftige Methode, um zu testen, inwiefern ein *silencing*-Effekt mittels Doppelstrang-DNA (dsDNA) oder Einzelstrang-DNA (ssDNA) beobachtet werden kann, ist der *cleavage*-Assay unter Verwendung des BYLs. *NbAGO1* kann mit der zuvor beschriebenen, gegen das GFP-*target* gerichteten gf698-siRNA programmiert werden und eine Spaltung des *targets* induzieren (Iki *et al.* 2010).

In einem initialen Experiment sollte die Hydrolyse der GFP-*target*-RNA durch *NbAGO1* mit einer 21 nt langen dsDNA, welche dem gf698-siRNA-Duplex entspricht, und mit einer 21 nt langen ssDNA, deren Sequenz dem *guide strand* der gf698-siRNA entspricht, im Vergleich zu der entsprechenden gf698-dsRNA bzw. -ssRNA untersucht werden.

Um zu gewährleisten, dass kein Rest einzelsträngiger DNA vorhanden ist, wurde das hybridisierte Oligonukleotid aus einem nativen Polyacrylamid-Gel isoliert und gereinigt. Mittels Silberfärbung wurde der Doppelstrang erneut detektiert, allerdings konnte auch eine geringe Menge Einzelstrang nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Nach der Inkubation der Ansätze mit siRNA-Duplex, siRNA *guide strand*, dsDNA oder ssDNA jeweils mit und ohne *NbAGO1*-mRNA erfolgte die Durchführung der Spaltreaktion und die Analyse der Spaltfragmente mittels denaturierender PAGE und Autoradiographie (siehe 3.2.5).

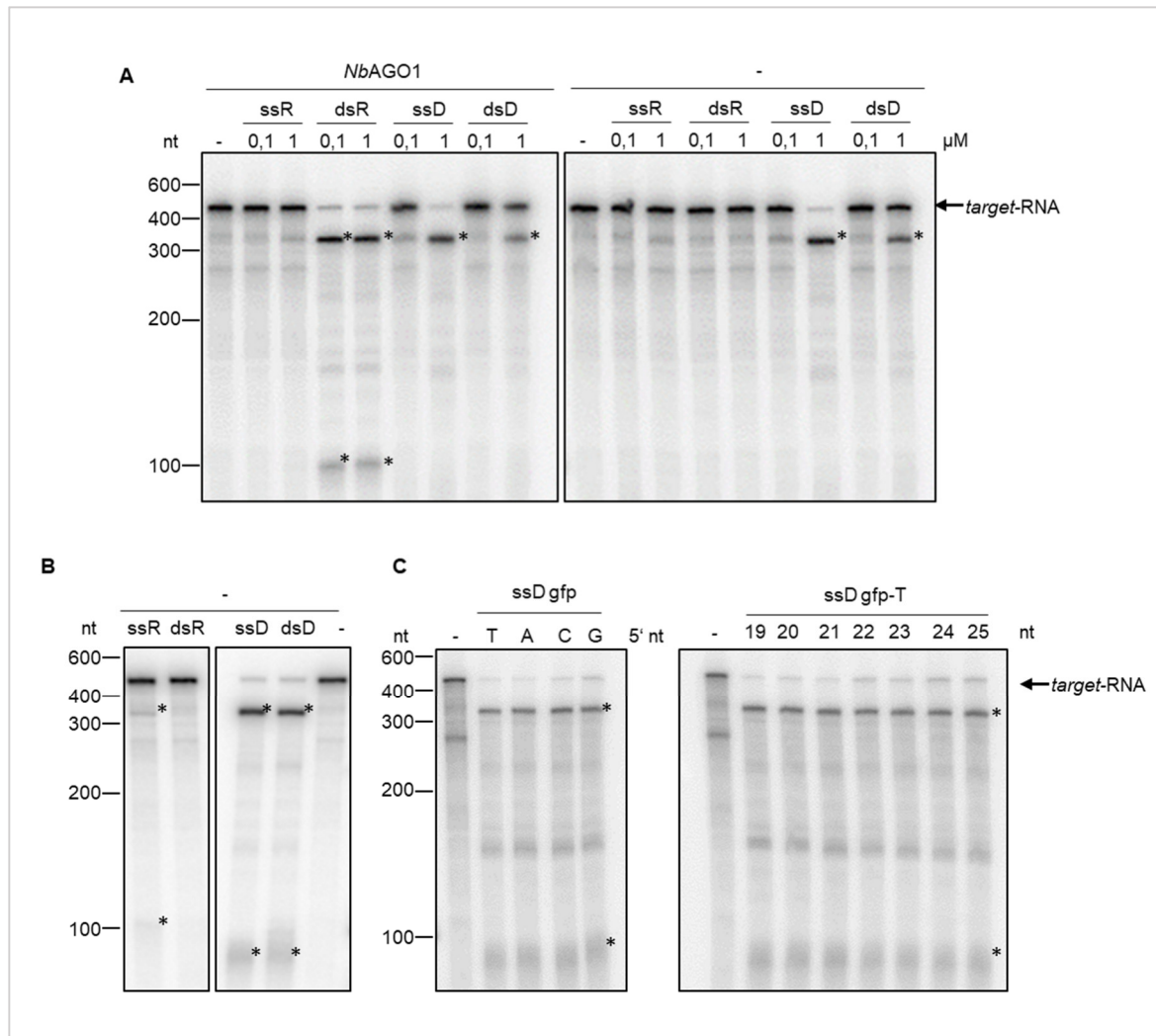


Abbildung 4.8: Cleavage einer target-RNA erfolgte in Abhängigkeit einer ssDNA oder dsDNA unabhängig von co-exprimiertem AGO.

(A) Cleavage-Assay mit ^{32}P -markierter GFP-target-RNA und gf698-dsRNA (dsR), ssRNA (ssR), dsDNA (dsD) und ssDNA (ssD) in den jeweils angegebenen Konzentrationen (0,1 und 1 μM). Ansätze mit bzw. ohne *NbAGO1*-mRNA (-) wurden mit den jeweiligen RNA- oder DNA-Oligonukleotiden für 2,5 h inkubiert (In-vitro-Translation von *NbAGO1*-mRNA). **(B)** Cleavage-Assay, bei dem ^{32}P -markierte GFP-target-RNA und RNA- bzw. DNA-Oligonukleotide (jeweils 0,1 μM Endkonzentration) zuerst vereint und anschließend zum Ansatz gegeben wurden. **(C)** Cleavage-Assay mit ^{32}P -markiertem GFP-target und gf698-ssDNA mit den unterschiedlichen 5'-Nukleotiden T, A, C, G bzw. verschiedenen Längen (19–25 nt) der ssDNA mit 5'-T. Es galten die gleichen Bedingungen wie in (B) beschrieben. Die Analyse der RNA erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie. Die Spaltfragmente sind jeweils mit Sternchen gekennzeichnet.

Die Hydrolyse der GFP-target-RNA im BYL in Gegenwart von ssRNA und dsRNA war bekanntermaßen von der Synthese zusätzlichen AGO-Proteins abhängig (Abbildung 4.8A). Im Gegensatz dazu wiesen die in Abbildung 4.8A gezeigten Resultate darauf hin, dass bei der Verwendung von ssDNA und dsDNA eine Spaltung der GFP-target-RNA auch in Abwesenheit von co-exprimiertem AGO erfolgte. Während bei der *NbAGO1*-abhängigen siRNA-vermittelten Hydrolyse das 3'-Spaltfragment deutlich sichtbar war, konnte es in der *NbAGO1*-unabhängigen Hydrolyse nicht detektiert werden (Abbildung 4.8A). Die Hydrolyse wird durch co-exprimiertes AGO in Gegenwart der ssDNA bzw. dsDNA nicht verbessert.

Anschließend sollte überprüft werden, ob die Inkubationszeit der Oligonukleotide im BYL einen Einfluss auf die Spaltung der *target*-RNA hat. Der Assay wurde modifiziert, indem RNA- bzw. DNA-Oligonukleotide und *target*-RNA zuerst gemischt und dann zu Ansätzen ohne co-exprimiertes AGO gegeben wurden (siehe 3.2.6). Wie in Abbildung 4.8B zu sehen ist, war die Spaltung im Fall von dsDNA und ssDNA effizienter als in der oben beschriebenen Variante, bei der die *target*-RNA erst deutlich nach den Oligonukleotiden zugegeben wurde. Zudem war nun ein 3'-Spaltfragment detektierbar. Auch unter Verwendung der ssRNA erfolgte eine Hydrolyse der GFP-*target*-RNA. Allerdings unterschied sich hier das Spaltmuster von der dsDNA- oder ssDNA-induzierten Spaltung, bei der ein kleineres 3'-Spaltfragment entstand (Abbildung 4.8B).

In diesen Experimenten konnte somit gezeigt werden, dass die ssDNA- und dsDNA-vermittelte Hydrolyse der *target*-RNA im BYL unabhängig von co-exprimiertem AGO erfolgt und ein anderes Spaltmuster generiert.

4.2.2 Das 5'-Ende und die Länge der verwendeten Einzelstrang-DNA haben keinen Einfluss auf die Spalteffizienz

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Hydrolyse der *target*-RNA nicht von synthetisiertem *NbAGO1* abhängig war. Es ist denkbar, dass im BYL ein anderes AGO-Protein in ausreichender Konzentration vorliegt und in der Lage ist, die ssDNA oder dsDNA zu binden und die Hydrolyse einer *target*-RNA zu induzieren. Unterschiedliche AGOs bevorzugen siRNAs mit unterschiedlichen 5'-Nukleotiden und unterschiedlichen Längen (Mi *et al.* 2008). Die Überprüfung der Spaltaktivität induziert durch DNA-Oligonukleotide mit den unterschiedlichen 5'-Nukleotiden A, C, G, T und Längen von 19–25 nt sollte Aufschluss darüber geben, ob es sich um ein BYL-internes AGO-Protein handelt, das die beobachtete endonukleolytische Hydrolyse der *target*-RNA vermittelt. Es wurde ein *cleavage*-Assay durchgeführt, bei dem GFP-*target*-RNA und DNA-Oligonukleotide zuerst gemischt und anschließend zum Ansatz zugegeben wurden. Der Vergleich der Signalintensitäten der Spaltfragmente zeigte, dass die unterschiedlichen 5'-Nukleotide A, C, G, T und Längen von 19–25 nt der ssDNA keinen Einfluss auf die beobachtete Spaltaktivität im BYL haben (Abbildung 4.8C).

4.2.3 Die DNA-induzierte Hydrolyse ist Mg²⁺-Ionen abhängig

Die durch AGO1 katalysierte endonukleolytische Hydrolyse ist Mg²⁺- oder Mn²⁺-abhängig. Durch Komplexierung der Mg²⁺-Ionen im Ansatz mittels EDTA sollte überprüft werden, ob die Spaltaktivität von AGO bzw. der BYL-internen Aktivität unterdrückt wird.

Es wurde *AGO1*-mRNA in Anwesenheit der *gf698*-siRNA für 2 h im BYL translatiert (siehe 3.2.3). Anschließend wurde dieser sowie ein weiterer Ansatz ohne *AGO1*-Translation mit EDTA in einer Endkonzentration von 2 und 5 mM für 30 min versetzt. Es erfolgte die Zugabe der *target*-RNA bzw. des *target*-RNA/ASO-Gemischs (siehe 3.2.3 und 3.2.6).

Es konnte gezeigt werden, dass EDTA die durch *NbAGO1*-vermittelte Spaltung und die BYL-interne Aktivität inhibierte (Abbildung 4.9). Die Zugabe von 2 mM EDTA reichte aus, um die *AGO1*-vermittelte Hydrolyse vollständig zu inhibieren. Die ssDNA-induzierte Hydrolyse war bei 2 mM nur partiell und bei 5 mM vollständig inhibiert. Außerdem konnte beobachtet werden, dass EDTA das Verhältnis von 5'- zu 3'-Spaltfragment verschiebt. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Spaltung durch das BYL-interne Enzym von Mg^{2+} -Ionen abhängt.

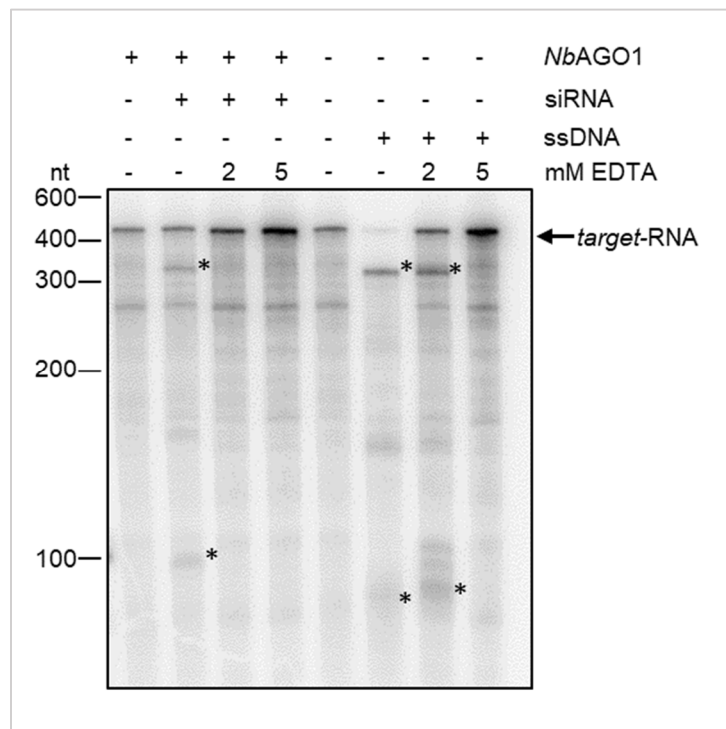


Abbildung 4.9: Inhibition der Spaltung durch *AGO1* bzw. die BYL-interne Aktivität mittels EDTA.

Ansätze mit *AGO1*-mRNA wurden für 2 h in Anwesenheit der *gf698*-siRNA translatiert. Alle Ansätze wurden mit den angegebenen Mengen EDTA versetzt und für 30 min inkubiert. Es erfolgte die Zugabe der radioaktiv markierten GFP-*target*-RNA zu den Ansätzen mit vorheriger *AGO*-Translation. In den übrigen Ansätzen wurde ein Gemisch aus radioaktiv markierter GFP-*target*-RNA und ssDNA hinzugefügt. Die Analyse der RNA erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie. Die Spaltfragmente sind jeweils mit Sternchen gekennzeichnet.

4.2.4 Immunpräzipitation von ssDNA-programmierten FLAG-AGOs

Die bisherigen Ergebnisse lassen annehmen, dass *AGO*-Proteine im BYL vermutlich weder ssDNA noch dsDNA binden und die endonukleolytische Hydrolyse der *target*-RNA katalysieren. Es sollte überprüft werden, ob synthetisiertes *AGO* mit einer ssDNA programmiert werden und eine *target*-RNA hydrolysieren kann. Dafür wurde die *cleavage*-

Reaktion vom Translationsansatz getrennt, indem FLAG-AGO1/2/5/7/10 in Anwesenheit von siRNA oder ssDNA im BYL synthetisiert wurde. Anschließend wurde FLAG-AGO1/2/5/7/10 mittels Immunpräzipitation isoliert. In einem *cleavage*-Ansatz in Abwesenheit vom BYL wurden dann mit der GFP-*target*-RNA die AGO-Proteine auf *slicer*-Aktivität überprüft. Als Positivkontrolle diente AGO1, programmiert mit einer siRNA. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von AGO-mRNA und einer kleinen unspezifischen Nukleinsäure sowie ein Ansatz ohne Zugabe von AGO-mRNA, aber mit einem einzelsträngigen DNA-Oligonukleotid.

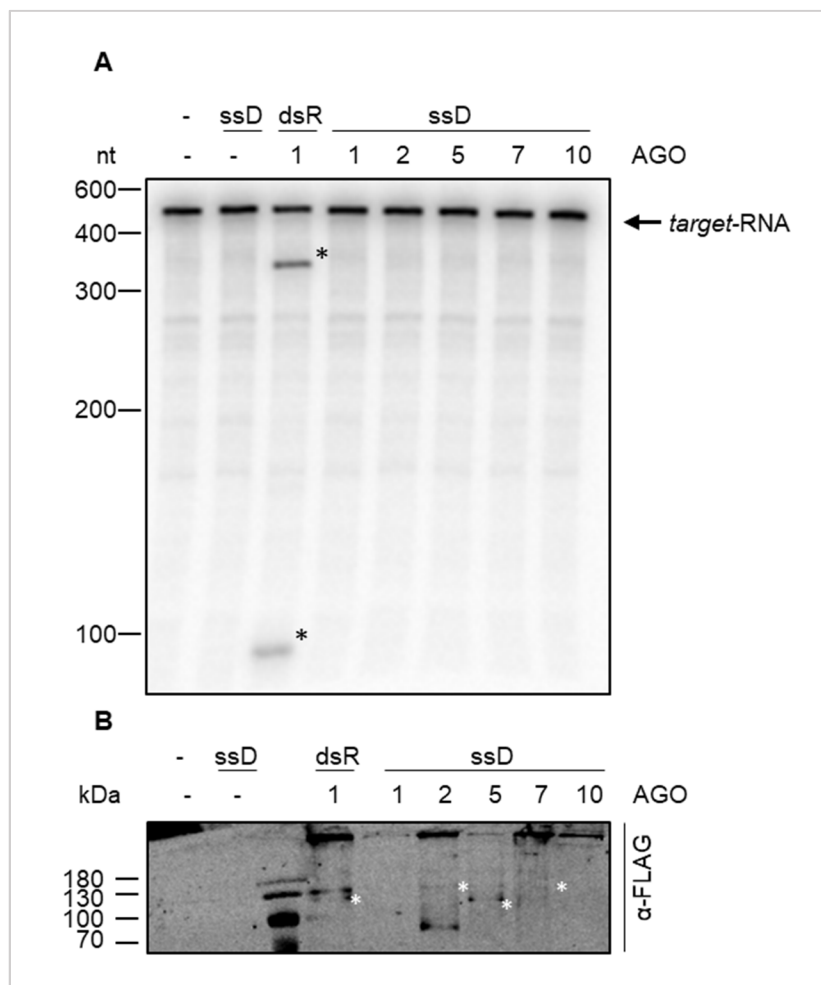


Abbildung 4.10: Cleavage-Assay mit immunpräzipitiertem AGO-Protein, programmiert mit ssDNA.

Es wurde mRNA von AGO1, 2, 5, 7 und 10 in Gegenwart der angegebenen gf698-siRNA (dsR) bzw. gf698-ssDNA (ssD) translatiert und anschließend mittels anti-FLAG immunpräzipitiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von AGO-mRNA und einer kleinen unspezifischen Nukleinsäure (-/-) sowie ein Ansatz ohne Zugabe von AGO-mRNA, aber mit einer kleinen Nukleinsäure ssD (ssD/-). **(A)** Zur Durchführung der Spaltreaktion wurden die immunpräzipitierten AGOs 1, 2, 5, 7 und 10 mit der radioaktiv markierten GFP-*target*-RNA inkubiert. Die Analyse der RNA erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie. Die Spaltfragmente sind mit Sternchen markiert und entsprechen im Fall der AGO1-Spaltung den Größen von 335 nt und 98 nt. **(B)** Der Nachweis von FLAG-AGO1, 2, 5, 7 und 10 nach Immunpräzipitation aus den Ansätzen mit dsRNA (dsR) oder ssDNA (ssD) erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot mit anti-FLAG-Antikörpern. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von AGO-mRNA und einer kleinen Nukleinsäure (-/-) sowie ein Ansatz ohne Zugabe von AGO-mRNA, aber mit einer kleinen Nukleinsäure ssD (ssD/-).

In Abbildung 4.10A ist zu sehen, dass nur siRNA programmiertes FLAG-AGO1 in der Lage war, die Hydrolyse der GFP-*target*-RNA hervorzurufen. FLAG-AGOs, welche mit der ssDNA programmiert werden sollten, zeigten keine Hydrolyse der GFP-*target*-RNA. Im Western Blot konnten lediglich FLAG-AGO1, programmiert mit siRNA, und FLAG-AGO2, -AGO5 und -AGO7, die mit einer ssDNA programmiert sein könnten, schwach mittels anti-FLAG-Antikörper nach Elution der Immunpräzipitation detektiert werden. FLAG-AGO1 und -AGO10 im Zusammenhang mit einer ssDNA konnten nicht im Western Blot detektiert werden.

4.2.5 *E. coli*-RNase H generiert das gleiche Spaltmuster wie die BYL-interne Aktivität

Nachdem die ssDNA- oder dsDNA-vermittelte Hydrolyse nicht in Abhängigkeit von AGO gezeigt werden konnte, wurde weiterhin vermutet, dass diese Aktivität durch eine andere Nuklease im BYL vermittelt wurde. Ein Enzym, das RNA in DNA:RNA-Heteroduplexen schneidet, ist RNase H (Hyjek *et al.* 2019). Auch in Krebs-2 Aszites Tumorextrakt und *Rabbit Reticulocyte Lysate* wurde aufgrund der Hydrolyse einer *target*-RNA nach Zugabe einer DNA eine RNase H-Aktivität postuliert (Crum *et al.* 1988; Miroshnichenko *et al.* 1988). Eine RNase H-Aktivität im BYL war bisher nicht bekannt. Ein Vergleich zwischen den durch *NbAGO1*, *E. coli*-RNase H und den durch das im BYL vorhandene Enzym generierten Spaltmustern sollte ein Indiz dafür liefern, ob es sich im BYL um RNase H handelt.

Im Ansatz mit *NbAGO1* erfolgte die Translation der entsprechenden mRNA in Gegenwart der 21 nt langen gf698-dsRNA, anschließend wurde das GFP-*target* hinzugefügt. Zum Vergleich der Spaltmuster wurde der Assay modifiziert, indem die 21 nt lange gf698-ssDNA mit der *target*-RNA zuerst vereint und dann zu dem Ansatz ohne co-exprimiertes *NbAGO1* gegeben wurde (siehe 3.2.6). In einem weiteren Ansatz, in dem die gereinigte *E. coli*-RNase H der Firma New England Biolabs GmbH (NEB) vorlag, wurde in gleicher Weise verfahren, nur dass anstelle von BYL die *E. coli*-RNase H verwendet wurde (siehe 3.2.7).

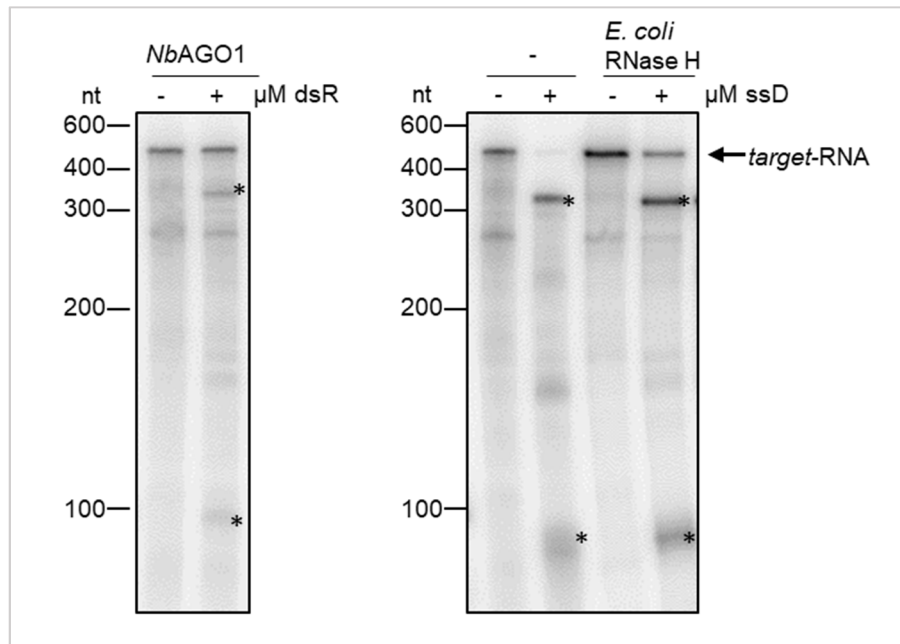


Abbildung 4.11: Cleavage-Assay zum Vergleich der ssDNA-vermittelten *target*-Spaltung im BYL mit der Aktivität von *NbAGO1* und *E. coli*-RNase H.

Es wurde *NbAGO1*-mRNA in Anwesenheit der *gf698*-siRNA (dsR) (0,1 µM Endkonzentration) translatiert und die Spaltaktivität der entsprechenden radioaktiv markierten GFP-*target*-RNA untersucht. Zur Überprüfung des BYL-internen Enzyms wurde der Assay modifiziert, indem die ssDNA (ssD) (0,1 µM Endkonzentration) und die *target*-RNA zuerst vereint und dann zu einem Ansatz ohne co-exprimiertes AGO gegeben wurden (-). Der Ansatz mit der *E. coli*-RNase H von NEB wurde in gleicher Weise mit *E. coli*-RNase H anstelle von BYL durchgeführt. Die Analyse der RNA erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie. Die Spaltfragmente sind jeweils mit Sternchen gekennzeichnet.

Das Spaltmuster, das durch AGO, programmiert mit einer siRNA, generiert wurde, unterscheidet sich von den durch die potenzielle RNase H-Aktivität im BYL und die von *E. coli*-RNase H generierten Spaltmustern. Das Spaltmuster, das durch die potenzielle RNase H-Aktivität im BYL generiert wurde, ähnelte demgegenüber dem Spaltmuster der *E. coli*-RNase H (Abbildung 4.11). Die 3'-Spaltfragmente der potenziellen BYL-RNase H und der *E. coli*-RNase H waren im Vergleich zum *NbAGO1*-generierten 3'-Spaltfragment kleiner und die entsprechenden Banden diffuser.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die BYL-interne Aktivität und die *E. coli*-RNase H ein sehr ähnliches Spaltmuster generieren.

4.2.6 Identifizierung der Spaltstellen

Die Untersuchung der Spaltmuster ließ vermuten, dass es sich um eine RNase H-Aktivität im BYL handelt. Da RNase H von *antisense*-Oligonukleotiden abhängt, wurde im Folgenden ssDNA als ASO bezeichnet. Eine genauere Charakterisierung der RNase H-Aktivität und des dafür verantwortlichen Enzyms im BYL würde ein besseres Verständnis über die Aktivität ermöglichen. Aus diesem Grund sollten die durch das Enzym erzeugten Spaltstellen in der *target*-RNA charakterisiert werden.

AGO-Proteine spalten zwischen den Nukleotiden der *target*-RNA, die den Positionen 10 und 11 des siRNA *guide strand* gegenüberliegen (Elbashir *et al.* 2001; Haley und Zamore 2004). Eine RNase H-katalysierte Spaltung ist unabhängig von der *target*-Sequenz. Für RNase H1 ist eine Spaltung zwischen den Nukleotiden 5–10 bei einem 17–20 nt langen Heteroduplex in der RNA-Sequenz beschrieben (Chon *et al.* 2009; Gaidamakov *et al.* 2005; Wu *et al.* 2001). Für RNase H2 zeigten Chon *et al.*, dass eine Spaltung eines 20 nt langen RNA/DNA-Heteroduplex nach 6–9 und 13–16 Nukleotiden, also im vorderen und im hinteren Bereich der RNA-Sequenz im Heteroduplex erfolgt (Chon *et al.* 2009).

Die nachfolgend beschriebenen RNase H-Assays wurden generell ohne Translation von AGO-mRNA durchgeführt. Das ASO wurde mit der entsprechenden *target*-RNA gleichzeitig zum Ansatz hinzugefügt (siehe 3.2.6). Nach Isolation des 5'-Spaltfragments aus dem Polyacrylamid-Gel konnte dessen 3'-Ende mittels Sequenzierung identifiziert werden (siehe 3.4.12). Die Sequenz von 10 verschiedenen isolierten 3'-Enden wurde überprüft.



Abbildung 4.12: Darstellung der durch die potenzielle RNase H-Aktivität im BYL generierten Spaltstelle in der GFP-target-RNA.

Dargestellt ist eine Teilsequenz der GFP-*target*-RNA. Ribonukleotide in Großbuchstaben sind Teil der Heteroduplexstruktur. Der schwarze Balken stellt das ASO dar. Der schwarze Strich markiert die zu erwartende AGO1-Schnittstelle und die unterschiedlich großen roten Striche markieren die hier mit unterschiedlicher Häufigkeit (2x, 1x, 5x und 2x) identifizierten Spaltstellen durch die potenzielle BYL-RNase H.

Wie in Abbildung 4.12 dargestellt, zeigten zwei der untersuchten Enden eine Spaltung nach dem zweiten Nukleotid an, ein untersuchtes Ende nach dem dritten Nukleotid, fünf untersuchte Enden nach dem vierten Nukleotid und zwei untersuchte Enden nach dem fünften Nukleotid der RNA-Sequenz im Heteroduplex. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich, aufgrund der Position der Hydrolyse in der *target*-RNA, die Hydrolyse der Aktivität im BYL von der AGO-spezifischen Hydrolyse unterscheidet.

4.2.7 Ein Verkürzen des ASOs am 3'-Ende verändert die bevorzugte Spaltstelle

Aufgrund der Hydrolyse nach den ersten sechs Nukleotiden ausgehend vom 5'-Ende der *target*-RNA und dem Ausbleiben einer Hydrolyse zwischen den Nukleotiden nahe zum 3'-Ende der *target*-RNA, ähnelt das Spaltungsmuster überdies eher einer RNase H1- als einer RNase H2-Aktivität. Die Vermutung, dass RNase H1 für die ASO-abhängige Spaltung verantwortlich ist, sollte im Folgenden untersucht werden. RNase H1 und RNase H2 benötigen zur Bindung unterschiedlich viele Nukleotide in einer Heteroduplexstruktur, um die endonukleolytische Hydrolyse zu katalysieren (Nowotny *et al.* 2007; Rychlik *et al.* 2010).

Im Fall von RNase H1 ist bekannt, dass eine Verkürzung um ein Nukleotid des 3'-Endes des ASOs zur Verschiebung der Spaltstelle um eine Position in 3'-Richtung des *targets* führt. Eine Verkürzung des 5'-Endes des ASOs hat dagegen keinen Einfluss auf die Position der Spaltstelle (Lima *et al.* 2003). Eine Verkürzung des 3'-Endes und eine Verschiebung der Spaltstelle wurde im Fall von RNase H2 nicht beschrieben.

Es wurde ein RNase H-Assay (siehe 3.2.6) mit unterschiedlich langen ASOs durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die bevorzugte Spaltstelle, welche durch die putative, im BYL enthaltene RNase H generiert wird, verschiebt. Als *target* diente ein vollständig aus Ribonukleotiden bestehendes, 27 nt langes RNA-Molekül mit der Sequenz des GFP-*targets*. Alle entstandenen Heteroduplexe sind in Abbildung 4.13A dargestellt. Das ASO mit 27 nt war vollständig komplementär zu dem verwendeten *target*. Das ASO mit 25 nt war am 3'- und am 5'-Ende je ein Nukleotid kürzer. Die 23, 21, 20 und 19 nt langen ASOs waren am 5'-Ende ein Nukleotid kürzer und am 3'-Ende jeweils 3, 5, 6 bzw. 7 nt kürzer als das 27 nt lange ASO. Die beiden 18 und 17 nt langen ASOs waren am 5'-Ende genau so lang wie das 27 nt lange ASO und am 3'-Ende 10 bzw. 9 nt kürzer. Als Größenstandard diente ein durch alkalische Hydrolyse fragmentiertes 15 nt langes, ³²P-markiertes-, synthetisches RNA-Oligonukleotid.

Die bevorzugten Spaltstellen im *target* und die Anzahl der benötigten Nukleotide im Duplex sind in Abbildung 4.13 und Tabelle 4.3 veranschaulicht.

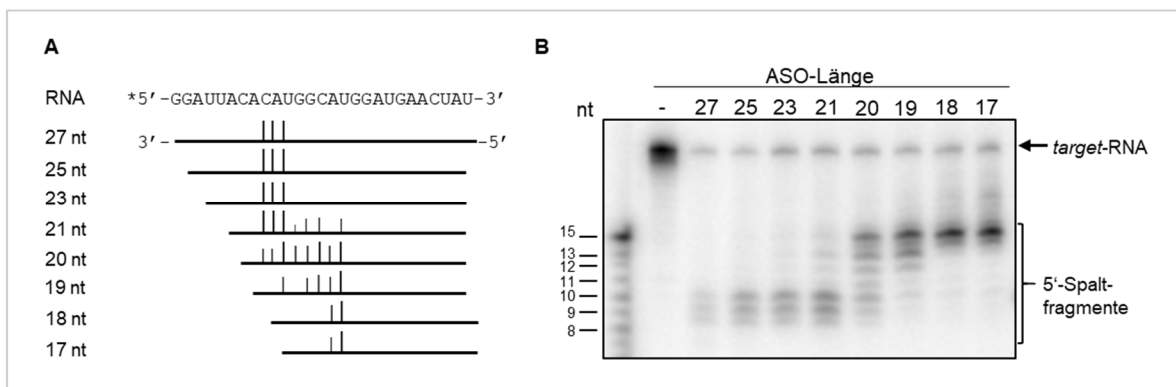


Abbildung 4.13: Einfluss der ASO-Länge auf die Schnittstelle der potenziellen BYL-RNase H.

(A) Darstellung des vollständig aus Ribonukleotiden bestehenden *targets*. ASOs in den unterschiedlichen Längen sind als schwarze Balken dargestellt. Die schwarzen Striche stellen die im RNase H-Assay ermittelte Spaltstelle im *target* dar, die Strichhöhe entspricht der Häufigkeit der identifizierten Hydrolyse. Der Stern kennzeichnet die ³²P-Markierung. (B) RNase H-Assay mit dem in (A) dargestellten, radioaktiv markierten *target* und den verschiedenen langen ASOs (27, 25, 23, 21, 20, 19, 18, 17 nt). Als Größenstandard diente ein durch alkalische Hydrolyse fragmentiertes ³²P-markiertes 15 nt langes RNA-Oligonukleotid. Die Analyse der RNA erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie. Der Bereich der ermittelten 5'-Spaltfragmente ist markiert.

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Spaltstellen im *target* und minimale Anzahl von Heteroduplex-Basenpaaren 5'-seitig der Spaltstelle in der *target*-RNA.

ASO [nt]	Schnittstelle im <i>target</i> nach [nt] (ausgehend vom 5'-Ende des <i>targets</i>)	Anzahl der im Duplex benötigten 3'-Nukleotide [nt] (ausgehend vom 3'-Ende des ASOs)
27	8, 9, 10	8, 9, 10
25	8, 9, 10	7, 8, 9
23	8, 9, 10	5, 6, 7
21	8, 9, 10, 11, 12, 13, 15	3, 4, 5, 6, 7, 8, 10
20	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
19	10, 12, 13, 14, 15	3, 5, 6, 7, 8
18	14, 15	5, 6
17	14, 15	4, 5

Ausgehend vom 5'-Ende der *target*-RNA wurde unter Verwendung des 27 nt langen ASOs das RNA-*target* nach 8, 9 und 10 Nukleotiden im Heteroduplex hydrolysiert. Diese Spaltstellen blieben unter Verwendung der 25, 23 und 21 nt langen ASOs bestehen. Die Verkürzung am 3'-Ende des ASOs wurde in diesem Bereich toleriert und die bevorzugte Spaltstelle lag weiterhin im Bereich der Nukleotide 8–10 der *target*-RNA. Im Fall des 21 nt langen ASOs entstanden in geringerer Menge 11–15 nt lange 5'-Spaltfragmente. Unter Verwendung des 20 nt langen ASOs wurden alle Spaltfragmente mit den Größen von 8–15 nt generiert. Die Menge der 8 und 9 nt langen Spaltfragmente nahm ab, während die Menge der 13 und 15 nt langen Spaltfragmente jeweils zunahm. Im Fall des 19 nt langen ASOs entstanden hauptsächlich 10–15 nt lange Spaltfragmente. Die 18 bzw. 17 nt langen ASOs induzierten eine Hydrolyse der *target*-RNA nach 14 und 15 Nukleotiden, gezählt vom 5'-Ende des RNA-*targets*. Im Bereich der ASO-Länge von 19–21 nt veränderte sich die von der RNase H-bevorzugte Spaltstelle. Weiterhin konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass eine Anzahl von minimal zwei Heteroduplex-Basenpaaren 5'-seitig der Spaltstelle in der *target*-RNA ausreichte, um die Spaltung an der bevorzugten Stelle nach 8–10 nt in der *target*-RNA zu induzieren. Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass beide bevorzugten Spaltstellen nach 8–10 nt und nach 13–15 nt die Sequenz CAU enthalten.

In diesem Versuch konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass sich die Position der Hydrolyse mit jedem Nukleotid, das am 3'-Ende des ASOs gekürzt wird, um eine Position in 3'-Richtung verschiebt.

4.2.8 DNA:RNA:DNA-*targets* lassen zwischen einer RNase H1- und RNase H2-Aktivität unterscheiden

Da die Ergebnisse bisher nicht eindeutig zeigten, ob RNase H1 oder RNase H2 die ASO-induzierte Hydrolyse katalysiert, sollte entsprechend untersucht werden, ob es sich bei der Aktivität im BYL um eine RNase H1- oder H2-Aktivität handelt. RNase H1 und H2 unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität. In einem *target*, das aus Desoxyribonukleotiden und Ribonukleotiden besteht, benötigt RNase H1 zur Bindung mindestens vier aufeinanderfolgende Ribonukleotide, während H2 schon ab einem einzigen Ribonukleotid das *target* hydrolysiert. RNase H1 spaltet bei vier Ribonukleotiden 3'-seitig des ersten oder zweiten Ribonukleotids (RR'RR; R = Ribonukleotid; „ ‘ “ = Schnittstelle) (Nowotny *et al.* 2007; Ohtani *et al.* 1999). RNase H2 erzeugt in Abhängigkeit von der Anzahl der Ribonukleotide im *target* verschiedene Spaltmuster. Grundsätzlich katalysiert RNase H2 die Hydrolyse so, dass ein Ribonukleotid am 3'-Fragment verbleibt. Bei Vorhandensein eines Ribonukleotids schneidet RNase H2 5'-seitig davon ('R), bei zwei Ribonukleotiden dazwischen (R'R) und bei vier Ribonukleotiden 3'-seitig des ersten oder dritten Ribonukleotids (R'RR'R) (Eder und Walder 1991; Jeong *et al.* 2004).

Es wurden 27 nt lange *target*-DNAs erstellt, die ein, zwei oder vier Ribonukleotide enthielten (siehe Abbildung 4.14A), um aufgrund der Hydrolyse zwischen RNase H1 und H2 zu unterscheiden. Die erste *target*-DNA, bezeichnet als D₉R₁D₁₇, enthielt ein Ribonukleotid an Position 10. Die zweite und dritte *target*-DNA, bezeichnet als D₈R₂D₁₇ und D₉R₂D₁₆, enthielt Ribonukleotide an den Positionen 9 und 10 bzw. 10 und 11. Die *targets* mit vier Ribonukleotiden enthielten diese an den Positionen 9–12 (D₈R₄D₁₅) bzw. 10–13 (D₉R₄D₁₄). Alle *targets* wurden mit dem 27 nt langen ASO in einem RNase H-Assay auf ihre Spaltung analysiert (siehe 3.2.6). Als Größenstandard dienten endständig mit ³²P-markierte Oligonukleotide, die identisch mit den potenziellen 5'-Spaltfragmenten D₉, D₉R₁, D₈R₂ und D₉R₂ waren.

