



## **- BREAKING THE SILENCE -**

# **Untersuchung des antiviralen RNA-silencings in einem pflanzlichen *in vitro* System**

**Dissertation**

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I

(Biowissenschaften)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

**Jana Schuck**

geb. am 17.03.1986 in Potsdam

öffentlich verteidigt am 03.11.2014

Gutachter: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens  
Prof. Dr. Ulla Bonas  
PD Dr. Michael Wassenegger

***Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,  
das gelöst werden will.***

*Galileo Galilei*



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Der Mechanismus des RNA- <i>silencings</i>	1
1.1.1	Aufbau und Funktion von ARGONAUTE-Proteinen	2
1.1.2	Biogenese und Funktion kleiner regulatorischer RNAs	4
1.2	Das antivirale RNA- <i>silencing</i> in Pflanzen	9
1.2.1	Sekundäre vsiRNAs und RNA-abhängige RNA-Polymerasen	11
1.2.2	Virale Suppressoren des antiviralen RNA- <i>silencings</i>	11
1.3	TBSV (Tomatenzwerbuschvirus)	12
1.3.1	Morphologie und Genomorganisation von TBSV	13
1.3.2	Der Vermehrungszyklus von TBSV	13
1.3.3	Die Rolle von DI-RNAs während viraler Infektionen	14
1.4	Motivation der Arbeit	17
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
2.1	Chemikalien, Puffer und Verbrauchsmaterialien	19
2.2	Arbeiten mit Pflanzen, Zellen und Lysat	19
2.2.1	Prokaryotische Zellen	19
2.2.1.1	Kultivierungsbedingungen prokaryotischer Zellen	19
2.2.1.2	Herstellung und Transformation prokaryotischer Zellen	20
2.2.2	Eukaryotische Zellen und Pflanzenmaterial	21
2.2.2.1	Kultivierung pflanzlicher BY-2-Zellen in Suspension	21
2.2.2.2	Anzucht und Haltung von <i>Nicotiana benthamiana</i>	21
2.2.2.3	Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i>	22
2.2.2.4	Inokulation von <i>Nicotiana benthamiana</i> mit TBSV	22
2.2.2.5	Präparation von TBSV-Viruspartikeln	22
2.2.3	Arbeiten mit dem BYL <i>in vitro</i> System	23
2.2.3.1	Präparation zytoplasmatischer Extrakte aus BY-2-Zellen	23
2.2.3.2	Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung	24
2.2.3.3	<i>In vitro</i> Translation	24
2.2.3.4	Luciferase-Assay	25
2.2.3.5	DCL-Assay	25
2.2.3.6	<i>Cleavage</i> Assay	26
2.2.3.7	DCL/ <i>cleavage</i> Assay	27
2.2.3.8	<i>In vitro</i> Replikation von TBSV	27

2.2.3.9	<i>In vitro</i> Replikations-Inhibitionsassay	27
2.3	Molekulargenetische Arbeiten mit DNA	28
2.3.1	DNA-Isolation	28
2.3.1.1	Plasmid-Minipräparation	28
2.3.1.2	Plasmid-Midipräparation	28
2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.3.3	Restriktionsverdau von DNA	29
2.3.4	Reinigung und Präzipitation von DNA	29
2.3.5	Konzentrationsbestimmung von DNA	29
2.3.6	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA	30
2.3.7	Ligation von DNA-Fragmenten	30
2.3.8	PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> )	30
2.3.9	Quantitative <i>real time</i> -PCR	31
2.3.9.1	$\Delta\Delta c_t$ -Methode	32
2.3.10	DNA-Sequenzierung	33
2.3.10.1	RNA-Sequenzierung	33
2.3.10.2	Darstellung der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung als <i>heat map</i>	34
2.4	Molekulargenetische Arbeiten mit RNA	34
2.4.1	RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial	34
2.4.2	<i>In vitro</i> Transkription	35
2.4.2.1	<i>In vitro</i> Transkription mit 5'- <i>cap</i> -Analogon	36
2.4.2.2	Generierung radioaktiv markierter RNA	36
2.4.3	Reinigung von Nukleinsäuren	36
2.4.4	Präzipitation von RNA	36
2.4.5	Generierung doppelsträngiger RNA	37
2.4.6	Generierung von siRNA-Pools mittels ShortCut RNase III	37
2.4.7	Konzentrationsbestimmung von RNA	37
2.4.8	Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.4.9	Autoradiographie	38
2.4.10	Phosphorylierung von RNA	38
2.4.11	Reverse Transkription	39
2.4.11.1	Reverse Transkription maturer vsiRNAs	40
2.4.11.2	5'-RACE ( <i>Rapid amplification of cDNA ends</i> )	40
2.5	Proteinbiochemische Methoden	41
2.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli	41
2.5.2	Immunpräzipitation - Affinitätsreinigung	42
2.5.3	Western <i>blotting</i>	42