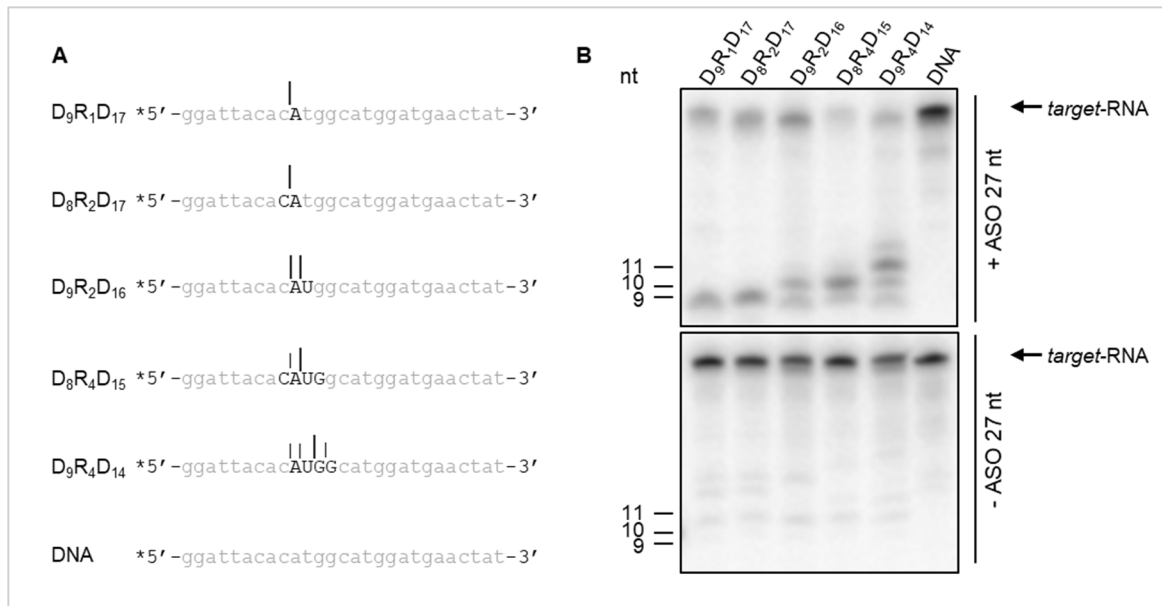


Abbildung 4.14: RNase H-Assay mit DNA:RNA:DNA/DNA-Heteroduplexen mit der im BYL vorhandenen potenziellen RNase H.

(A) Darstellung der DNA:RNA:DNA-Hybrid-*targets* mit unterschiedlicher Anzahl an Ribonukleotiden. Ribonukleotide sind in schwarzen Großbuchstaben und Desoxyribonukleotide in grauen Kleinbuchstaben dargestellt. Die schwarzen Striche stellen die im RNase H-Assay ermittelten Spaltstellen dar. Der Stern kennzeichnet die radioaktive Markierung am 5'-Ende. (B) RNase H-Assay mit den in (A) dargestellten DNA-*targets*, welche mit dem 27 nt langem ASO vereint (+) oder ohne ASO (-) zum Assay hinzugefügt wurden. Die Größen der Spaltfragmente wurden mittels synthetischer Oligonukleotide, bestehend aus Desoxy- und Ribonukleotiden, ermittelt. Die Analyse der RNA erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie.

In Abbildung 4.14B ist zu sehen, dass die im BYL vorhandene RNase H alle *target*-Sequenzen hydrolysierte. Die Spaltung des DNA-*targets* D₉R₁D₁₇ erfolgte 5'-seitig des Ribonukleotids und resultierte in einem 9 nt langen 5'-Spaltfragment. Das DNA-*target* D₈R₂D₁₇, dessen Hydrolyse ebenfalls in einem 9 nt langen 5'-Spaltfragment resultierte, wurde zwischen den zwei Ribonukleotiden hydrolysiert. Bei dem anderen DNA-*target* mit zwei Ribonukleotiden (D₉R₂D₁₆) entstanden zwei 5'-Spaltfragmente mit gleicher Signalstärke und einer Länge von 9 und 10 nt, was einer Hydrolyse 5'-seitig beider Ribonukleotide entspricht.

Eine Spaltung der DNA-*targets* D₈R₄D₁₅ und D₉R₄D₁₄ ergab unterschiedliche Spaltmuster. Bei dem DNA-*target* D₈R₄D₁₅ entstanden zwei Spaltfragmente mit einer Größe von 9 und 10 nt. Das entsprach einer Hydrolyse 3'-seitig des ersten und zweiten Ribonukleotids, wobei Letzteres, aufgrund der Intensität des 10 nt langen Spaltfragments, offenbar die präferierte Spaltstelle war. Bei dem DNA-*target* D₉R₄D₁₄ entstanden vier Spaltfragmente der Größen 9, 10, 11 und 12 nt. Das entsprach einer Hydrolyse 5'-seitig von jedem Ribonukleotid. Die Intensität des 11 nt langen 5'-Spaltfragments deutete auf eine präferierte Spaltung 3'-seitig des zweiten Ribonukleotids hin. Es konnte somit gezeigt werden, dass DNA-*targets* mit ein bis vier Ribonukleotiden von der potenziellen RNase H im BYL hydrolysiert werden.

4.2.9 Das Einfügen einer Basenfehlpaarung 5'-seitig des Ribonukleotids verhindert die Hydrolyse der *target*-RNA

Die vorangegangenen Experimente deuteten darauf hin, dass unter anderem eine RNase H2 im BYL vorliegt. Für die RNase H2 der Erythroleukämie-Zelllinie K562 (dort ursprünglich als RNase H1 bezeichnet) konnte gezeigt werden, dass eine Basenfehlpaarung 5'-seitig des Ribonukleotids die Spaltung des DNA-*targets* nicht verhindert, aber die Spaltung bei einer Basenfehlpaarung mit dem Ribonukleotid stark reduziert ist (Eder und Walder 1991). Auch die *E. coli*-RNase H2 hydrolysiert trotz der Basenfehlpaarung 3'-seitig des Ribonukleotids in einem RNA:DNA/DNA-Heteroduplex (Ohtani *et al.* 2008b). Es sollte daher untersucht werden, ob die RNase H2 im BYL trotz einer Basenfehlpaarung im Bereich des Ribonukleotids das *target* hydrolysiert.

Es wurde die Hydrolyse des DNA-*targets* D₉R₁D₁₇ mit drei unterschiedlichen, nicht vollständig komplementären ASOs untersucht. In dem 27 nt langen ASO wurde jeweils ein Nukleotid ausgetauscht, sodass entweder das Ribonukleotid oder jeweils ein Desoxyribonukleotid 5'- bzw. 3'-seitig davon ungepaart vorlag (siehe Abbildung 4.15A). Die Hydrolyse des endständig mit ³²P-markierten D₉R₁D₁₇-*targets* wurde unter Verwendung der drei verschiedenen ASOs (siehe Abbildung 4.15A) im RNase H-Assay in BYL untersucht (siehe 3.2.6).

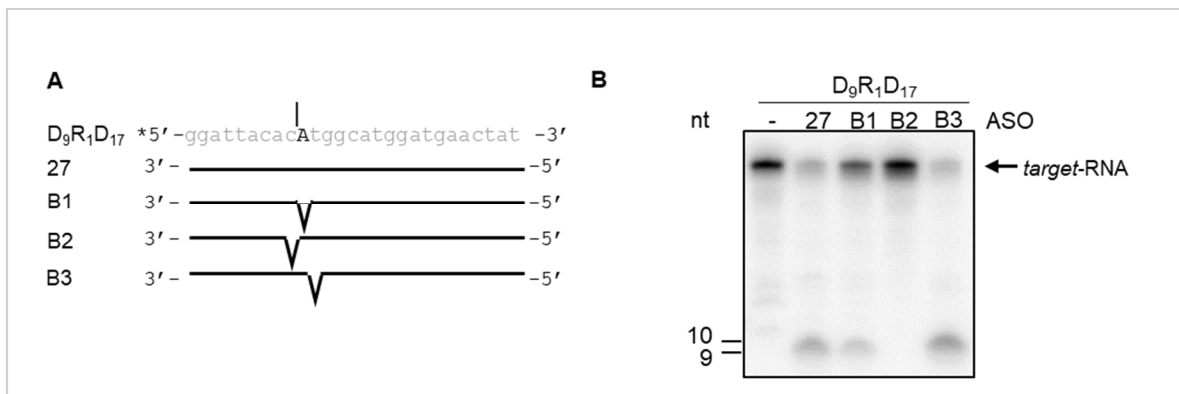


Abbildung 4.15: Effekte von Basenfehlpaarungen im D₉R₁D₁₇/DNA-Heteroduplex auf die RNase H-Aktivität.

(A) Darstellung des D₉R₁D₁₇-Hybrid-*targets*. Ribonukleotide sind in schwarzen Großbuchstaben und Desoxyribonukleotide in grauen Kleinbuchstaben abgebildet. Der Stern kennzeichnet die radioaktive Markierung am 5'-Ende. Die schwarzen Balken repräsentieren die 27 nt langen ASOs mit den drei Basenfehlpaarungen (B1, B2 und B3). Der senkrechte Strich kennzeichnet die im RNase H-Assay detektierte Schnittstelle. (B) RNase H-Assay mit dem in (A) dargestellten radioaktiv markierten *target*, welches ohne ASO (-) oder vereint mit dem vollständig komplementärem, 27 nt langem ASO (+) bzw. den Varianten B1, B2 und B3 zum BYL gegeben wurde. Die Analyse der RNA erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie.

Lagen das Ribonukleotid oder das 3'-benachbarte Desoxyribonukleotid ungepaart vor, wurde das D₉R₁D₁₇-*target* 5'-seitig des Ribonukleotids hydrolysiert, wie im Fall des vollständig komplementären ASOs (Abbildung 4.15B). Lag die Basenfehlpaarung direkt 5'-seitig des Ribonukleotids (ASO 27 nt B2), wurde das *target* nicht geschnitten. Es konnte

somit gezeigt werden, dass eine ausgebildete Duplexstruktur 5'-seitig des Ribonukleotids zur Spaltung des *targets* durch die im BYL enthaltenen RNase H-Aktivitäten essenziell ist.

4.2.10 Die im BYL enthaltenen RNase H-Aktivitäten erkennen nur bedingt den Übergang von RNA zu DNA

Zur weiteren Charakterisierung der RNase H im BYL sollte das Vorhandensein einer JRNase-Aktivität untersucht werden. *Junction Ribonucleases* (JRNase) erkennen den Übergang von RNA zu DNA in einem RNA:DNA/DNA-Duplex. RNA:DNA/DNA-Heteroduplexe kommen in Okazaki-Fragmenten während der Replikation vor. JRNasen schneiden diese Hybride 5'-seitig des 3'-Nukleotids des RNA-Anteils (letztes Ribonukleotid vor dem Übergang). Diese JRNase-Aktivität wird vorrangig RNase H2 zugeschrieben. Zur Hydrolyse der RNA wird kein vollständig komplementärer Heteroduplex benötigt, es reichen partielle Duplexstrukturen oder angrenzende Duplexstrukturen aus. Auch ein Duplex aus Okazaki-Fragment und einer komplementären RNA ist ein Substrat für prokaryotische RNase HII (Murante *et al.* 1998; Ohtani *et al.* 2008a, 2008b). Inwiefern eine Duplexstruktur im Bereich des RNA:DNA-Übergangs benötigt wird, sollte zusätzlich untersucht werden.

Die Spaltung eines endständig mit ^{32}P -markierten $\text{R}_{10}\text{D}_{17}$ -*targets* wurde unter Verwendung der 27, 21, 20, 19, 18 und 17 nt langen ASOs (Abbildung 4.16A), einer 21 nt langen, komplementären RNA und der zuvor beschriebenen ASOs mit den an Position 9, 10 und 11 eingefügten Basenfehlpaarungen (Abbildung 4.16D) im RNase H-Assay untersucht (siehe 3.2.6).

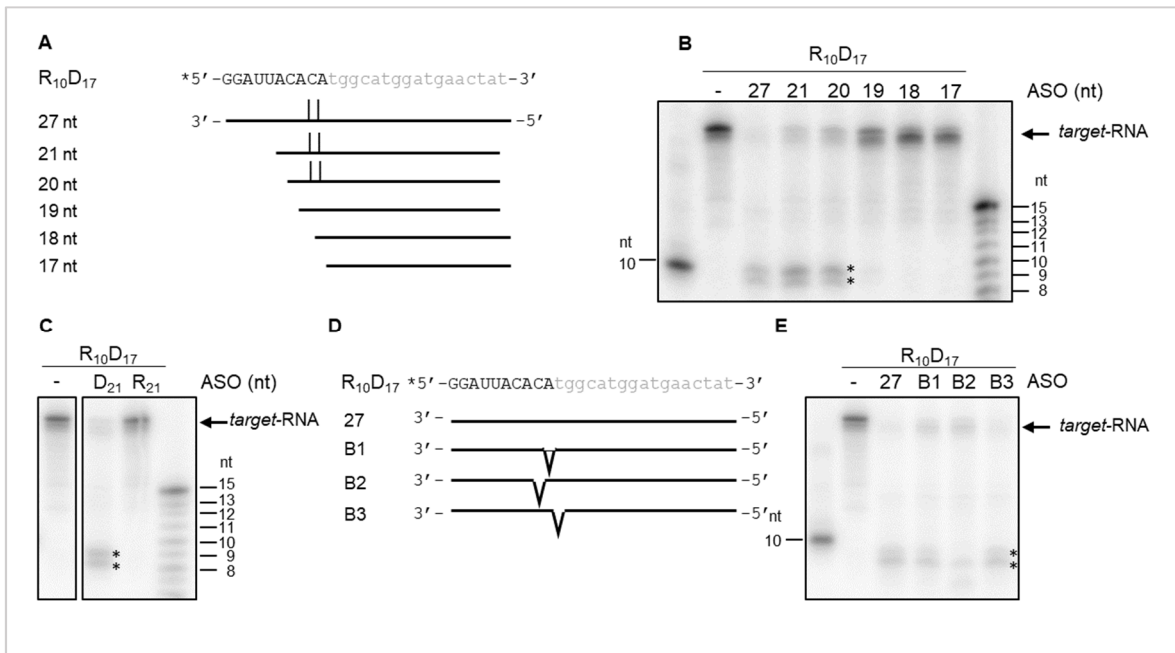


Abbildung 4.16: RNase H-Assay mit RNA:DNA-Hybrid als *target* zur Überprüfung einer JRNase-Aktivität. (A), (D) Darstellung des RNA:DNA-Hybrid-*targets*. Ribonukleotide sind in schwarzen Großbuchstaben und Desoxyribonukleotide in grauen Kleinbuchstaben abgebildet. Die schwarzen Balken stellen die 27, 21, 20, 19, 18 und 17 nt langen ASOs oder ASOs mit Basenfehlpaarungen an Position 9 (B1), 10 (B2) und 11 (B3) dar. Der Stern kennzeichnet die endständige Markierung mit ^{32}P . Die senkrechten Striche über den Balken kennzeichnen die mit dem jeweiligen ASO detektierte Schnittstelle in dem *target*. (B), (C), (E) RNase H-Assay mit den in (A) und (D) dargestellten radioaktiv markierten *targets* und ASOs oder einer komplementären, 21 nt langen RNA. Als Größenstandard diente entweder ein 10 nt langes oder ein alkalisch hydrolysiertes, endständig mit ^{32}P -markiertes, 15 nt langes Oligoribonukleotid. Die Analyse der RNA erfolgte durch 15%ige denaturierende PAGE und Autoradiographie. Die 5'-Spaltfragmente wurden jeweils mit einem Sternchen markiert.

Wie in Abbildung 4.16B und C zu erkennen ist, wurde eine Hydrolyse des RNA₁₀:DNA₁₇-Hybrids nur unter Verwendung der 27, 21 und 20 nt langen ASOs und nicht unter Verwendung der 19, 18 und 17 nt langen ASOs oder einer 21 nt langen komplementären RNA induziert. Bei der Hydrolyse entstanden zwei 5'-Spaltfragmente mit den Größen 8 und 9 nt. Demnach wurde das R₁₀D₁₇-*target* 5'-seitig des letzten oder vorletzten Ribonukleotids im Heteroduplex hydrolysiert und es verblieben ein bzw. zwei Ribonukleotide an dem 3'-Spaltfragment. Die Basenfehlpaarungen an Position 10 und 11 der ASOs B1 und B3 hatten keinen Einfluss auf die Generierung der 8 und 9 nt langen 5'-Spaltfragmente (Abbildung 4.16E). Befand sich die Basenfehlpaarung 5'-seitig des letzten Ribonukleotids (ASO B2), wurde das 5'-Spaltfragment von 9 nt nicht mehr generiert.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse im BYL nicht nur 5'-seitig des letzten, sondern auch des vorletzten Ribonukleotids im *target* und nicht unter Verwendung einer komplementären RNA induziert wird.

4.2.11 Immunpräzipitation der *N. benthamiana*-RNase H2

Nachdem gezeigt werden konnte, dass im BYL eine RNase H vorliegt, die unter anderem typische Eigenschaften einer RNase H2 aufweist, sollte das Enzym nach In-vitro-Translation rekonstituiert werden, um die Hydrolyse der zuvor verwendeten *targets* zu untersuchen. Dazu sollten die Transkripte für alle drei Untereinheiten der RNase H2 im BYL *in vitro* transkribiert werden, um die funktionsfähige RNase H2 synthetisch zu generieren.

Zunächst wurde versucht, die codierende Sequenz der RNase H2-Untereinheiten A, B und C mittels PCR von *N. benthamiana*-cDNA zu amplifizieren und zur späteren Detektion der Proteine im Western Blot und zur Co-Immunpräzipitation mit der codierenden Sequenz des FLAG- oder HA-tags in den pSP64-Poly(A)-Vektor zu klonieren (siehe 3.3). Im Fall der Untereinheit A, im Folgenden bezeichnet als RH2A, konnte in der Solgenomics-Datenbank nur ein Gen gefunden werden, während für die Untereinheiten B (RH2B) und C (RH2C) jeweils zwei Genkopien gefunden werden konnten. Die Klonierung der codierenden Sequenz von *RH2A* war sowohl mit einem FLAG- als auch mit einem HA-tag erfolgreich. Im Fall der *RH2B* konnte nur die codierende Sequenz eines der beiden Gene und nur mit einem HA-tag kloniert werden. Die Klonierung der codierenden Sequenz von *RH2C* war ebenfalls nur für das eine der beiden Gene erfolgreich. Diese codierende Sequenz konnte dagegen sowohl mit der Sequenz des HA-tags als auch mit der Sequenz des FLAG-tags versehen werden.

Nach erfolgreicher In-vitro-Transkription (siehe 3.4.4) von FLAG-RH2A, FLAG-RH2C, HA-RH2A, HA-RH2B und HA-RH2C wurde überprüft, ob die Untereinheiten im BYL synthetisiert werden. Der Nachweis der Überexpression von FLAG-RH2A und FLAG-RH2C erfolgte mittels anti-FLAG-Antikörper im Western Blot (siehe 3.5.2). Es konnten Signale in den Proben FLAG-RH2A und FLAG-RH2C detektiert werden, die den Untereinheiten A (34,5 kDa) und B (39 kDa) entsprechen (Abbildung 4.17A). Unter Verwendung des anti-HA-Antikörpers war die Detektion eines Signals bei den Proben HA-RH2A, HA-RH2B und HA-RH2C möglich, dass dem Molekulargewicht der Untereinheiten A, B und C (19,5 kDa) entsprechen würde. Das Signal in der Probe HA-RH2B war sehr schwach (Abbildung 4.17B).

Anschließend sollten jeweils zwei Untereinheiten über die mit einem FLAG-tag versehene dritte Untereinheit co-immunpräzipitiert werden. Dazu wurden in der ersten Strategie die BYL-Translationsansätze von FLAG-RNase H2A mit den entsprechenden Ansätzen von HA-RH2B und HA-RH2C und in der zweiten Strategie FLAG-RH2C mit den Ansätzen HA-RH2A und HA-RH2B vereinigt und nachfolgend die Co-Immunpräzipitation mittels

FLAG-Epitop durchgeführt (siehe 3.5.4). Zusätzlich erfolgte die Immunpräzipitation der FLAG-RH2A und der FLAG-RH2C ohne die Vereinigung mit Translationsansätzen der anderen Untereinheiten. Ziel dieser Immunpräzipitationen war es, eine Interaktion zu den im BYL vorliegenden Untereinheiten zu überprüfen. Als Kontrolle der Immunpräzipitation diente ein Translationsansatz ohne die mRNA einer RNase H2-Untereinheit. Nach Immunpräzipitation wurden die Proteine der vier Proben mittels SDS-PAGE (siehe 3.5.2) aufgetrennt, mittels Silberfärbung (siehe 3.5.3) sichtbar gemacht und mit der Kontrolle, in der keine RNase H2-Untereinheit translatiert wurde, verglichen.

Nach der Vereinigung der Translationsansätze von FLAG-RH2A, HA-RH2B und HA-RH2C und anschließender Immunpräzipitation von FLAG-RH2A konnte ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 34,5 kDa, das der Untereinheit FLAG-RH2A entsprechen würde, und sehr schwach ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 39 kDa, das dem Molekulargewicht von HA-RH2B entsprechen würde, detektiert werden. Bei Immunpräzipitation von FLAG-RH2C nach Zugabe der Translationsansätze von HA-RH2A und HA-RH2B konnte im Silbergel ein Protein mit dem entsprechenden apparenten Molekulargewicht für FLAG-RH2C von 19,5 kDa und für HA-RH2B von 39 kDa detektiert werden.

Wurde ausschließlich FLAG-RH2A oder FLAG-RH2C ohne Zugabe der anderen translatierten Untereinheiten immunpräzipitiert, konnten Proteine mit dem jeweiligen apparenten Molekulargewicht und ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 39 kDa, was der RH2B-Untereinheit entsprechen würde, mittels Silberfärbung detektiert werden. Eine Detektion von RH2A bzw. RH2C war ohne die vorherige Translation der entsprechenden RNA nicht möglich.

Auffällig war dagegen ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ~ 25 kDa, das immunpräzipitiert wurde, wenn zuvor die RH2C-Untereinheit unabhängig von einem der *tags* translatiert wurde.

Es kann zusammengefasst werden, dass im Fall einer Immunpräzipitation von FLAG-RH2A nur die Untereinheit RH2B, nicht aber die Untereinheit RH2C detektiert werden konnte, obwohl keine direkte Interaktion zwischen den Untereinheiten RH2A und RH2B stattfindet. Bei Immunpräzipitation von FLAG-RH2C konnte nur die Untereinheit RH2B, nicht aber die Untereinheit RH2A detektiert werden.

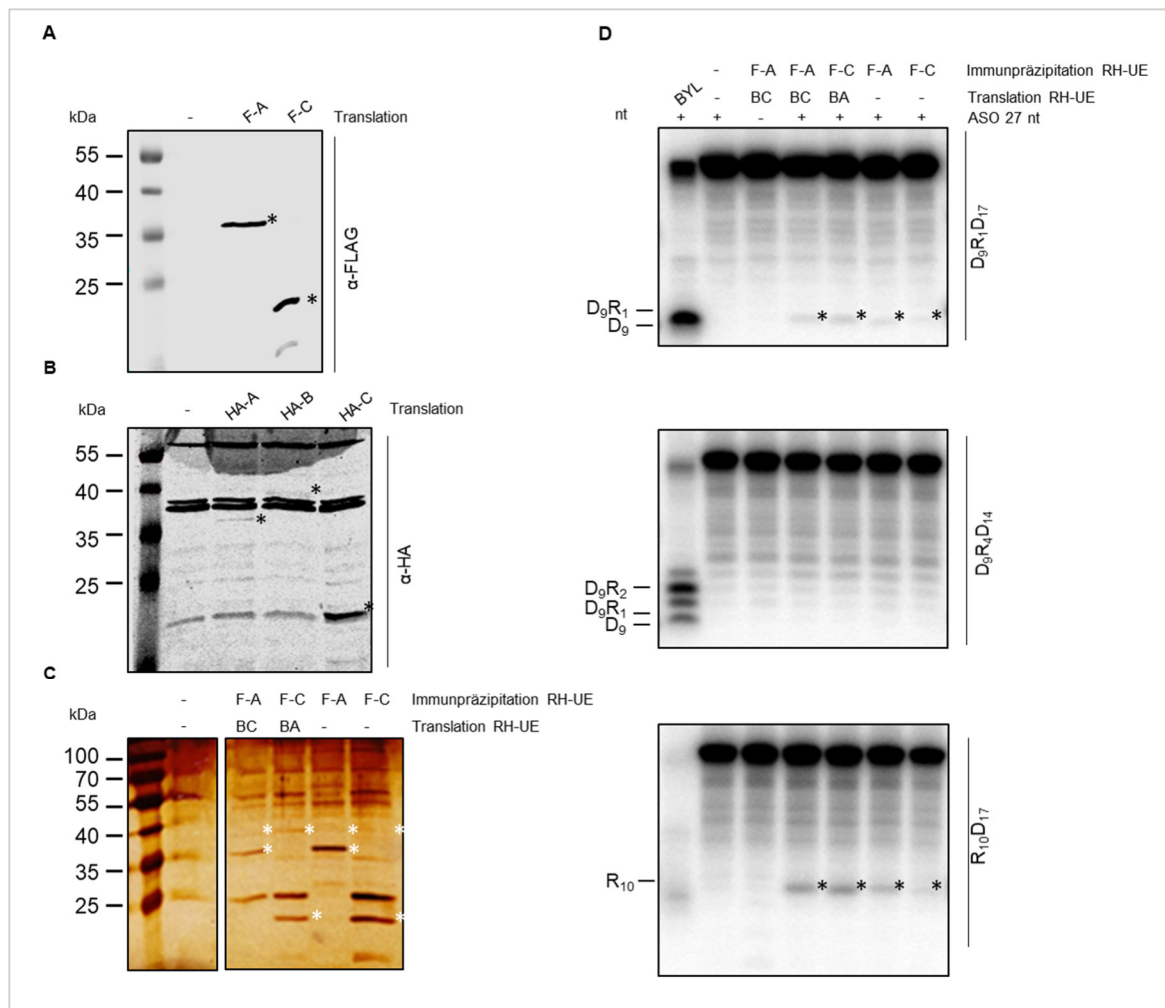


Abbildung 4.17: Nachweis der immunpräzipitierten RNase H2 mit anschließendem RNase H-Assay.

Die mit einem FLAG- (F-) oder HA-*tag* (HA) versehenen RNase H2-Untereinheiten (UE) A, B, und C wurden im BYL translatiert und mittels Western Blot unter Verwendung eines anti-FLAG- (A) bzw. anti-HA-Antikörpers (B) nachgewiesen. Die Untereinheiten wurden ihrem apparenten Molekulargewicht entsprechend bei ca. 35 kDa (RH2A), 39 kDa (RH2B) und 19 kDa (RH2C) mit einem Stern markiert. (C) Immunpräzipitation der FLAG-RH2A oder FLAG-RH2C mittels FLAG-Epitop und Co-Immunpräzipitation der mit einem HA-*tag* versehenen, in-vitro-translatierten Untereinheiten oder der im BYL vorhandenen Untereinheiten mit nachfolgendem Nachweis mittels PAGE und Silberfärbung. (D) ASO-abhängige *target*-Spaltung (D₉R₁D₁₇, D₉R₄D₁₄, R₁₀D₁₇) durch die immunpräzipitierte RNase H2. Als Kontrollen dienten ein RNase H-Assay mit BYL ohne vorherige Translation der entsprechenden RNA einer RNase H2-Untereinheit und ein Ansatz ohne Zugabe des ASOs zur eluierten RNase H2. Als ASO wurde das zuvor beschriebene 27 nt lange DNA-Oligonukleotid verwendet. Die Analyse der RNA erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie. Die Spaltfragmente sind jeweils mit Sternen gekennzeichnet und entsprechen der Größe von 9 nt.

Zur Überprüfung der Aktivität der *N. benthamiana*-RNase H2 wurden die Eluate der Immunpräzipitation auf ASO-abhängige *target*-Spaltung getestet. Anstelle des BYLs wurde der RNase H-Assay in TR-Puffer durchgeführt, um die Hintergrundaktivität der im BYL vorhandenen RNase H zu vermeiden. Als *target*-RNA dienten die zuvor verwendeten Oligonukleotide mit einem (D₉R₁D₁₇) und mit vier (D₉R₄D₁₄) Ribonukleotiden sowie das *target*, das einem Okazaki-Fragment ähnelt (R₁₀D₁₇). Diese wurden mittels Phosphorylierung endständig mit ³²P-markiert und mit dem 27 nt langen ASO als Gemisch zum RNase H-Assay hinzugefügt. Zum Vergleich der entstehenden Spaltfragmente erfolgte die Durchführung eines RNase H-Assays im BYL (siehe 3.2.6). Als Kontrolle diente eine

Immunpräzipitation, bei der zuvor keine Translation einer RNase H2-Untereinheit erfolgte, sowie ein Ansatz mit immunpräzipitierter FLAG-RH2A, in dem das *target* ohne ASO hinzugefügt wurde.

Nach Zugabe des *targets* mit nur einem Ribonukleotid ($D_9R_1D_{17}$) entstand ausschließlich mit den Eluaten, in deren Translationsansätzen eine oder alle drei Untereinheiten translatiert wurden, das gleiche Spaltfragment wie nach einem RNase H-Assay im BYL. Dieses Spaltfragment hatte eine Größe von 9 nt und resultierte somit aus einer Hydrolyse 5'-seitig des einzelnen Ribonukleotids. Im Fall des *targets* mit vier Ribonukleotiden ($D_9R_4D_{14}$) konnte keine Spaltung nach Immunpräzipitation der RNase H2-Untereinheiten detektiert werden. Dieses Ergebnis unterscheidet sich zu dem des RNase H-Assays im BYL, bei dem die Hydrolyse des *targets* vier Spaltfragmente der Größen 9, 10, 11 und 12 nt generierte. Im Fall der Spaltung des Okazaki-ähnlichen Fragments ($R_{10}D_{17}$) unter Verwendung der immunpräzipitierten RNase H2-Untereinheiten konnte ein Spaltfragment der Größe 9 nt detektiert werden, dass aus einer Spaltung 5'-seitig des letzten Ribonukleotids resultiert. Bei der Spaltung des Okazaki-ähnlichen Fragments mit dem BYL konnte, entgegen den vorherigen Ergebnissen (siehe 4.2.10), bei dem zwei Spaltfragmente der Größen 8 und 9 nt detektiert werden konnten, nur ein Fragment von 8 nt detektiert werden. Somit unterscheiden sich die Ergebnisse der Spaltung der RNase H2 zu den beiden Ergebnissen der Spaltung im BYL.

4.2.12 Die im BYL vorliegende RNase H-Aktivität schneidet auch das TBSV-Genom

Durch die Immunpräzipitation konnte eine Aktivität der *N. benthamiana*-RNase H2 gezeigt werden. Aus den vorherigen Experimenten ist auch das Vorhandensein einer RNase H1-Aktivität im BYL denkbar. Es sollte daher überprüft werden, ob ASOs im Zusammenhang mit der RNase H im BYL die endonukleolytische Hydrolyse der TBSV-*target*-RNA induzieren können, um potenziell weitere Nukleinsäure-basierte Schutzmaßnahmen gegen Pflanzenviren zu entwickeln. Die Identifizierung effizienter vsiRNAs (esiRNAs) von TBSV durch Gago-Zachert *et al.* bietet dafür eine Grundlage. Es wurde gezeigt, dass mit den vsiRNAs 179, 209, 3243 oder 3039 (die Nummer der siRNA beschreibt die Position innerhalb der Nukleotidsequenz der (+) -Strang TBSV-RNA, zu der das 5'-Nukleotid des *guide*-Strangs komplementär ist) programmiertes AGO1/2 eine Spaltung der TBSV-*target*-RNA induziert und diese inaktiviert. *In planta* konnte so ein Schutz gegen eine TBSV-Infektion generiert werden. Im Gegensatz dazu induzierte mit den vsiRNAs 3701 und 3722 beladenes AGO1/2 keine Hydrolyse der TBSV-*target*-RNA und auch keinen Schutz gegen eine TBSV-Infektion. Somit wurde gezeigt, dass die TBSV-*target*-RNA an bestimmten *target*-Sequenzen zugänglich bzw. unzugänglich für den RISC ist (Gago-Zachert *et al.* 2019).

Es sollte *in vitro* getestet werden, ob ASOs, deren Sequenz dem *guide strand* der vsiRNAs 179, 209, 3243, 3701, 3722 und 3039 entsprechen, in der Lage sind, eine Hydrolyse des TBSV-Genoms zu induzieren und sich somit die Zugänglichkeit der *target*-RNA für den RISC gleichermaßen für RNase H verhält. Es sollten außerdem zwei Varianten des ASOs 209 mit den 5'-Nukleotiden A und T (bezeichnet als 209T) getestet werden, um die nachfolgenden Ergebnisse mit den Ergebnissen der AGO1- bzw. AGO2-spezifischen vsiRNAs 209U bzw. 209A zu vergleichen. Die ASOs wurden unter Translationsbedingungen, aber ohne Zugabe von AGO-mRNA inkubiert. Es erfolgte die Zugabe der mit ^{32}P -markierten TBSV-*target*-RNA und die Durchführung des RNase H-Assays (siehe 3.2.6).

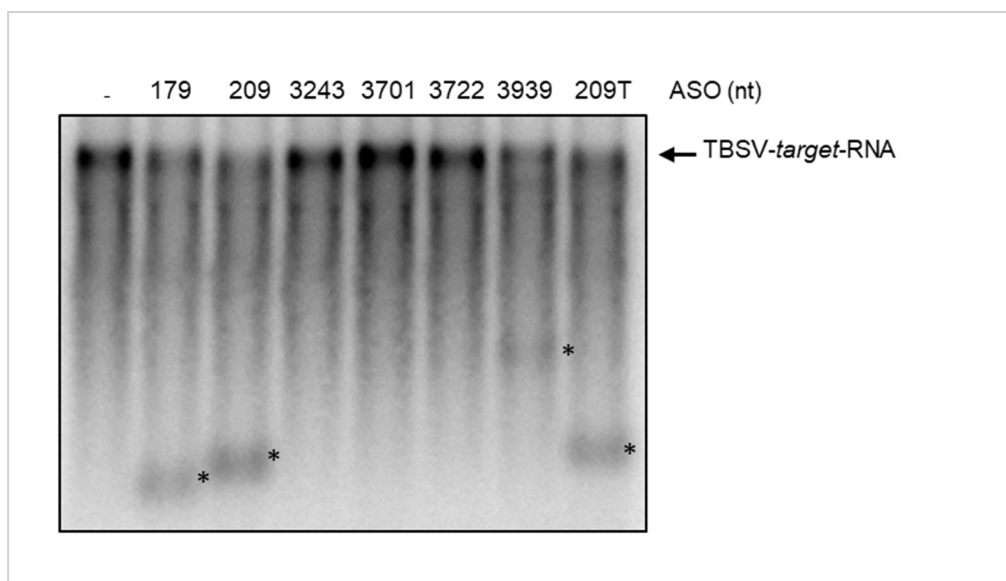


Abbildung 4.18: ASOs, deren Sequenzen dem *guide strand* effizienter vsiRNAs entsprechen, induzieren eine Spaltung der TBSV-*target*-RNA *in vitro*.

Die ASOs 179, 209, 3243, 3701, 3722, 3039 und 209T wurden im BYL für 2,5 h inkubiert. Anschließend wurde die radioaktiv-markierte TBSV-*target*-RNA hinzugefügt und inkubiert. Die aufgereinigte RNA wurde mittels denaturierendem Agarose-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne ASO. Spaltfragmente sind jeweils mit einem Stern markiert.

In Abbildung 4.18 ist zu sehen, dass die ASOs, deren Sequenz dem *guide strand* der effizienten vsiRNAs 179, 209, 209, 209U und 3939 entsprachen, eine Spaltung induzierten. Demgegenüber wurde durch das ASO, dessen Sequenz dem *guide strand* der effizienten vsiRNA 3243 entsprach, keine Spaltung induziert. Die ASOs 3701 und 3722 induzierten analog der vsiRNA 3701 und 3722 keine Hydrolyse der TBSV-*target*-RNA. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass RISC und RNase H wie zuvor beschrieben nach dem gleichen Prinzip agieren, welches stark von der Struktur der *target*-RNA bestimmt wird.

4.2.13 ASOs können die Pflanze vor einer Virus-Infektion schützen

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass ASOs auf dem TBSV-Genom aktiv werden. Nun sollte überprüft werden, ob ASOs eine protektive Wirkung in der Pflanze erzeugen. Nowak *et al.* verwendeten ASOs gegen eine TMV-Infektion. Allerdings führten hier nur 21 nt lange dsDNA und ~470 bp dsDNA, nicht jedoch ssDNA zum Schutz der *N. tabacum*-Pflanze gegen TMV (Nowak *et al.* 2009). Aus diesem Grund sollten auch dsDNAs auf eine protektive Wirkung untersucht werden.

Es wurde das 21 nt lange ASO, dessen Sequenz dem *guide strand* der effizienten vsiRNA 209 mit einem 5'-U oder -A entspricht und der ineffizienten vsiRNAs 3701 und 3722 entsprechen, verwendet. Außerdem wurde die protektive Wirkung einer 21 nt langen siDNA, die dem Duplex der vsiRNA209 entspricht, inklusive 3'-Überhängen von 2 nt, untersucht. Durch dieses experimentelle Vorgehen sollten die Ergebnisse von Nowak *et al.* und die hier beschriebenen *in-vitro*-Ergebnisse verifiziert werden, bei denen nur die einzelsträngige DNA und nicht der DNA-Duplex, der der siRNA entspricht, eine Hydrolyse der *target*-RNA induziert. Als Positivkontrolle diente die effiziente vsiRNA 209 mit einem 5'-U oder 5'-A. Als Negativkontrollen diente jenes ASOs, deren Sequenz dem *guide strand* der gf698-siRNA entspricht oder die dem gf698-siRNA-Duplex analoge siDNA. Die *N. benthamiana*-Pflanzen wurden mit der TBSV-RNA und dem ASO oder der siDNA als Gemisch mittels Siliciumcarbid mechanisch co-inokuliert (siehe 3.1.3.2). Die Pflanzen wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen auf Symptome der TBSV-Infektion beobachtet. Die in Abbildung 4.19 aufgeführten Ergebnisse stammen aus 2–4 unabhängigen Experimenten und der angegebenen Anzahl (n) von Pflanzen. Pro Experiment wurden prinzipiell 6 Pflanzen verwendet. Die Anwendung des unspezifischen gf698-ASOs und der gf698-siDNA verhinderte die TBSV-Infektion nicht, wie am Ausbleiben des Pflanzenwachstums erkannt wurde. Lediglich 4 bzw. 10 % der Pflanzen, die mit dem gf689-ASO mit einem 5'-T bzw. einem 5'-A behandelt wurden, zeigten keine Symptome. 97 bzw. 100 % der Pflanzen blieben symptomfrei, wenn sie zuvor mit der siRNA 209 mit einem 5'-U bzw. mit einem 5'-A behandelt wurden. Pflanzen, die mit den ASOs 209T bzw. 209A behandelt wurden, blieben zu 78 bzw. 63 % symptomfrei. Die *in vitro* ineffizienten ASOs 3701 und 3722 erzeugten keine protektive Wirkung. Lediglich 8 % der damit behandelten Pflanzen zeigten, vergleichbar mit der gf698-Kontrolle, keine Symptome. Pflanzen, die mit der siDNA 209 behandelt wurden, zeigten ebenfalls zu 8 % keine Symptome.

Somit konnte mit den ASO 209T und 209A eine protektive Wirkung generiert werden. Mit der siDNA 209, die der siRNA 209 in ihrer Struktur entsprach und bei der durch die Untersuchungen von Nowak *et al.* eine AGO-induzierte Wirkung erwartet wurde, konnte keine protektive Wirkung generiert werden.