2.5.4 Silberfärbung . . . . .	43
<b>3 ERGEBNISSE . . . . .</b>	<b>45</b>
3.1 Rekonstitution der RISC-vermittelten RNA-Spaltung <i>in vitro</i> . . . . .	45
3.2 Rekonstitution des antiviralen RNA- <i>silencing in vitro</i> . . . . .	46
3.2.1 Die Inhibition der viralen Replikation erfolgt durch die Spaltung neu synthetisierter (+)RNA . . . . .	50
3.2.2 Die Repression der RISC-vermittelten Replikationsinhibition durch den <i>silencing</i> -Suppressor p19 . . . . .	54
3.3 Untersuchung verschiedener AGO/RISCs bezüglich ihres antiviralen Po- tentials . . . . .	55
3.4 Identifizierung effizienter viraler siRNAs . . . . .	59
3.4.1 Untersuchung der DCL-Aktivität <i>in vitro</i> . . . . .	59
3.4.2 Identifizierung effizienter vsiRNAs der (ds)R3.5-Region . . . . .	61
3.4.3 Untersuchung der antiviralen Wirkung von vsiRNA1 <i>in vivo</i> . . . . .	65
3.4.4 Charakterisierung von (+)vsiRNAs aus der (+)DI-R3.5-RNA . . . . .	67
3.4.4.1 Immunpräzipitation von funktionellem RISC . . . . .	68
3.4.4.2 Illumina <i>RNA sequencing</i> BYL-generierter vsiRNAs . . . . .	69
<b>4 DISKUSSION . . . . .</b>	<b>83</b>
4.1 Das BYL als <i>in vitro</i> System zur Untersuchung des antiviralen RNA- <i>silencings</i> . . . . .	83
4.2 Charakterisierung verschiedener AGO/RISCs bezüglich ihrer antiviralen Funktion . . . . .	85
4.3 Die Inhibition der viralen Replikation erfolgt auf (+)RNA-Ebene . . . . .	88
4.4 Identifizierung effizienter vsiRNAs aus doppelsträngiger RNA . . . . .	91
4.5 vsiRNA1 zeigt eine antivirale Wirkung <i>in vivo</i> . . . . .	93
4.6 vsiRNAs können direkt aus dem viralen Genom prozessiert werden . . . . .	95
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK . . . . .</b>	<b>99</b>
<b>6 ANHANG . . . . .</b>	<b>103</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS . . . . .</b>	<b>I</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS . . . . .</b>	<b>III</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS . . . . .</b>	<b>V</b>



# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aa	Aminosäure; <i>amino acid</i>
AGO	Argonaut-Nuklease
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	<i>auxin response factor</i>
At	<i>A. thaliana; Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Ce	<i>C. elegans; Caenorhabditis elegans</i>
3'-CITE	<i>3'-cap-independent translational enhancer</i>
DCL	<i>Dicer like proteins</i>
DCR	<i>Dicer</i>
dd	doppelt destilliert
DI-RNA	<i>defective interfering RNA</i>
<i>Dm</i>	<i>D. melanogaster; Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonuklexinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DRB	(ds)RNA-Bindeprotein
DRM	<i>domains rearranged methyltransferase</i>
(ds)	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEF1 $\alpha$	<i>eucaryotic translation elongation factor 1 <math>\alpha</math></i>
ESCRT	<i>endosomal sorting complexes required for transport</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gs	<i>guide strand</i>
h	Stunden
HEN1	<i>HUA enhancer 1</i>
<i>Hs</i>	<i>H. sapiens; Homo sapiens</i>
Hsp70	<i>heatshock protein 70</i>
HYL1	<i>hyponastic leaves 1</i>
MID	<i>middle domain</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
m7G	7-Methylguanosin
mM	millimolar