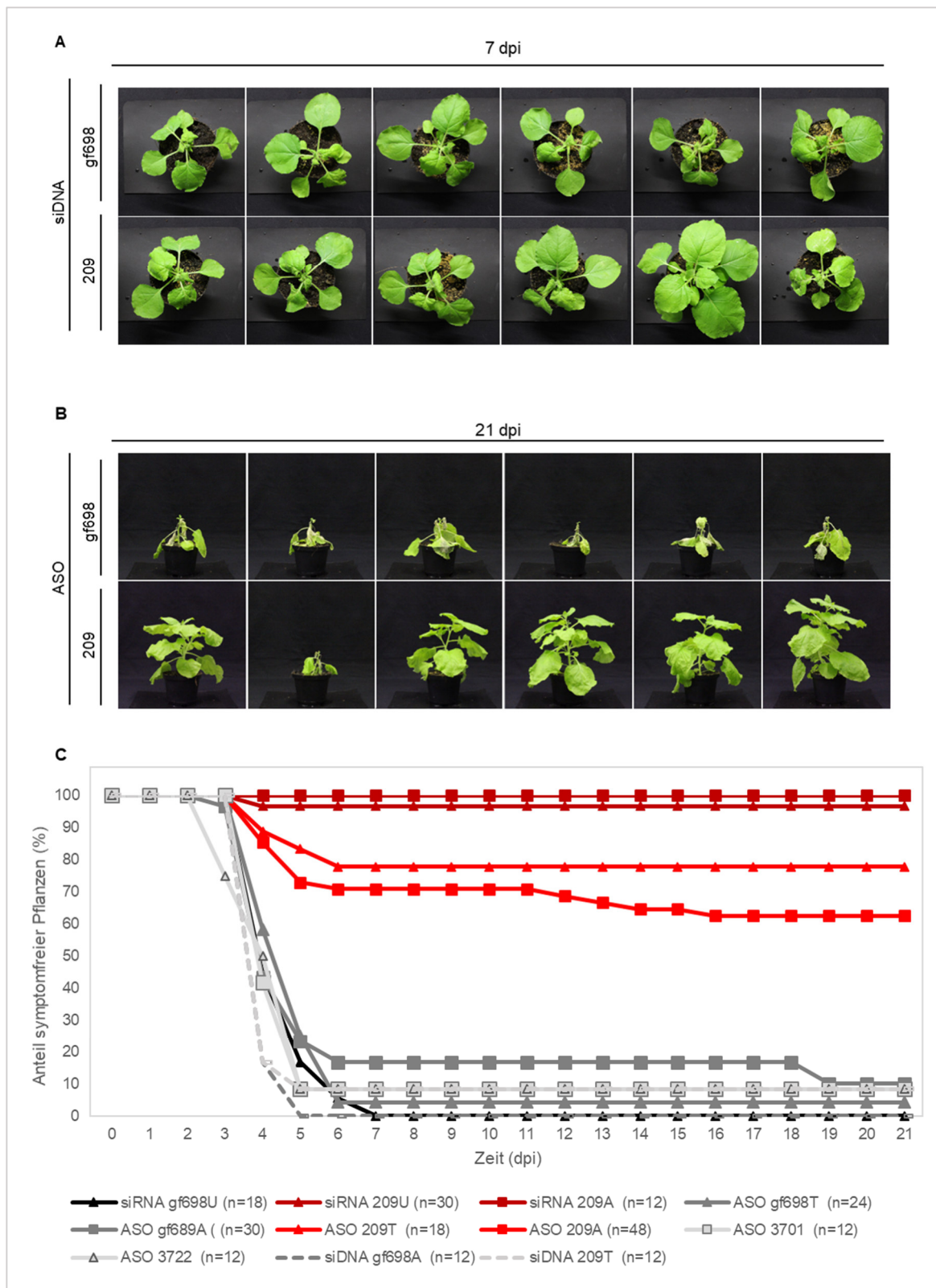


Abbildung 4.19: Die *in vitro* effizienten ASOs 209A oder 209T schützen Pflanzen vor einer TBSV-Infektion.

(A) Vergleich von *N. benthamiana*-Pflanzen, die mechanisch mit TBSV (5 oder 10 ng) und mit der Kontrolle gf698-siDNA oder der siDNA 209 (400 pmol), die der vsiRNA 209 entspricht, behandelt wurden, 7 Tage nach Inokulation (*days post inoculation*, dpi). **(B)** Vergleich von *N. benthamiana*-Pflanzen, die mechanisch mit TBSV (5 oder 10 ng) und mit der Kontrolle gf698-ASO oder dem ASO 209A (900 pmol), das dem *guide strand* der effizienten vsiRNA 209A entspricht, behandelt wurden, nach 21 dpi. **(C)** Zusammenfassung der protektiven Wirkung verschiedener siRNAs, ASOs und siDNAs im Vergleich zu unspezifischen Kontroll-Nukleinsäuren. Die Gesamtzahl der Pflanzen (n) ist in der Abbildung angegeben.

4.2.14 In-vitro-Spaltaktivität modifizierter ASOs im BYL

Es konnte gezeigt werden, dass mittels ASO eine protektive Wirkung gegen eine Infektion durch TBSV generiert werden kann. Dieser Effekt sollte durch Einsatz modifizierter ASOs verbessert werden, vor allem hinsichtlich der Zeitdauer der Wirkung. Es sind verschiedene Modifikationen von DNA-Oligonukleotiden beschrieben. Die 2'-O-Methoxyethyl (MOE)- und 2'-O-Methyl (OMe)-Modifikation erhöht die Endo- und Exonukleaseresistenz, außerdem liegt eine stabilere Duplex-Struktur vor. Allerdings reduziert diese Modifikationen die Bindung von RNase H an den Heteroduplex (Prakash und Bhat 2007). Die *locked nucleic acid* (LNA)-Modifikation bewirkt eine höhere Bindungsaffinität zum *target* und entsprechend modifizierte ASOs induzieren eine bessere Hydrolyse als ASOs mit anderen Modifikationen, wie z.B. ASOs mit einer OMe-Modifikation (Kurreck *et al.* 2002). Die Phosphorothioat (PS)-Modifikation beeinflusst die Hydrophobizität und damit die Permeation über die Lipid-Zellmembran, die Proteinassoziation und die Nukleaseresistenz (Dowdy 2017; Iwamoto *et al.* 2017). Zunächst wurden verschiedene Modifikationen auf ihre Spaltaktivität und ihre Stabilität *in vitro* getestet.

Modifikationen der Ribose am 2'-Kohlenstoff lassen das Desoxyribonukleotid einem Ribonukleotid ähnlicher werden. Aus diesem Grund wurden im Fall der MOE- und OMe-Modifikationen ausschließlich das erste und letzte (MOE2, OMe2) oder die zwei ersten und zwei letzten Nukleotide (MOE4, OMe4) modifiziert, um die Bindung des Heteroduplex durch RNase H nicht zu beeinträchtigen. Aus dem gleichen Grund wurden auch das 5'- und 3'-Nukleotid im Fall der LNA-Modifikation modifiziert (LNA2). Es wurden zwei ASOs mit der PS-Modifikation generiert. Einerseits wurde das Phosphatrückgrat zwischen dem ersten und zweiten sowie dem vorletzten und letzten Nukleotid modifiziert (PS2), andererseits im gesamten Rückgrat (PS20). Die Sequenz der modifizierten ASOs entsprach der Sequenz des *guide strand* der effizienten vsiRNA 209 oder der ineffizienten vsiRNA 3701 als Kontrolle. Die modifizierten Oligonukleotide wurden unter Translationsbedingungen im BYL inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der mit ³²P-markierten TBSV-*target*-RNA und die Durchführung des RNase H-Assays (siehe 3.2.6).

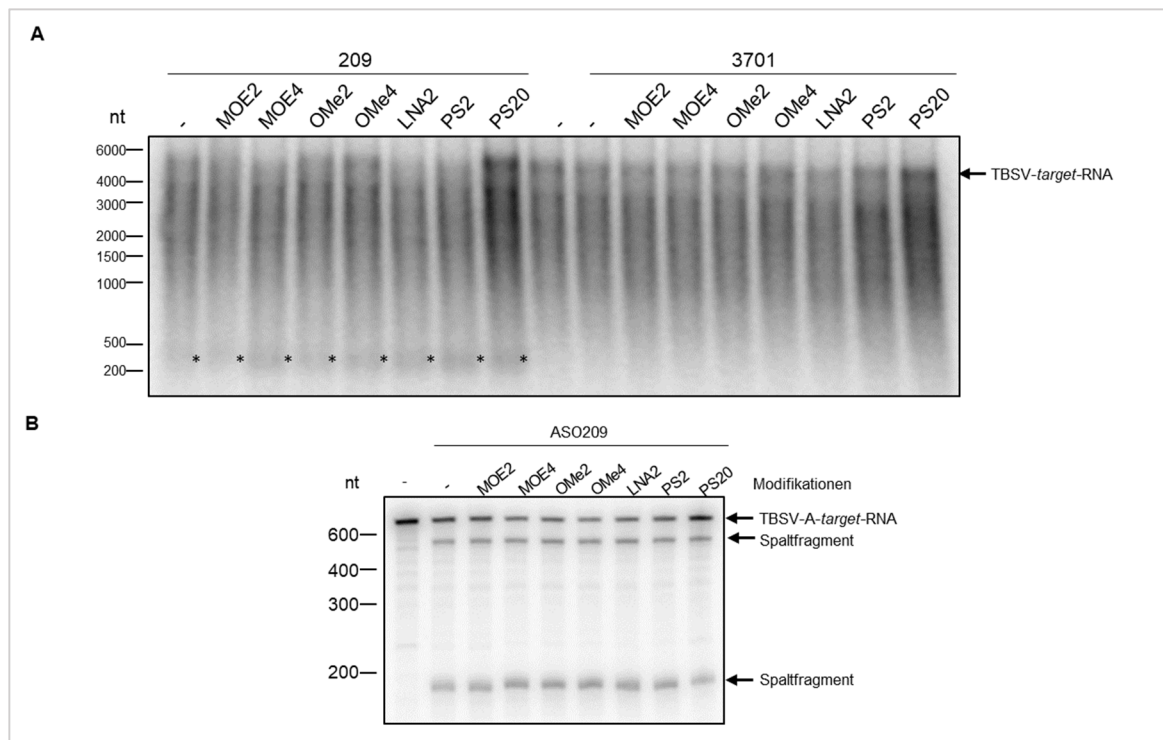


Abbildung 4.20: Auswirkung von Nukleotidmodifikationen auf die ASO-vermittelte Hydrolyse der TBSV-target-RNA.

(A) Modifizierte ASOs, deren Sequenzen dem *guide strand* der effizienten vsiRNA 209 bzw. der ineffizienten vsiRNA 3701 entsprachen, wurden nach Inkubation im BYL auf die Spaltung der radioaktiv markierten TBSV-target-RNA getestet. Die aufgereinigte RNA wurde mittels denaturierendem Agarose-Gel aufgetrennt. (B) Die Hydrolyse des TBSV-Fragments A (TBSV-A) wurde nach Zugabe des *target-RNA*/ASO-Gemischs untersucht. Die aufgereinigte RNA wurde mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Die Detektion der Spaltfragmente erfolgte mittels Autoradiographie. Sternchen oder Pfeile markieren jeweils die Höhe der durch das ASO 209 generierten Spaltfragmente.

In Abbildung 4.20A ist zu sehen, dass die TBSV-target-RNA unter Verwendung des ASOs 209 mit allen Modifikationen hydrolysiert wurde. Im Fall der ASOs mit der MOE4-, LNA2- und PS2-Modifikation war die Signalintensität der nicht gespaltenen TBSV-target-RNA schwächer als mit der MOE2-, OMe2-, OMe4- und PS20-Modifikation, wodurch von einer stärkeren Hydrolyseaktivität der RNase H ausgegangen werden kann. Die TBSV-target-RNA wurde mit dem als Negativkontrolle eingesetzten ASO 3701 nicht hydrolysiert. Es wurden weiterhin Versuche zum RNase H-Assay durchgeführt, in denen die *target-RNA* mit den modifizierten ASOs vereint zum BYL zugegeben wurden, ohne dass vorher eine Inkubation der modifizierten ASOs im BYL erfolgte. Hier erfolgte eine durch das ASO 3701 induzierte Spaltung (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis kann durch die Art der Zugabe von ASO und *target-RNA* verursacht worden sein.

Zur weiteren Überprüfung der Spalteffizienz wurde das unterschiedlich modifizierte ASO 209 mit dem ^{32}P -markierten TBSV-Fragment A als *target* getestet. Das TBSV-Fragment A deckt die 5'-terminale Region des TBSV-Genoms mit einer Größe von 740 nt ab (Gago-Zachert *et al.* 2019; Wu *et al.* 2013). Eine Hydrolyse des TBSV-Fragments A durch ASO 209 resultierte in ein 5'-Spaltfragment der Größe ~190 nt und in ein 3'-Spaltfragment der Größe ~550 nt. In diesem RNase H-Assay wurden die

jeweiligen ASOs und die *target*-RNA als Gemisch hinzugefügt. Unter diesen experimentellen Bedingungen wurde eine ähnliche Signalintensität der Spaltfragmente bei den Proben, in denen die ASOs mit den Modifikationen MOE4, OMe2, OMe4, LNA2 und PS2 eingesetzt wurden, detektiert. Daraus wurde geschlossen, dass die *target*-RNA mit vergleichbarer Effizienz hydrolysiert wurde. Unter Verwendung des ASOs 209 mit der PS20-Modifikation war die Signalintensität der *target*-RNA trotz detektierbarer Spaltfragmente genauso stark wie die Signalintensität des nicht gespaltenen *targets*, was ein Hinweis auf eine Stabilisierung der *target*-RNA sein könnte.

In Abhängigkeit der unterschiedlich modifizierten ASOs konnte gezeigt werden, dass RNase H die TBSV-*target*-RNA mit unterschiedlicher Effizienz hydrolysiert.

4.2.15 Stabilität modifizierter ASOs im BYL

Zur Generierung eines effektiven Schutzes gegen eine Virus-Infektion in der Pflanze sollte das ASO vor der Virus-Infektion in der Zelle vorliegen und bis zur Infektion möglichst stabil gegenüber Nukleasen sein. Die Stabilität des unmodifizierten ASOs, der vsiRNA209 sowie der modifizierten ASOs MOE4, LNA2, PS2, PS20 mit der Sequenz des *guide strands* der vsiRNA209 sollten daher im BYL überprüft werden. Dazu wurden diese endständig mit ³²P-markiert und mit gleichen Pufferbedingungen wie in dem Assay zuvor (siehe 3.2.6), jedoch ohne CPK, das zur Unterstützung der Translationsreaktion im Assay hinzugefügt wurde, inkubiert. Es wurde je eine Probe nach 0, 2, 4, 8 und 24 h genommen und die ASOs bzw. siRNA mit einer denaturierende PAGE und Autoradiographie überprüft. Aufgrund der Intensität der Signalstärke wurden Rückschlüsse über die Stabilität bzw. den Abbau geschlossen.

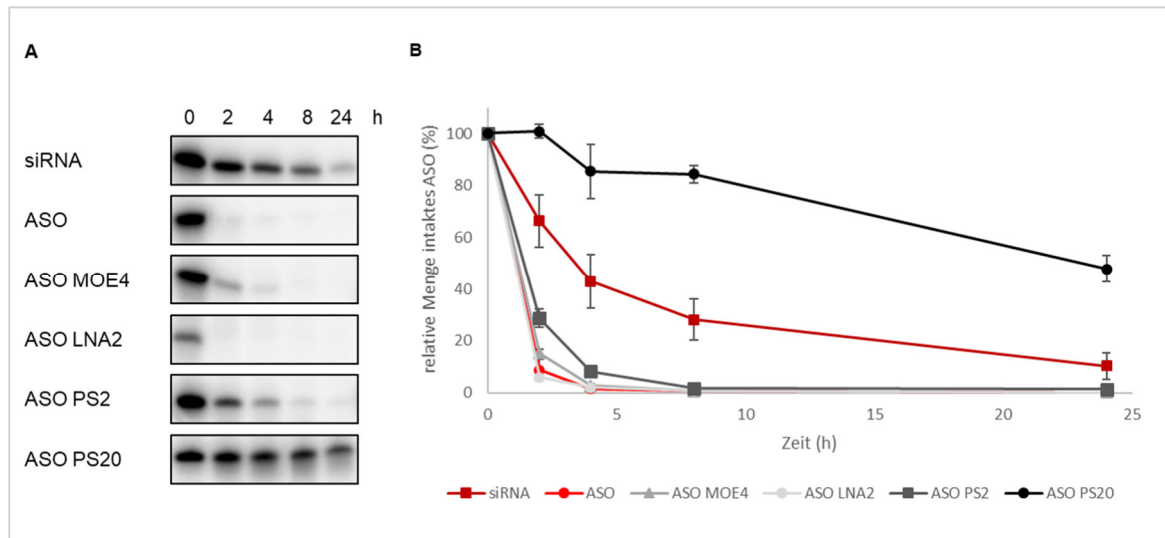


Abbildung 4.21: Effekte der Nukleotidmodifikationen des ASOs auf die ASO-Stabilität.

(A) siRNA, das unmodifizierte ASO und die verschiedenen modifizierten ASOs wurden im BYL für 0, 2, 4, 8 und 24 h inkubiert und mittels 15 %iger denaturierende PAGE und Autoradiographie auf ihre Stabilität überprüft. (B) Quantifizierung der Signale aus (A) und zwei weiteren unabhängigen Experimenten mittels ImageQuant. Angegeben ist der prozentuale Anteil des intakten ASOs über die Zeit von 0, 2, 4, 8 und 24 h als Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten inklusive Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Der Abbau der ASOs bzw. der siRNA ist in der Abbildung 4.21A gezeigt. Es erfolgte eine Quantifizierung der Signale dreier unabhängiger Experimente mittels der Bildanalyse-Software ImageQuant TL (GE Healthcare GmbH, USA) (Abbildung 4.21B). Es konnte nach 24 h Inkubation ein Signal für die markierte siRNA im Gel detektiert werden, das nach Quantifizierung des Signals einer relativen Menge von 10 % entsprach. Für das markierte ASO ohne Modifikation konnte nach zwei Stunden Inkubation im BYL kein Signal mehr detektiert werden. Ein Signal für das markierte MOE4-modifizierte ASO konnte bis zu vier Stunden detektiert werden. Die Detektion des markierten LNA2-modifizierten ASOs war nach zwei Stunden nicht mehr möglich. Die markierten PS2- und PS20-modifizierten ASOs konnten bis acht bzw. 24 Stunden detektiert werden. Für das PS20-modifizierte ASO wurde nach 24 h eine relative Menge von 48 % quantifiziert. Für die modifizierten ASOs bzw. siRNA ergab sich folgende Stabilitätsrangfolge: PS20 > siRNA > PS2 > MOE4 > ASO = LNA2.

4.2.16 Modifizierte ASOs können den Schutz vor TBSV-Infektionen verbessern

Es konnte zuvor gezeigt werden, dass die Modifikationen der ASOs einen stabilisierenden Effekt auf das ASO gegenüber Nukleasen haben. Aus diesem Grund sollten die ASOs mit den zuvor verwendeten Modifikationen *in vivo* auf ihr Potenzial, die Pflanze vor einer TBSV-Infektion zu schützen, untersucht werden. Es wurde die TBSV-RNA mit den verschiedenen modifizierten ASOs vereint und mechanisch mittels Siliciumcarbid jeweils in zwei Blätter der *N. benthamiana*-Pflanzen co-inokuliert (siehe 3.1.3.2). Die Pflanzen wurden 21 Tage lang hinsichtlich der Ausbildung von Symptomen einer TBSV-Infektion beobachtet. Es konnte

durch zwei unabhängige Experimente mit jeweils 6 Pflanzen gezeigt werden, dass alle modifizierten ASOs das Potential haben, die Pflanze vor einer TBSV-Infektion zu schützen (Abbildung 4.22).

Mit einer Ausnahme zeigten alle Pflanzen, die mit dem unspezifischen gf698-ASO behandelt wurden, Symptome einer TBSV-Infektion. Von den Pflanzen, die mit dem ASO 209 ohne Modifikation behandelt wurden, zeigten 58 % keine Symptome. Pflanzen, die mit dem MOE4-modifizierten ASO behandelt wurden, blieben zu 92 % symptomfrei, solche mit dem LNA2- und PS2-modifizierten ASO blieben zu 83 % und mit dem PS20-modifizierten ASO zu 75 % symptomfrei (Abbildung 4.22). So kann nach diesen Ergebnissen eine Rangfolge der verschiedenen Modifikationen für eine Protektion der Pflanzen wie folgt aufgestellt werden: MOE4 > LNA2 = PS2 > PS20 > ASO 209.

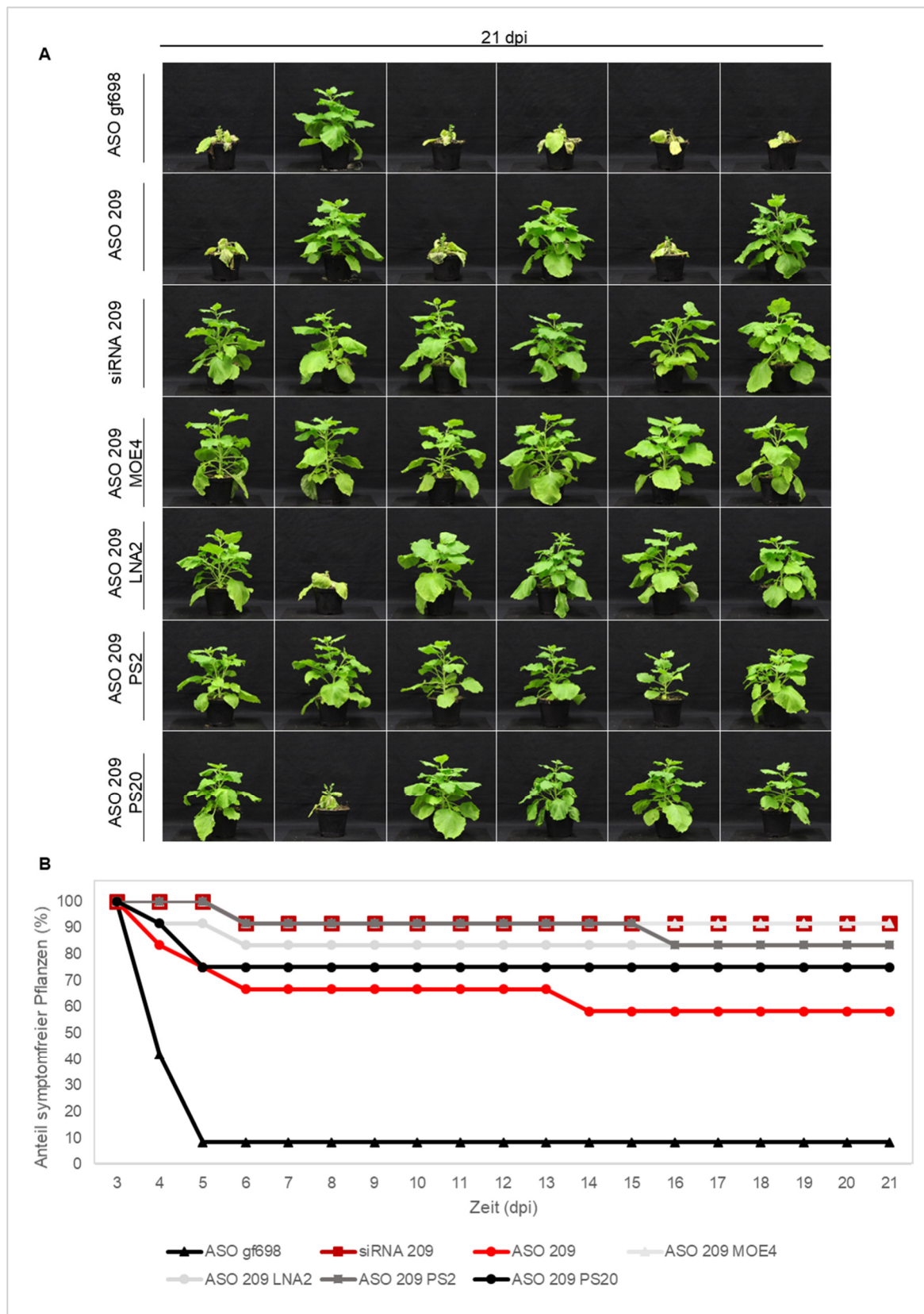


Abbildung 4.22: ASO-Modifikationen verbessern den Schutz vor TBSV-Infektionen.

(A) Beispiele für die mit den unterschiedlich modifizierten ASOs behandelten *N. benthamiana*-Pflanzen 21 dpi nach der Infektion. **(B)** Zusammenfassung der protektiven Wirkung gegen TBSV, generiert durch die siRNA oder das ASO 209 ohne bzw. mit den verschiedenen Modifikationen, im Vergleich zum gf698-Kontroll-ASO über einen Zeitraum von 21 dpi. Die Pflanzen wurden mit 5 ng TBSV-RNA und 150 pmol siRNA oder 900 pmol ASO mittels *rub-in* co-inokuliert. In zwei unabhängigen Experimenten wurden je 6 Pflanzen für jede Behandlung verwendet.

Für eine Anwendung von ASOs in der Pflanze sollte überprüft werden, ob die ASOs nur einen Pflanzenschutz generieren, wenn sie gleichzeitig mit der TBSV-RNA mechanisch mittels Siliciumcarbid inokuliert werden, oder ob bei einer zeitlichen Trennung zwischen ASO- und TBSV-RNA-Inokulation ebenfalls eine protektive Wirkung erzielt werden kann. Dazu wurden zunächst die ASOs mit den verschiedenen Modifikationen MOE4, LNA2, PS2 und PS20 bzw. das ASO ohne Modifikation in je 6 Pflanzen mittels *rub-in* inokuliert und das Inokulum auf den Blättern für 3 min trocknen lassen. Anschließend erfolgte die Inokulation der TBSV-RNA. Die Pflanzen wurden 21 Tage lang hinsichtlich der Ausbildung von Symptomen einer TBSV-Infektion beobachtet.

In zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 6 Pflanzen konnte gezeigt werden, dass alle modifizierten ASOs das Potential haben, die Pflanze vor einer TBSV-Infektion zu schützen (Abbildung 4.23). Es fiel auf, dass der Schutz durch die ASOs im Falle eines zeitlichen Versatzes schlechter war als bei der Co-Inokulation. Die Pflanzen, die mit dem unspezifischen *gf698*-ASO behandelt wurden, zeigten mit einer Ausnahme alle die typischen Symptome einer TBSV-Infektion. 33 % der Pflanzen, die mit dem ASO 209 ohne Modifikation behandelt worden waren, blieben symptomfrei. Pflanzen, die mit dem MOE4-modifizierten ASO behandelt worden waren, blieben zu 50 % symptomfrei, diejenigen mit dem LNA-modifizierten ASO blieben zu 33 %, mit dem PS2-modifizierten ASO zu 58 % und mit dem PS20-modifizierten ASO zu 42 % symptomfrei (Abbildung 4.22). Bis auf die LNA-Modifikation konnte durch die Modifikation des Oligonukleotids ein besserer Schutz generiert werden als ohne Modifikation. So kann nach diesen Ergebnissen eine Rangfolge der verschiedenen Modifikationen für eine Protektion der Pflanzen wie folgt aufgestellt werden: PS2 > MOE4 > PS20 > LNA = ASO 209.

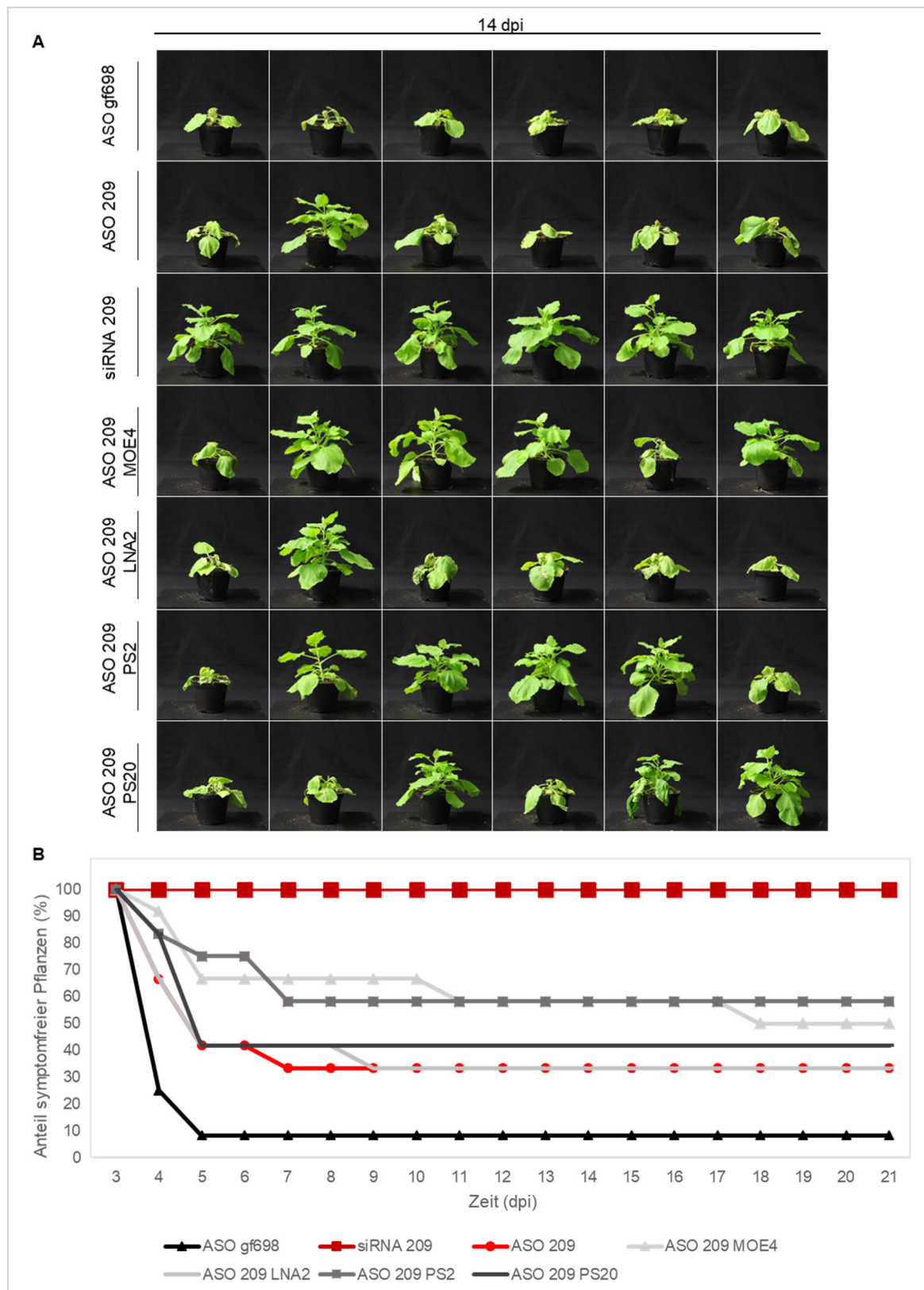


Abbildung 4.23: ASO-Behandlung der Pflanzen vor der Inokulation von TBSV-RNA schützt vor einer Infektion.

(A) Beispiele für die mit den unterschiedlich modifizierten ASOs behandelten *N. benthamiana*-Pflanzen 14 dpi nach der Infektion. **(B)** Zusammenfassung der protektiven Wirkung gegen TBSV, generiert durch die siRNA oder das ASO 209 ohne bzw. mit verschiedenen Modifikationen, im Vergleich zum gf698-Kontroll-ASO über einen Zeitraum von 21 dpi. Zuerst wurden die Pflanzen mit 150 pmol siRNA oder 900 pmol ASO mittels *rub-in* behandelt. 3 min später erfolgte die Inokulation von 5 ng TBSV-RNA mittels *rub-in*. In zwei unabhängigen Experimenten wurden je 6 Pflanzen für jede Behandlung verwendet.

5 Diskussion

Der Schutz von Pflanzen vor Viren hat eine starke wirtschaftliche Bedeutung. Allerdings gestaltet sich dieser aufgrund der Vielzahl verschiedener Übertragungswege und der hohen Anpassungsfähigkeit der Viren an Umweltfaktoren äußerst schwierig. Aus diesem Grund war die Erforschung der pflanzlichen Immunantwort und die Etablierung eines umweltfreundlichen und zuverlässigen Pflanzenschutzmittels Ziel dieser Arbeit.

5.1 Identifizierung von RISC-Faktoren

5.1.1 Co-Immunpräzipitation von potenziellen AGO-Interaktionspartnern

Die Identifizierung von bisher unbekanntem AGO-Interaktionspartnern sollte ein besseres Verständnis der Funktion des RISC und damit der Immunantwort der Pflanze gegenüber Viren ermöglichen. Das BYL-System eignet sich zur Identifizierung von an der Assemblierung und der Aktivität des RISC beteiligten Faktoren (Iki *et al.* 2012). Zunächst konnten in der FLAG-AGO1-, AGO1-, FLAG-AGO2- und AGO2-Probe co-immunpräzipitierte Proteine erfolgreich durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung detektiert werden (siehe Abschnitt 4.1.1). Die Proben, in denen die AGO-Proteine ohne FLAG-tag translatiert wurden, dienten als Negativkontrolle. Die in diesen Proben detektierten Proteine sind wahrscheinlich an das Anti-FLAG M2 *affinity gel* unspezifisch bindende Proteine. Aufgrund der stringenten Bedingungen des Waschschritts mit einer NaCl-Konzentration von 300 mM ist davon auszugehen, dass unspezifisch-bindende Proteine entfernt und spezifisch-bindende Proteine erfolgreich angereichert wurden. Die Verwendung eines Waschpuffers mit einer geringeren NaCl-Konzentration hätte möglicherweise dafür gesorgt, dass auch schwache Interaktionspartner detektierbar gewesen wären.

Die Proteine der IP-Proben konnten mittels MS erfolgreich identifiziert werden (Abschnitt 4.1.2). Durch die identifizierten Proteine in der Negativkontrolle konnten unspezifisch-bindende Proteine in den IP-Proben erkannt werden. Diese wurden bei der Auswertung der Daten der Proben FLAG-AGO1 und FLAG-AGO2 daher nicht beachtet. Die identifizierten Kandidaten in den Proben FLAG-AGO1 und FLAG-AGO2 könnten aufgrund der ausgewählten Methode der Immunpräzipitation direkte oder indirekte Interaktionspartner sein. Des Weiteren ist es möglich, dass eine indirekte Interaktion über die eingesetzte siRNA stattfindet. Die IP in dieser Arbeit wurde ohne *cross-links* und ohne ATP-Analogen durchgeführt. Beide Methoden helfen zur Identifizierung von schwachen bzw. transient bindenden Interaktionspartnern. Ein *cross-link* würde die Interaktionspartner, die nur temporär an das AGO-Protein binden, den ganzen Immunpräzipitationsprozess mit diesem

verknüpfen (Kluger und Alagic 2004). Dadurch würden die schwachen Interaktionspartner auch unter stringenten Bedingungen des Waschschriffs nachgewiesen werden können. ATP wird bei der RISC-Assemblierung durch HSP90 hydrolysiert. Um diese Hydrolyse zu verlangsamen, kann das ATP-Analogon ATP γ S verwendet werden und die Interaktionspartner, welche mit dem HSP90-AGO-Komplex assoziieren, wären länger an das AGO-Protein gebunden. Somit würde die Chance erhöht werden, Kandidaten zu identifizieren, die an dem Aufbau des RISC beteiligt sind (Iki *et al.* 2012).

Es wurden Kandidaten aufgrund der Anreicherung durch die IP und ihrer in der Literatur beschriebenen Funktion aus den MS-Datensätzen ausgewählt (Abschnitt 4.1.3). Die Kriterien eines potenziellen AGO-Interaktionspartners waren eine RNA-bindende Eigenschaft, eine zum AGO-Protein entsprechende Lokalisation oder eine Funktion, die im Zusammenhang mit dem RISC stehen kann, wie z.B. die Faltung von Proteinen oder das Auflösen von RNA-sekundär-Strukturen.

Untersucht wurden entsprechend die Kandidaten *NbZFP*, *NbEIF4A*, *NtEF1A*, *NtCpn60*, *NtPAB* und *NtAKIP-like* (Abschnitt 4.1.5). Bei dem Kandidaten *NtPAB* war eine Translation im BYL nur in einer geringen Menge möglich. Die Kandidaten *NtEF1A* und *NtCpn60* konnten nicht detektiert werden. Die fehlende Detektion im Western Blot nach In-vitro-Translation könnte unterschiedliche Ursachen haben. Eine Ursache könnte sein, dass die Proteine eine geringe Stabilität in dem cytoplasmatischen Extrakt BYL aufweisen. Eine andere Ursache könnte die fehlende Zugänglichkeit des *tags* durch den Antikörper sein, da dieser durch das Protein selbst maskiert ist. Ein *Linker* zwischen Protein und *tag* könnte das Maskieren des *tags* durch das Protein verhindern. Eine andere Möglichkeit wäre, einen anderen *tag* zu verwenden oder das Protein massenspektrometrisch nachzuweisen. Die Translation der Kandidatenproteine in einem In-vivo-System könnte eine alternative Methode zur In-vitro-Translation im BYL darstellen. Anschließend könnte die Interaktion mit den aufgereinigten Proteinen im BYL untersucht werden. Alternativ könnten beide Interaktionspartner, also sowohl das Kandidatenprotein als auch das AGO-Protein, *in vivo* synthetisiert und In-vivo-Interaktionsstudien durchgeführt werden. Ein Beispiel ist die Split-YFP-Methode, bei der aufgrund einer Interaktion der fluoreszierende Komplex wiederhergestellt wird und als Nachweis für eine Interaktion in der Pflanze dient. Damit könnte überprüft werden, ob das Kandidatenprotein in der Pflanze mit AGO1 interagiert. Die Detektion von Proteinen im Western Blot mittels Antikörper ist im Vergleich zur MS weniger sensitiv. Um das Protein nach IP im Western Blot detektieren zu können, muss es in ausreichender Konzentration vorliegen. Für die Positivkontrolle war es notwendig, die Bedingungen des Waschschriffs anzupassen, um das Protein nach Immunpräzipitation im Western Blot detektieren zu können. Unter diesen Bedingungen konnte interessanterweise

beobachtet werden, dass eine Co-IP mit den im BYL translatierten und einem Myc-tag versehenen Kandidaten *NbZFP*, *NbEIF4A* und *NtAKIP-like* möglich war (siehe Abbildung 4.2). Da die IP in diesen Studien mit ausreichend stringenten und die IP, deren Proben für die MS verwendet wurde, mit stringenteren Bedingungen des Waschschriffs durchgeführt wurde, deutet dies darauf hin, dass die Interaktion der Kandidaten mit AGO1 eine spezifische Interaktion darstellt.

Wie zuvor beschrieben lässt die Funktion der Kandidaten eine Interaktion mit AGO1 vermuten. Eine potenzielle Funktion des *A. thaliana*-Tandem-Zink-Finger-Proteins im Zusammenhang mit RISC könnte aufgrund der Eigenschaft, dass es zwischen Zellkern und Cytoplasma wechselt und an Nukleinsäuren bindet, vermutet werden. Des Weiteren lokalisiert dieses Protein in *processing bodies*, in denen mRNAs abgebaut werden (Pomeranz *et al.* 2010). Auch AGO-Proteine lokalisieren in *processing bodies*, wodurch eine Wechselwirkung mit einem Zink-Finger-Protein vermutet werden könnte (Sonenberg und Hinnebusch 2009). Aufgrund der mittels Co-Immunpräzipitation gezeigten Interaktion mit FLAG-AGO1 und der Identifizierung mit drei proteotypischen Peptiden befindet sich dieses Protein nach erneuter Auswertung der Rohdaten noch unter den potenziellen Kandidaten als Bestandteil des RISC.

Eine Funktion der RNA-Helicase eIF4A im RISC könnte aufgrund ihrer Fähigkeit zur Auflösung von Sekundärstrukturen von mRNA vor der Translation, z.B. einer *target*-RNA des RISC, vermutet werden. Des Weiteren ist im humanen System beschrieben, dass Ago2 miRNA-abhängig an die Cap-Struktur einer entsprechenden mRNA bindet (Kiriakidou *et al.* 2007). Dadurch könnte eine Interaktion zwischen AGO und der Helikase (eIF4A) zustande kommen. Auch für den Translationsinitiationsfaktor eIF1A konnte eine Interaktion mit Ago2 und dadurch eine Funktion im RISC gezeigt werden (Yi *et al.* 2015). Eine Interaktion ist auch im pflanzlichen System möglich, da eine translationsreprimierende Wirkung von AGO gut untersucht ist. Die Inhibition der Translation erfolgt über Blockierung der Ribosomen durch die miRNA-abhängige Bindung des AGOs an die *target*-RNA (Carbonell 2017). Aufgrund seiner funktionellen Eigenschaften ist eIF4A ein interessanter Kandidat, auch wenn dieser im Rahmen dieser Arbeit nur mit einem proteotypischen Peptid und daher mit einer geringen Quantität vertreten war.

Aufgrund der zuvor erwähnten translationsreprimierenden Wirkung von AGO wäre auch der mit FLAG-AGO1 co-immunpräzipitierte Kandidat *NtEF1* von Interesse, der eine Rolle bei der Translation spielt. So ist als Modell denkbar, dass durch die Interaktion von *NtEF1* mit AGO/RISC die Elongation der Translation inhibiert wird. Da die In-vitro-Translation des Kandidaten *NtEF1a* im BYL wie zuvor erwähnt nicht erfolgreich war, konnte die Interaktion zwischen FLAG-AGO1 und *NtEF1a* mit dieser Methode jedoch nicht untersucht werden.

Auch bei dem Kandidaten *NtCpn60* war eine Translation im BYL nicht möglich. Chaperone fördern die Faltung von Proteinen. So ist die Chaperon-vermittelte Beladung des RISC durch die HSP70/HSP90-Maschinerie im tierischen und im pflanzlichen System gut untersucht (Iki *et al.* 2010; Iwasaki *et al.* 2010). Die Beteiligung weiterer Chaperone an der Beladung oder Rekrutierung des RISC ist nicht abwegig. Möglicherweise handelt es sich bei dem Kandidaten *NtCpn60* in den MS-Daten um einen indirekten Interaktionspartner von AGO, da eine Interaktion mit HSP70 aus Kürbis-Chloroplasten bekannt ist (Tsugeki und Nishimura 1993).

Der Kandidat *NtPAB* mit einem *RNA-recognition motif* könnte aufgrund seiner RNA-bindenden Eigenschaft als Interaktionspartner von AGO in Frage kommen. Das *Arabidopsis*-Homolog Poly(A)-bindende Protein (AT4G34110.1) interagiert mit an der Translation beteiligten Faktoren wie z.B. dem eIF4G, wodurch eine Interaktion mit AGO ebenfalls möglich wäre (Gallie 2018). Dieser Kandidat konnte allerdings nur mit geringer Ausbeute im BYL translatiert werden und wurde vermutlich aus diesem Grund nicht nach Co-Immunpräzipitation mittels Western Blot als Interaktionspartner von FLAG-AGO1 detektiert. Möglicherweise liegt in diesem Fall ebenfalls eine indirekte Interaktion vor und die Detektion im Western Blot ist nicht ausreichend sensitiv.

Der Kandidat *NtAKIP-like* wurde von Dr. Jana Schuck nach Immunpräzipitation von FLAG-AGO1 mittels MS identifiziert. Nach Translation im BYL konnte er erfolgreich mit FLAG-AGO1 co-immunpräzipitiert werden. Dieser kam daher aufgrund seiner Funktion im RNA-Metabolismus und ABA-Signalweg als Interaktionspartner in Betracht. Allerdings wurden die Funktion und Lokalisation von *AKIP-like* bisher nur in *guard*-Zellen untersucht, wodurch eine Funktion im RNAi infrage gestellt werden müsste (Li *et al.* 2002).

Zwei Möglichkeiten des Einflusses der Kandidaten auf die Spaltaktivität sind denkbar. Einerseits könnte der Kandidat einen Einfluss auf die Beladung von *NtAGO1* mit der siRNA haben. Andererseits könnte die Aktivität des programmierten RISC beeinflusst sein.

Die drei Kandidaten *NbZFP*, *NbEIF4A* und *NtAKIP-like* zeigten, anders als von Iki *et al.* für CYP40 nachgewiesen (Iki *et al.* 2012), keinen Einfluss auf die Effizienz der Hydrolyse katalysiert durch AGO1 (siehe Abbildung 4.3). Dabei spielte es keine Rolle, ob die siRNA vor oder nach der AGO1-Translation hinzugefügt wurde. CYP40 wurde als Positivkontrolle verwendet. Allerdings wurde mit CYP40 in dieser Arbeit kein Einfluss auf die RISC-Aktivität festgestellt. Aus diesem Grund ist es nicht eindeutig, inwiefern die übrigen Kandidaten einen positiven Einfluss auf die Spaltaktivität haben. Dieser fehlende Effekt von CYP40 könnte an einer zu hohen Menge der *target*-RNA liegen. Eine Anpassung der *target*-RNA-Menge könnte die Detektion eines Unterschieds in der Spalteffizienz verbessern. Eine andere Möglichkeit wäre die Anpassung der siRNA-Menge, obwohl auch

bei einer siRNA-Konzentration von 5 nM kein Effekt einer CYP40-Zugabe auf die Effizienz der Hydrolyse von AGO1 beobachtet wurde. Eine Anpassung des Assays, sodass CYP40 die Effizienz der Hydrolyse von AGO1 verbessert, würde eine Aussage über den Einfluss der ausgewählten Kandidaten auf die Effizienz der Hydrolyse von AGO1 bestärken.

Iki *et al.* haben den Einfluss von CYP40 auf die Beladung von AGO1 mit siRNA untersucht. Sie konnten zeigen, dass CYP40 mit dem HSP90-AGO1-siRNA-Komplex interagiert und die Beladung von AGO1 mit siRNA durch HSP90 unterstützt. Dadurch hat CYP40 einen indirekten Einfluss auf die Spaltaktivität (Iki *et al.* 2012). Eine Funktion in der Beladung von AGO1 wäre dementsprechend eine weitere Möglichkeit, wie ein Faktor die RISC-Aktivität beeinflussen könnte.

5.1.2 Ein Luciferase-Reporter-Assay zur Untersuchung der Beteiligung der potenziellen RISC-Faktoren im RNA-*silencing* in *N. benthamiana*

Ein In-vivo-Reportersystem wurde erstellt, das in initialen Studien das Potenzial zeigte, den Einfluss von Kandidatenproteinen auf das RNA-*silencing* zu untersuchen. Dieses System ist eine Kombination aus dem *silencing* des Luciferase-Reporters und der Cas9-vermittelten Mutagenese der potenziellen Kandidaten (siehe Abbildung 4.5). Der Einfluss des Kandidaten auf das RNA-*silencing* kann über eine Veränderung der Firefly-Luciferase-Aktivität gemessen werden. Voraussetzung ist das *silencing* des Reporters durch die von Enrico Ehrhardt identifizierte, effiziente Luciferase-siRNA. In *N. benthamiana* konnte die identifizierte siRNA als amiRNA und die codierende Sequenz der Luciferase vom selben Plasmid nach Applikation der Agrobakterien transient co-exprimiert werden. Durch die Messung einer geringen Luciferase-Aktivität konnte der Effekt des *silencing* auf die Luciferase nachgewiesen werden. Eine deutlich höhere Luciferase-Aktivität konnte bestimmt werden, wenn der VSR p19 co-exprimiert wurde, um die siRNA zu binden und somit ein *silencing* zu verhindern. P19 ist ein effektiver *silencing*-Suppressor. Es stellte sich die Frage, inwiefern eine Cas9-dirigierte Kandidaten-Mutagenese eine ähnliche supprimierende Wirkung auf das RNA-*silencing* haben kann. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Varianten der Inokulation diskutiert, von denen auf zwei im Folgenden näher eingegangen werden wird. Außerdem soll diskutiert werden, wie die Auswahl der sgRNA erfolgte, um eine effektive Cas9-dirigierte Mutagenese des RISC-Faktors zu erzielen, und wie diese Mutagenese nachgewiesen werden kann.

5.1.2.1 Unterschiedliche Ansätze zur Agrobakterien-vermittelten Inokulation der zwei Konstrukte für das Luciferase-Reportersystem und die CRISPR/Cas-vermittelte Mutagenese

Der erste Versuch beinhaltete eine transgene Expression des GFP-Reportersystems. Das *silencing* des GFP-Reportersystems war durch die Verwendung des 35S-Promotors für die Expression der GFP-spezifischen amiRNA sehr effektiv und konnte mittels Cas9-vermittelter Kandidaten-Mutagenese nicht gestört werden. Der Aufbau des GFP-Reportersystems und des Luciferase-Reportersystems unterscheidet sich ausschließlich in den Reportern und der dazu passenden siRNA und nicht in den verwendeten Promotoren. Aus diesem Grund wurde ein effektives *silencing* auch für das Luciferase-Reportersystem erwartet. Der transgene Ansatz eignete sich nicht, da das *silencing* des Reporters als Transgen sehr effektiv war und die Cas9-vermittelte Kandidaten-Mutagenese dieses nicht unterbrechen konnte. Aus diesem Grund wurde ein transienter Ansatz untersucht.

Der in dieser Arbeit beschriebene transiente Ansatz hat den Vorteil, dass die beiden Systeme – das Luciferase-Reportersystem und das System der Cas9-vermittelten Mutagenese – mittels Agrobakterium-vermittelter Transformation zeitversetzt angewendet werden konnten. Es sollte gewährleistet werden, dass zunächst mittels Cas9-vermittelter Mutagenese ein Ausschalten des potenziellen RISC-Kandidaten stattfindet. Zur Expression des Cas9-Konstrukts wurden zunächst 2–3 Tage nach Inokulation der Agrobakterien veranschlagt (Wydro *et al.* 2006). Ein weiterer Zeitraum wurde benötigt, in dem die Cas9-vermittelte Mutagenese des Kandidatengens eine Auswirkung auf Proteinebene hat. Die Auswirkung auf Proteinebene hängt von der Stabilität der entsprechenden mRNA, die noch vor der Mutagenese generiert wurde, und von der Stabilität des intakten Proteins ab. Die Mutagenese wirkt sich erst aus, wenn das Protein von der entsprechenden mRNA, welche die Mutation enthält, synthetisiert wird. Solange genügend intaktes Protein vorhanden ist, kann auf Genebene eine Mutation vorliegen, ohne dass sich Auswirkungen zeigen. Der AGO1-siRNA-Komplex hat eine Lebensspanne von 2–3 Tagen (Csorba *et al.* 2010). Eine Mutagenese in AGO1 würde sich deshalb erst auswirken, wenn ein entsprechender Umsatz von AGO bzw. RISC erfolgt ist. Dementsprechend würde es sich auch mit anderen Kandidaten verhalten. Aufgrund der Cas9-Expression und der Auswirkung der Mutagenese auf Proteinebene wurde für den Abstand zwischen den Inokulationen ein Zeitraum von 5 Tagen gewählt.

Nach der festgesetzten Zeitspanne von 5 Tagen wurde das Luciferase-Reportersystem mittels Agrobakterium-vermittelter Transformation in die Pflanzenzelle integriert. Der Zeitraum nach der zweiten Inokulation musste die Expression des Reportersystems und das *silencing* der Luciferase beinhalten. In diesem Fall wurden ebenfalls 5 Tage gewählt.

Durch die Auswahl dieser beiden Zeitspannen konnte mit der Positivkontrolle eine erfolgreiche Cas9-vermittelte Mutagenese von AGO1 und somit ein Ausschalten des Luciferase-*silencing*, resultierend in einer erhöhten Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle, detektiert werden. Mit diesem Ergebnis konnte die grundsätzliche Verwendbarkeit des Systems gezeigt werden.

Ein Nachteil der zeitversetzten Inokulation war die zweimalige Behandlung der *N. benthamiana*-Blätter mit Agrobakterien und die aus der zweiten Inokulation resultierende geringere Transformationseffizienz. Dieses Problem wurde durch die Expression der Renilla-Luciferase, die als Transformationskontrolle diente, beobachtet. Wurden die Agrobakterien, die das Reportersystem codierende Konstrukt enthielten, als erstes inokuliert, war die Aktivität der Renilla-Luciferase deutlich höher, als bei der zweiten Agrobakterieninokulation. Aufgrund der unterschiedlich effizienten Transformation diente die Renilla-Luciferase-Aktivität zur Normalisierung der Firefly-Luciferase-Aktivität.

5.1.2.2 Steigerung der Mutationsrate und das Dilemma der Allopolyploidie

Die durch Cas9 vermittelte Mutationsrate beträgt in einem transienten Assay in *N. benthamiana* lediglich 2 %, während die Mutationsrate bei transgenen *N. tabacum*-Pflanzen, welche die Gene *Cas9* und *sgRNA* stabil exprimieren, > 80 % beträgt (Gao *et al.* 2015; Nekrasov *et al.* 2013). Die unterschiedliche Mutationsrate vermittelt durch Cas9 ist der Transformationsmethode geschuldet (Gao *et al.* 2015). Angesichts dieser ineffizienten Mutationsrate sollten effiziente sgRNAs ausgewählt werden. Zur Auswahl effizienter sgRNAs diente die Software von Doench *et al.* (2014). Mittlerweile sind limitierende Faktoren dieser Software bekannt, sodass die Auswahl der sgRNAs möglicherweise nicht optimal war. Limitierende Faktoren sind zum Beispiel, dass diese Algorithmen auf dem spezifischen experimentellen Umfeld und den spezifischen Organismen beruhen und dass unterschiedliche Methoden zur Abschätzung der Wirksamkeit verwendet wurden (Kaur *et al.* 2016). Dadurch könnten sich die Effizienz der ausgewählten sgRNA *in planta* von der vorherbestimmten Effizienz unterscheiden.

Zur Verbesserung der Mutationsrate wurden zwar acht verschiedene sgRNAs ausgewählt und deren codierende Sequenz wurde gleichzeitig in die Pflanze transformiert, allerdings deckten nicht alle acht sgRNAs alle Homologe und Paraloge der Kandidatengene gleichzeitig ab. Somit stellte das allopolyploide Genom von *N. benthamiana* einen weiteren limitierenden Faktor dar. Wie in den Ergebnissen zu sehen ist, bewirkte die Mutagenese von AGO1 keine höhere Aktivität der Firefly-Luciferase. Erst nach zusätzlicher Mutagenese des Paralogs AGO1-2 konnte das *silencing* des Luciferase-Reporters aufgehoben werden und eine höhere Detektion des Luciferase-Signals im Vergleich zur Kontrolle erfolgen (siehe

Abbildung 4.6A). Vermutlich spielen beide AGO-Paraloge eine Rolle beim *silencing*, und bei Mutagenese von *AGO1* übernahm das Paralog *AGO1-2* die Rolle im *silencing* vollständig. Diese *AGO1-2*-Kontrolle zeigt, dass das Reportersystem wahrscheinlich funktioniert, dass allerdings alle Paraloge und Homologe eine Mutation enthalten müssen, um das System effizient einsetzen zu können. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Reportersystems wurde der Einfluss der Mutagenese in den Kontrollen *CYP40* und *TRN1* überprüft. *CYP40* ist an der Formierung des RISC beteiligt (Iki *et al.* 2012). *TRN1* ist in der miRNA-Assoziation an *AGO1* involviert (Cui *et al.* 2016). Die Mutagenese der zwei Kontrollkandidaten zeigte jedoch keinen Effekt auf das *silencing* der Luciferase. Resultierend läge die Vermutung nahe, dass die beiden ausgewählten Proteine im Vergleich zu *AGO1* eine weniger entscheidende Rolle in der Funktion des RISC spielen und dass deswegen deren Mutagenese nicht zum Aufheben des *silencing* führt. Gegen diese Erklärung spricht jedoch, dass die *Arabidopsis-cyp40*-Mutante *sqn-1* den gleichen morphologischen Phänotyp aufweist wie die *Arabidopsis-ago1*-Mutante (Earley und Poethig 2011). Eine alternative Erklärung wäre, dass durch die eingesetzten sgRNAs nicht alle Homologe und Paraloge der beiden Gene ausreichend abgedeckt und infolgedessen nicht ausreichend mittels Cas9 mutagenisiert werden. Demzufolge kann keine Aussage über die getesteten Kandidaten aus der IP getroffen werden. Eine unzureichende Mutagenese der Kandidaten kann auch in diesem Fall verantwortlich dafür sein, dass kein Aufheben des *silencing* der Firefly-Luciferase detektiert wurde. Aus diesen Überlegungen lässt sich für zukünftige Arbeiten ableiten, dass zunächst untersucht werden müsste, welche Paraloge und Homologe der Zielgene exprimiert sind, um folglich die für diese Paraloge und Homologe spezifischen sgRNAs auszuwählen.

5.1.2.3 Detektion der Cas9-vermittelten Mutagenese

Im Folgenden soll diskutiert werden, wie die Cas9-vermittelte Mutagenese überprüft werden kann. Das Cas9-Protein schneidet zwar spezifisch drei Nukleotide stromaufwärts des PAM, allerdings entstehen beim *non-homologous end joining* (NHEJ) unterschiedliche Insertionen bzw. Deletionen (Belhaj *et al.* 2013; Brooks *et al.* 2014). Somit entsteht bei der transienten Agrobakterientransformation des Cas9-codierenden Konstrukts in jeder Zelle ein unterschiedliches Mutationsereignis. Aus diesem Grund war es schwierig, die Mutagenese der Kandidaten zu überprüfen. Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, die Ebene, auf der die Mutagenese überprüft werden sollte, festzulegen. In dem vorgenommenen Versuch konnte die Mutation nur auf der Ebene der genomischen DNA überprüft werden, da keine negative Regulation auf Transkriptebene oder aber die Abnahme der Proteinmenge nur mittels Western Blot nachzuweisen war. Auf Transkriptebene kann es durch *nonsense-mediated mRNA decay* zu einer Verringerung

der mRNA-Menge kommen. Auf Proteinebene findet eine Veränderung der Proteinmenge nur im Fall einer Deletion oder Insertion von ein bis zwei Nukleotiden statt, was in einen *frameshift* und somit in der Regel in ein dysfunktionales Protein resultiert. Eine Überprüfung auf Proteinebene war in dieser Arbeit aufgrund der fehlenden Antikörper nicht durchführbar. Zukünftige Studien sollten nach Verfügbarkeit der Antikörper den Versuch wiederholen oder es sollten Antikörper für potenzielle Kandidaten abgeleitet werden.

In dieser Arbeit wurde die Mutagenese auf Transkriptebene überprüft. Obwohl auf den Einsatz der gleichen DNA-Menge in die PCR geachtet wurde, konnte überraschenderweise bei den meisten überprüften Kandidaten eine Abnahme der Signalstärke des PCR-Fragments im Agarosegel detektiert werden (siehe Abbildung 4.6B). Dabei wurde die Abnahme zwischen den Proben beobachtet, die mit jenen Konstrukten behandelt wurden, welche die spezifisch an das Kandidatengen bindende Cas9 codieren, und denjenigen, welche das unspezifisch an das mCh-Gen bindende Cas9 codieren. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf eine erfolgreiche Mutagenese der Kandidatengene sein. Die andere Möglichkeit für die Abnahme der Signalstärke ist der Einsatz von DNA in geringerer Qualität (Abbildung 4.6). Zukünftige Arbeiten zu diesem Thema sollten deshalb standardmäßig eine Überprüfung der Qualität der DNA, z. B. mittels Agarosegelelektrophorese, durchführen. Insofern Unterschiede in der DNA-Qualität nachgewiesen werden würden, sollten die entsprechenden Proben mittels etablierter Verfahren isoliert und gereinigt werden.

In manchen Fällen, wie z.B. dem *TRN1*, war es möglich, ein im Vergleich zum Wildtyp kleineres PCR-Fragment zu detektieren, was auf eine Deletion in größerem Maßstab hindeutet. Um dieses Ziel zu erreichen, dürfen die sgRNA-*target*-Sequenzen nicht so weit auseinanderliegen und müssen mit gleicher Effizienz gespalten werden (Brooks *et al.* 2014; Hsu *et al.* 2014). Dies wurde bei der Auswahl der sgRNAs sowohl bei dem Kandidaten *TRN1* als auch bei den anderen Kandidaten beachtet.

Aufgrund der unterschiedlichen Ereignisse in jeder Zelle konnten mehrere unterschiedliche Nukleotide an der gleichen Position der Sequenzierung detektiert werden. Aus diesem Grund erwies sich eine Überprüfung der Sequenz von PCR-Produkten, die von genomischer DNA amplifiziert wurden, als aussagekräftigste Methode zur Überprüfung der Mutagenese. Insgesamt konnte auf DNA-Ebene die Mutation der Kandidatengene in Form einer Überlagerung von Signalen, einer verringerten Signalintensität oder der Amplifikation eines kleineren Fragments detektiert werden. Eine wie oben vorgeschlagene Verifizierung auf Proteinebene erscheint im Rahmen dieser Resultate demnach unnötig.

5.1.3 Mögliche Funktion neu ausgewählter Kandidaten im RNA-*silencing*

Im Folgenden sollen die Funktionen neuer Kandidaten nach der präzisierten Auswertung, in der die Kandidaten durch drei proteotypische Peptide vertreten sind, als AGO-assoziiertes Protein oder RISC-Kandidaten diskutiert werden (Tabelle 4.2). Diese Kandidaten konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr analysiert werden und sollten Zielstellung weiterführender wissenschaftlicher Abhandlungen sein. Die Kandidaten sollen jedoch trotzdem mit Hilfe der zuvor erwähnten Kriterien wie der Eigenschaft, RNA zu binden, einer AGO-ähnlichen Lokalisation oder einer im Zusammenhang mit dem RNA-*silencing* stehenden Funktion, evaluiert werden.

Der *N. tabacum*-Kandidat mit dem Namen *WD40-repeat-containing domain* (Nitab4.5_0001831g0090.1) ist ein Homolog des *A. thaliana*-Proteins *Elongator complex protein 1* (AT5G13680.1), das im Zusammenhang mit der Regulation des Abscisinsäure-abhängigen Schließens der Stomata und der Samenkeimung steht. Als Pol II-bindendes Protein spielt das *A. thaliana*-Homolog eine Rolle bei der Acetylierung der Histone (Ding und Mou 2015). Auch für *AtAGO1* wurde eine Interaktion mit den Pol II-Komplex-Untereinheiten beschrieben (Bajczyk *et al.* 2019). Diese Interaktion zur Pol II und die damit einhergehende Rolle in der Modifikation von Chromatin würde eventuell erklären, warum DNA-abhängige RNA-Polymerasen, wie zum Beispiel Pol V (Nitab4.5_0000307g0250.1), sowie Chromatin-modulierende Proteine in den Daten gefunden wurden. Die RNA-Polymerase V (Pol V) spielt eine Rolle beim transkriptionellen *gene silencing* (Carbonell 2017).

Der Kandidat *Ankyrin repeat-containing domain* (Nitab4.5_0003481g0090.1) ist als E3-Ubiquitin-Ligase im ABA-Signalweg involviert und spielt vermutlich auch eine Rolle bei der pflanzlichen Immunität (Gu und Innes 2012; Stone *et al.* 2006). Eine Identifizierung einer Ubiquitin-Ligase war aufgrund der RING-Typ E3-Ubiquitin-Ligase, welche *Drosophila melanogaster* AGO1, dass nicht mit siRNA beladen ist, ubiquitiniert, von Interesse. Außerdem ist bekannt, dass das *Arabidopsis*-F-box-Protein FBW2 über einen Proteasom-unabhängigen Mechanismus auf unbekannte Weise als Negativregulator von AGO1 wirkt (Earley *et al.* 2010; Kobayashi *et al.* 2019). Hier wäre allerdings der funktionelle Nachweis der Bedeutung eines solchen Proteins mittels CRISPR-Cas9 schwierig, da eine Depletion eines solchen Kandidaten die Aktivität des AGO-Proteins nicht verringert, sondern erhöht, und folglich auch das *silencing* des Reportergens nicht beeinflusst. Alternativ könnte eine Überexpression des Kandidaten die Menge des AGO-Proteins negativ beeinflussen, wodurch auch das *silencing* des Reporters negativ beeinflusst wäre.

Die Proteinsequenzen der beiden Kandidaten mit den Einträgen *P-loop-containing nucleoside triphosphate hydrolase* (Nitab4.5_0008709g0020.1) und *RNA helicase UPF1, UPF2-interacting domain* (Nitab4.5_0005487g0030.1) sind zu 91 % identisch und

entsprechen zu 80 % dem *Arabidopsis*-Protein *up-frameshift protein 1* (UPF1), das eine entscheidende Rolle im *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) spielt (Culbertson und Leeds 2003). NMD ist ein Kontrollmechanismus, bei dem mRNAs auf falsche Stopcodone, auch als *premature translational termination codons* bezeichnet, überprüft und gegebenenfalls abgebaut werden (Culbertson und Leeds 2003). Diese Kandidaten könnten aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu UPFs aus Hefe von Interesse sein. Für das *Arabidopsis*-Protein UPF1 wird eine Verbindung zu RNAi vermutet, da in *upf1*-Mutanten das *silencing* des an der Blütenentwicklung beteiligten *AP3* Gens ausbleibt (Arciga-Reyes *et al.* 2006).

RACK1, das homolog zu dem Kandidaten *WD40-repeat-containing domain* (Nitab4.5_0000150g0090.1) ist, ist als *scaffold*-Protein Bestandteil vieler Komplexe in der Zelle, wie zum Beispiel der 40S-ribosomalen Untereinheit, hat selbst jedoch keine enzymatische Aktivität (Adams *et al.* 2011; Gibson 2012). Des Weiteren beeinflusst RACK1 in *Arabidopsis* die Anreicherung von pre-miRNAs und reifer miRNA, indem es mit SERRATE interagiert und bestimmte pre-miRNA stabilisiert. Im Cytosol ist es Teil des AGO1-Komplexes. Einen Einfluss auf die miRNA-vermittelte Hydrolyse durch AGO1 hat RACK1 in *Arabidopsis* allerdings nicht (Speth *et al.* 2013).

Der Kandidat *small ubiquitin-related modifier* (Nitab4.5_0000477g0030.1) war als SUMO-Peptidase von Interesse, da die humane SUMO-Peptidase Nucleoporin Nup358 als Interaktionspartner von humanen AGO-Proteinen eine essenzielle Rolle beim miRNA-vermittelten mRNA-Abbau in HeLa-Zellen spielt (Sahoo *et al.* 2017). Des Weiteren hat die SUMOylierung des humanen AGO2 einen stabilisierenden Effekt auf das Protein (Sahin *et al.* 2014).

Die hier beschriebenen Kandidaten sollten daher nach weiterer Optimierung des RISC-Aktivitäts-Assays oder des In-vivo-Fluc-*silencing*-Systems auf eine potenzielle Funktion im RISC getestet werden.

5.2 DNA-dirigierte RNA-Spaltung

5.2.1 Pflanzliche AGO-Proteine werden nicht zu einem DNA-*induced-silencing-complex* (DISC) programmiert

Vor dem Hintergrund der Evolutionstheorie wird vermutet, dass aus Ribozymen Retroviren entstanden sind. Retroviren benötigen die reverse Transkription ihrer RNA in DNA und damit einhergehend einen Abbau der Template-RNA, katalysiert durch die RNase H-Domäne der reversen Transkriptase. Diese RNase H-Domäne kommt in Eukaryoten, Prokaryoten und Viren vor. Eine mögliche Entwicklung bestand darin, dass sich aus der Replikationsmaschinerie der Retroviren, aufgrund des Abbaus der RNA in Anwesenheit der *antisense*-DNA, *silencing*-Mechanismen gegenüber Viren entwickelt haben könnten. Auch die PIWI-Domäne von AGO-Proteinen entspricht einer RNase H-Domäne, weshalb AGOs zu der RNase H-like-Superfamilie gehören (Moelling *et al.* 2017). Bei Ago-Proteinen in Prokaryoten wurde beobachtet, dass sie einzelsträngige DNA-Oligonukleotide binden und RNA-*targets* endonukleolytisch hydrolysieren. Unter den prokaryotischen Vertretern sind die zuvor erwähnten bakteriellen Ago-Proteine aus *Aquifex aeolicus* und aus *Thermus thermophilus* sowie das Ago des Archaeons *Methanocaldococcus jannaschii* gut untersucht (Sheng *et al.* 2014; Willkomm *et al.* 2016; Yuan *et al.* 2005). Es wird vermutet, dass sie eine Rolle im prokaryotischen Immunsystem spielen und DNA-dirigiert fremde DNA oder RNA, wie zum Beispiel die von Phagen, transposablen Elementen oder Plasmid-DNA, abwehren (Makarova *et al.* 2009; Swarts *et al.* 2014). Kristallstrukturen der AGO-Proteine aus *T. thermophilus* und aus dem Menschen zeigen die Ähnlichkeit in den einzelnen Domänen und der Gesamtheit des Proteins und weisen somit auf eine mögliche evolutionäre Entwicklung der eukaryotischen AGO-Proteine aus den prokaryotischen AGO-Proteinen hin. Des Weiteren deutet die strukturelle Ähnlichkeit zwischen den AGO-Proteinen aus *T. thermophilus* und aus dem Menschen auf die Möglichkeit hin, dass das humane AGO2 eine DNA-dirigierte endonukleolytische Hydrolyse eines RNA-*targets* induzieren kann (Elkayam *et al.* 2012; Schirle und MacRae 2012; Willkomm *et al.* 2016). Die PAZ-Domäne ist für die Bindung des 3'-Endes der siRNA verantwortlich und bindet im Fall des *Drosophila*-AGO1 und des humanen AGO2 neben RNA auch DNA (Lingel *et al.* 2004; Yan *et al.* 2003). Demgegenüber ist die Formierung eines DISC aus struktureller Sicht eher unwahrscheinlich, da die hydrophilere *guide*-Binde-Tasche des humanen AGO2 im Vergleich zu der des bakteriellen Agos *guide*-DNA mit geringer Affinität bindet (Schirle und MacRae 2012; Willkomm *et al.* 2016). Eine zelluläre Funktion des mit einem DNA-Molekül assoziierten humanen AGO2-Proteins ist nicht beschrieben.

Eine Programmierung von pflanzlichen AGO-Proteinen zu einem DISC ist ebenfalls nicht bekannt, liegt aber aufgrund einer möglichen evolutionären Entwicklung aus prokaryotischen Agos nahe. Für das pflanzliche AGO-Protein wurde eine Assoziation zu

einem DISC beschrieben. So beobachteten Nowak *et al.* bei einer Co-Inokulation von dsDNA bzw. einer siDNA und TMV einen Schutz in *Nicotiana tabacum* gegenüber der TMV-Infektion und vermuteten, dass AGO dabei eine Rolle spielt. Im Fall des 470 bp langen dsDNA-Fragments wurde vermutet, dass eine Prozessierung von DCL in siDNAs stattfindet (Nowak *et al.* 2009). Voinnet *et al.* sowie Palauqui und Balzergue beobachteten nach Einbringen eines DNA-Konstrukts ohne Promotor als Plasmid, PCR-Produkt oder als Einzelstrang in *sense*- oder *antisense*-Orientierung in *Nicotiana spec.* ein DNA-induziertes post-transkriptionelles *silencing*. Der zugrundeliegende Mechanismus ist unbekannt. Möglicherweise existieren noch AGO-unabhängige Wege, durch die DNA-vermitteltes *silencing* erfolgt (Palauqui und Balzergue 1999; Voinnet *et al.* 1998). Ein PCR-Fragment hatte in dem Farn *Adiantum capillus-veneris* einen *silencing*-Effekt auf das Gen *PHOTOTROPIN2*, was phänotypisch beobachtet und durch eine Reduktion der mRNA-Menge detektiert werden konnte (Kawai-Toyooka *et al.* 2004). Auf welche Weise diese dsDNA eine Wirkung erzielte, ist nicht bekannt. Visualisiert mittels GFP konnte die Verbreitung des *silencing*-Signals, das in Zellen generiert wurde, die die fremde DNA erhalten hatten, durch verschiedene Pfropf-Versuche bestätigt werden (Palauqui und Balzergue 1999; Voinnet *et al.* 1998). Wie zuvor beschrieben, beobachteten Nowak *et al.* eine Prozessierung von dsDNA. Inwiefern eine 21 nt lange ssDNA oder eine siDNA an der endonukleolytische Hydrolyse einer *target*-RNA beteiligt sind, konnte in dem verwendeten In-vitro-System BYL untersucht werden. Eine siRNA-abhängige endonukleolytischen Hydrolyse der *target*-RNA im BYL erfolgte nur bei Generierung von AGO-Protein durch In-vitro-Translation. Eine durch 21 nt lange ssDNA und dsDNA induzierte Hydrolyse fand überraschenderweise unabhängig von der AGO-Supplementierung statt und resultierte in einem kleineren 3'-Fragment verglichen mit dem 3'-Fragment der AGO-abhängigen endonukleolytischen Hydrolyse (siehe Abbildung 4.8). Es ist möglich, dass ein im BYL vorhandenes AGO-Protein an dieser Hydrolyse beteiligt ist und unterschiedliche Spaltmuster in Abhängigkeit vom Vorhandensein von kleinen RNA- bzw. DNA-Molekülen generiert. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Hydrolyse durch weitere, bislang nicht identifizierte Proteine im BYL katalysiert wurde. Aufgrund dessen, dass die durch dsDNA und ssDNA induzierten Spaltmuster identisch waren, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass in beiden Fällen das gleiche Protein an der Hydrolyse der *target*-RNA involviert ist. Der eingesetzte Doppelstrang wurde dabei nach der Hybridisierung über ein natives Polyacrylamidgel gereinigt, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass der *antisense*-Strang als ssDNA wirkt.

Die unterschiedlichen pflanzlichen AGOs präferieren unterschiedliche 5'-Nukleotide des *guide*-Strangs und unterschiedliche siRNA-Längen (Mi *et al.* 2008). Im Fall der ssDNA-abhängigen endonukleolytischen Hydrolyse konnte keine Präferenz hinsichtlich des

5'-Nukleotids und der Länge der ssDNA beobachtet werden (Abschnitt 4.2.2). Dieses Ergebnis stellte in Frage, ob im BYL ein AGO-Protein mit einer 21 nt langen ssDNA wirkt. Die Studie einer Mg^{2+} -Abhängigkeit bei der endonukleolytischen Hydrolyse lässt nicht zwischen den Proteinen AGO und RNase H unterscheiden. Aufgrund der unterschiedlichen Effekte nach Zugabe von 2 mM EDTA scheint es allerdings eine unterschiedlich ausgeprägte Abhängigkeit von Mg^{2+} -Ionen zu geben (siehe Abschnitt 4.2.3). Die im BYL gezeigte Mg^{2+} -abhängige endonukleolytische Hydrolyse ist ein Hinweis auf ein Mg^{2+} -abhängiges Enzym.

Die Vermutung, dass es sich um kein AGO-Protein handelt, wird dadurch untermauert, dass nach IP von AGO2, AGO5 und AGO7, welche mit ssDNA beladen werden sollten, keine Spaltaktivität detektiert werden konnte (siehe 4.2.4). Im Fall von AGO1 und AGO10 war dagegen kein Protein nach der IP nachweisbar. Inwiefern AGO eine dsDNA binden kann, müsste allerdings mittels IP, einem *loading assay* oder *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) überprüft werden. Es kann vermutet werden, dass ein anderes Protein in Verbindung mit einer ssDNA wirkt.

5.2.2 RNase H katalysiert DNA-abhängige die endonukleolytische Hydrolyse einer RNA im BYL

Entsprechend wurde der Vermutung nachgegangen, ob RNase H, die für die Hydrolyse von RNA in RNA/DNA-Heteroduplexen verantwortlich ist (Hyjek *et al.* 2019), auch im BYL aktiv sein könnte. Die DNA-abhängige Hydrolyse einer *target*-RNA im BYL resultierte in ein vergleichbares Fragmentmuster wie die durch eine *E. coli*-RNase HI von NEB katalysierte endonukleolytische Hydrolyse (siehe Abbildung 4.11). Dies war ein Hinweis auf eine RNase H-induzierte, von einer ssDNA-abhängige Hydrolyse. Ähnliche Beobachtungen wurden mit dem Zellextrakt Krebs-2 Aszites Tumorextrakt und dem *Rabbit Reticulocyte Lysate* gemacht, in denen eine ssDNA-abhängige Hydrolyse der viralen RNA von PVX und TMV erfolgte (Crum *et al.* 1988; Miroshnichenko *et al.* 1988). Auch HeLa-Extrakte und Weizenkeimextrakt dienten zur Untersuchung der RNase H-abhängige Hydrolyse von Heteroduplexen (Cazenave *et al.* 1987; Pileur *et al.* 2000). Die Aktivität einer RNase H bei der Generierung der dsDNA-abhängigen Immunität in *N. tabacum* gegen TMV war auch eine Vermutung von Nowak *et al.*, allerdings konnten die Autoren diese Immunität nicht bei der Applikation von einzelsträngigen *antisense*-DNA-Oligonukleotiden, sondern nur mit dsDNA und siDNA beobachten. Dieses Ergebnis spricht dagegen, dass eine RNase H bei diesen Beobachtungen eine Rolle spielt (Nowak *et al.* 2009).

Weitere Indizien für eine DNA-induzierte, AGO-unabhängige Hydrolyse stellen die Resultate zur Charakterisierung der Spaltstelle dar (siehe 4.2.6 und siehe 4.2.7). AGO hydrolysiert das RNA-*target* zwischen den Nukleotiden, die mit den Positionen 10 und 11

des *guide*-Strangs der siRNA Basenpaarungen bilden (Haley und Zamore 2004). Im Gegensatz zur AGO-abhängigen endonukleolytischen Hydrolyse erfolgt die RNase H-abhängige Hydrolyse im 5'-Bereich der Heteroduplex-formierenden *target*-RNA, was den im BYL generierten Spaltfragmenten entsprach. Aus diesem Grund wird angenommen, dass es sich bei der DNA-induzierten Hydrolyse im BYL nicht um eine AGO-, sondern um eine RNase H-abhängige Aktivität handelt.

5.2.3 Unterscheidung zwischen RNase H1 und H2 aufgrund des Hydrolysebereichs in der *target*-RNA

In Eukaryoten sind zwei RNase H-Proteine, RNase H1 und RNase H2, vertreten. Wie schon erwähnt unterscheiden diese sich in ihrer Struktur, Funktion und ihren Eigenschaften (Hyjek *et al.* 2019). Aufgrund der identifizierten Spaltstelle des GFP- und des 27 nt langen RNA-*targets* kann diskutiert werden, ob es sich um eine RNase H1- oder eine RNase H2-abhängige endonukleolytische Hydrolyse handelt.

Zunächst soll die Bindung des Heteroduplexes durch RNase H1 durch die Hybrid-Binde-Domäne (HBD) und die RNase H-Domäne diskutiert werden.

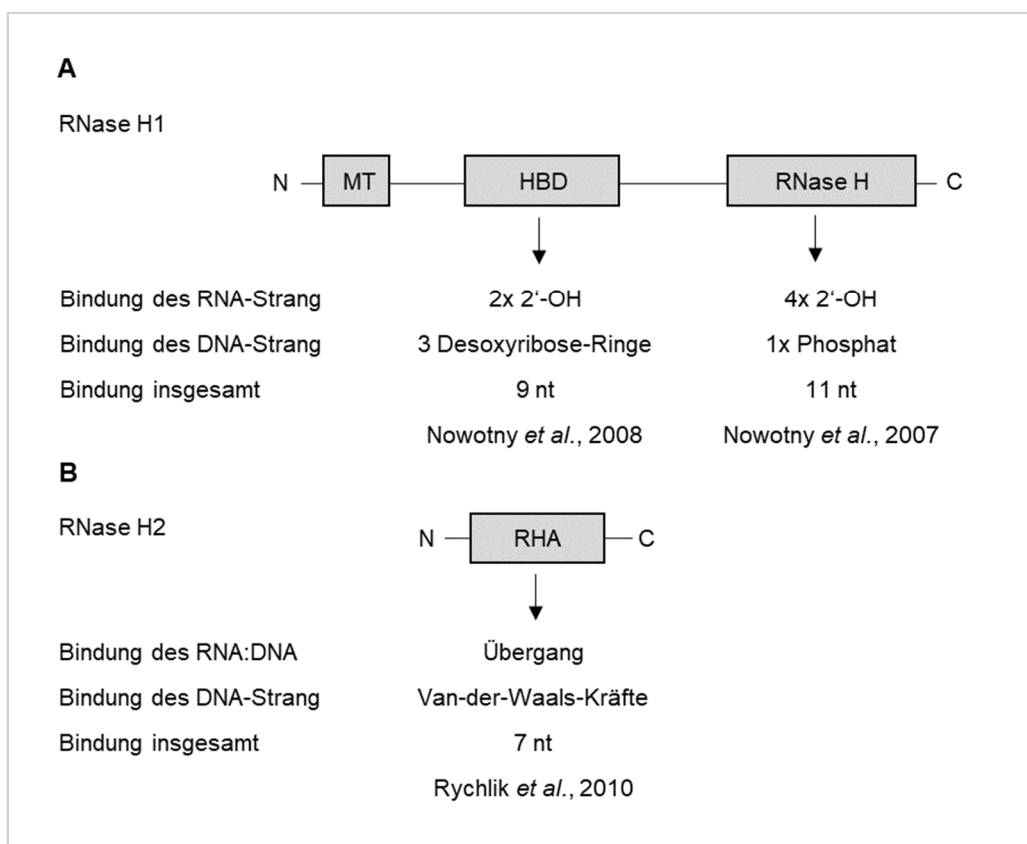


Abbildung 5.1: Überblick über die möglichen RNase H-Nukleinsäure-Bindungen und ihre in der Literatur beschriebenen Spaltmuster.
(A) Schematische Darstellung des RNase H1-Proteins mit der Mitochondrien-*target*-Sequenz (MT), der Hybrid-Binde-Domäne (HBD) und der H-Domäne. Zusammengefasst ist die Substratbindung durch die HBD und RNase H-Domäne. **(B)** Schematische Darstellung der RNase H2-Untereinheit A und ihrer Substratbindung.

Die HBD bindet, wie in Abbildung 5.1 dargestellt, zwei 2'-OH-Gruppen des RNA-Strangs und drei Desoxyribose-Heterozyklen des DNA-Strangs, sodass fünf Nukleotide gebunden werden. Insgesamt werden neun Nukleotide des Duplexes von der HBD überspannt (Nowotny *et al.* 2008). In dieser Arbeit wurde die endonukleolytische Hydrolyse einer 433 nt langen GFP-*target*-RNA in Abhängigkeit von einem ASO, dessen Sequenz dem *guide*-Strang der gf698-siRNA entspricht, untersucht (Abschnitt 4.2.6). Aufgrund der Spaltung des GFP-*targets* ab dem zweiten Nukleotid der RNA-Sequenz im Heteroduplex ist eine Bindung des Heteroduplexes durch die HBD der RNase H1 eher unwahrscheinlich. In dem verwendeten 27 nt langen *target* findet die Hydrolyse vorrangig in der Heteroduplexstruktur nach 8–10 nt ausgehend vom 5'-Ende der *target*-RNA statt, wodurch eine Bindung im 5'-Bereich des *targets* durch die HBD möglich wäre. Diese Bindung durch die HBD kann jedoch aufgrund der unveränderten Position der Spaltstelle trotz 3'-seitiger Verkürzung des Oligonukleotids (siehe 4.2.7) und der daraus folgenden kürzeren Heteroduplexstruktur ausgeschlossen werden.