<i>Mm</i>	<i>M. musculus; Mus musculus</i>
nat-siRNA	<i>natural cis-acting small interfering RNA</i>
<i>Nb</i>	<i>N. benthamiana; Nicotiana benthamiana</i>
nf	Nuklease-frei
<i>Nt</i>	<i>N. tabacum; Nicotiana tabacum</i>
nt	Nukleotid
NTR	nicht translatierte Region
oligo-dT	oligo-Desoxythymidin
ORF	<i>open reading frame</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PAZ	Piwi-Argonaut-Zwille-Domäne
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
piRNA	<i>piwi-interacting RNA</i>
PIWI	<i>P-element induced wimpy testis</i>
PMSF	Phenylmethyldisulfonylfluorid
Pol II	DNA-abhängige RNA-Polymerase II
ps	<i>passenger strand</i>
PTGS	<i>posttranscriptional gene silencing</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA-ends</i>
ra-siRNA	<i>repeat-associated small interfering RNA</i>
RBD	RNA-bindende Domäne
RDR	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	reverse Transkription, <i>reverse transcription</i>
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
sgRNA	subgenomische RNA
SGS3	<i>Suppressor of Gene Silencing 3</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLA	stem loop A
<i>Sp</i>	<i>S. pombe; Schizosaccharomyces pombe</i>
sRNA	<i>small RNA</i>
(ss)	einzelsträngig
TAS-Gen	<i>trans acting small interfering RNA-Gen</i>
ta-siRNA	<i>trans acting small interfering RNA</i>

---

TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGS	<i>transcriptional gene silencing</i>
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
U	<i>units</i>
VIGS	<i>virus-induced gene silencing</i>
vRdRp	virale RNA-abhängige RNA-Polymerase
vsiRNA	<i>viral small interfering RNA</i>
VSR	<i>viral suppressor of RNA silencing</i>
v/v	Volumen pro Volumen, <i>volume per volume</i>
WAGO	<i>worm Argonaute</i>
w/v	Masse pro Volumen, <i>weight per volume</i>
z.B.	zum Beispiel