Eine andere Möglichkeit, nämlich die, dass die HBD die *target*-RNA dennoch bindet, ist aufgrund der Flexibilität zwischen der HBD und der H-Domäne in Betracht zu ziehen. Es wird vermutet, dass die H-Domäne nach der Spaltung vom Heteroduplex dissoziiert und eine weitere Spaltung an einer anderen Stelle im Heteroduplex katalysiert (Nowotny *et al.* 2008). Inwiefern eine Hydrolyse 5'-seitig der HBD-Bindestelle möglich ist, ist unbekannt. Durch Bindung des Heteroduplexes fördert die HBD zwar die Aktivität der RNase H1, ist jedoch nicht essenziell dafür. Aus diesem Grund kann auch die eigenständige Bindung der H-Domäne diskutiert werden. Die H-Domäne bindet ebenfalls den Heteroduplex, indem beim RNA-Strang die 2'-OH-Gruppen von vier aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden und beim DNA-Strang ein Phosphatrest und insgesamt sieben Desoxyribonukleotide gebunden werden (siehe Abbildung 5.1). Die Bindung des Phosphats, welches im DNA-Strang zwei Nukleotide 3'-seitig der Spaltstelle liegt, ist am bedeutendsten für die Bindung des DNA-Strangs (Nowotny *et al.* 2007). In diesem Fall könnte es sein, dass die ersten Nukleotide 5'-seitig des GFP-RNA-*targets* im GFP-*target* / ASO-Duplex ausschließlich durch die H-Domäne der RNase H1 gebunden und hydrolysiert werden.

In der Literatur sind verschiedene Spaltmuster für RNase H1 beschrieben, die sich zum Teil widersprechen. Diese sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Überblick über die möglichen in der Literatur beschriebenen RNase H1-Spaltmuster.
Die der Literatur entsprechenden (+) oder nicht entsprechenden (-) Hydrolysen sind gekennzeichnet.

Spaltung	Beschriebener Hydrolysebereich	Länge des Heteroduplex / <i>target</i> -RNA	In dieser Arbeit beobachtetes Ergebnis
Pileur <i>et al.</i> , 2000	3'-Bereich	20 bp	-
Gaidamakov <i>et al.</i> , 2005;	5–10 nt	18 bp	+
Chon <i>et al.</i> , 2009	5–8 nt	20 bp	+
Wu <i>et al.</i> ; 2001	7–10 nt	17 bp	+
Lima <i>et al.</i> , 2003	Verkürzen = Verschieben	25 nt	-

Anhand dieser Spaltmuster soll diskutiert werden, ob es sich bei der Aktivität im BYL um eine RNase H1 handeln könnte. Zusammenfassend wurde von unterschiedlichen Gruppen für die RNase H1-abhängige endonukleolytische Hydrolyse gezeigt, dass die *target*-RNA von RNase H1 zwischen den Nukleotiden 5 bis 10 bei einem Heteroduplex mit einer Länge von 17 bis 20 bp hydrolysiert wird (Chon *et al.* 2009; Gaidamakov *et al.* 2005; Wu *et al.* 2001). In dieser Arbeit wurde die Hydrolyse einer 433 nt langen GFP- und einer 27 nt langen *target*-RNA (siehe 4.2.6 und siehe 4.2.7) in Abhängigkeit von gf698-ASOs im BYL untersucht. Die GFP-*target*-RNA wurde nach den Nukleotiden zwei bis fünf hydrolysiert. Dieses beschriebene Muster stimmt nur teilweise mit dem Muster der RNase H1-induzierten endonukleolytischen Hydrolyse überein. Die 27 nt lange *target*-RNA wurde nach den Nukleotiden acht bis zehn, gezählt vom 5'-Ende, hydrolysiert. Die Entstehung von kürzeren Produkten durch Spaltungen an Positionen acht bis zehn, gezählt vom 5'-Ende, könnte ein Hinweis auf eine RNase H1-abhängige Spaltung sein.

Gegen eine RNase H1-induzierte endonukleolytische Hydrolyse spricht die Beobachtung von Pileur *et al.*, wonach RNase H1 eine *target*-RNA im Heteroduplex mit einer Länge von 20 nt nahe des 3'-Endes und RNase H2 eine *target*-RNA im Heteroduplex nahe des 5'-Endes hydrolysiert (Pileur *et al.* 2000). Sowohl das GFP- als auch das 27 nt lange *target* wurden im Bereich des 5'-Endes der *target*-RNA im Heteroduplex geschnitten. Im Fall einer RNase H1-abhängigen Hydrolyse müsste sich außerdem die Position der Hydrolyse um ein Nukleotid verschieben, sobald das ASO am 3'-Ende um ein Nukleotid verkürzt wird, damit eine Duplexstruktur bestehend aus 7 nt vor der Spaltstelle erhalten bleibt (Lima *et al.* 2003). Diese Verschiebung konnte mit dem 27 nt langen *target* und den verkürzten ASOs nicht entsprechend den Ergebnissen von Lima *et al.* beobachtet werden. Allerdings war bei diesem Versuch auffällig, dass sich die Sequenz CAU, die sich bei der Verwendung der längeren ASOs (21–27 nt) als die bevorzugte Spaltstelle darstellte, im Bereich der verschobenen Spaltstelle wiederholte. Unter RNase H-Endonukleasen besteht keine Sequenzspezifität, allerdings wird eine Sequenz-Präferenz durch RNase H vermutet (Hyjek

et al. 2019). Für die humane RNase H1 wurde zum Beispiel eine bevorzugte Spaltung zwischen den Nukleotiden G und U im RNA-*target* beschrieben (Wu *et al.* 1999).

Im Folgenden soll die Bindung des Heteroduplexes durch RNase H2 und die Möglichkeit einer RNase H2-induzierten Hydrolyse diskutiert werden. Wie in Abbildung 5.1 dargestellt, werden insgesamt sieben Basenpaare durch die prokaryotische RNase HII gebunden (Rychlik *et al.* 2010). RNase HII erkennt vorrangig RNA:DNA-Übergänge. Hier spielt vor allem die Bindung der 2'OH-Gruppe des Ribonukleotids und die Art (Ribonukleotid oder Desoxyribonukleotid) des 3'-seitigen Nukleotids eine Rolle. Die Erkennung des RNA:DNA-Übergangs ist bei der eukaryotischen RNase H2 im Vergleich zu der prokaryotischen RNase HII weniger spezifisch, infolgedessen wird das Fehlen von Desoxyribonukleotiden toleriert (Figiel *et al.* 2011; Rychlik *et al.* 2010; Shaban *et al.* 2010). Die Spaltung von durchgängig aus Ribonukleotiden bestehenden *targets* ist also nicht auszuschließen. Der komplementäre Strang des Substrats bzw. das ASO wird vermutlich nur über van-der-Waals-Kräfte gebunden (Figiel *et al.* 2011).

Des Weiteren ist für die RNase H2 aus unterschiedlichen Organismen, wie in Tabelle 5.2 dargestellt, beschrieben, dass eine endonukleolytische Hydrolyse der RNA in einem 20 bp langen RNA/DNA-Heteroduplex nach den Nukleotiden 6–9 und 13–16 stattfindet (Chon *et al.* 2009; Jeong *et al.* 2004). Die Studien von Pileur *et al.* ergaben eine Hydrolyse nach 6 und 8 nt gezählt vom 5'-Ende des RNA-*targets* (Pileur *et al.* 2000).

Tabelle 5.2: Überblick über die möglichen in der Literatur beschriebenen RNase H2-Spaltmuster. Die der Literatur entsprechenden (+) oder nicht entsprechenden (-) Hydrolysen sind gekennzeichnet.

Publikation	Beschriebener Hydrolysebereich	Länge des Heteroduplex	In dieser Arbeit beobachtetes Ergebnis
Pileur <i>et al.</i> , 2000	6 und 8 nt	20 bp	+ und -
Chon <i>et al.</i> , 2009	6-9 nt und 13-16 nt	20 bp	+ und -

Somit würde die beobachtete Spaltung des GFP-*targets* und des 27 nt langen *targets* im 5'-Bereich mit dem in der Literatur beschriebenen Muster übereinstimmen. Dagegen konnte bei den 10 analysierten 3'-Enden der 5'-Spaltprodukte des GFP-*targets* keine Hydrolyse im 3'-Bereich der *target*-RNA im Heteroduplex beobachtet werden. Chon *et al.* beschreiben diese als die präferierte Hydrolyse (Chon *et al.* 2009). Eine Möglichkeit könnte sein, dass die Spaltstelle aufgrund der geringen Anzahl der Klone nicht detektiert werden konnte. Auf Grundlage der vorliegenden Literatur und den in dieser Arbeit beobachteten Spaltmustern ist es schwierig, eine eindeutige Aussage über die Unterschiede in der endonukleolytischen Hydrolyse zwischen RNase H1 und H2 zu machen. Aus diesem Grund wird in Betracht gezogen, dass beide RNasen im BYL für die Ergebnisse verantwortlich sind.

5.2.4 Unterscheidung zwischen RNase H1 und H2 aufgrund der Spaltung verschiedener DNA:RNA:DNA-*targets*

Unter Verwendung von artifiziellen Substraten wurde eine weitere Charakterisierung der endonukleolytischen Hydrolyse im BYL vorgenommen. Die Substrate bestanden aus Desoxyribonukleotiden (D) und Ribonukleotiden (R), die sich in der Anzahl und der Position unterschieden und wie folgt bezeichnet werden: D₉R₁D₁₇, D₈R₂D₁₇, D₉R₂D₁₆, D₈R₄D₁₅ und D₉R₄D₁₄ (Abbildung 5.2). Es ist bekannt, dass RNase H1 und H2 DNA-*targets* mit unterschiedlicher Anzahl an Ribonukleotiden auf unterschiedliche Weise hydrolysieren. RNase H1 bindet die 2'-OH-Gruppen von vier aufeinanderfolgenden Ribonukleotiden. Aufgrund dieser Eigenschaft muss ein DNA-*target* als Substrat für RNase H1 vier Ribonukleotide enthalten, da ansonsten keine Bindung durch die RNase H-Domäne erfolgt (Nowotny *et al.* 2007). Bekannte Modellstrukturen von RNase H2 erklären die beobachtete Spaltung 5'-seitig des Ribonukleotids, indem die einzelne 2'-OH-Gruppe sowie die Abwesenheit einer weiteren 2'-OH-Gruppe des 3'-seitigen Desoxyribonukleotids spezifisch erkannt werden. Die Anordnung der Metallionen in dem Protein führt dazu, dass 5'-seitig des gebundenen Ribonukleotids der nukleophile Angriff stattfindet (Rychlik *et al.* 2010; Shaban *et al.* 2010). Es wurde für RNase H2 beschrieben, dass für die Hydrolyse eines DNA:RNA₁:DNA-*targets* eine Nukleotidpräferenz in der Rangfolge rA>rU>rC>rG vorliegt (Eder *et al.* 1993).

Die putativ im BYL vorhandene RNase H hydrolysiert ein Substrat aus DNA:RNA₁:DNA 5'-seitig des einzelnen Ribonukleotids. Die endonukleolytische Hydrolyse von diesem *target* ist eine RNase H2-spezifische Hydrolyse. Zur Hydrolyse des *targets* D₉R₁D₁₇ ist eine Duplexstruktur 5'-seitig des Ribonukleotids essenziell (siehe Abschnitt 4.2.9). Die Toleranz hinsichtlich einer fehlenden Basenpaarung des Ribonukleotids entspricht den Ergebnissen Eders und Walders für RNase H2. Das Ergebnis hinsichtlich einer Basenfehlpaarung des Desoxyribonukleotids 5'-seitig des Ribonukleotids deckt sich jedoch nicht mit dem Resultat von Eder und Walder, denn dort wurde im Vergleich zu dem vollständig komplementären ASO und zu den anderen nicht vollständig komplementären ASOs eine ineffizientere Hydrolyse detektiert, wohingegen die Hydrolyse in der vorliegenden Arbeit völlig inhibiert war (Eder und Walder 1991). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit verwendeten Eder und Walder allerdings humanes rekombinantes Protein. Inwiefern eine Basenfehlpaarung die Hydrolyse inhibiert, kann derzeit mit den Modellstrukturen von RNase H2 nicht erklärt werden, da das ASO höchstwahrscheinlich nur über van-der-Waals-Kräfte mit dem Rückgrat des Proteins interagiert und eine Bindung / Erkennung dadurch nicht beeinflusst werden sollte (Rychlik *et al.* 2010). Allerdings ist die Heteroduplexstruktur 5'-seitig des Ribonukleotids zur Substraterkennung, Bindung oder Hydrolyse essenziell.

Targets mit zwei Ribonukleotiden werden zwischen den beiden Ribonukleotiden und 5'-seitig des ersten Ribonukleotids gespalten. Die endonukleolytische Hydrolyse der *targets* mit zwei Ribonukleotiden ist ein Hinweis darauf, dass eine RNase H2 im BYL vorliegt (Abbildung 5.2). Bei der Hydrolyse des *targets* D₈R₂D₁₇ lief das 5'-Spaltfragment im Polyacrylamid-Gel etwas langsamer als das 5'-Spaltfragment des DNA-*targets* D₉R₁D₁₇. Dieser Unterschied kommt wahrscheinlich durch das am 5'-Spaltfragment verbliebene Ribonukleotid zustande. Die Hydrolyse des *targets* D₈R₂D₁₇ an einer Position und des *targets* D₉R₂D₁₆ an zwei Positionen kann mit der für RNase H2 zuvor beschriebenen Nukleotidpräferenz erklärt werden. Möglicherweise wird das *target* D₈R₂D₁₇ mit einem rC und rA aufgrund des weniger bevorzugten rCs nur zwischen den zwei Ribonukleotiden hydrolysiert. Bei dem *target* D₉R₂D₁₆ mit einem rA und rU wird die Phosphodiester-Bindung 5'-seitig des rAs bevorzugt hydrolysiert, ein weiterer Schnitt erfolgt 5'-seitig des rUs (Abbildung 5.2B).

Die bei DNA-*targets* mit vier Ribonukleotiden entstandenen Spaltmuster sind sowohl RNase H1 als auch RNase H2 zuzuordnen. Das *target* D₈R₄D₁₅ wird 5'-seitig des zweiten und dritten Ribonukleotids gespalten. Die Spaltung 5'-seitig des dritten Ribonukleotids weist auf eine RNase H1-Aktivität hin (Eder und Walder 1991). Cerritelli und Crouch beschreiben im Fall für RNase H1 auch eine Hydrolyse 5'-seitig des zweiten Ribonukleotids, allerdings wird dieses Ergebnis von keinen weiteren experimentellen Studien unterstützt (Cerritelli und Crouch 2009).

Das *target* D₉R₄D₁₄ wird 5'-seitig aller vier Ribonukleotide hydrolysiert. Die Hydrolyse des *targets* D₉R₄D₁₄ des zweiten und vierten Ribonukleotids könnte durch die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der RNase H2 verursacht worden sein (Cerritelli und Crouch 2009). Allerdings konnte anhand der Aktivität der immunpräzipitierten RNase H2 eindeutig gezeigt werden, dass die *targets*, welche vier Ribonukleotide enthalten, kein Substrat für diese RNase H2 sind. Aus diesem Grund wird eine Hydrolyse dieser *targets* durch RNase H1 angenommen. Die Hydrolyse 5'-seitig des ersten Ribonukleotids des *targets* D₉R₄D₁₄ kann nicht durch die in der Literatur beschriebenen Daten erklärt werden. Eine Spaltung durch RNase H1 ist unwahrscheinlich, da die Interaktion mit den Mg²⁺-Ionen an dem Phosphat des zweiten Ribonukleotids stattfindet. Eine Interaktion mit dem Phosphat des ersten Ribonukleotids wäre vermutlich nicht möglich. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass RNase H1 wirklich 5'-seitig des zweiten Ribonukleotids hydrolysiert und das letzte Ribonukleotid des 5'-Spaltfragments durch eine andere RNase abgespalten wird (Abbildung 5.2).

Die diskutierten Daten weisen insgesamt darauf hin, dass im BYL Aktivitäten sowohl von RNase H1 als auch von RNase H2 vorliegen.

A		B		
Substrat	Beobachtetes Hydrolysemuster	Mögliche RNase	Erwartetes Hydrolysemuster	Erklärung für das Hydrolysemuster
D ₉ R ₁ D ₁₇	*5' ggattacacA ggcatggatgaactat3'	H2	d ³² Rd	Eder und Walder, 1991
D ₈ R ₂ D ₁₇	*5' ggattacacCA ggcatggatgaactat3'	H2	dR ³² Rd	rA > rU > rC
D ₉ R ₂ D ₁₆	*5' ggattacacA ggcatggatgaactat3'	H2	dR ³² Rd	rA > rU > rC
D ₈ R ₄ D ₁₅	*5' ggattacacCAU gcatggatgaactat3'	H1	RR ³² RR	Nowotny <i>et al.</i> 2007
D ₉ R ₄ D ₁₄	*5' ggattacacCAU gcatggatgaactat3'	H1 H2	RR ³² RR R ³² RR	Spaltung vermutlich durch RNase H1, da keine Spaltung durch RNase H2 in IP-Studien beobachtet wurden.

Abbildung 5.2: Zusammenfassung der Spaltung verschiedener DNA:RNA:DNA-Substrate durch RNase H-Aktivität in BYL.

(A) Darstellung der DNA:RNA:DNA-Substrate mit unterschiedlicher Anzahl an Ribonukleotiden. Die schwarzen Striche stellen die im RNase H-Assay ermittelten Positionen, an denen die Hydrolyse erfolgte, dar. Ribonukleotide sind in schwarzen Großbuchstaben und Desoxyribonukleotide in grauen Kleinbuchstaben dargestellt. Der Stern kennzeichnet die ³²P-Markierung am 5'-Ende. (B) Auflistung der in dieser Hydrolyse vermutlich involvierten RNase, des erwarteten Spaltmusters und der möglichen Erklärung für die entsprechende RNase H-abhängige Hydrolyse.

5.2.5 Die im BYL vorhandene RNase H2 weist keine JRNase-Aktivität auf

Das *target*, das aus 10 Ribonukleotiden und 17 Desoxyribonukleotiden besteht und somit einem Okazaki-Fragment ähnelt, wurde im BYL überraschenderweise an zwei Positionen hydrolysiert. RNase H2 ist verantwortlich für die Entfernung der RNA-Primer in Okazaki-Fragmenten, indem sie 5'-seitig des 3'-terminalen Ribonukleotids schneidet. Das Verbleiben eines Ribonukleotids an dem DNA-Teil des Okazaki-Fragments ist eine charakteristische Eigenschaft für die Spaltung durch RNase H2 (Murante *et al.* 1998; Ohtani *et al.* 2008a, 2008b). Die zusätzliche Hydrolyse des *targets* 5'-seitig des vorletzten Ribonukleotids könnte mit der Tolerierung der 2'-OH-Gruppe 3'-seitig des folgenden Ribonukleotids durch die eukaryotische RNase H2 erklärt werden, oder es handelt sich in diesem Fall um eine Hydrolyse durch RNase H1 (Figiel *et al.* 2011; Ohtani *et al.* 2008a). Ohtani *et al.* zeigten, dass die *E. coli*-RNase H1 die beiden erwähnten 3'-Spaltfragmente generieren kann, während die *E. coli*-RNase HIII- und die *Thermus thermophilus*-JRNase ausschließlich ein 3'-Spaltfragment generieren, bei dem nur ein Ribonukleotid am DNA-Teil des Okazaki-Fragments verbleibt (Ohtani *et al.* 2008a). In der vorliegenden Arbeit hydrolysierte die immunpräzipitierte RNase H2 das Okazaki-Fragment ausschließlich 5'-seitig des 3'-terminalen Ribonukleotids. Dieses Ergebnis ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass das größere Spaltfragment durch RNase H2 generiert wurde. Das kleinere Spaltfragment könnte durch RNase H1 generiert worden sein.

Im Falle einer kleineren Duplexstruktur, bei der das ASO nicht den Übergang von RNA zu DNA abdeckte, erfolgte keine Hydrolyse des Okazaki-ähnlichen Fragments (siehe Absatz

4.2.10). Für die *E. coli*-RNase HII wurde gezeigt, dass der komplementäre Strang nicht die Erkennung des Übergangs von RNA zu DNA beeinflusst, wenn er auf ein oder zwei Nukleotide stromabwärts des RNA:DNA-Übergangs verkürzt wird (Ohtani *et al.* 2008a). Würde es sich bei der im BYL identifizierten RNase H2 um eine JRNase-Aktivität handeln, sollte durch ein ASO von 19 nt, das drei Ribonukleotide abdeckt, eine Hydrolyse induziert werden. Befand sich eine Basenfehlpaarung 5'-seitig des letzten Ribonukleotids (ASO B2), wurde das 5'-Spaltfragment von 9 nt nicht mehr generiert, da wie zuvor beschrieben (siehe 4.2.9) eine Duplexstruktur 5'-seitig der Spaltstelle vorliegen muss. Auch im Fall des Okazaki-ähnlichen Fragments wurden in dieser Arbeit keine Basenfehlpaarungen toleriert, wie es für die JRNase aus *Thermus thermophilus* in der Literatur gezeigt werden konnte (Ohtani *et al.* 2008b). Entsprechend ist davon auszugehen, dass es sich bei der ASO-abhängigen Hydrolyse im BYL zwar um eine RNase H2-induzierte Hydrolyse handelt, das Enzym aber keine JRNase-Aktivität hat. Die JRNase-Aktivität würde sich von der RNase H-Aktivität unterscheiden, indem sie vorrangig den RNA:DNA-Übergang statt der Duplexstruktur erkennt.

5.2.6 Die erfolgreiche Immunpräzipitation der RNase H2-Untereinheiten

Nach Überexpression und Immunpräzipitation der zwei RNase H2-Untereinheiten A und C ergab der anschließende Aktivitätstest die erwartete ASO-dirigierte RNase H2-typische Spaltung des *targets* mit einem Ribonukleotid (D₉R₁D₁₇) und dem Okazaki-ähnlichen Fragment (R₁₀D₁₇) (siehe Abschnitt 4.2.11). Im humanen Zellextraktssystem ist vor allem RNase H1 für die RNase H-abhängige Wirkung von ASOs verantwortlich (Wu *et al.* 2004). Deswegen war es durchaus überraschend, eine RNase H2-Aktivität zu detektieren und ihre Anwesenheit in Form der Co-Immunpräzipitation einzelner Untereinheiten zu bestätigen. RNase H2 wird im Allgemeinen in der Literatur nur in Form eines Trimers – bestehend aus den Untereinheiten A, B und C – als aktiv beschrieben (Chon *et al.* 2009; Jeong *et al.* 2004). Dies deckt sich mit Ergebnissen neuerer Studien, die diese Resultate durch 3D-Strukturaufklärung untermauern konnten (Figiel *et al.* 2011; Shaban *et al.* 2010). Demgegenüber zeigten ältere Studien, in welchen die RNase H2-Untereinheit A als Monomer gereinigt werden konnte, überraschenderweise eine Aktivität dieses Monomers (Frank *et al.* 1994; Qiu *et al.* 1999).

In dieser Arbeit konnten mittels Western Blot die FLAG-RH2A bzw. FLAG-RH2C-Untereinheiten immunpräzipitiert werden (Abbildung 5.3).

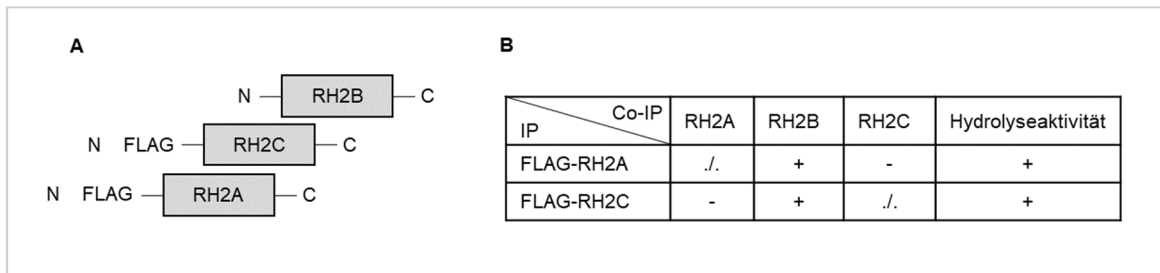


Abbildung 5.3: Darstellung der RNase H2 aus den Untereinheiten A, B, C mit entsprechender Immunpräzipitation und Spaltaktivität.

(A) Die Untereinheiten A und C wurden mit einem FLAG-tag versehen und in zwei unabhängigen Immunpräzipitationen verwendet. (B) Die nach Co-Immunpräzipitation mit FLAG-RH2A bzw. FLAG-RH2C detektierte RH2-Untereinheiten. Mittels Silberfärbung detektierte, co-immunpräzipitierte Untereinheiten wurden mit einem + versehen. Untereinheiten, welche nicht mittels Silberfärbung detektiert wurden, aber vermutlich dennoch co-immunpräzipitiert wurden, sind mit einem - gekennzeichnet. Des Weiteren ist die ASO-dirigierte *target*-RNA-Spaltung durch die (co-)immunpräzipitierten Proteine markiert (+).

Eine Co-Immunpräzipitation der Untereinheit B erfolgte aus dem BYL sowohl mit als auch ohne ihre vorherige Translation der Untereinheit B. Diese Immunpräzipitation der Untereinheit wurde durch Silberfärbung im Polyacrylamidgel nachgewiesen. Die Co-Immunpräzipitation der Untereinheit C bzw. der Untereinheit A konnte nach Immunpräzipitation von FLAG-RH2A bzw. FLAG-RH2C nicht gezeigt werden (Abbildung 5.3). Dieses Ergebnis war aufgrund der beschriebenen direkten Interaktion zwischen RH2A und RH2C unerwartet. Die Untereinheit A interagiert nur über RH2C mit der Untereinheit B (Shaban *et al.* 2010). Da die Untereinheit B nach der IP von FLAG-RH2A mittels Silberfärbung im Polyacrylamidgel nachgewiesen wurde, ist eine Präzipitation von RH2C wahrscheinlich. Eine Hydrolyse der zwei *targets* durch RH2A als Monomer ist zwar denkbar, aber vermutlich war die Menge an co-immunpräzipitierter Untereinheit C zu gering für ihre Detektion in der Silberfärbung, aber ausreichend für die Überprüfung der Aktivität. Obwohl im Fall der immunpräzipitierten FLAG-RH2C keine Detektion der co-immunpräzipitierten Untereinheit A stattfand, muss auch hier aufgrund der Aktivitäts-Assays von ihrer Co-Immunpräzipitation ausgegangen werden. Somit konnte trotz der fehlenden Detektion der Untereinheiten nach PAGE und Silberfärbung durch die Aktivitätstests gezeigt werden, dass die Untereinheit A im BYL vorhanden ist und eine Co-Immunpräzipitation über FLAG-RH2C erfolgte. Zukünftige Studien könnten mittels Western Blot und einem gegen die Untereinheit A spezifisch gerichteten Antikörper oder mittels Massenspektrometrie untersuchen, ob die Untereinheit A nachzuweisen ist. Die Spalteffizienz ist in diesem Fall aufgrund der geringeren Menge der co-immunpräzipitierten RH2A-Untereinheit schwächer als die Spaltaktivität nach direkter Immunpräzipitation von FLAG-RH2A.

Nach Immunpräzipitation der Untereinheiten FLAG-RH2A und FLAG-RH2C waren zwei Signale von Proteinen mit einem apparenten Molekulargewicht von 90 und 25 kDa auffällig, die mittels Silberfärbung im Polyacrylamidgel nachgewiesen werden konnten (Abbildung

4.17). Beschrieben ist eine Interaktion aller Untereinheiten der *A. thaliana*-RNase H2 mit der Ribonukleotid-Reduktase 1 (91 kDa), und der Untereinheiten A und C der *A. thaliana*-RNase H2 mit der Thymidin-Kinase (26 kDa). Während die Thymidin-Kinase einen Vorläufer der Nukleotidbiosynthese zur Verfügung stellt, wandelt die Ribonukleotid-Reduktase 1 dNTPs in rNTPs um. Es wurde vermutet, dass diese Faktoren mit RNase H2 interagieren, um während der Replikation den Austausch von falsch eingebauten rNTPs zu dNTPs zu gewährleisten (Kalhorzadeh *et al.* 2014). Auch diese zwei Proteine könnten mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

Die Co-Immunpräzipitation von RNase H2-Untereinheiten und der anschließende Nachweis der ASO-abhängigen Spaltaktivität der *targets* bestätigte die Anwesenheit der RNase H2 im BYL und ihre generelle Funktion als Trimer.

5.2.7 ASOs können als antiviraler Wirkstoff in Pflanzen verwendet werden

Die postulierte Evolution von eukaryotischen AGO-Proteinen legt eine DNA-dirigierte Aktivität nahe, wie sie auch in Prokaryoten auftritt. Die in der Literatur beschriebenen Hinweise auf eine solche Aktivität konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Stattdessen wurde gezeigt, dass es im BYL – und möglicherweise generell in pflanzlichen Zellen – RNase H-Aktivitäten gibt, die der in der Literatur beschriebenen RNase H1 und H2 offenbar stark ähneln. Somit stellten sich die zentralen Fragen, ob auch DNA-Oligonukleotide generell antiviral wirken können und ob sie im Speziellen ein *silencing* des TBSV-Genoms im BYL und *in planta* induzieren. So konnte mit den ASOs, deren Sequenzen dem *guide*-Strang von esiRNAs entsprachen, im BYL gezeigt werden, dass diese über endonukleolytische Hydrolyse, wahrscheinlich katalysiert durch RNase H, ebenfalls eine Inaktivierung des Virusgenoms bewirken (Abbildung 4.18). Es konnte schon im Fall von TMV und PVX in humanen Zellextrakten gezeigt werden, dass ASOs das Virusgenom abbauen, allerdings wurde dies nicht zur Anwendung auf die Immunisierung von Pflanzen gebracht (Crum *et al.* 1988; Miroshnichenko *et al.* 1988). Ein wesentlicher Faktor ist, dass für die beiden Viren TMV und PVX, im Gegensatz zu TBSV, keine esiRNAs bekannt sind. EsiRNAs haben eine hohe Affinität zum AGO-Protein und dirigieren den RISC an eine zugängliche *target*-Sequenz (Gago-Zachert *et al.* 2019). Die Zugänglichkeit der *target*-Sequenz wird durch die Struktur des viralen Genoms bestimmt (Ameres *et al.* 2007; Obernosterer *et al.* 2008). Es ist auch möglich, dass RNA-bindende Proteine die *target*-Sequenz blockieren (Nagy und Pogany 2011). Im Fall einer siRNA spielt die effiziente Prozessierung aus einem dsRNA durch ein DCL und die Bindung an AGOs eine Rolle. Im Fall der ASOs ist vor allem die Zugänglichkeit der *target*-Sequenzen von Bedeutung.

So sind *target*-Sequenzen, die für siRNA/RISC gut zugänglich sind, auch für ASO / RNase H gut zugänglich. Im Fall des ASO 209 und der ineffizienten ASOs 3701 und 3722

korrelierten die Daten *in vivo* mit den In-vitro-Daten, da das ASO 209 sowohl eine effiziente Spaltung des TBSV-Genoms im BYL induzierte als auch *N. benthamiana*-Pflanzen vor einer TBSV-Infektion schützte. Die ineffizienten ASOs 3701 und 3722 zeigten keine Hydrolyse der *target*-RNA und generierten keinen Schutz vor einer TBSV-Infektion in der Pflanze. Dadurch wurde gezeigt, dass die TBSV-*target*-RNA an diesen *target*-Sequenzen unzugänglich ist. Die als esiRNA identifizierte siRNA 3243 zeigte als DNA-Oligonukleotid überraschenderweise keine Hydrolyse der *target*-RNA im BYL. Möglicherweise war dieser Bereich für die RNase H nicht zugänglich.

Nowak *et al.* konnten zuvor sowohl mit langen dsDNAs als auch mit sogenannter *short interfering* DNA einen Schutz gegen TMV realisieren. Der Einsatz von einzelsträngiger *antisense*-DNA war dagegen erfolglos. Die mangelnde Wirkung des ASOs ist möglicherweise einer nicht zugänglichen *target*-Sequenz geschuldet. Dafür generierte eine 21 nt lange dsDNA einen Schutz gegen TMV von 70 % (Nowak *et al.* 2009). Dies ist widersprüchlich zu den in dieser Arbeit generierten Daten, da die 21 nt lange gfp-dsDNA *in vitro* eine schlechtere Hydrolyse der GFP-*target*-RNA und die 21 nt lange dsDNA 209 *in vivo* keine Immunität gegen TBSV generierte. Mit Hilfe des esiRNA-Screens von siRNA ist es möglich, Sequenzen in einer *target*-RNA zu identifizieren, die vermutlich aufgrund der Zugänglichkeit der *target*-Sequenz offenbar in analoger Weise für RNaseH/ASO zugänglich sind.

5.2.8 Modifikationen verbessern die Stabilität von ASOs im BYL und den Pflanzenschutz

Die zuvor beschriebenen Modifikationen der Nukleotide oder des Phosphatrückgrats erhöhen die Resistenz gegenüber Endo- und Exonukleasen, die Schmelztemperatur des ASO / *target*-RNA-Hybrids, die Bindungsaffinität des ASOs zur *target*-RNA, oder beeinflussen die Hydrophobizität und Proteinassoziation. Das TBSV-Genom und das TBSV-Fragment A wurden unter Einsatz des effizienten ASOs 209 mit allen verwendeten Modifikationen hydrolysiert (Abbildung 4.20). Bei dem Versuch mit der 2,5-stündigen Inkubation der modifizierten Kontroll-ASOs 3701 im BYL wurde wie erwartet keine Spaltung des nachfolgend zugegebenen TBSV-Genoms beobachtet. Erfolgte die Zugabe des ASOs ohne eine 2,5-stündige Inkubation, konnte in einem Versuch eine Spaltung beobachtet werden. Die experimentelle Durchführung könnte in diesem Fall die Hydrolyse der *target*-RNA beeinflusst haben. Die Aktivität der ASOs wird kaum von ihrer möglicherweise unterschiedlichen Stabilität im BYL beeinflusst. Vermutlich kommt diese Spaltung durch den geringeren Abbau und die daraus resultierende höhere ASO-Konzentration zustande. Denkbar wäre auch, dass die *target-site*, bevor die *target*-RNA zum BYL hinzugefügt wurde, zugänglich war, sich die Faltung allerdings nach Zugabe der *target*-RNA ins BYL verändert (Gago-Zachert *et al.* 2019; Wu *et al.* 2013). Inwiefern die Zugabe der *target*-RNA die

Spaltung beeinflusst und Bereiche zugänglich werden, könnte durch weitere *cleavage*-Assays mit unterschiedlichen Bedingungen untersucht werden.

In diesem Versuch konnten Unterschiede in der Effizienz der Hydrolyse des TBSV-Genoms mit den modifizierten ASOs beobachtet werden. Diese Unterschiede hängen vermutlich mit der Stabilität der modifizierten ASOs im BYL zusammen. Vermutlich sind die ASOs mit den Modifikationen MOE2 und OMe2 (jeweils an den beiden terminalen Nukleotiden) und OMe4 (jeweils an den zwei ersten und letzten terminalen Nukleotiden) weniger stabil als die ASOs mit den anderen Modifikationen. Die anderen ASOs mit der MOE4- (jeweils an den zwei ersten und letzten terminalen Nukleotiden), LNA2- (jeweils an den beiden terminalen Nukleotiden), PS2- (zwischen den beiden terminalen Nukleotiden) und PS20-Modifikation (zwischen allen Nukleotiden) induzierten eine effizientere Hydrolyse. Eine OMe-Modifikation erhöhte zwar die Stabilität des Heteroduplexes, aber nicht die metabolische Stabilität des ASOs. Die MOE-Modifikation war dahingehend eine Verbesserung der OMe-Modifikation, da sie sowohl zu einer hohen Stabilität der Heteroduplexstruktur führt als auch gegen Nukleasen resistent ist (Prakash und Bhat 2007). Ein entsprechender Unterschied zwischen der MOE2- und der OMe2- und OMe4-induzierten Spaltung wurde nach Inkubation des ASOs im Lysat vor Zugabe des *targets* in der Spaltung des TBSV-Genoms sichtbar. Auch die MOE-Modifikation von zwei weiteren Nukleotiden (MOE4) zeigte eine Verbesserung im Vergleich zum ASO mit der MOE2-Modifikation. Die beiden ASOs mit den Modifikationen LNA2 und PS2 induzierten eine Hydrolyse des TBSV-Genoms mit gleicher Effizienz. Heteroduplexe mit einem LNA-modifizierten ASO sind gegenüber Heteroduplexen mit einem PS-modifizierten ASO ein bevorzugteres Substrat, wobei diese Eigenschaft in diesem Fall keine Rolle spielen sollte, da nur die beiden äußeren Nukleotide modifiziert sind. In Ansätzen mit ASOs mit der PS20-Modifikation zeigte das Signal der intakten *target*-RNA eine höhere Intensität als Ansätze mit ASOs mit anderen Modifikationen, woraus geschlossen wurde, dass dieses einen stabilisierenden Effekt auf die RNA hat. Ein sequenzspezifischer Effekt ist unwahrscheinlich, da auch die Signal-Intensität einer RNA, die kein *target* darstellt, stärker war (Abbildung 6.2). Eine naheliegende Erklärung für diesen stabilisierenden Effekt ist, dass ASOs mit dieser Modifikation von Proteinen mit Nukleinsäure-Bindedomänen oder von Chaperonen gebunden werden (Crooke 2017). Es ist möglich, dass unter den bindenden Proteinen RNasen sind und deren Aktivität durch das ASO inhibiert wird, wodurch weniger *target*-RNA unspezifisch abgebaut wird. Insgesamt konnte mit den MOE4-, LNA2-, PS2- und PS20-modifizierten ASOs eine stärkere Hydrolyse induziert werden als mit den übrigen modifizierten ASOs.

Die ASOs mit den unterschiedlichen Modifikationen waren nach Inkubation im BYL noch nach 2, 4 oder 24 h detektierbar. Eine 21 nt lange siRNA-Duplex war im BYL noch nach 24 h detektierbar, während das ASO ohne Modifikation nach 2 h im BYL abgebaut war. Ein ASO mit vier MOE-modifizierten Nukleotiden am 3'-Ende war 9 h gegenüber Schlangengift-Phosphodiesterasen stabil (Prakash und Bhat 2007). Diese Stabilität kann kaum mit dem Nachweis des MOE4-modifizierten ASOs im BYL nach 4 h verglichen werden, da die Modifizierungen innerhalb der Sequenz beider ASOs an unterschiedlichen Stellen auftraten. Für ein LNA2-modifiziertes ASO konnte in humanem Serum gezeigt werden, dass es nach 6 h noch in Spuren nachweisbar ist (Kurreck *et al.* 2002). Im BYL war das LNA2-modifizierte ASO allerdings schon nach zwei Stunden nicht mehr nachweisbar. Dieser Effekt könnte durch eine höhere Nukleaseaktivität im BYL im Vergleich zu humanem Serum zustande kommen. Die Stabilität eines ASOs mit zwei terminalen PS-Modifikationen wird in der Literatur nicht beschrieben, wodurch keine Einschätzung erfolgen kann, ob eine Stabilität von bis zu acht Stunden ein zu erwartendes Ergebnis ist. In beiden Fällen könnten Modifikationen von weiteren Nukleotiden die Stabilität verbessern. Für das ASO, bei dem pro Phosphodiestergruppe ein Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom ersetzt wurde (PS-Modifikation), konnten nach Inkubation in Rattenleberhomogenat eine Halbwertszeit von 6,25 Tagen approximiert werden (Iwamoto *et al.* 2017). Nach 24 h Inkubation im BYL lagen noch ca. 60 % intaktes ASO vor, was einer Halbwertszeit von 30 h entspräche. Im Vergleich zum Rattenleberhomogenat war zu beobachten, dass im BYL ein stärkerer Abbau der ASOs vorliegt. Die Möglichkeit besteht, dass das PS20-ASO im BYL auch nach mehreren Tagen noch nicht vollständig abgebaut ist. Um dies zu untersuchen, sollte die Studiendauer zur Inkubation im BYL auf ein Vielfaches der Halbwertszeit erhöht werden. Dadurch könnte besser eingeschätzt werden, wie lange das ASO ein Potential hätte, auf der Pflanze gegen eine Virus-Infektion zu wirken. Der Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Daten zeigt, dass die ASOs mit den unterschiedlichen Modifikationen eine geringere Stabilität im BYL aufwiesen als in anderen Extrakten. Inwiefern der Abbau der modifizierten ASOs auf eine Pflanzenzelle übertragen werden kann, ist fraglich, da durch die Lysat-Präparation möglicherweise Nukleasen aus den Vakuolen freigesetzt wurden oder allgemein in BY2-Zellen ein anderes Nukleasespektrum vorliegt.

Die Pflanzenexperimente bestätigten die Ergebnisse in Bezug auf die Stabilität und die Spalteffizienz der modifizierten ASOs. Bei einer Co-Inokulation der verschiedenen modifizierten ASOs und der TBSV-RNA wurde die protektive Wirkung im Vergleich zum ASO ohne Modifikation verbessert. Obwohl die PS-modifizierten ASOs im BYL stabiler waren, induzierten sie einen geringeren Pflanzenschutz als die MOE4- und LNA-

modifizierten ASOs, deren Spalteffizienz gleich oder besser war. Bei einer zeitlich getrennten Inokulation von modifizierten ASOs und TBSV-RNA wurde die Immunität im Vergleich zum nicht modifizierten ASO nur mit den Modifikationen MOE4, PTO2 und PTO20 verbessert. Aufgrund der geringen Stabilität des ASOs mit der LNA-Modifikation ist die ausbleibende Verbesserung der Immunität mit diesem ASO nicht überraschend. Durch die Trennung von ASO und Virus-RNA wird eine Formierung des Heteroduplexes vor der Inokulation verhindert. Werden ASO und Virus-RNA getrennt inokuliert, ist davon auszugehen, dass nicht jede Zelle, die Virus-RNA aufnimmt, vorher auch mit einem ASO inokuliert wurde, wodurch die Immunisierungs-Kapazität des ASOs verringert wird. Liegen modifizierte ASOs in Zellen vor, in die die Virus-RNA transportiert wird, kommt der Stabilität der ASOs eine größere Bedeutung für die protektive Wirkung zu als bei einer Co-Inokulation. Dies ist ein weiteres Indiz für die zuvor formulierte Vermutung, dass im BYL beobachtete Effekte nicht direkt auf Pflanzenzellen übertragbar sind.

Die Wirkung der ASOs in den Pflanzenexperimenten lässt sich gut mit den In-vitro-Daten korrelieren. Dafür sind die Rangfolgen zusammengefasst in Tabelle 5.3 aufgeführt. ASOs, die eine deutlichere Spaltung zeigten, generierten auch einen besseren Pflanzenschutz. Das ASO PS2 war im Vergleich zu den anderen ASOs im BYL etwas stabiler und zeigte auch einen besseren Effekt bei der getrennten Inokulation von ASO und TBSV-RNA. Unter Verwendung des ASO PS20 wurde *in vitro* die geringste Hydrolyse im Vergleich zu den anderen ASOs detektiert. In diesem Fall wurde der geringste Pflanzenschutz generiert, obwohl dieses ASO im BYL die größte Stabilität zeigte.

Tabelle 5.3: Zusammenfassung der beobachteten Rangfolge der modifizierten ASOs.

Unterschiede werden durch '>', keine Unterschiede durch '=' dargestellt. Insgesamt müssen die Versuche mit mehr Pflanzen wiederholt werden, um die Unterschiede zu bekräftigen.

Versuch	Rangfolge*
Spaltaktivität <i>in vitro</i>	MOE4 = LNA = PS2 > PS20
Stabilität in BYL	PS20 > PS2 > MOE4 > ASO = LNA2
Schutz vor TBSV-Infektion (Co-Inokulation)	MOE4 > LNA2 = PS2 > PS20 > ASO 209
Schutz vor TBSV-Infektion (getrennte/versetzte Inokulation)	PS2 > MOE4 > PS20 > LNA = ASO 209

Die beiden ASOs mit den Modifikationen PS2 und MOE4, die die beste Spaltaktivität, Stabilität und den besten Pflanzenschutz im Vergleich zu den ASOs mit anderen Modifikationen zeigten, sind in Abbildung 5.4 dargestellt.



Abbildung 5.4: Sequenz der beiden effizientesten ASOs mit den Modifikationen PS2 und MOE4.

Die Modifikation PS2 ist mit einem Stern zwischen den Nucleotiden dargestellt. Die Modifikation MOE des Adenosins ist mit der Ziffer 5 dargestellt. Die Abbildung der Modifikationen wurde aus Shen und Corey, 2018, entnommen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Beobachtungen zeigen aufgrund der im BYL untersuchten RNase H-Aktivität und der *in vitro* und *in planta* eingesetzten ASOs gegen die TBSV-RNA erstmals die Möglichkeit auf, ASOs als Wirkstoff zur Immunisierung von Pflanzen zu verwenden. Durch die Verwendung von *target*-Sequenzen, welche im esiRNA-Screen identifiziert wurden, ist die Zugänglichkeit für das ASO und die RNase H gesichert. Auch wenn nur der Einzelstrang verglichen wird, sind DNA-Oligonucleotide deutlich kostengünstiger als RNA-Oligonucleotide (Shen und Corey 2018). Während siRNAs bisher nur über Nanopartikel in Blattzellen aufgenommen werden konnten (Zhang *et al.* 2019), wäre der Transport des ASOs mit der PS-Modifikation aufgrund der hydrophoben Eigenschaft über die Zellmembran gesichert (Dowdy 2017). Ein weiterer Vorteil ist, dass beim Einsatz von Saccharose-Lösung ASOs über Zuckertransporter in der Pflanze ebenfalls von Zelle zu Zelle transportiert werden könnten (Sun *et al.* 2007). Diese verschiedenen positiven Eigenschaften bieten eine gute Grundlage zur Entwicklung von ASOs als Schutzmaßnahme gegen wirtschaftlich relevante Viren und sollten daher im Fokus weiterführender Arbeiten stehen.

6 Zusammenfassung

Der Schutz von Pflanzen vor Virusinfektionen ist wissenschaftlich und wirtschaftlich von ungebrochener Relevanz, wird derzeit jedoch hauptsächlich über die Anwendung von Pestiziden gegen den Überträgervektor, meist Insekten, erreicht. Transgene Pflanzen stellen zwar eine Alternative dar, sind jedoch aufgrund ihrer aufwendigen Herstellung, des durch Regularien eingeschränkten Anbaus und des allgemeinen negativen Rufs in der Bevölkerung nicht optimal. In den letzten Jahren wurde vermehrt die Applikation von exogenen *small interfering* RNAs und doppelsträngigen RNA-Molekülen in den Fokus der Forschung gerückt. Deshalb ist die Charakterisierung des *RNA-induced silencing complex* und dessen Nutzung für die Protektion von Pflanzen von großer Bedeutung. Die Assemblierung des *RNA-induced silencing complex* im BY2-Lysat war Grundlage für die Untersuchung des Komplexes einerseits und potenzieller Interaktionspartner andererseits, aber auch für die Untersuchung eines potenziellen *DNA-induced silencing complex*. Die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse über die *antisense*-Oligonukleotide konnten *in vivo* bestätigt werden.

Im Anschluss an eine Immunpräzipitation von AGONAUTE1 über einen FLAG-tag konnten mögliche BY2-Lysat-interne AGONAUTE1-Interaktionspartner mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Ein in dieser Arbeit entwickeltes Reportersystem sollte dazu dienen, diese Kandidaten *in planta* zu untersuchen. Dieses Reportersystem wurde mittels Agrobakterium-vermittelter Transformation in Blätter von *N. benthamiana* eingebracht. Im Grundzustand war die Genexpression der Firefly-Luciferase durch eine Luciferase-spezifische *small interfering* RNA, die in Form einer artifiziellen *microRNA* codiert war, negativ reguliert. Der transiente *knockdown* von AGONAUTE1 oder einem im *RNA-induced silencing complex* involvierten Kandidaten mittels CRISPR-Cas9 störte das *silencing* der Firefly-Luciferase. Die Detektion der Luciferase war ein Hinweis auf die Beteiligung des AGONAUTE1 oder mutagenisierter Kandidaten am *RNA-silencing*. Nach erfolgreichem transientem *knockdown* von AGONAUTE1-1 und AGONAUTE1-2 wurde eine um den Faktor 12 erhöhte Firefly-Luciferase-Aktivität detektiert, was als Nachweis für die Funktionsfähigkeit des Systems angesehen werden konnte. Der transiente *knockdown* der Gene zeigte, entweder aufgrund eines unzureichenden *knockdowns* oder einer hohen Stabilität des Proteins, keinen Effekt auf die Expression der Firefly-Luciferase. Nach weiterer Optimierung könnte dieses Reportersystem jedoch zur Verifizierung weiterer Kandidaten dienen.

Für Prokaryoten wurde beschrieben, dass AGONAUTE mit DNA zu einem DNA-*induced silencing complex* programmiert werden können und dadurch fremde Nukleinsäure als Schutzmaßnahme abbauen. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Hinweise gefunden, dass pflanzliche AGONAUTE-Proteine mit DNA-Oligonukleotiden zu einem DNA-*induced silencing complex* programmiert werden können, weshalb sie wahrscheinlich nicht zur DNA-abhängigen Immunisierung beitragen. Ein Hinweis auf eine AGONAUTE1-unabhängige Spaltung mittels 21 Nukleotid-langem DNA-Oligonukleotid war die Identifizierung der Position der Hydrolyse mittels *Rapid amplification of cDNA ends*, die sich von der Position der *small interfering* RNA-abhängigen Hydrolyse unterschied. Dieses Ergebnis deutete auf eine RNase H-abhängige Hydrolyse hin. Folglich wurden die RNase H1- und H2-Aktivitäten im BY2-Lysat untersucht und gezeigt, dass diese für die DNA-abhängige Hydrolyse im BYL verantwortlich sind. Es konnte erfolgreich untersucht werden, dass sowohl RNase H1 als auch RNase H2 im BYL aktiv sind.

Antisense-Oligonukleotide, die von effizienten *small interfering* RNAs abgeleitet wurden, waren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Lage, die *Tomato bushy stunt virus*-RNA zu inaktivieren. So gab die Untersuchung der Spaltkapazität des *antisense*-Oligonukleotid *in vitro* einen Hinweis auf die Aktivität *in planta*. Ein *antisense*-Oligonukleotid, das von einer ineffizienten *small interfering* RNA abgeleitet wurde, war ebenfalls ineffizient, was ein Hinweis auf die vergleichbare Zugänglichkeit der *target*-Sequenz für den RNA-*induced silencing complex* und das *antisense*-Oligonukleotid bzw. die RNase H ist. *Antisense*-Oligonukleotide mit einer Phosphorthioat-Modifikation zwischen und *antisense*-Oligonukleotide mit jeweils zwei 2'-O-Methoxyethyl-Modifikation an den beiden letzten endständigen Nukleotiden zeigten eine bessere Stabilität *in vitro* sowie eine höhere Protektionskapazität *in vivo* als das *antisense*-Oligonukleotid ohne Modifikation.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen des RNA-*induced silencing complex* und der RNase H-abhängigen Hydrolyse führten zu Ergebnissen, die folglich zur Immunisierung von Pflanzen gegen eine Virusinfektion angewendet werden können. So könnte in Zukunft die Anwendung von kleinen einzelsträngigen DNA-Oligonukleotiden als „Impfstoff“ zur Protektion von Pflanzen optimiert werden.

V. Literaturverzeichnis

- Aaziz R. und Tepfer M.** 1999. 'Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants', *J Gen Virol*, 80 (Pt 6): 1339-1346.
- Adams D. R., Ron D. und Kiely P. A.** 2011. 'RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function', *Cell Communication and Signaling*, 9.
- Alvarado V. Y. und Scholthof H. B.** 2011. 'AGO2: A New Argonaute Compromising Plant Virus Accumulation', *Frontiers in Plant Science*, 2: 112.
- Ameres S. L., Martinez J. und Schroeder R.** 2007. 'Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC', *Cell*, 130: 101-112.
- Arciga-Reyes L., Wootton L., Kieffer M. und Davies B.** 2006. 'UPF1 is required for nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and RNAi in Arabidopsis', *Plant Journal*, 47: 480-489.
- Arudchandran A., Cerritelli S., Narimatsu S., Itaya M., Shin D. Y., Shimada Y. und Crouch R. J.** 2000. 'The absence of ribonuclease H1 or H2 alters the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to hydroxyurea, caffeine and ethyl methanesulphonate: implications for roles of RNases H in DNA replication and repair', *Genes Cells*, 5: 789-802.
- Bajczyk M., Bhat S. S., Szewc L., Szweykowska-Kulinska Z., Jarmolowski A. und Dolata J.** 2019. 'Novel Nuclear Functions of Arabidopsis ARGONAUTE1: Beyond RNA Interference', *Plant physiology*, 179: 1030-1039.
- Bartel D. P.** 2004. 'MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function', *Cell*, 116: 281-297.
- Baumberger N. und Baulcombe D. C.** 2005. 'Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 11928-11933.
- Behrens S. E., Gursinsky T. und Schuck J.** 2018. "Methode zur gezielten Identifizierung hocheffizienter "small interfering RNAs "eRNAs" zur Anwendung in Pflanzen und anderen Zielorganismen." In.: WO 2019001602 A1.
- Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S. und Nekrasov V.** 2013. 'Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system', *Plant Methods*, 9: 39.
- Bennett C. F.** 2019. 'Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age', *Annu Rev Med*, 70: 307-321.
- Bennett C. F. und Swayze E. E.** 2010. 'RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50: 259-293.
- Bhaya D., Davison M. und Barrangou R.** 2011. 'CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation', *Annu Rev Genet*, 45: 273-297.
- Bologna N. G. und Voinnet O.** 2014. 'The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis', *Annu Rev Plant Biol*, 65: 473-503.
- Bombarely A., Rosli H. G., Vrebalov J., Moffett P., Mueller L. A. und Martin G. B.** 2012. 'A Draft Genome Sequence of *Nicotiana benthamiana* to Enhance Molecular Plant-Microbe Biology Research', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25: 1523-1530.
- Bouche N., Laressergues D., Gascioli V. und Vaucheret H.** 2006. 'An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs', *EMBO J*, 25: 3347-3356.
- Broccoli S., Rallu F., Sanscartier P., Cerritelli S. M., Crouch R. J. und Drolet M.** 2004. 'Effects of RNA polymerase modifications on transcription-induced negative supercoiling and associated R-loop formation', *Mol Microbiol*, 52: 1769-1779.

- Brooks C., Nekrasov V., Lippman Z. B. und Van Eck J.** 2014. 'Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system', *Plant Physiol*, 166: 1292-1297.
- Carbonell A.** 2017. 'Plant ARGONAUTES: Features, Functions, and Unknowns', *Methods Mol Biol*, 1640: 1-21.
- Cazenave C., Loreau N., Thuong N. T., Toulme J. J. und Helene C.** 1987. 'Enzymatic amplification of translation inhibition of rabbit beta-globin mRNA mediated by anti-messenger oligodeoxynucleotides covalently linked to intercalating agents', *Nucleic Acids Research*, 15: 4717-4736.
- Cerritelli S. M. und Crouch R. J.** 2009. 'Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes', *Febs Journal*, 276: 1494-1505.
- Cerritelli S. M., Fedoroff O. Y., Reid B. R. und Crouch R. J.** 1998. 'A common 40 amino acid motif in eukaryotic RNases H1 and caulimovirus ORF VI proteins binds to duplex RNAs', *Nucleic Acids Research*, 26: 1834-1840.
- Cerritelli S. M., Frolova E. G., Feng C., Grinberg A., Love P. E. und Crouch R. J.** 2003. 'Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in Rnaseh1 null mice', *Molecular Cell*, 11: 807-815.
- Chon H., Vassilev A., DePamphilis M. L., Zhao Y., Zhang J., Burgers P. M., Crouch R. J. und Cerritelli S. M.** 2009. 'Contributions of the two accessory subunits, RNASEH2B and RNASEH2C, to the activity and properties of the human RNase H2 complex', *Nucleic Acids Research*, 37: 96-110.
- Ciftci-Yilmaz S. und Mittler R.** 2008. 'The zinc finger network of plants', *Cell Mol Life Sci*, 65: 1150-1160.
- Crooke S. T.** 2017. 'Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides', *Nucleic Acid Ther*, 27: 70-77.
- Crooke S. T., Witztum J. L., Bennett C. F. und Baker B. F.** 2018. 'RNA-Targeted Therapeutics', *Cell Metab*, 27: 714-739.
- Crum C., Johnson J. D., Nelson A. und Roth D.** 1988. 'Complementary oligodeoxynucleotide mediated inhibition of tobacco mosaic virus RNA translation in vitro', *Nucleic Acids Research*, 16: 4569-4581.
- Csorba T., Lozsa R., Hutvagner G. und Burgyan J.** 2010. 'Poliovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1', *Plant Journal*, 62: 463-472.
- Cui Y., Fang X. und Qi Y.** 2016. 'TRANSPORTIN1 Promotes the Association of MicroRNA with ARGONAUTE1 in Arabidopsis', *Plant Cell*, 28: 2576-2585.
- Culbertson M. R. und Leeds P. F.** 2003. 'Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution', *Current Opinion in Genetics & Development*, 13: 207-214.
- Dalakouras A., Wassenegger M., Dadami E., Ganopoulos I., Pappas M. L. und Papadopoulou K.** 2020. 'Genetically Modified Organism-Free RNA Interference: Exogenous Application of RNA Molecules in Plants', *Plant Physiol*, 182: 38-50.
- Dangl J. L., Horvath D. M. und Staskawicz B. J.** 2013. 'Pivoting the plant immune system from dissection to deployment', *Science*, 341: 746-751.
- Dayeh D. M., Cantara W. A., Kitzrow J. P., Musier-Forsyth K. und Nakanishi K.** 2018. 'Argonaute-based programmable RNase as a tool for cleavage of highly-structured RNA', *Nucleic Acids Research*, 46.
- Deleris A., Gallego-Bartolome J., Bao J., Kasschau K. D., Carrington J. C. und Voinnet O.** 2006. 'Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense', *Science*, 313: 68-71.
- Ding Y. und Mou Z.** 2015. 'Elongator and its epigenetic role in plant development and responses to abiotic and biotic stresses', *Frontiers in Plant Science*, 6: 296.
- Doench J. G., Hartenian E., Graham D. B., Tothova Z., Hegde M., Smith I., Sullender M., Ebert B. L., Xavier R. J. und Root D. E.** 2014. 'Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation', *Nat Biotechnol*, 32: 1262-1267.

- Dowdy S. F.** 2017. 'Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics', *Nat Biotechnol*, 35: 222-229.
- Earley K., Smith M., Weber R., Gregory B. und Poethig R.** 2010. 'An endogenous F-box protein regulates ARGONAUTE1 in Arabidopsis thaliana', *Silence*, 1: 15.
- Earley K. W. und Poethig R. S.** 2011. 'Binding of the Cyclophilin 40 Ortholog SQUINT to Hsp90 Protein Is Required for SQUINT Function in Arabidopsis', *Journal of Biological Chemistry*, 286: 38184-38189.
- Eder P. S. und Walder J. A.** 1991. 'Ribonuclease-H from K562 Human Erythroleukemia-Cells - Purification, Characterization, and Substrate-Specificity', *Journal of Biological Chemistry*, 266: 6472-6479.
- Eder P. S., Walder R. Y. und Walder J. A.** 1993. 'Substrate specificity of human RNase H1 and its role in excision repair of ribose residues misincorporated in DNA', *Biochimie*, 75: 123-126.
- Edwards K. D., Fernandez-Pozo N., Drake-Stowe K., Humphry M., Evans A. D., Bombarely A., Allen F., Hurst R., White B., Kernodle S. P., Bromley J. R., Sanchez-Tamburrino J. P., Lewis R. S. und Mueller L. A.** 2017. 'A reference genome for Nicotiana tabacum enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency', *BMC Genomics*, 18.
- Elbashir S. M., Lendeckel W. und Tuschl T.** 2001. 'RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs', *Genes & Development*, 15: 188-200.
- Elkayam E., Kuhn C. D., Tocilj A., Haase A. D., Greene E. M., Hannon G. J. und Joshua-Tor L.** 2012. 'The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a', *Cell*, 150: 100-110.
- Evans S. P. und Bycroft M.** 1999. 'NMR structure of the N-terminal domain of Saccharomyces cerevisiae RNase HI reveals a fold with a strong resemblance to the N-terminal domain of ribosomal protein L9', *J Mol Biol*, 291: 661-669.
- Fagard M., Boutet S., Morel J. B., Bellini C. und Vaucheret H.** 2000. 'AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 11650-11654.
- Figiel M., Chon H., Cerritelli S. M., Cybulska M., Crouch R. J. und Nowotny M.** 2011. 'The structural and biochemical characterization of human RNase H2 complex reveals the molecular basis for substrate recognition and Aicardi-Goutieres syndrome defects', *J Biol Chem*, 286: 10540-10550.
- Finnegan E. J., Margis R. und Waterhouse P. M.** 2003. 'Posttranscriptional gene silencing is not compromised in the Arabidopsis CARPEL FACTORY (DICER-LIKE1) mutant, a homolog of Dicer-1 from Drosophila', *Curr Biol*, 13: 236-240.
- Fishilevich E., Velez A. M., Storer N. P., Li H., Bowling A. J., Rangasamy M., Worden S. E., Narva K. E. und Siegfried B. D.** 2016. 'RNAi as a management tool for the western corn rootworm, Diabrotica virgifera virgifera', *Pest Manag Sci*, 72: 1652-1663.
- Frank P., Albert S., Cazenave C. und Toulme J. J.** 1994. 'Purification and characterization of human ribonuclease HII', *Nucleic Acids Research*, 22: 5247-5254.
- Frank P., Braunshofer-Reiter C., Poltl A. und Holzmann K.** 1998. 'Cloning, subcellular localization and functional expression of human RNase HII', *Biol Chem*, 379: 1407-1412.
- Gago-Zachert S., Schuck J., Weinholdt C., Knoblich M., Pantaleo V., Grosse I., Gursinsky T. und Behrens S. E.** 2019. 'Highly efficacious antiviral protection of plants by small interfering RNAs identified in vitro', *Nucleic Acids Research*, 47: 9343-9357.
- Gaidamakov S. A., Gorshkova, II, Schuck P., Steinbach P. J., Yamada H., Crouch R. J. und Cerritelli S. M.** 2005. 'Eukaryotic RNases H1 act processively by interactions through the duplex RNA-binding domain', *Nucleic Acids Research*, 33: 2166-2175.
- Gallie D. R.** 2018. 'Plant growth and fertility requires functional interactions between specific PABP and eIF4G gene family members', *PLoS One*, 13: e0191474.

- Gao J., Wang G., Ma S., Xie X., Wu X., Zhang X., Wu Y., Zhao P. und Xia Q.** 2015. 'CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*', *Plant Mol Biol*, 87: 99-110.
- Gibson T. J.** 2012. 'RACK1 research - ships passing in the night?', *FEBS Lett*, 586: 2787-2789.
- Gu Y. und Innes R. W.** 2012. 'The KEEP ON GOING protein of *Arabidopsis* regulates intracellular protein trafficking and is degraded during fungal infection', *Plant Cell*, 24: 4717-4730.
- Gursinsky T., Schulz B. und Behrens S. E.** 2009. 'Replication of Tomato bushy stunt virus RNA in a plant in vitro system', *Virology*, 390: 250-260.
- Gursinsky Torsten, Pirovano Walter, Gambino Giorgio, Friedrich Susann, Behrens Sven-Erik und Pantaleo Vitantonio.** 2015. 'Homeologs of the *Nicotiana benthamiana* Antiviral ARGONAUTE1 Show Different Susceptibilities to microRNA168-Mediated Control', *Plant physiology*, 168: 938-952.
- Haley B. und Zamore P. D.** 2004. 'Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex', *Nat Struct Mol Biol*, 11: 599-606.
- Hearne P. Q., Knorr D. A., Hillman B. I. und Morris T. J.** 1990. 'The complete genome structure and synthesis of infectious RNA from clones of tomato bushy stunt virus', *Virology*, 177: 141-151.
- Henderson I. R., Zhang X., Lu C., Johnson L., Meyers B. C., Green P. J. und Jacobsen S. E.** 2006. 'Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning', *Nat Genet*, 38: 721-725.
- Hou C. Y., Lee W. C., Chou H. C., Chen A. P., Chou S. J. und Chen H. M.** 2016. 'Global Analysis of Truncated RNA Ends Reveals New Insights into Ribosome Stalling in Plants', *Plant Cell*, 28: 2398-2416.
- Hsu P. D., Lander E. S. und Zhang F.** 2014. 'Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering', *Cell*, 157: 1262-1278.
- Hyjek M., Figiel M. und Nowotny M.** 2019. 'RNases H: Structure and mechanism', *DNA Repair (Amst)*: 102672.
- Iki T., Yoshikawa M., Meshi T. und Ishikawa M.** 2012. 'Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants', *EMBO J*, 31: 267-278.
- Iki T., Yoshikawa M., Nishikiori M., Jaudal M. C., Matsumoto-Yokoyama E., Mitsuhashi I., Meshi T. und Ishikawa M.** 2010. 'In Vitro Assembly of Plant RNA-Induced Silencing Complexes Facilitated by Molecular Chaperone HSP90', *Molecular Cell*, 39: 282-291.
- Iwamoto N., Butler D. C. D., Svrzikapa N., Mohapatra S., Zlatev I., Sah D. W. Y., Meena, Standley S. M., Lu G., Apponi L. H., Frank-Kamenetsky M., Zhang J. J., Vargeese C. und Verdine G. L.** 2017. 'Control of phosphorothioate stereochemistry substantially increases the efficacy of antisense oligonucleotides', *Nat Biotechnol*, 35: 845-851.
- Iwasaki S., Kobayashi M., Yoda M., Sakaguchi Y., Katsuma S., Suzuki T. und Tomari Y.** 2010. 'Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes', *Molecular Cell*, 39: 292-299.
- Iwasaki S., Sasaki H. M., Sakaguchi Y., Suzuki T., Tadakuma H. und Tomari Y.** 2015. 'Defining fundamental steps in the assembly of the *Drosophila* RNAi enzyme complex', *Nature*, 521: 533-536.
- Jeong H. S., Backlund P. S., Chen H. C., Karavanov A. A. und Crouch R. J.** 2004. 'RNase H2 of *Saccharomyces cerevisiae* is a complex of three proteins', *Nucleic Acids Research*, 32: 407-414.
- Jones-Rhoades M. W., Bartel D. P. und Bartel B.** 2006. 'MicroRNAs and their regulatory roles in plants', *Annual Review of Plant Biology*, 57: 19-53.
- Juliano R. L., Ming X., Carver K. und Laing B.** 2014. 'Cellular uptake and intracellular trafficking of oligonucleotides: implications for oligonucleotide pharmacology', *Nucleic Acid Ther*, 24: 101-113.

- Kalhorzadeh P., Hu Z., Cools T., Amiard S., Willing E. M., De Winne N., Gevaert K., De Jaeger G., Schneeberger K., White C. I. und De Veylder L.** 2014. 'Arabidopsis thaliana RNase H2 deficiency counteracts the needs for the WEE1 checkpoint kinase but triggers genome instability', *Plant Cell*, 26: 3680-3692.
- Kaur K., Gupta A. K., Rajput A. und Kumar M.** 2016. 'ge-CRISPR - An integrated pipeline for the prediction and analysis of sgRNAs genome editing efficiency for CRISPR/Cas system', *Sci Rep*, 6: 30870.
- Kawai-Toyooka H., Kuramoto C., Orui K., Motoyama K., Kikuchi K., Kanegae T. und Wada M.** 2004. 'DNA interference: a simple and efficient gene-silencing system for high-throughput functional analysis in the fern adiantum', *Plant and Cell Physiology*, 45: 1648-1657.
- Kiriakidou M., Tan G. S., Lamprinaki S., De Planell-Saguer M., Nelson P. T. und Mourelatos Z.** 2007. 'An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation', *Cell*, 129: 1141-1151.
- Kluger R. und Alagic A.** 2004. 'Chemical cross-linking and protein-protein interactions - a review with illustrative protocols', *Bioorganic Chemistry*, 32: 451-472.
- Kobayashi H., Shoji K., Kiyokawa K., Negishi L. und Tomari Y.** 2019. 'Ruka Eliminates Dysfunctional Argonaute by Selective Ubiquitination of Its Empty State', *Molecular Cell*, 73: 119-129 e115.
- Komoda K., Naito S. und Ishikawa M.** 2004. 'Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 1863-1867.
- Kuciński Jan, Kmera Aleksandra, Rowley M. Jordan, Khurana Pragya, Nowotny Marcin und Wierzbicki Andrzej T.** 2019. 'Functional characterization of RNase H1 proteins in *Arabidopsis thaliana*', *bioRxiv*: 662080.
- Kurreck J., Wyszko E., Gillen C. und Erdmann V. A.** 2002. 'Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids', *Nucleic Acids Research*, 30: 1911-1918.
- Kwak P. B. und Tomari Y.** 2012. 'The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly', *Nat Struct Mol Biol*, 19: 145-151.
- Lefkowitz E. J., Dempsey D. M., Hendrickson R. C., Orton R. J., Siddell S. G. und Smith D. B.** 2018. 'Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)', *Nucleic Acids Research*, 46: D708-D717.
- Li J., Kinoshita T., Pandey S., Ng C. K., Gygi S. P., Shimazaki K. und Assmann S. M.** 2002. 'Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase', *Nature*, 418: 793-797.
- Lima W. F., Wu H. und Crooke S. T.** 2001. 'Human RNases H', *Methods Enzymol*, 341: 430-440.
- Lima W. F., Wu H., Nichols J. G., Prakash T. P., Ravikumar V. und Crooke S. T.** 2003. 'Human RNase H1 uses one tryptophan and two lysines to position the enzyme at the 3'-DNA/5'-RNA terminus of the heteroduplex substrate', *J Biol Chem*, 278: 49860-49867.
- Lin Han-Xin, Xu Wei und White K Andrew.** 2007. 'A multicomponent RNA-based control system regulates subgenomic mRNA transcription in a tombusvirus', *Journal of Virology*, 81: 2429-2439.
- Lingel A., Simon B., Izaurralde E. und Sattler M.** 2004. 'Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain', *Nat Struct Mol Biol*, 11: 576-577.
- Liu Q., Yao X., Pi L., Wang H., Cui X. und Huang H.** 2009. 'The ARGONAUTE10 gene modulates shoot apical meristem maintenance and establishment of leaf polarity by repressing miR165/166 in Arabidopsis', *Plant Journal*, 58: 27-40.
- Lujan S. A., Williams J. S., Clausen A. R., Clark A. B. und Kunkel T. A.** 2013. 'Ribonucleotides are signals for mismatch repair of leading-strand replication errors', *Molecular Cell*, 50: 437-443.
- Majorek K. A., Dunin-Horkawicz S., Steczkiewicz K., Muszewska A., Nowotny M., Ginalski K. und Bujnicki J. M.** 2014. 'The RNase H-like superfamily: new

- members, comparative structural analysis and evolutionary classification', *Nucleic Acids Research*, 42: 4160-4179.
- Makarova K. S., Wolf Y. I., van der Oost J. und Koonin E. V.** 2009. 'Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements', *Biol Direct*, 4: 29.
- Margis R., Fusaro A. F., Smith N. A., Curtin S. J., Watson J. M., Finnegan E. J. und Waterhouse P. M.** 2006. 'The evolution and diversification of Dicers in plants', *FEBS Lett*, 580: 2442-2450.
- Martinez J. und Tuschl T.** 2004. 'RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease', *Genes Dev*, 18: 975-980.
- Mi S. J., Cai T., Hu Y. G., Chen Y., Hodges E., Ni F. R., Wu L., Li S., Zhou H., Long C. Z., Chen S., Hannon G. J. und Qi Y. J.** 2008. 'Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide', *Cell*, 133: 116-127.
- Miller W. A. und Koev G.** 2000. 'Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses', *Virology*, 273: 1-8.
- Miller W. A. und White K. A.** 2006. 'Long-distance RNA-RNA interactions in plant virus gene expression and replication', *Annu Rev Phytopathol*, 44: 447-467.
- Miroshnichenko N. A., Karpova O. V., Morozov SYu, Rodionova N. P. und Atabekov J. G.** 1988. 'Translation arrest of potato virus X RNA in Krebs-2 cell-free system: RNase H cleavage promoted by complementary oligodeoxynucleotides', *FEBS Lett*, 234: 65-68.
- Moelling K., Broecker F., Russo G. und Sunagawa S.** 2017. 'RNase H As Gene Modifier, Driver of Evolution and Antiviral Defense', *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Moelling K., Matskevich A. und Jung J. S.** 2006. 'Relationship between retroviral replication and RNA interference machineries', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 71: 365-368.
- Morel J. B., Godon C., Mourrain P., Beclin C., Boutet S., Feuerbach F., Proux F. und Vaucheret H.** 2002. 'Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance', *Plant Cell*, 14: 629-639.
- Moutinho Ana, Camacho Luísa, Haley Ann, Pais M Salomé, Trewavas Anthony und Malhó Rui.** 2001. 'Antisense perturbation of protein function in living pollen tubes', *Sexual Plant Reproduction*, 14: 101-104.
- Murante R. S., Henricksen L. A. und Bambara R. A.** 1998. 'Junction ribonuclease: an activity in Okazaki fragment processing', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 2244-2249.
- Nagy P. D. und Pogany J.** 2011. 'The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors', *Nature Reviews Microbiology*, 10: 137-149.
- Naruse K., Matsuura-Suzuki E., Watanabe M., Iwasaki S. und Tomari Y.** 2018. 'In vitro reconstitution of chaperone-mediated human RISC assembly', *RNA*, 24: 6-11.
- Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J. D. und Kamoun S.** 2013. 'Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease', *Nat Biotechnol*, 31: 691-693.
- Nicaise V.** 2014. 'Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges', *Frontiers in Plant Science*, 5: 660.
- Nicaise V., German-Retana S., Sanjuan R., Dubrana M. P., Mazier M., Maisonneuve B., Candresse T., Caranta C. und LeGall O.** 2003. 'The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic virus', *Plant Physiol*, 132: 1272-1282.
- Nowak M., Wyszko E., Fedoruk-Wyszomirska A., Pospieszny H., Barciszewska M. Z. und Barciszewski J.** 2009. 'A new and efficient method for inhibition of RNA viruses by DNA interference', *Febs Journal*, 276: 4372-4380.
- Nowotny M., Cerritelli S. M., Ghirlando R., Gaidamakov S. A., Crouch R. J. und Yang W.** 2008. 'Specific recognition of RNA/DNA hybrid and enhancement of human RNase H1 activity by HBD', *EMBO J*, 27: 1172-1181.

- Nowotny M., Gaidamakov S. A., Crouch R. J. und Yang W.** 2005. 'Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: substrate specificity and metal-dependent catalysis', *Cell*, 121: 1005-1016.
- Nowotny M., Gaidamakov S. A., Ghirlando R., Cerritelli S. M., Crouch R. J. und Yang W.** 2007. 'Structure of human RNase H1 complexed with an RNA/DNA hybrid: insight into HIV reverse transcription', *Molecular Cell*, 28: 264-276.
- Obernosterer G., Tafer H. und Martinez J.** 2008. 'Target site effects in the RNA interference and microRNA pathways', *Biochem Soc Trans*, 36: 1216-1219.
- Oerke E. C. und Dehne H. W.** 2004. 'Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection', *Crop Protection*, 23: 275-285.
- Ohtani N., Haruki M., Morikawa M., Crouch R. J., Itaya M. und Kanaya S.** 1999. 'Identification of the genes encoding Mn²⁺-dependent RNase HII and Mg²⁺-dependent RNase HIII from *Bacillus subtilis*: classification of RNases H into three families', *Biochemistry*, 38: 605-618.
- Ohtani N., Tomita M. und Itaya M.** 2008a. 'Junction ribonuclease activity specified in RNases HII/2', *Febs Journal*, 275: 5444-5455.
- . 2008b. 'Junction ribonuclease: a ribonuclease HII orthologue from *Thermus thermophilus* HB8 prefers the RNA-DNA junction to the RNA/DNA heteroduplex', *Biochem J*, 412: 517-526.
- Olson A. J., Bricogne G. und Harrison S. C.** 1983. 'Structure of tomato bushy stunt virus IV: The virus particle at 2.9-resolution', *Journal of Molecular Biology*, 171: 61-93.
- Omarov R., Sparks K., Smith L., Zindovic J. und Scholthof H. B.** 2006. 'Biological relevance of a stable biochemical interaction between the tombusvirus-encoded P19 and short interfering RNAs', *J Virol*, 80: 3000-3008.
- Oster S. K., Wu B. und White K. A.** 1998. 'Uncoupled expression of p33 and p92 permits amplification of tomato bushy stunt virus RNAs', *J Virol*, 72: 5845-5851.
- Palauqui J. C. und Balzergue S.** 1999. 'Activation of systemic acquired silencing by localised introduction of DNA', *Curr Biol*, 9: 59-66.
- Pileur F., Toulme J. J. und Cazenave C.** 2000. 'Eukaryotic ribonucleases HI and HII generate characteristic hydrolytic patterns on DNA-RNA hybrids: further evidence that mitochondrial RNase H is an RNase HII', *Nucleic Acids Research*, 28: 3674-3683.
- Pogany J., White K. A. und Nagy P. D.** 2005. 'Specific binding of tombusvirus replication protein p33 to an internal replication element in the viral RNA is essential for replication', *J Virol*, 79: 4859-4869.
- Pomeranz M. C., Hah C., Lin P. C., Kang S. G., Finer J. J., Blackshear P. J. und Jang J. C.** 2010. 'The Arabidopsis tandem zinc finger protein AtTZF1 traffics between the nucleus and cytoplasmic foci and binds both DNA and RNA', *Plant Physiol*, 152: 151-165.
- Prakash T. P. und Bhat B.** 2007. '2'-Modified oligonucleotides for antisense therapeutics', *Curr Top Med Chem*, 7: 641-649.
- Qi Y., He X., Wang X. J., Kohany O., Jurka J. und Hannon G. J.** 2006. 'Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation', *Nature*, 443: 1008-1012.
- Qiu J., Qian Y., Frank P., Wintersberger U. und Shen B.** 1999. '*Saccharomyces cerevisiae* RNase H(35) functions in RNA primer removal during lagging-strand DNA synthesis, most efficiently in cooperation with Rad27 nuclease', *Mol Cell Biol*, 19: 8361-8371.
- Qu F., Ye X. und 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 U S A*, 105: 14732-14737.
- Reijns M. A., Bubeck D., Gibson L. C., Graham S. C., Baillie G. S., Jones E. Y. und Jackson A. P.** 2011. 'The structure of the human RNase H2 complex defines key interaction interfaces relevant to enzyme function and human disease', *J Biol Chem*, 286: 10530-10539.