#### **Ribonukleosidtriphosphate**

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat

#### **Desoxyribonukleosidtriphosphate**

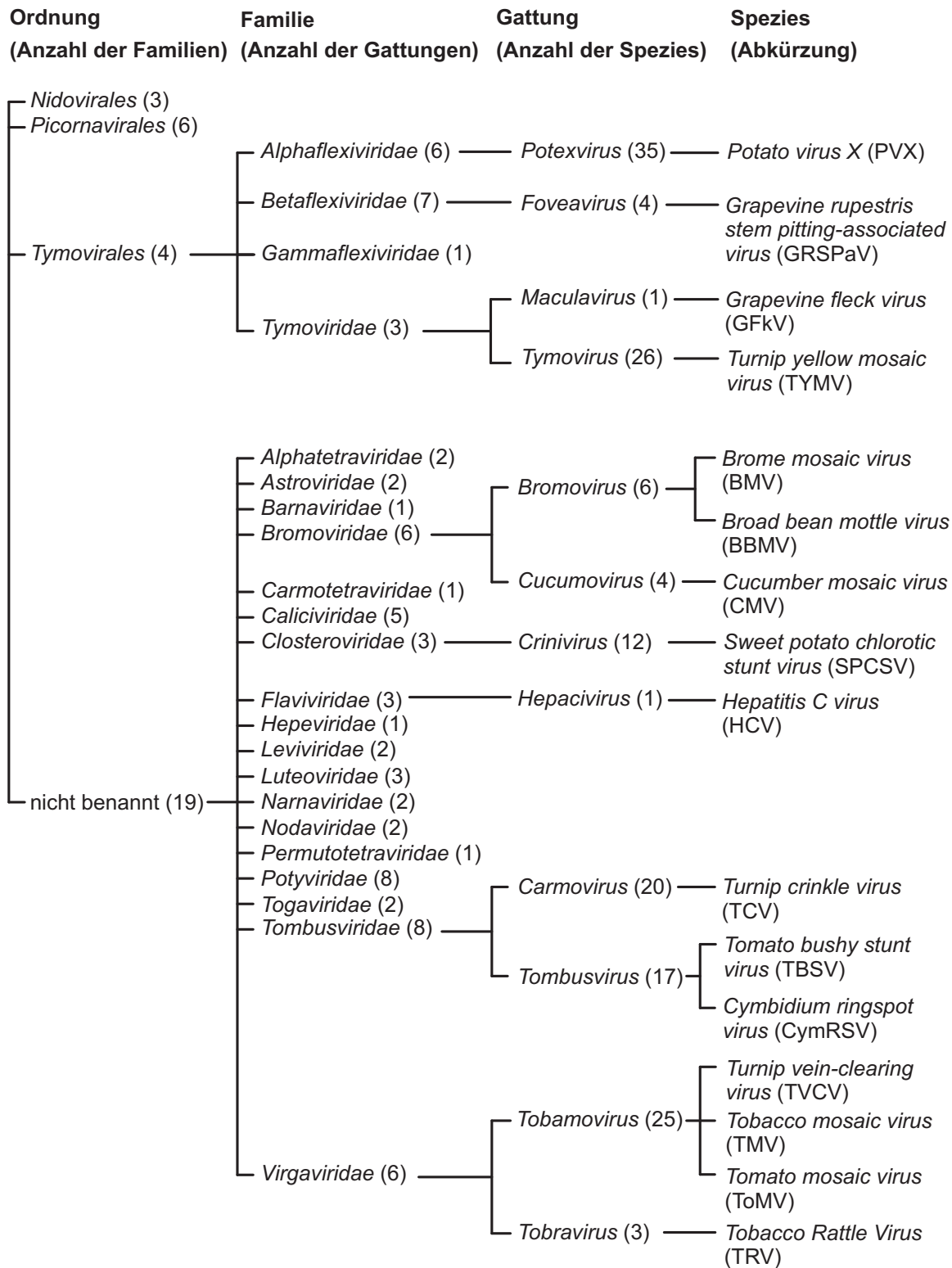
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat

#### **Aminosäuren**

A	Ala	Alanin	L	Leu	Leucin
R	Arg	Arginin	K	Lys	Lysin
N	Asn	Asparagin	M	Met	Methionin
D	Asp	Asparaginsäure	F	Phe	Phenylalanin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin	S	Ser	Serin
E	Glu	Glutaminsäure	T	Thr	Threonin
G	Gly	Glycin	W	Trp	Tryptophan
H	His	Histidin	Y	Tyr	Tyrosin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin

Die in dieser Arbeit verwendeten Anglizismen sind durch kursive Schreibweise kenntlich gemacht.

Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit erwähnten (+)RNA-Viren:



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Der Mechanismus des RNA-silencings

Das RNA-*silencing* ist ein konservierter Mechanismus zur transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulation der Genexpression in Eukaryoten, der in Pflanzen, Tieren und Pilzen vorkommt [14, 82, 106]. Das RNA-*silencing*, das auch als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet wird, kann grundsätzlich drei verschiedene biologische Prozesse vermitteln:

1. die negative Regulation der Genexpression von mRNAs durch posttranskriptionelles Gen-*silencing* (PTGS)
2. die Suppression der zellulären Transkription durch transkriptionelles Gen-*silencing* (TGS)
3. die Abwehr viraler Infektionen durch antivirales RNA-*silencing*.

Alle 3 Mechanismen des RNA-*silencings* werden durch *small* RNAs (sRNAs) mediert. Die Prozessierung pflanzlicher sRNAs erfolgt durch Dicer- oder *Dicer like*-Proteine (DCLs) aus der Familie der Typ-III-Endoribonukleasen aus doppelsträngiger (ds) RNA oder Sekundärstrukturen einzelsträngiger (ss) RNAs. Das Genom des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* codiert vier DCLs, die konstitutiv in verschiedenen Geweben wie Blättern, Stängel und Blüten exprimiert werden [78].

Nach der Prozessierung werden die sRNAs durch 2'-O-Methylierung durch die Methyltransferase HEN1 (*HUA enhancer 1*) stabilisiert und vor Abbau geschützt [19, 172]. Anschließend werden die sRNA-Duplexe in Effektor Komplexe eingebaut, die als *RNA-induced silencing complexes* (RISC) bezeichnet werden [30, 104, 105, 108, 149].

RISCs enthalten ARGONAUTE- (AGO) Nukleasen, sRNAs und andere bisher unvollständig charakterisierte Komponenten. Der sogenannte *passenger strand* (ps) des gebundenen sRNA-Duplexes wird aus dem RISC entfernt. Der verbleibende *guide strand* (gs) ermöglicht nun die Bindung des RISC an eine komplementäre *target*-RNA. In Abhängigkeit der Komponenten des RISCs kann dies zu unterschiedlichen Effekten wie der Spaltung der *target*-RNA, der Inhibition der Translation oder der Methylierung von DNA führen [21, 143].

Im Folgenden sollen die AGO-Proteine und sRNAs als essentielle Bestandteile aktiver RISCs näher beleuchtet werden.

### 1.1.1 Aufbau und Funktion von ARGONAUTE-Proteinen

AGO-Proteine sind die katalytischen Einheiten der RISCs und in eukaryotischen Organismen hoch konserviert. In Abhängigkeit der Funktion und ihrer Verbreitung werden AGO-Proteine in 3 Unterfamilien eingeteilt: Proteine der AGO-Unterfamilie werden von fast allen Eukaryoten ubiquitär exprimiert, wohingegen Vertreter der WAGO-Unterfamilie nur in Würmern vorkommen. Die Proteine der PIWI-Unterfamilie binden piRNAs (*piwi-interacting RNAs*) und werden ausschließlich in der tierischen Keimbahn exprimiert.

Die Anzahl der durch Eukaryoten exprimierten AGO-Proteine variiert sehr stark (siehe Tabelle 1.1). *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*, *Sp*) exprimiert beispielsweise nur 1 AGO-Protein, wohingegen das Genom von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*, *Ce*) für 25 Homologe dieser Proteinfamilie codiert [161].

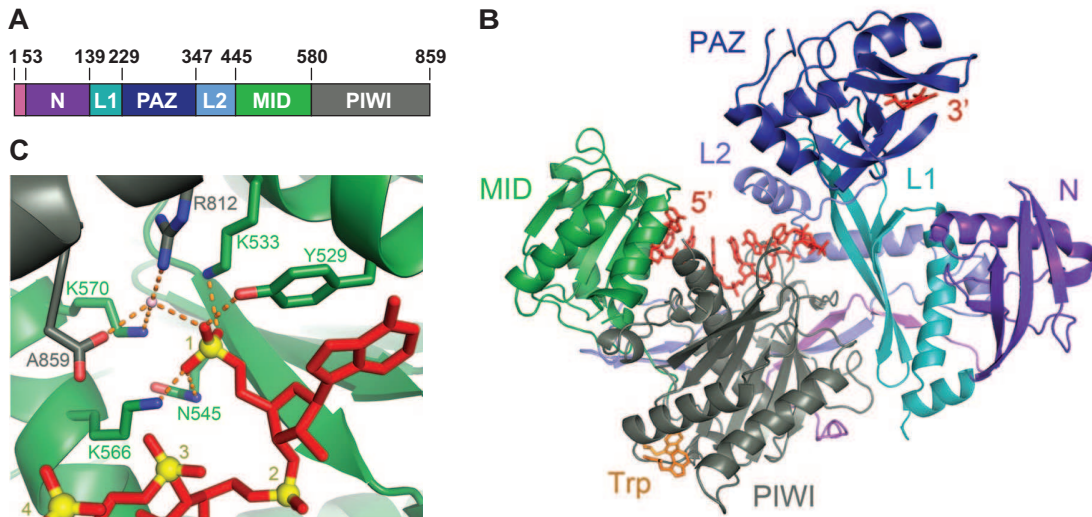
Organismus	Gesamt	AGOs	PIWIs	WAGOs	Sonstige
<i>S. pombe</i>	1	1	0	0	0
<i>D. melanogaster</i>	5	2	3	0	0
<i>M. Musculus</i>	8	5	3	0	0
<i>H. Sapiens</i>	8	4	4	0	0
<i>A. thaliana</i>	10	10	0	0	0
<i>C. elegans</i>	25	2	2	16	5