- Reinhart B. J., Weinstein E. G., Rhoades M. W., Bartel B. und Bartel D. P.** 2002. 'MicroRNAs in plants', *Genes Dev*, 16: 1616-1626.
- Rychlik M. P., Chon H., Cerritelli S. M., Klimek P., Crouch R. J. und Nowotny M.** 2010. 'Crystal structures of RNase H2 in complex with nucleic acid reveal the mechanism of RNA-DNA junction recognition and cleavage', *Molecular Cell*, 40: 658-670.
- Sahin U., Lapaquette P., Andrieux A., Faure G. und Dejean A.** 2014. 'Sumoylation of human argonaute 2 at lysine-402 regulates its stability', *PLoS One*, 9: e102957.
- Sahoo M. R., Gaikwad S., Khuperkar D., Ashok M., Helen M., Yadav S. K., Singh A., Magre I., Deshmukh P., Dhanvijay S., Sahoo P. K., Ramtirtha Y., Madhusudhan M. S., Gayathri P., Seshadri V. und Joseph J.** 2017. 'Nup358 binds to AGO proteins through its SUMO-interacting motifs and promotes the association of target mRNA with miRISC', *EMBO Rep*, 18: 241-263.
- Saibil H. R. und Ranson N. A.** 2002. 'The chaperonin folding machine', *Trends Biochem Sci*, 27: 627-632.
- Sammons Robert D, Ivashuta Sergey, Liu Hong, Wang Dafu, Feng Paul CC, Kouranov Andrei Y und Andersen Scott E.** 2013. "Polynucleotide molecules for gene regulation in plants." In.: Google Patents US 20140018241A1.
- Schauer S. E., Jacobsen S. E., Meinke D. W. und Ray A.** 2002. 'DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development', *Trends Plant Sci*, 7: 487-491.
- Schirle N. T. und MacRae I. J.** 2012. 'The crystal structure of human Argonaute2', *Science*, 336: 1037-1040.
- Scholthof H. B., Scholthof K. B., Kikkert M. und 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.
- Scholthof Herman B., Desvoyes Bénédicte, Kuecker Joan und Whitehead Elizabeth.** 1999. 'Biological Activity of Two Tombusvirus Proteins Translated from Nested Genes Is Influenced by Dosage Control via Context-Dependent Leaky Scanning', *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 12: 670-679.
- Scholthof K. B., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C. und Foster G. D.** 2011. 'Top 10 plant viruses in molecular plant pathology', *Mol Plant Pathol*, 12: 938-954.
- Scholthof K. B., Scholthof H. B. und Jackson A. O.** 1995. 'The tomato bushy stunt virus replicase proteins are coordinately expressed and membrane associated', *Virology*, 208: 365-369.
- Schuck J., Gursinsky T., Pantaleo V., Burgyan J. und Behrens S. E.** 2013. 'AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant in vitro system', *Nucleic Acids Research*, 41: 5090-5103.
- Shaban N. M., Harvey S., Perrino F. W. und Hollis T.** 2010. 'The structure of the mammalian RNase H2 complex provides insight into RNA:NA hybrid processing to prevent immune dysfunction', *J Biol Chem*, 285: 3617-3624.
- Shen X. und Corey D. R.** 2018. 'Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs', *Nucleic Acids Research*, 46: 1584-1600.
- Sheng G., Zhao H., Wang J., Rao Y., Tian W., Swarts D. C., van der Oost J., Patel D. J. und Wang Y.** 2014. 'Structure-based cleavage mechanism of Thermus thermophilus Argonaute DNA guide strand-mediated DNA target cleavage', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 652-657.
- Silhavy D., Molnar A., Lucioli A., Szittya G., Hornyik C., Tavazza M. und Burgyan J.** 2002. 'A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs', *EMBO J*, 21: 3070-3080.
- Sonenberg N. und Hinnebusch A. G.** 2009. 'Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets', *Cell*, 136: 731-745.
- Song J. J., Liu J., Tolia N. H., Schneiderman J., Smith S. K., Martienssen R. A., Hannon G. J. und Joshua-Tor L.** 2003. 'The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes', *Nature Structural Biology*, 10: 1026-1032.

- Song J. J., Smith S. K., Hannon G. J. und Joshua-Tor L.** 2004. 'Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity', *Science*, 305: 1434-1437.
- Sparks J. L., Chon H., Cerritelli S. M., Kunkel T. A., Johansson E., Crouch R. J. und Burgers P. M.** 2012. 'RNase H2-initiated ribonucleotide excision repair', *Molecular Cell*, 47: 980-986.
- Speth C., Willing E. M., Rausch S., Schneeberger K. und Laubinger S.** 2013. 'RACK1 scaffold proteins influence miRNA abundance in Arabidopsis', *Plant Journal*, 76: 433-445.
- Stone S. L., Williams L. A., Farmer L. M., Vierstra R. D. und Callis J.** 2006. 'KEEP ON GOING, a RING E3 ligase essential for Arabidopsis growth and development, is involved in abscisic acid signaling', *Plant Cell*, 18: 3415-3428.
- Sun C. X., Ridderstrale K., Høglund A. S., Larsson L. G. und Jansson C.** 2007. 'Sweet delivery - sugar translocators as ports of entry for antisense oligodeoxynucleotides in plant cells', *Plant Journal*, 52: 1192-1198.
- Swarts D. C., Jore M. M., Westra E. R., Zhu Y., Janssen J. H., Snijders A. P., Wang Y., Patel D. J., Berenguer J., Brouns S. J. J. und van der Oost J.** 2014. 'DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute', *Nature*, 507: 258-261.
- Tahbaz N., Carmichael J. B. und Hobman T. C.** 2001. 'GERp95 belongs to a family of signal-transducing proteins and requires Hsp90 activity for stability and Golgi localization', *J Biol Chem*, 276: 43294-43299.
- Takeda A., Iwasaki S., Watanabe T., Utsumi M. und Watanabe Y.** 2008. 'The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins', *Plant and Cell Physiology*, 49: 493-500.
- Tarun S. Z., Jr., Wells S. E., Deardorff J. A. und Sachs A. B.** 1997. 'Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 9046-9051.
- Tomari Y. und Zamore P. D.** 2005. 'Perspective: machines for RNAi', *Genes & Development*, 19: 517-529.
- Tsugeki R. und Nishimura M.** 1993. 'Interaction of homologues of Hsp70 and Cpn60 with ferredoxin-NADP+ reductase upon its import into chloroplasts', *FEBS Lett*, 320: 198-202.
- Vaucheret H., Vazquez F., Crete P. und 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.
- Voinnet O., Vain P., Angell S. und Baulcombe D. C.** 1998. 'Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA', *Cell*, 95: 177-187.
- Wang Y., Sheng G., Juranek S., Tuschl T. und Patel D. J.** 2008. 'Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex', *Nature*, 456: 209-213.
- Wei K. F., Wu L. J., Chen J., Chen Y. F. und Xie D. X.** 2012. 'Structural evolution and functional diversification analyses of argonaute protein', *J Cell Biochem*, 113: 2576-2585.
- Willkomm S., Zander A., Grohmann D. und Restle T.** 2016. 'Mechanistic Insights into Archaeal and Human Argonaute Substrate Binding and Cleavage Properties', *PLoS One*, 11: e0164695.
- Wu B., Grigull J., Ore M. O., Morin S. und White K. A.** 2013. 'Global organization of a positive-strand RNA virus genome', *PLoS Pathog*, 9: e1003363.
- Wu B. und White K. A.** 1999. 'A primary determinant of cap-independent translation is located in the 3'-proximal region of the tomato bushy stunt virus genome', *J Virol*, 73: 8982-8988.
- Wu H., Lima W. F. und Crooke S. T.** 1998. 'Molecular cloning and expression of cDNA for human RNase H', *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 8: 53-61.
- . 1999. 'Properties of cloned and expressed human RNase H1', *J Biol Chem*, 274: 28270-28278.
- . 2001. 'Investigating the structure of human RNase H1 by site-directed mutagenesis', *J Biol Chem*, 276: 23547-23553.

- Wu H., Lima W. F., Zhang H., Fan A., Sun H. und Crooke S. T.** 2004. 'Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs', *J Biol Chem*, 279: 17181-17189.
- Wydro M., Kozubek E. und Lehmann P.** 2006. 'Optimization of transient Agrobacterium-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*', *Acta Biochim Pol*, 53: 289-298.
- Xie Z., Johansen L. K., Gustafson A. M., Kasschau K. D., Lellis A. D., Zilberman D., Jacobsen S. E. und Carrington J. C.** 2004. 'Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants', *PLoS Biol*, 2: E104.
- Yamamura Y. und Scholthof H. B.** 2005. 'Tomato bushy stunt virus: a resilient model system to study virus-plant interactions', *Mol Plant Pathol*, 6: 491-502.
- Yan K. S., Yan S., Farooq A., Han A., Zeng L. und Zhou M. M.** 2003. 'Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain', *Nature*, 426: 468-474.
- Yang M. Y., Bowmaker M., Reyes A., Vergani L., Angeli P., Gringeri E., Jacobs H. T. und Holt I. J.** 2002. 'Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication', *Cell*, 111: 495-505.
- Yang Z., Hou Q. C., Cheng L. L., Xu W., Hong Y. T., Li S. und Sun Q. W.** 2017. 'RNase H1 Cooperates with DNA Gyrase to Restrict R-Loops and Maintain Genome Integrity in Arabidopsis Chloroplasts', *Plant Cell*, 29: 2478-2497.
- Yi T., Arthanari H., Akabayov B., Song H., Papadopoulos E., Qi H. H., Jedrychowski M., Guttler T., Guo C., Luna R. E., Gygi S. P., Huang S. A. und Wagner G.** 2015. 'eIF1A augments Ago2-mediated Dicer-independent miRNA biogenesis and RNA interference', *Nat Commun*, 6: 7194.
- Yuan Y. R., Pei Y., Ma J. B., Kuryavyi V., Zhadina M., Meister G., Chen H. Y., Dauter Z., Tuschl T. und Patel D. J.** 2005. 'Crystal structure of A-aeolicus Argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage', *Molecular Cell*, 19: 405-419.
- Zamecnik P. C. und Stephenson M. L.** 1978. 'Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75: 280-284.
- Zhang H., Demirer G. S., Zhang H., Ye T., Goh N. S., Aditham A. J., Cunningham F. J., Fan C. und Landry M. P.** 2019. 'DNA nanostructures coordinate gene silencing in mature plants', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 7543-7548.
- Zhang X. R., Yuan Y. R., Pei Y., Lin S. S., Tuschl T., Patel D. J. und Chua N. H.** 2006. 'Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense', *Genes & Development*, 20: 3255-3268.
- Zheng X., Zhu J., Kapoor A. und Zhu J. K.** 2007. 'Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing', *EMBO J*, 26: 1691-1701.

VI. Danksagung

Am Ende dieser Arbeit angelangt bin ich sehr dankbar, dass diese Arbeit zustande gekommen ist. In diesem Sinn möchte ich mich bei einigen Personen für die umfangreiche Unterstützung bedanken.

Besonders bedanke ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. Sven-Erik Behrens für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, das Angebot eines sehr interessanten Themas und das Einbringen von konstruktiven Vorschlägen, die maßgeblich zum Gelingen meiner Promotionsarbeit beigetragen haben.

Dr. Torsten Gursinsky danke ich ganz besonders für seine unzähligen Ideen, die hilfreichen Diskussionen und Erklärungen und die gute Zusammenarbeit. Dein großer Einsatz hat wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen und war mir eine große Unterstützung. Ich danke dir für deine Hilfsbereitschaft, deinen Humor und die interessanten Gespräche, die den Arbeitsalltag und die Kaffeepausen sehr bereichert haben. Nicht zuletzt danke ich dir auch für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Dr. Selma Gago-Zachert gilt mein Dank für die Unterstützung bei den Pflanzenexperimenten und für die förderlichen Ideen und Vorschläge.

Thanks Dr. Vitantonio Pantaleo for sharing your frustration about the missing paper you were searching for and the discussion which brought up some ideas about the topics in this thesis. Sadly, we did not place a bet that would have given me a great chance to win an excellent espresso with cream. However, I was enjoying our nice discussion and jogging tours.

Prof. Dr. Ralph Golbik danke ich für die viele Hilfe bei der regulatorischen Organisation meiner Versuche, die fachliche Unterstützung einer Biologin im biochemischen Kontext und die zahlreichen interessanten und motivierenden Gespräche. Ich bedauere es sehr, dass wir RNase H nicht mehr gereinigt haben.

Bei Dr. Dirk Dobritzsch vom Institut für Biochemie und Biotechnologie der Universität Halle-Wittenberg bedanke ich mich für die Durchführung der Massenspektrometrie und bei Dr. habil. Johannes Stuttmann vom Institut für Biologie der Universität Halle-Wittenberg für das Design und die Generierung der verschiedenen CRISPR/Cas-Konstrukte.

Last but not least, wie unser Chef zu sagen pflegt, möchte ich mich bei den derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanken. Marie Knoblich, Alexandra Meyer, Aysan Ghasemzadeh, Susann Friedrich, Katja Rostowski, Christine Hamann und Konstantin Stopp. Es hat sehr viel Spaß gemacht mit euch zu arbeiten. Die lustigen Gespräche, interessanten Diskussionen, bereichernden Kaffeepausen und Mittagessengespräche haben mich immer wieder zur Arbeit motiviert und die Frustration bei dem einen oder anderen fehlgeschlagenen Experiment sehr gemindert. Danke,

Konstantin und Lennart für die Korrekturlesung. Auch Falko Jähnert möchte ich für die Unterstützung im Endspurt der Fertigstellung danken. Danke für deine Zeit, Hilfe und die vielen, aber unteranderen auch sehr interessanten Gespräche.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie, Freunden und meinen Geschwistern im Glauben bedanken. Auch ihr hattet einen großen unterstützenden Einfluss. Ich danke meinem Papa, mit dem ich am Ende viele gemeinsame Erfahrungen über das Promovieren teilen konnte, obwohl doch eine gewisse Zeitspanne dazwischenliegt. Ich danke meinen Geschwistern im Glauben für die vielen Gebete, das Zuhören, das Teilen, das Motivieren und die Ratschläge. Durch euch habe ich den Blick für das Wesentliche nicht verloren. Ich möchte Dr. Fiona Weiß für die Abschlusskorrektur danken. Ich danke dir für dein Verständnis und die Ermutigungen.

Zum Abschluss danke ich meinem großen Gott für seine Treue und den kleinen Einblick in seine geniale Schöpfung.

VII. Anhang

Tabelle 6.1: Fertigpuffer

Puffer und Lösungen	Hersteller
10x DNaseI-Puffer, RNase free	Roche
10x T4-DNA-Ligase Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc.
10x T4-RNA-Ligase Puffer	Promega
5x <i>Phusion</i> HF-Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc.
10x Dream <i>Taq</i> -Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc.
5x Reaktionspuffer für Reverse Transkriptase (RT)	Thermo Fisher Scientific Inc.
5x Reaktionspuffer für AMV RT	Promega
5x Transkriptionspuffer	Agilent Technologies
Rapi-Gest SF	Waters
2x <i>RNA Loading Dye</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 6.2: Verwendete Plasmide und Vektoren

Vektor	Resistenz	Beschreibung
pDGE5_sgRNA1-Ago1	Amp	Level 1, Modul 1, sgRNA gegen Ago1
pDGE7_sgRNA1-Ago1	Amp	Level 1, Modul 1, sgRNA gegen Ago1
pDGE9_sgRNA1-Ago1	Amp	Level 1, Modul 3, sgRNA gegen Ago1
pDGE9_sgRNA3-Ago1	Amp	Level 1, Modul 3, sgRNA gegen Ago1
pDGE10_sgRNA1-Ago1	Amp	Level 1, Modul 4, sgRNA gegen Ago1
pDGE10_sgRNA3-Ago1	Amp	Level 1, Modul 4, sgRNA gegen Ago1
pDGE12_sgRNA2-Ago1	Amp	Level 1, Modul 5, sgRNA gegen Ago1
pDGE12_sgRNA4-Ago1	Amp	Level 1, Modul 5, sgRNA gegen Ago1
pDGE13_sgRNA2-Ago1	Amp	Level 1, Modul 6, sgRNA gegen Ago1
pDGE13_sgRNA4-Ago1	Amp	Level 1, Modul 6, sgRNA gegen Ago1
pDGE14_sgRNA2-Ago1	Amp	Level 1, Modul 7, sgRNA gegen Ago1
pDGE15_sgRNA2-Ago1	Amp	Level 1, Modul 8, sgRNA gegen Ago1
pDGE7_sgRNA1-Ago1-2	Amp	Level 1, Modul 2, sgRNA gegen Ago1-2
pDGE10_sgRNA2-Ago1-2	Amp	Level 1, Modul 4, sgRNA gegen Ago1-2
pDGE13_sgRNA3-Ago1-2	Amp	Level 1, Modul 6, sgRNA gegen Ago1-2
pDGE15_sgRNA4-Ago1-2	Amp	Level 1, Modul 8, sgRNA gegen Ago1-2
pDGE5_sgRNA1-mCherry	Amp	Level 1, Modul 1, sgRNA gegen mCh
pDGE7_sgRNA1-mCherry	Amp	Level 1, Modul 2, sgRNA gegen mCh
pDGE9_sgRNA1-mCherry	Amp	Level 1, Modul 3, sgRNA gegen mCh
pDGE10_sgRNA1-mCherry	Amp	Level 1, Modul 4, sgRNA gegen mCh
pDGE12_sgRNA2-mCherry	Amp	Level 1, Modul 5, sgRNA gegen mCh
pDGE13_sgRNA2-mCherry	Amp	Level 1, Modul 6, sgRNA gegen mCh
pDGE14_sgRNA2-mCherry	Amp	Level 1, Modul 7, sgRNA gegen mCh
pDGE15_sgRNA2-mCherry	Amp	Level 1, Modul 8, sgRNA gegen mCh

Anhang

pDGE5_sgRNA1-AKIP-like	Amp	Level 1, Modul 1, sgRNA gegen AKIP-like
pDGE7_sgRNA1-AKIP-like	Amp	Level 1, Modul 2, sgRNA gegen AKIP-like
pDGE9_sgRNA2-AKIP-like	Amp	Level 1, Modul 3, sgRNA gegen AKIP-like
pDGE10_sgRNA2-AKIP-like	Amp	Level 1, Modul 4, sgRNA gegen AKIP-like
pDGE12_sgRNA3-AKIP-like	Amp	Level 1, Modul 5, sgRNA gegen AKIP-like
pDGE13_sgRNA3-AKIP-like	Amp	Level 1, Modul 6, sgRNA gegen AKIP-like
pDGE14_sgRNA4-AKIP-like	Amp	Level 1, Modul 7, sgRNA gegen AKIP-like
pDGE15_sgRNA4-AKIP-like	Amp	Level 1, Modul 8, sgRNA gegen AKIP-like
pDGE5_sgRNA1-CYP40	Amp	Level 1, Modul 1, sgRNA gegen CYP40
pDGE7_sgRNA1-CYP40	Amp	Level 1, Modul 2, sgRNA gegen CYP40
pDGE7_sgRNA5-CYP40	Amp	Level 1, Modul 2, sgRNA gegen CYP40
pDGE9_sgRNA2-CYP40	Amp	Level 1, Modul 3, sgRNA gegen CYP40
pDGE10_sgRNA2-CYP40	Amp	Level 1, Modul 4, sgRNA gegen CYP40
pDGE10_sgRNA6-CYP40	Amp	Level 1, Modul 4, sgRNA gegen CYP40
pDGE12_sgRNA3-CYP40	Amp	Level 1, Modul 5, sgRNA gegen CYP40
pDGE13_sgRNA3-CYP40	Amp	Level 1, Modul 6, sgRNA gegen CYP40
pDGE13_sgRNA7-CYP40	Amp	Level 1, Modul 6, sgRNA gegen CYP40
pDGE14_sgRNA4-CYP40	Amp	Level 1, Modul 7, sgRNA gegen CYP40
pDGE15_sgRNA4-CYP40	Amp	Level 1, Modul 8, sgRNA gegen CYP40
pDGE15_sgRNA8-CYP40	Amp	Level 1, Modul 8, sgRNA gegen CYP40
pDGE5_sgRNA1-TRN	Amp	Level 1, Modul 1, sgRNA gegen TRN
pDGE7_sgRNA2-TRN	Amp	Level 1, Modul 2, sgRNA gegen TRN
pDGE9_sgRNA3-TRN	Amp	Level 1, Modul 3, sgRNA gegen TRN
pDGE10_sgRNA4-TRN	Amp	Level 1, Modul 4, sgRNA gegen TRN
pDGE12_sgRNA5-TRN	Amp	Level 1, Modul 5, sgRNA gegen TRN
pDGE13_sgRNA6-TRN	Amp	Level 1, Modul 6, sgRNA gegen TRN
pDGE14_sgRNA7-TRN	Amp	Level 1, Modul 7, sgRNA gegen TRN
pDGE15_sgRNA8-TRN	Amp	Level 1, Modul 8, sgRNA gegen TRN
pDGE5_sgRNA1-ZFP	Amp	Level 1, Modul 1, sgRNA gegen ZFP
pDGE7_sgRNA1-ZFP	Amp	Level 1, Modul 2, sgRNA gegen ZFP
pDGE9_sgRNA2-ZFP	Amp	Level 1, Modul 3, sgRNA gegen ZFP
pDGE10_sgRNA2-ZFP	Amp	Level 1, Modul 4, sgRNA gegen ZFP
pDGE12_sgRNA3-ZFP	Amp	Level 1, Modul 5, sgRNA gegen ZFP
pDGE13_sgRNA3-ZFP	Amp	Level 1, Modul 6, sgRNA gegen ZFP
pDGE14_sgRNA4-ZFP	Amp	Level 1, Modul 7, sgRNA gegen ZFP
pDGE15_sgRNA4-ZFP	Amp	Level 1, Modul 8, sgRNA gegen ZFP
pDGE5_sgRNA1-EIF4A	Amp	Level 1, Modul 1, sgRNA gegen EIF4A
pDGE7_sgRNA1-EIF4A	Amp	Level 1, Modul 2, sgRNA gegen EIF4A
pDGE9_sgRNA2-EIF4A	Amp	Level 1, Modul 3, sgRNA gegen EIF4A
pDGE10_sgRNA2-EIF4A	Amp	Level 1, Modul 4, sgRNA gegen EIF4A
pDGE12_sgRNA3-EIF4A	Amp	Level 1, Modul 5, sgRNA gegen EIF4A
pDGE13_sgRNA3-EIF4A	Amp	Level 1, Modul 6, sgRNA gegen EIF4A
pDGE14_sgRNA4-EIF4A	Amp	Level 1, Modul 7, sgRNA gegen EIF4A
pDGE15_sgRNA4-EIF4A	Amp	Level 1, Modul 8, sgRNA gegen EIF4A
pDGE1_4x2sgmCherry	Spec	Level 2, 2 verschiedene sgRNA in 4 Kopien
pDGE355-TREX_mCh	Spec	Level 2, 2 verschiedene sgRNA in 4 Kopien

pDGE1_sgAgo1.4x	Spec	Level 2, 4 verschiedene sgRNA in 2 Kopien
pDGE1_Ago1-2	Spec	Level 2, 4 sgRNA gegen Ago1, 4 gegen Ago1-2
pDGE355-TREX_Ago1.4x	Spec	Level 2, 4 verschiedene sgRNA in 2 Kopien
pDGE355-TREX_Ago1-2	Spec	Level 2, 4 sgRNA gegen Ago1, 4 gegen Ago1-2
pDGE1_sgAKIP-like.4x	Spec	Level 2, 4 verschiedene sgRNA in 2 Kopien
pDGE1_sgCYP40.8x	Spec	Level 2, 8 verschiedene sgRNA
pDGE1_sgTRN.8x	Spec	Level 2, 8 verschiedene sgRNA
pDGE1_sgEIF4A.4x	Spec	Level 2, 4 verschiedene sgRNA in 2 Kopien
pDGE1_sgZFP.4x	Spec	Level 2, 4 verschiedene sgRNA in 2 Kopien
pSPLF2-Ago1-2.2.2	Amp	CDS von Ago1-2 (Niben101Scf00887g01007.1)
pSPLF_PD1_ZFP	Amp	CDS ZFP (Niben101Ctg15635g00003.1)
pSPLF_PD2 EIF4A	Amp	CDS Helicase EIF4A (Niben101Scf01848g05002.1)
pSPLF_PD4-EF1a	Amp	CDS Elongation Factor 1a (Nitab4.5_0001802g0030.1)
pSPLF_PD5_Chaperonin	Amp	CDS Myc-Chaperonin (Nitab4.5_0000041g0130.1)
pSPLF_PD6_PAB	Amp	CDS Myc-RNA recognition motif (Nitab4.5_0004376g0010.1)
pSPLF_PD7_TPR	Amp	CDS Myc-Tetratricopeptid (AT5G21990.1)
pSPLF_PD8_AKIP-like	Amp	CDS Myc-AKIP-like (Nitab4.5_0002915g0070.1)
pSPLF_PD9_Luc	Amp	CDS Myc-NanoLuc-Promega
pSPLF_PD10_GFP	Amp	CDS Myc-EGFP
pSPLF_PD11_Cyp40	Amp	CDS Myc-Cyclophilin40 (Niben101Scf03080g00001.1)

*Ampicillin- (Amp), Spectinomycin-(Spec) Resistenz, coding sequenz (CDS)

Tabelle 6.3: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz	Verwendung	Beschreibung
mCherry_sgRNA1_f	ATTGCCCCGAGGACGGCGCCCTGA	GC	KJ541670.1
mCherry_sgRNA1_r	AAACTCAGGGCGCCGCTCCTCGGGG	GC	KJ541670.1
mCherry_sgRNA2_f	ATTGCGGCGGCCACTACGACGCTG	GC	KJ541670.1
mCherry_sgRNA2_r	AAACACGCGTCGTAGTGGCCGCCG	GC	KJ541670.1
AGO1_sgRNA1_f	ATTGAGAGGCTGGGCACCTCAGCA	GC	Niben101Scf05146g06007.1/Niben101Scf01571g04001.1
AGO1_sgRNA1_r	AAACTGCTGAGGTGCCAGCCTCT	GC	Niben101Scf05146g06007.1/Niben101Scf01571g04001.1
AGO1_sgRNA2_f	ATTGGTGGTGGGGAGCTCCACG	GC	Niben101Scf05146g06007.1/Niben101Scf01571g04001.1
AGO1_sgRNA2_r	AAACCGTGGAGCTCCCCACCACC	GC	Niben101Scf05146g06007.1/Niben101Scf01571g04001.1
AGO1-sgRNA3_f	ATTGCTGGCTGCACAACAAGTTGC	GC	Niben101Scf05146g06007.1/Niben101Scf01571g04001.1
AGO1-sgRNA3_r	AAACCGCAACTTGTGTGCAGCCAG	GC	Niben101Scf05146g06007.1/Niben101Scf01571g04001.1
AGO1-sgRNA4_f	ATTGTGAATACTACCAACAGGGCA	GC	Niben101Scf05146g06007.1/Niben101Scf01571g04001.1
AGO1-sgRNA4_r	AAACTGCCCTGTTGGTAGTATCA	GC	Niben101Scf05146g06007.1/Niben101Scf01571g04001.1
sgAgo1-2.1f	ATTGTCCAGCCTCTTCTCCACCT	GC	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
sgAgo1-2.1r	AAACAGGTGGAGGAAGGCTGGA	GC	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
sgAgo1-2.2f	ATTGTCCACCATAATGACTGTTGAG	GC	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
sgAgo1-2.2r	AAACCTCAACAGTCAATATGGTGGGA	GC	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
sgAgo1-2.3f	ATTGTGTAGAGCTGCCCTGCTCAGG	GC	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
sgAgo1-2.3r	AAACCTGAGCAGGCAGCTCTACA	GC	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
sgAgo1-2.4f	ATTGCTCCCTTCCCTGGACGCAG	GC	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
sgAgo1-2.4r	AAACCTGCGTCCAGGGGAAAGGGGAG	GC	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
CYP40-sgRNA1_f	ATTGAAGAGCTTCATGGTACAAGG	GC	Niben101Scf03080g00001.1/Niben101Scf03300g00004.1
CYP40-sgRNA1_r	AAACCTTGTACCATGAAGCTCTT	GC	Niben101Scf03080g00001.1/Niben101Scf03300g00004.1
CYP40-sgRNA2_f	ATTGACTCGAACTTCCCCTCTGGA	GC	Niben101Scf03080g00001.1/Niben101Scf03300g00004.1
CYP40-sgRNA2_r	AAACTCCAGATGGGAAGTTCGAGT	GC	Niben101Scf03080g00001.1/Niben101Scf03300g00004.1
CYP40-sgRNA3_f	ATTGGATTGGGAGAAAATTCCTGA	GC	Niben101Scf03080g00001.1/Niben101Scf03300g00004.1
CYP40-sgRNA3_r	AAACTCAGGAAATTTCTCCGCAATC	GC	Niben101Scf03080g00001.1/Niben101Scf03300g00004.1
CYP40-sgRNA4_f	ATTGATACTGATGATATCTCTTGG	GC	Niben101Scf03080g00001.1/Niben101Scf03300g00004.1
CYP40-sgRNA4_r	AAACCCAAAGAGATATCATCAGTAT	GC	Niben101Scf03080g00001.1/Niben101Scf03300g00004.1

Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz	Verwendung	Beschreibung
Transportin_sgRNA1.f	ATTGGAAAGGTTCAAAGAGATCTG	GC	Niben101Scf01718g06002.1/Niben101Scf02908g03006.1/Niben101Scf01768g02028.1
Transportin_sgRNA1.r	AAACCAGATCTCTTTTGAACCCCTTC	GC	Niben101Scf01718g06002.1/Niben101Scf02908g03006.1/Niben101Scf01768g02028.1
Transportin_sgRNA2.f	ATTGCACGAGCGAAGATAAAAAGCG	GC	Niben101Scf01718g06002.1/Niben101Scf02908g03006.1
Transportin_sgRNA2.r	AAACCGCTTTTATCTTCGCTCGTG	GC	Niben101Scf01718g06002.1/Niben101Scf02908g03006.1
Transportin_sgRNA3.f	ATTGTGACGCTTCGGCAAGCAGCT	GC	Niben101Scf01718g06002.1/Niben101Scf02908g03006.1
Transportin_sgRNA3.r	AAACAGCTGCTGCCGAACGTCCA	GC	Niben101Scf01718g06002.1/Niben101Scf02908g03006.1
Transportin_sgRNA4.f	ATTGATGTAAGTCTGCTGATTAGCAGG	GC	Niben101Scf01718g06002.1/Niben101Scf02908g03006.1
Transportin_sgRNA4.r	AAACCTGCTTAATCAGCAGTACAT	GC	Niben101Scf01718g06002.1/Niben101Scf02908g03006.1
Transportin_sgRNA5.f	ATTGACAAGAGCATGCAGCAACTC	GC	Niben101Scf01768g02028.1/Niben101Scf00780g02003.1
Transportin_sgRNA5.r	AAACGAGTTGCTGCATGCTCTTGT	GC	Niben101Scf01768g02028.1/Niben101Scf00780g02003.1
Transportin_sgRNA6.f	ATTGCTATGGATAAAATATCTTCAA	GC	Niben101Scf01768g02028.1/Niben101Scf00780g02003.1
Transportin_sgRNA6.r	AAACTTGAAGATAATTTATCCATAG	GC	Niben101Scf01768g02028.1/Niben101Scf00780g02003.1
Transportin_sgRNA7.f	ATTGTAAACCACAGGCATCAATGT	GC	Niben101Scf01768g02028.1/Niben101Scf00780g02001.1
Transportin_sgRNA7.r	AAACACATTGATGCCCTGTGGTTCA	GC	Niben101Scf01768g02028.1/Niben101Scf00780g02001.1
Transportin_sgRNA8.f	ATTGGCTTTGGTCCCATAGGTGA	GC	Niben101Scf01768g02028.1/Niben101Scf00780g02001.1
Transportin_sgRNA8.r	AAACTCACCTATGGCACCAAGAGC	GC	Niben101Scf01768g02028.1/Niben101Scf00780g02001.1
NbHelicase_sgRNA1.f	ATTGCTTGCCACTATGCCGCCTG	GC	Niben101Scf01998g00002.1/Niben101Scf01848g05002.1
NbHelicase_sgRNA1.r	AAACAGGGCGGCATAGTGGCAGAG	GC	Niben101Scf01998g00002.1/Niben101Scf01848g05002.1
NbHelicase_sgRNA2.f	ATTGAGTTCATGAACAAGCCCTGTG	GC	Niben101Scf00394g00001.1/Niben101Scf01848g05002.1/Niben101Scf01998g00002.1
NbHelicase_sgRNA2.r	AAACCACAGGCTTGTTCATGAACT	GC	Niben101Scf00394g00001.1/Niben101Scf01848g05002.1/Niben101Scf01998g00002.1
NbHelicase_sgRNA3.f	ATTGGACACTCTGGGTATGGCTA	GC	Niben101Scf01998g00002.1/Niben101Scf01848g05002.1
NbHelicase_sgRNA3.r	AAACTAGCCCATCACCCAGAGTGTG	GC	Niben101Scf01998g00002.1/Niben101Scf01848g05002.1
NbHelicase_sgRNA4.f	ATTGCATACAGTATCTGCAACTCA	GC	Niben101Scf01998g00002.1/Niben101Scf01848g05002.1
NbHelicase_sgRNA4.r	AAACTGAGTTGCAGATACTGTATG	GC	Niben101Scf01998g00002.1/Niben101Scf01848g05002.1
NbZFP_sgRNA1.f	ATTGGCGATTTATGACTCGTCCTG	GC	Niben101Ctg15635g00003.1
NbZFP_sgRNA1.r	AAACGAGACGAGTCATAAATCGC	GC	Niben101Ctg15635g00003.1
NbZFP_sgRNA2.f	ATTGCACTGGTGCATATTATCTT	GC	Niben101Ctg15635g00003.1
NbZFP_sgRNA2.r	AAACAAGAAATAATATGCACCAGTG	GC	Niben101Ctg15635g00003.1

Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz	Verwendung	Beschreibung
NbZFP_sgRNA3.f	ATTGCTGGTACATTGGTTGGGGCT	GC	Niben101Ctg15635g00003.1
NbZFP_sgRNA3.r	AAACAGCCCCCAACCAATGTACCAG	GC	Niben101Ctg15635g00003.1
NbZFP_sgRNA4.f	ATTGCAGGGGTTAAATTAAGATCG	GC	Niben101Ctg15635g00003.1
NbZFP_sgRNA4.r	AAACCGATCTTAATTTAACCCCTG	GC	Niben101Ctg15635g00003.1
AKIP-sgRNA1_f	ATTGTGAGTACTACTCAGAAACCGG	GC	Niben101Scf05519g01004.1/Niben101Scf01001g07022.1
AKIP-sgRNA1_r	AAACCCGGTTTCTGAGTATACTCA	GC	Niben101Scf05519g01004.1/Niben101Scf01001g07022.1
AKIP-sgRNA2_f	ATTGAAGTTTGGTGAAGTTGAGGA	GC	Niben101Scf05519g01004.1/Niben101Scf01001g07022.1
AKIP-sgRNA2_r	AAACTCCTCAACTTCACCAAACCTT	GC	Niben101Scf05519g01004.1/Niben101Scf01001g07022.1
AKIP-sgRNA3_f	ATTGGCATACTTCATTGTCCAGA	GC	Niben101Scf05519g01004.1/Niben101Scf01001g07022.1
AKIP-sgRNA3_r	AAACTCTGACAAATGAAGTGTATGC	GC	Niben101Scf05519g01004.1/Niben101Scf01001g07022.1
AKIP-sgRNA4_f	ATTGGGTAATGCTGTGGGGCTGC	GC	Niben101Scf05519g01004.1/Niben101Scf01001g07022.1
AKIP-sgRNA4_r	AAACGCAGCCGCAACAGCATTACC	GC	Niben101Scf05519g01004.1/Niben101Scf01001g07022.1
Ago1-for	TGGTGGTGTGAGAGTTTTG	PCR/S	Niben101Scf05146g06007.1/Niben101Scf01571g04001.1
Ago1-rev-2	TGCTGGTTGATTGCTTTGGG	PCR/S	Niben101Scf05146g06007.1/Niben101Scf01571g04001.1
Ago1-2_Cas-Mut.f	AGCTCTGGGTCTCAAGAAAC	PCR/S	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
Ago1-2_Cas-Mut.r	AAGTCTTTGTCAGGCAGCTC	PCR/S	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
Cyp_sgmuf_f	GGAGTTCGTTTTTCATCGTGTG	K/PCR/S	Niben101Scf03080g00001.1/Niben101Scf03300g00004.1
Cyp_sgmuf_r	ATCACCCAGTAGTCACATGTTCC	PCR/S	Niben101Scf03080g00001.1/Niben101Scf03300g00004.1
NbTRN_Cas-Mut.f	ATGGCGGGCGGAGTGGAAC	PCR/S	Niben101Scf01718g06002.1/Niben101Scf02908g03006.1
NbTRN_Cas-Mut.r	GCATCCATGGCTCCTTCC	PCR/S	Niben101Scf01718g06002.1/Niben101Scf02908g03006.1
NbHelicas-Cas-M.f	ATTTTCCAACTGCTGCCACC	PCR/S	Niben101Scf01998g00002.1/Niben101Scf01948g05002.1
NbHelicas-Cas-M.r	TGCAGGTAGTTCTCTGGCTG	PCR/S	Niben101Scf01998g00002.1/Niben101Scf01948g05002.1
NbZFP-Cas-M.f	ATGAAGAGAAGCAGAGAAGAGG	PCR/S	Niben101Ctg15635g00003.1
NbZFP-Cas-M.r	CAAAAACAGGAGCAGGTGTCG	PCR/S	Niben101Ctg15635g00003.1
NbAKIP_for	GGTGAGATTGAGGATTGTAAGGC	PCR/S	Niben101Scf05519g01004.1/Niben101Scf01001g07022.1
NbAKIP_rev	GAATATTTCCCTTCTTTGCAGG	PCR/S	Niben101Scf05519g01004.1/Niben101Scf01001g07022.1
Ago1-2Nb1f	GCTAGCTAGCGCCATGGTGAAGAGGAACTG	K	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
Ago1-2Nb1r	TCCCCGGGGAAATTAGCAGTAGAACAATAAACCCTCTTC	K	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1

Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz	Verwendung	Beschreibung
Ago1-2Nb1r_EcoRV	GCCAGATATCTGGCACATTTGTGC	K	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
Ago1-2Nb1f_EcoRV	ACAAATGTCCAGATATCTGGC	K	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
Ago1-2NbSQ1f	TTGTGATCAAAATTTGGCTGCCCG	S	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
Ago1-2NbSQ2f	AAAGGACTGCCCTGCCACAAGTTG	S	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
Ago1-2NbSQ3f	ATATGCCACCCGACAGAGTTTG	S	Niben101Scf08137g02022.1.1/Niben101Scf00887g01007.1
Myc-Tag Xba überhänge	CTAGAGCCATGGAGCAGAAAGCTTATTTCTGAGGAGGATCTT	K	Myc Sequenz, Iki et. al/2012, EQKLISEEDL
Myc-rev	AAGATCCTCCTCAGAAATAAGCTTCTGCTCCATGGCT	K	Myc Sequenz, Iki et. al/2012, EQKLISEEDL
NbZFP_for	AAGAGAAGCAGAGAAGGATAG	K	Niben101Ctg15635g00003.1
NbZFP_rev	CCCGGGTTAGATAAAGCAGCGCAAAACAG	K	Niben101Ctg15635g00003.1
NbHelicase_f	ATTTCCACAAGAGTAATTCATAG	K	Niben101Scf01848g05002.1
NbHelicase_r	CCCGGGTCAAAAGGAGATCGGCCACATTG	K	Niben101Scf01848g05002.1
NtAgo-Domain_1_f	GTGCGGAAGAGGAGAACTG	K	Nitab4.5_0005973g0030.1/Nitab4.5_0001180g0170.1
NtAgo-Domain_1_r	CCCGGGCTAGCAGTAGAACATAACCCCTC	K	Nitab4.5_0005973g0030.1
NtAgo-Domain2_r	CCCGGGCTAGCAATAGAACATAAACCCCTC	K	Nitab4.5_0001180g0170.1_AgoDomain
NIEF1a_f	GGTAAAGAGAAATTCACATCAAC	K	Nitab4.5_0001802g0030.1_EF1a.Translation elongation
NIEF1a_r	CCCGGGTCATTTCTTCTTGAGCAGCC	K	Nitab4.5_0001802g0030.1_EF1a.Translation elongation
NtChaperonin	GCTTTAGCTTTTCGATGAATTCGG	K	Nitab4.5_0000041g0130.1_Chaperonin
NtChaperonin	CCCGGGTCAATACTCAGATGGAGAAATCAC	K	Nitab4.5_0000041g0130.1_Chaperonin
NtRRD_f	GCGCAGATTCAGGTTCCAGC	K	Nitab4.5_0004376g0010.1_RNA recognition motif domain
NtRRD_r	CCCGGGTCAAGAAACAAGGTTGTCATTGAG	K	Nitab4.5_0004376g0010.1_RNA recognition motif domain
ATPR7_f	TTTAAACGGGTTAATGGATCCTGAG	K	AT5G21990.1
ATPR7_r	CCCGGGCTAGTTTCCAATATAGCCGAGAC	K	AT5G21990.1
NtAKIP_f	GCGAAGAAGCGAAAAACCAG	K	Nitab4.5_0002915g0070.1
NtAKIP_r	CCCGGGTCATTTGGAGAGTGCCCGG	K	Nitab4.5_0002915g0070.1
NanoLuc_f	GTCITCACACTCGAAGATTTTCG	K	
NanoLuc_r	CCCGGGTTACGCCAGAAATCGGTTCCG	K	
GFP_f	GTGAGCAAGGGCGGAGGAG	K	
GFP_r	CCCGGGTCATTTGTATAGTTCCATCCATGCC	K	

Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz	Verwendung	Beschreibung
NbCyp40_r	CCCGGGCTATTTTGGAAACATCCTGGCG	K	Niben101Scf03080g00001.1/Niben101Scf03300g00004.1
gf698-21A-gs-D	aaguucaucccaugccaugugu	siRNA	21 nt lange siRNA
gf698-21A-ps-D	acauggcauggaagaacuuua	siRNA	21 nt lange siRNA
gf698-21U-gs-D	uaguucaucccaugccaugugu	siRNA	21 nt lange siRNA
gf698-21U-ps-D	acauggcauggaagaacuuua	siRNA	21 nt lange siRNA
gf698-21A-gs-D	AAGTTCATCCATGCCATGTGT	ASO	21nt lange DNA als ASO
gf698-21U-gs-D	TAGTTCATCCATGCCATGTGT	ASO	21nt lange DNA als ASO
gf698-21U-ps-D	TGGCCTAAGAAAAGAGATTTTT	ASO	21nt lange DNA als ASO
gf698-21C-gs-D	CAGTTCATCCATGCCATGTGT	ASO	21nt lange DNA als ASO
gf698-21G-gs-D	GAGTTCATCCATGCCATGTGT	ASO	21nt lange DNA als ASO
gf698-17T-gs-D	ATAGTTCATCCATGCCA	ASO	17 nt lange DNA als ASO
gf698-18T-gs-D	ATAGTTCATCCATGCCAT	ASO	18 nt lange DNA als ASO
gf698-19T-gs-D	TAGTTCATCCATGCCATGT	ASO	19 nt lange DNA als ASO
gf698-20T-gs-D	TAGTTCATCCATGCCATGTG	ASO	20 nt lange DNA als ASO
gf698-22U-gs-D	TAGTTCATCCATGCCATGTGTA	ASO	22 nt lange DNA als ASO
gf698-23T-gs-D	TAGTTCATCCATGCCATGTGTAA	ASO	23 nt lange DNA als ASO
gf698-24T-gs-D	TAGTTCATCCATGCCATGTGTAAT	ASO	24 nt lange DNA als ASO
gf698-25T-gs-D	TAGTTCATCCATGCCATGTGTAAATC	ASO	25 nt lange DNA als ASO
gf698-27-gs-D	ATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCC	ASO	27 nt lange DNA als ASO
gf698-27-B1-gs-D	ATAGTTCATCCATGCCAAGTGTAAATCC	ASO	27 nt lange DNA als ASO mit einem mismatch
gf698-27-B2-gs-D	ATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCC	ASO	27 nt lange DNA als ASO mit einem mismatch
gf698-27-B3-gs-D	ATAGTTCATCCATGCCCTTGTGTAATCC	ASO	27 nt lange DNA als ASO mit einem mismatch
GFP2f-5'-RACE	AGAATCGAGTTAAAAGGTATTG	RACE/PCR	Verwendung in Taq-PCR zur vervielfältigung des 5' RNaseH-Spaltfragments
5' RACE Outer Primer	GCTGATGGCGATGAATGAACACACTG	RACE	Verwendung in Taq-PCR zur vervielfältigung des 3' RNaseH-Spaltfragments
15.22 3' RT	ATTGATGGTGCCTAC	RACE	cDNA-Synthese des 5' RNase H-Spaltfragments
17.92 3' PCR	ATTGATGGTGCCTACAG	RACE	Verwendung in Taq-PCR zur vervielfältigung des 5' RNaseH-Spaltfragments
TraGFP1r	ATTTGGGCGGCTTATCTAGATCCGGTGGATCCCG	RACE/PCR	cDNA-Synthese des 3' RNase H-Spaltfragments/Verwendung in Taq-PCR
dsPCR5_f	TTGTGGGGTTTGAAGGTTGG	PCR	PCR zur generierung des TBSV 5' Fragments

Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz	Verwendung	Beschreibung
dsPCR5_r	AGGTACAGATGGTCTAGGCAC	PCR	PCR zur generierung des TBSV 5' Fragments
dsPCR3_f	GCTATACAAGGAAACGACGCTAG	PCR	PCR zur generierung des TBSV 3' Fragments
dsPCR3_r	CACTCATCTCCACAAACTCAGAC	PCR	PCR zur generierung des TBSV 3' Fragments
GFP_RHT1	GGATTACACATGGCATGGATGAACTAT	CA-target	DNA-target mit 0 integrierten Ribonukleotiden (Kleinbuchstaben)
GFP_RHT2	GGATTACACaTGGCATGGATGAACTAT	CA-target	DNA-target mit 1 integrierten Ribonukleotiden (Kleinbuchstaben)
GFP_RHT3	GGATTACACaTGGCATGGATGAACTAT	CA-target	DNA-target mit 2 integrierten Ribonukleotiden (Kleinbuchstaben)
GFP_RHT4	GGATTACaCaugGCATGGATGAACTAT	CA-target	DNA-target mit 4 integrierten Ribonukleotiden (Kleinbuchstaben)
GFP_RHT5	ggauuacacauggcauggaagacu	CA-target	RNA-target
GFP_RHT6	GGATTACACauggGCATGGATGAACTAT	CA-target	DNA-target mit 2 integrierten Ribonukleotiden (Kleinbuchstaben)
GFP_RHT7	GGATTACACauggGCATGGATGAACTAT	CA-target	DNA-target mit 4 integrierten Ribonukleotiden (Kleinbuchstaben)
GFP_RHT8	ggauuacacaTGGCATGGATGAACTAT	CA-target	DNA-target mit 10 integrierten Ribonukleotiden (Kleinbuchstaben)
M1-9nt	GGATTACAC	Marker	DNA-Oligonukleotide als Größenstandard mit 0
M2-10nt	GGATTACACA	Marker	DNA-Oligonukleotide als Größenstandard mit 0
M3-11nt	GGATTACACAT	Marker	DNA-Oligonukleotide als Größenstandard mit 0
M4ssDR-10nt	GGATTACACa	Marker	DNA-Oligonukleotide als Größenstandard mit 1 Ribonukleotid
M5ssDR-10nt	GGATTACAcA	Marker	DNA-Oligonukleotide als Größenstandard mit 2 Ribonukleotiden
M6ssDR-11nt	GGATTACACaU	Marker	DNA-Oligonukleotide als Größenstandard mit 2 Ribonukleotiden
M7ssR-15nt	ggauuacacauggca	Marker	RNA-Oligonukleotide als Größenstandard
M8ssR-10nt	ggauuacaca	Marker	RNA-Oligonukleotide als Größenstandard
siTVGM179m-gs	ugggucuccauggcguug	siRNA	21 nt lange TBSV siRNA
siTVGM179m-ps	agcgacauggagaccacaag	siRNA	21 nt lange TBSV siRNA
siTVGM209m-gs	aaaucucuuuuaggccaaa	siRNA	21 nt lange TBSV siRNA
siTVGM209m-ps	uggccuaaagaagagauuuu	siRNA	21 nt lange TBSV siRNA
siTVGM209mU-gs	uaaucucuuuuaggccaaa	siRNA	21 nt lange TBSV siRNA
siTVGM209mU-ps	uggccuaaagaagagauuuu	siRNA	21 nt lange TBSV siRNA
siTVGM179m-gs-D	TGATGGTCTCCATGTCCGCTTG	ASO	21nt lange TBSV ASO
siTVGM179mA-gs-D	AGATGGTCTCCATGTCCGCTTG	ASO	21nt lange TBSV ASO
siTVGM209m-gs-D	AAATCTCTTTCTTAGGCCAAA	ASO	21nt lange TBSV ASO

Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz	Verwendung	Beschreibung
siTVGM209m-ps-D	TGGCCTAAGAAAGAGATTTTT	ASO	21nt lange TBSV ASO
siTVGM209mT-gs-D	TAATCTCTTTCTTAGGCCAAA	ASO	21nt lange TBSV ASO
siTVGM3243m-gs-D	ATTCGCCAACTCAACTCTATC	ASO	21nt lange TBSV ASO
siTVGM3701m-gs-D	AAAAACGCACCTGTCTGTACCT	ASO	21nt lange TBSV ASO
siTVGM3722m-gs-D	TTAGAGACAGTACAAITTTATG	ASO	21nt lange TBSV ASO
siTVGM3939m-gs-D	TTACACTGTTAGCTTGTTCCTT	ASO	21nt lange TBSV ASO
siTVGM209m-D-MOE2	5AATCTCTTTCTTAGGCCAA5	ASO	ASO mit MOE-Modifikation; 5=MOE-A
siTVGM209m-D-MOE4	55ATCTCTTTCTTAGGCCAA55	ASO	ASO mit MOE-Modifikation; 5=MOE-A
siTVGM209m-D-OMe2	5AATCTCTTTCTTAGGCCAA5	ASO	ASO mit ME-Modifikation; 5=ME-A
siTVGM209m-D-OMe4	55ATCTCTTTCTTAGGCCAA55	ASO	ASO mit ME-Modifikation; 5=ME-A
siTVGM209m-D-LNA2	5AATCTCTTTCTTAGGCCAA5	ASO	ASO mit LNA-Modifikation; 5=LNA-A
siTVGM209m-D-PTO2	A*AAATCTCTTTCTTAGGCCAA*A	ASO	ASO mit PS-Modifikation; *=PS
siTVGM209m-D-PTO20	A*A*A*T*C*T*C*T*T*T*A*G*G*C*C*A*A*A	ASO	ASO mit PS-Modifikation; *=PS
siTVGM3701m-D-MOE2	5AAAAACGCACCTGTCTGTACC6	ASO	ASO mit MOE-Modifikation; 5=MOE-A; 6=MOE-T; 7=MOE-C
siTVGM3701m-D-MOE4	55AAAAACGCACCTGTCTGTACC6	ASO	ASO mit MOE-Modifikation; 5=MOE-A; 6=MOE-T
siTVGM3701m-D-OMe2	5AAAAACGCACCTGTCTGTACC6	ASO	ASO mit ME-Modifikation; 5=ME-A; 6=ME-T
siTVGM3701m-D-OMe4	55AAAAACGCACCTGTCTGTACC6	ASO	ASO mit ME-Modifikation; 5=ME-A; 6=ME-T; 7=ME-C
siTVGM3701m-D-LNA2	5AAAAACGCACCTGTCTGTACC6	ASO	ASO mit LNA-Modifikation; 5=LNA-A; 6=LNA-T
siTVGM3701m-D-PTO2	A*AAAAACGCACCTGTCTGTACC*T	ASO	ASO mit PS-Modifikation; *=PS
siTVGM3701m-D-PTO20	A*A*A*A*A*C*G*C*A*A*C*T*G*T*C*T*G*T*A*C*C*T	ASO	ASO mit PS-Modifikation; *=PS
NbRH2A-Ncol.1f	CATGCCATGGGTTCCGTTAGGCCAGC	K	Niben101Scf08240g01016.1
NbRH2A-Smal.1r	TCCCCCGGGGAATCAAAAACCTGTGAGAGAAATTC AAG	K	Niben101Scf08240g01016.1
NbRH2B1-Bsal.1f	GGCTACGGTCTCTCATGCACCTTGACATTCGCACC	K	Niben101Scf02372g000005.1
NbRH2B2-Bsal.1f	GGCTACGGTCTCTCATGGACCTTGACATTCGCCACC	K	Niben101Scf11702g000019.1
NbRH2B-Smal.1r	TCCCCCGGGGAATTCATCTTCCCCTCCTAGTAGCC	K	Niben101Scf11702g000019.1
NbRH2C1-Ncol.1f	CATGCCATGGAGAGAAACACCCGGCG	K	Niben101Scf03867g02043.1
NbRH2C1-Smal.1r	TCCCCCGGGGAATCATAACTCTAATTCCTTGATCAATTCG	K	Niben101Scf03867g02043.1
NbRH2C2-Ncol.1f	CATGCCATGGAGAGAAACACCCGGCG	K	Niben101Scf02174g03010.1

Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz	Verwendung	Beschreibung
NbRH2C2-Smal.1r	TCCCCCGGGGAATCAGTTCATAAAGTCTTAACTCTTG	K	Niben101Scf02174g03010.1
HA-tag-Xbal.f	CTAGAGCCATGTACCCATACCCATACGATGTTCCAGATTACGC	K	HA-Sequenz zur Klonierung von HA-RH2
HA-tag-NcoI.r	CATGGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATGGCT	K	HA-Sequenz zur Klonierung von HA-RH2
FLAG-tag-Xbal.f	CTAGAGCCATGGACTACAAGGATGACGATGACAAGTC	K	FLAG-Sequenz zur Klonierung von FLAG-RH2
FLAG-tag-NcoI.r	CATGGACTTGTGCATCGTCATCCCTGTAGTCCATGGCT	K	FLAG-Sequenz zur Klonierung von FLAG-RH2

*Abkürzungen: K: Klonierung, S: Sequenzierung; ASO: antisense-Oligonukleotid, siRNA: *small interfering RNA*, gs: *guide strand*, ps: *passanger strand*, CA: *cleavage Assay*, RACE: *Rapid amplification of cDNA ends*, PCR: Polymerasekettenreaktion; GC: *golden gate*-Klonierung, Niben: *Nicotiana benthamiana*, Nitab: *Nicotiana tabacum*, RH: RNase H, ffor: *forward*, rrev: *reverse*, HA-, FLAG-, Myc-tags, Kleinbuchstaben markieren die Ribonukleotide, OMe: 2'-O-Methyl-Modifikation, MOE: 2'-O-Methoxyethyl-Modifikation, LNA: *Locked nucleic acid*-Modifikation, *PS: Phosphorothioat-Modifikation

Als Beschreibung wurden die Accession-Nummern der entsprechenden Gene aus der Solgenomics- und der TAIR-Datenbank angegeben.

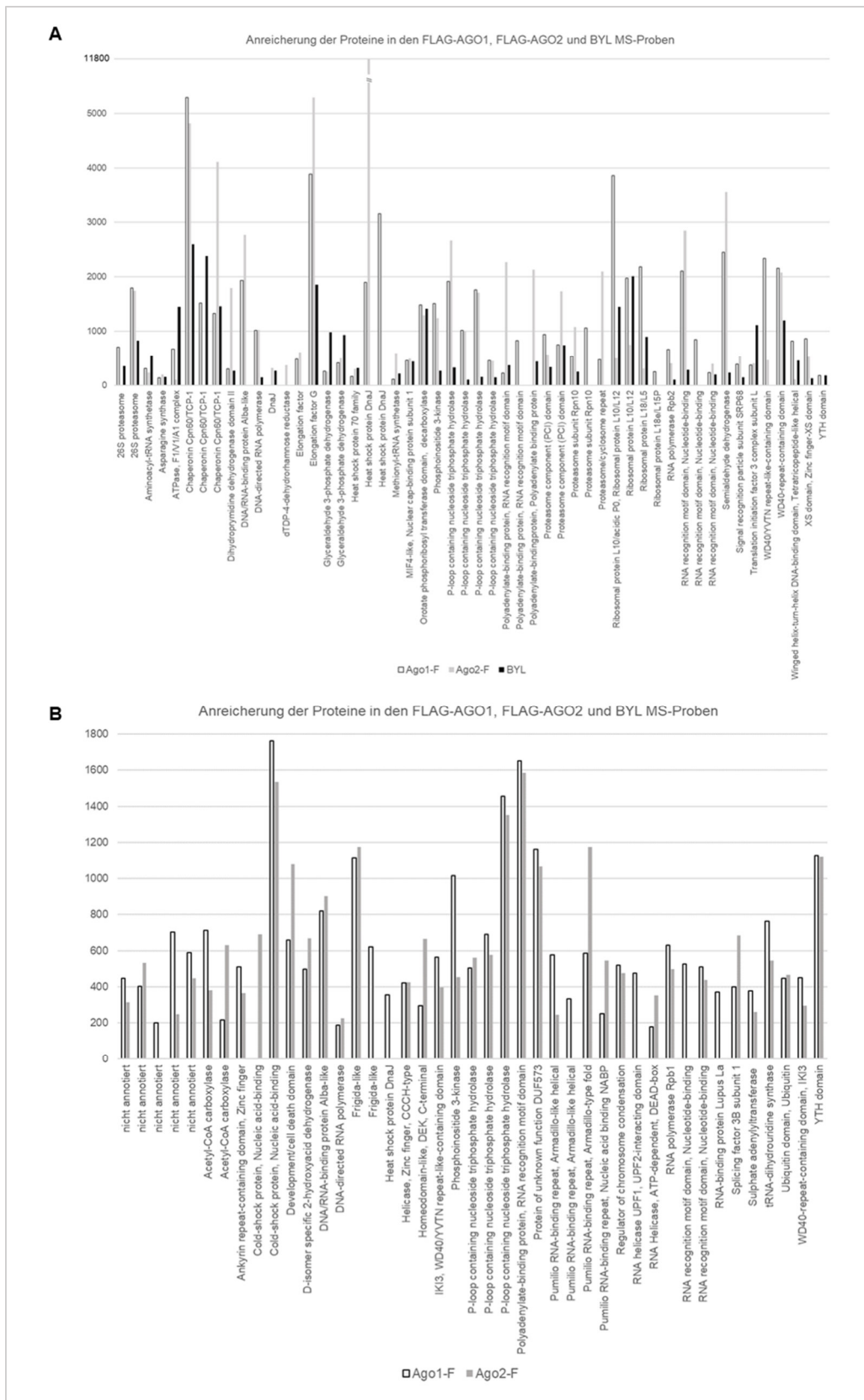


Abbildung 6.1: Menge der quantifizierten *N. tabacum*-Proteine in parts per million (ppm).
(A) 52 Proteine, welche in den drei MS-Proben FLAG-AGO1, FLAG-AGO2 und BYL identifiziert wurden. **(B)** 43 Proteine, welche in der IP FLAG-AGO1 und FLAG-AGO2 identifiziert wurden.

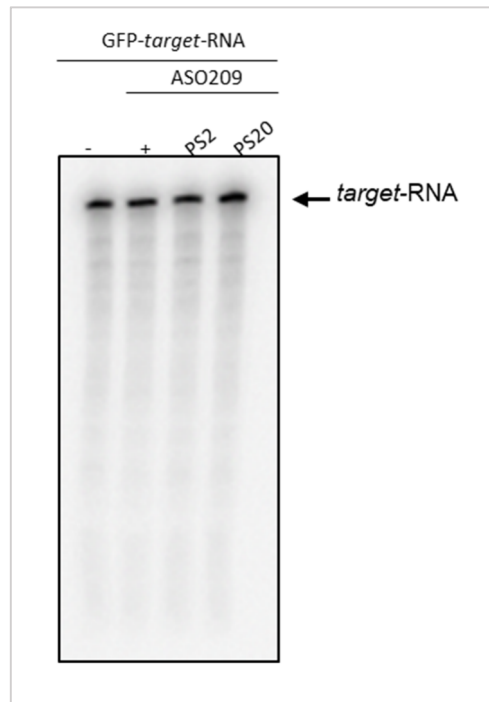
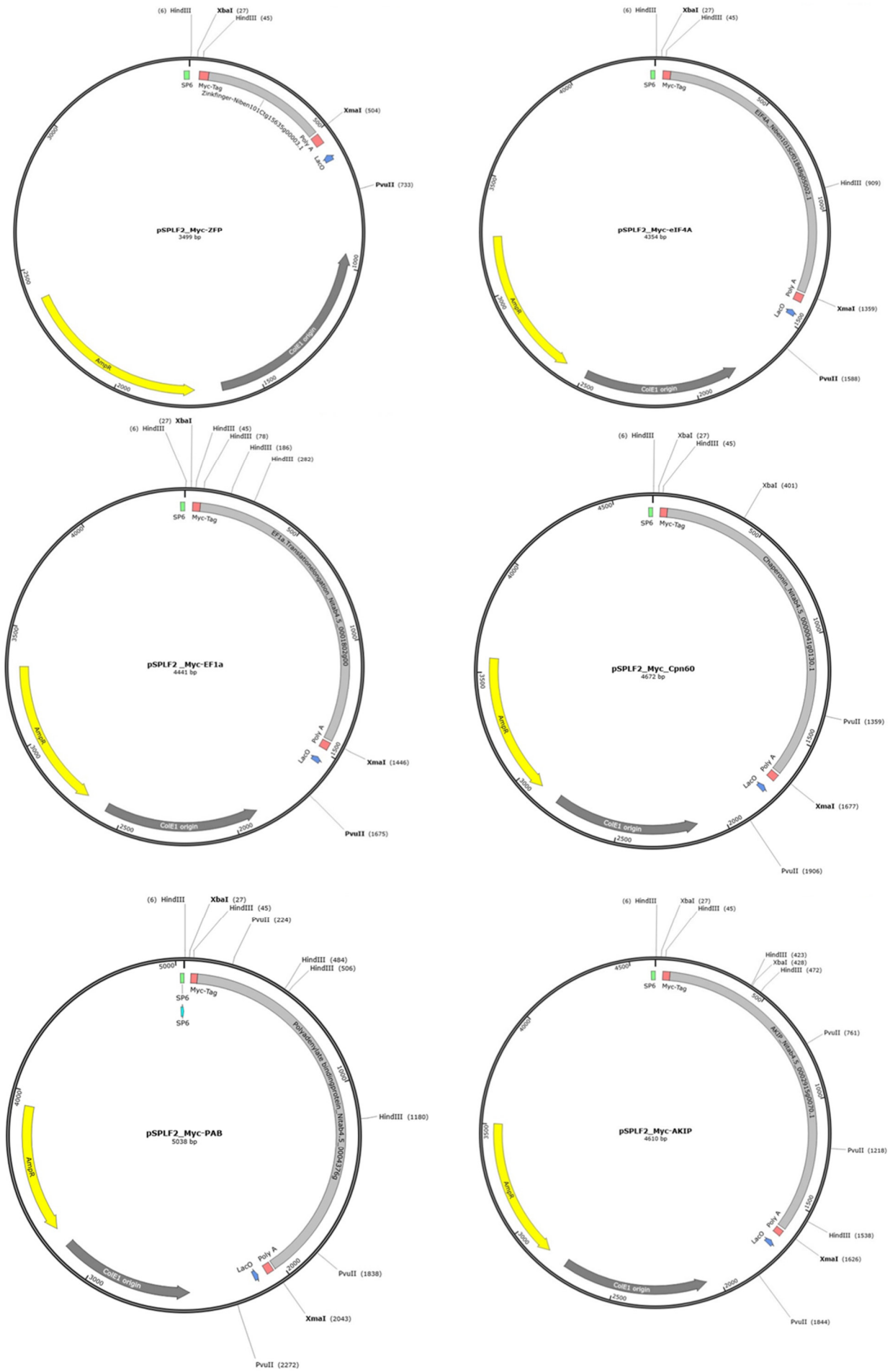


Abbildung 6.2: Sequenz-unspezifische Stabilisierung der GFP-*target*-RNA durch PS20-modifiziertes ASO209.

Es wurde die *target*-RNA mit dem Sequenz-unspezifischen ASO209 ohne Modifikation (+), mit PS2-Modifikation (PS2) und mit der PS20-Modifikation (PS20) für 15 min in BYL inkubiert. Als Negativkontrolle diente die *target*-RNA ohne ASO (-).



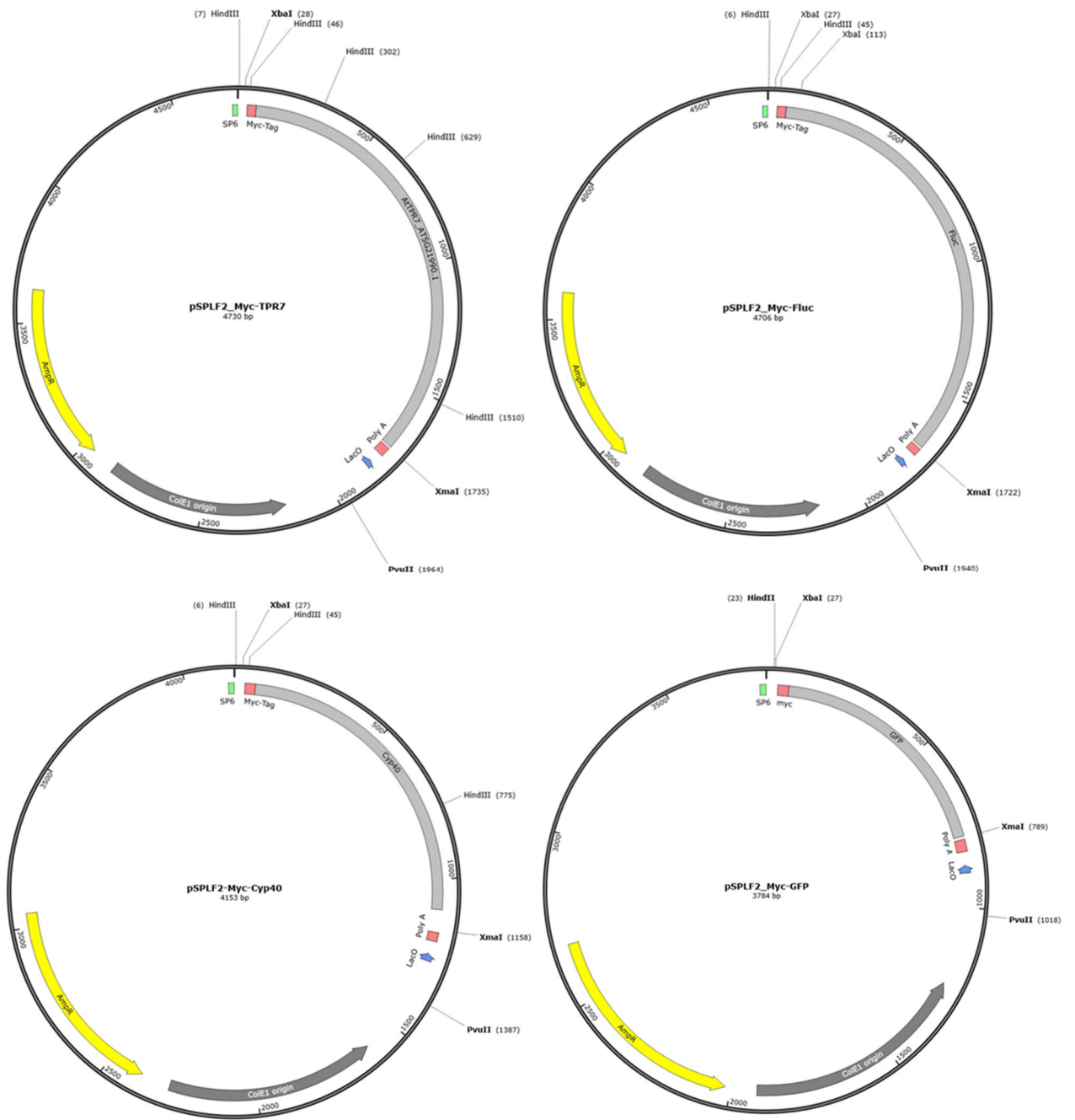
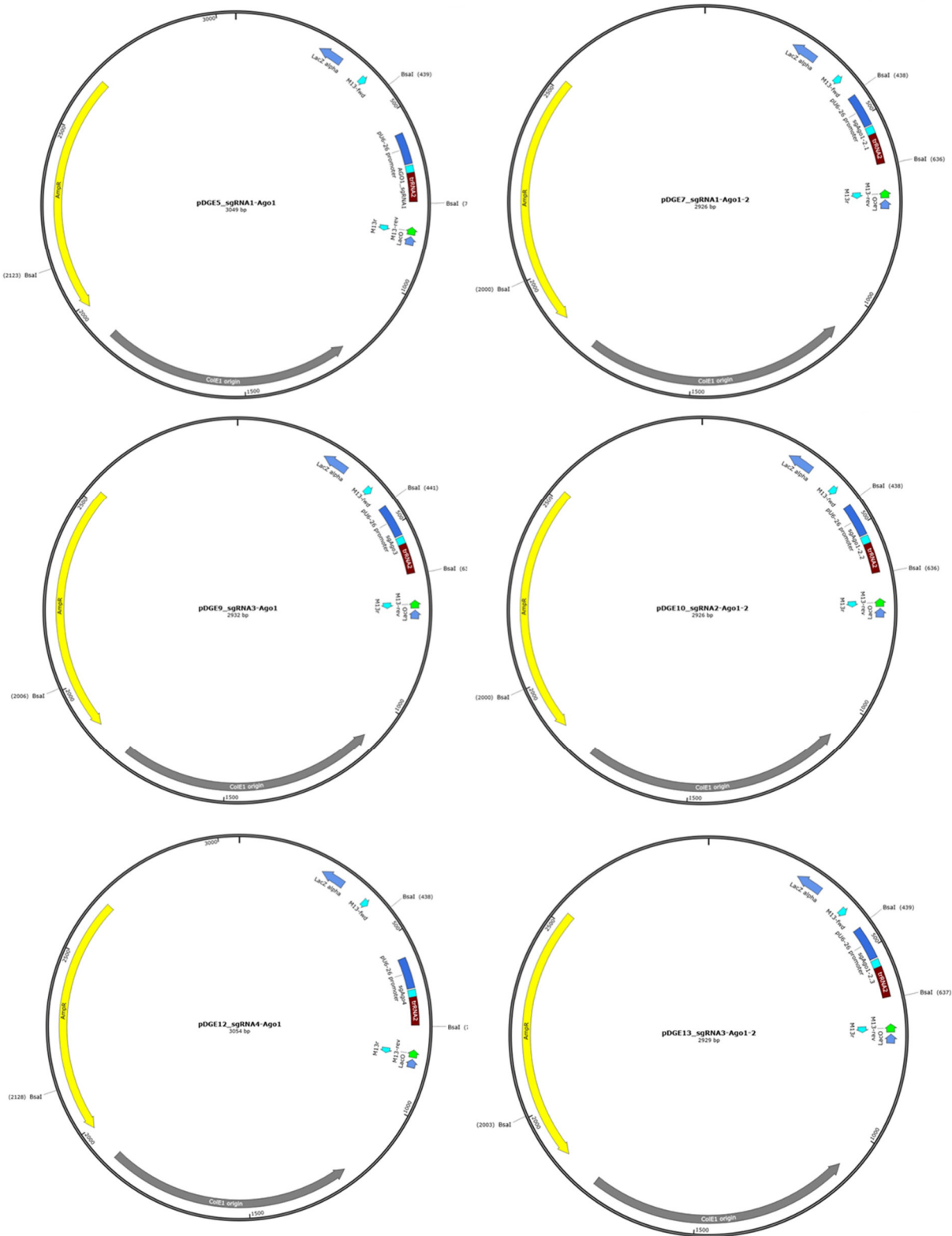


Abbildung 6.3: Plasmidkarten mit den klonierten CDS der potenziellen RISC-Faktoren.

Dargestellt ist der pSPLF2-Vektor mit den beschriebenen CDS der verschiedenen Kandidaten ZFP, eIF4A, EF1a, Cpn60, PAB und AKIP und der Kontrollen TRP, CYP40, GFP, FLUC. Gekennzeichnet ist außerdem der Promotor, der Myc-Tag, der ColE1-Origen, der PolyA-Schwanz, der lac-Operator und die Amplicin-Resistenz.



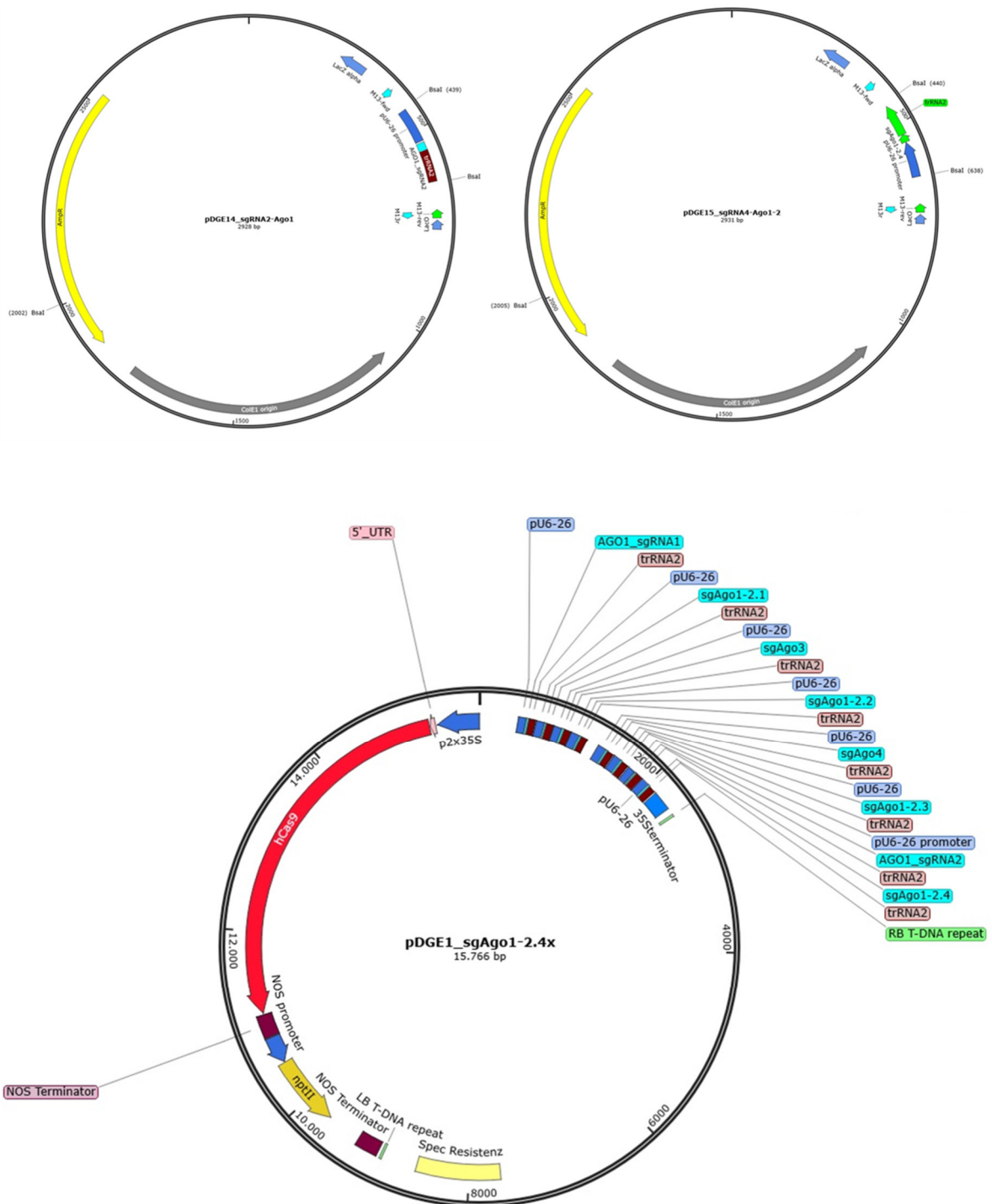


Abbildung 6.4: Plasmidkarten der CRISPR/Cas-Konstrukte.

Dargestellt sind die 8 Level 1-Konstrukte pDGE5, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15 mit der jeweiligen sgRNA beispielhaft komplementär zu AGO1-1 und AGO1-2, und das Level 2-Konstrukt, das die CDS von Cas9 enthält und in dem alle 8 sgRNAs aus den Level 1-Konstrukten vereint wurden. Gekennzeichnet sind außerdem Promotoren und Terminatoren, die Agrobakterien-spezifische Erkennungssequenz LB und RB zur Transformation, die Neomycinresistenz (nptII) für eine stabile Transformation und die Spectinomycin (Spec)-Resistenz.

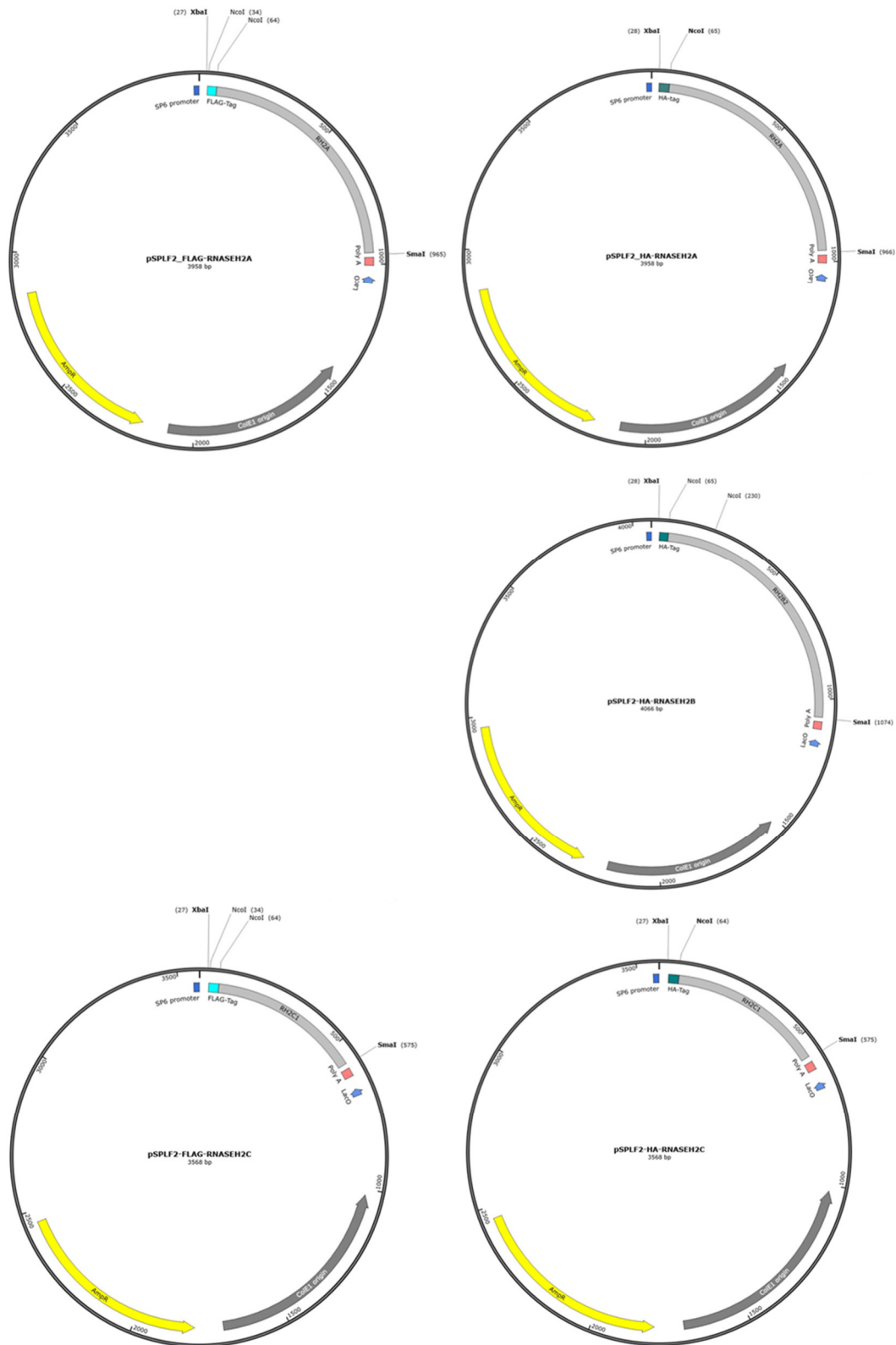


Abbildung 6.5: Plasmidkarten der CDS der RNase H2-Untereinheiten A, B und C.

Dargestellt ist der pSPLF2-Vektor mit den beschriebenen CDS der drei Untereinheiten. Gekennzeichnet ist außerdem der SP6-Promotor, der FLAG- oder HA-Tag, der ColE1-Origin, der PolyA-Schwanz, der lac-Operator und die Ampicillin-Resistenz.

VIII. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Cornelia Gruber

Staatsangehörigkeit deutsch

Ausbildung:

- seit 10.2016 Promotion „Untersuchung des AGO- und RNase H-abhängigen RNA silencings mittels pflanzlichen In-vitro-System zur Etablierung eines wirksamen antiviralen Pflanzenschutzmittels“,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Institut für Biochemie und Biotechnologie,
Abteilung Mikrobielle Biotechnologie,
Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens
- 10/2014 - 09/2016 Master of Science Biologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Masterarbeit: „Solanum lycopersicum MYB21 – Untersuchungen zur Interaktion mit JAZ-Proteinen und Herstellung von Tomaten-Mutanten mittels CRISPR/Cas9“,
Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle
Betreuerin: Prof. Dr. Bettina Hause
- 10.2011 - 07/2014 Bachelor of Science Biologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Bachelorarbeit: „Verifizierung möglicher Interaktionspartner des Typ-III-Effektors XopL aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*“
Institut für Biologie, Abteilung Pflanzengenetik
Betreuerin: Prof. Dr. Ulla Bonas
- 06/2010 Abitur an der Martin-Luther-Schule, Marburg

IX. Eidstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet habe. Textstellen, die aus diesen Quellen inhaltlich oder wörtlich übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt wurde und ich mich erstmals für die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Ort, Datum

Cornelia Gruber