**Tabelle 1.1** Übersicht über die AGO-Proteine verschiedener Organismen.

Die Struktur aller bisher untersuchten AGO-Proteine ist stark konserviert. Sie bestehen aus einer PAZ- (*Piwi-Argonaute-Zwille*), MID- (*middle*), PIWI- (*P-element induced wimpy testis*) und einer variablen N-terminalen Domäne [127]. Da bisher keine vollständige Kristallstruktur eines pflanzlichen AGO-Proteins existiert, wurde in Abbildung 1.1 die Domänenorganisation und die Kristallstruktur des humanen (*Homo sapiens*, *Hs*) AGO2-Proteins als Beispiel für ein AGO-Protein höherer Eukaryoten dargestellt.

Die PIWI-Domäne enthält das katalytische Zentrum des AGO-Proteins und weist eine deutliche Strukturhomologie zu Proteinen der RNase H-Familie auf [141]. Innerhalb dieser Domäne befindet sich die katalytische Triade, die aus 2 Asparaginsäuren und einem Histidin (H) oder Lysin (K) besteht (DDH/DDK-Motiv) und die endonukleolytische Spaltung der gebundenen *target*-RNA vermittelt [50]. Die resultierenden Spaltprodukte besitzen ein 5'-Phosphat und eine 3'-Hydroxylgruppe [84].

Des Weiteren ist die PIWI-Domäne für die Interaktion mit anderen Faktoren des RNA-silencings von Bedeutung. Viele bisher bekannte Interaktionspartner enthalten Glycin-Tryptophan (GW)-reiche Domänen, die eine Bindung an die PIWI-Domäne des AGO-Proteins ermöglichen [127].



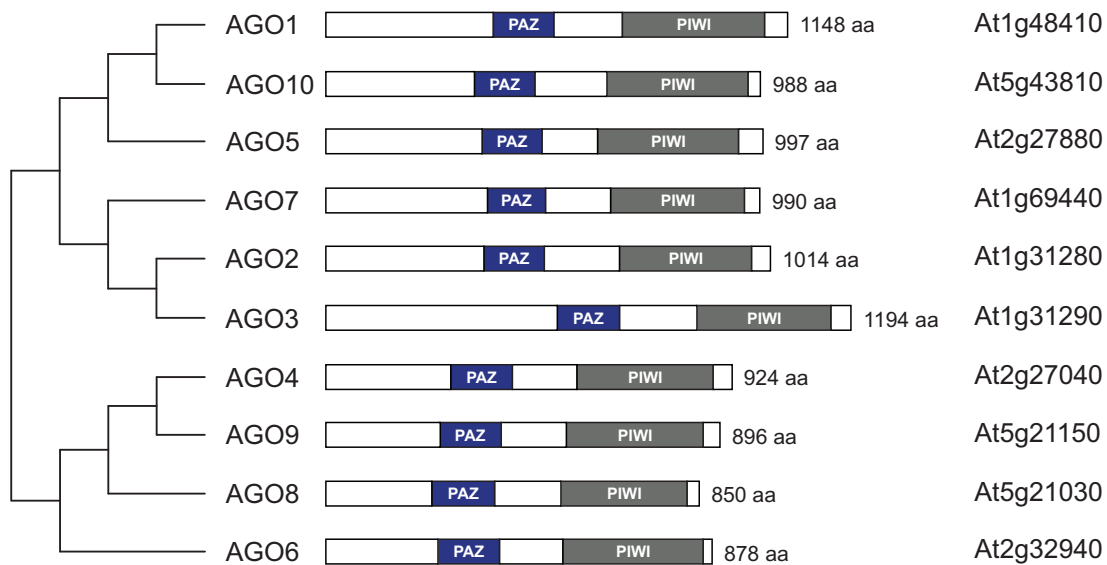
**Abbildung 1.1 Struktur des humanen AGO2; modifiziert nach [127]. (A)** Schematische Darstellung der Domänenorganisation des *HsAGO2*. **(B)** Kristallstruktur des *HsAGO2*-Proteins im Komplex mit einer 21 nt langen sRNA (rot). **(C)** Die Bindung des 5'-Nukleotids der sRNA erfolgt durch Aminosäurereste der MID- und PIWI-Domäne. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte orange Linien dargestellt.

Die PAZ-Domäne bindet den 2 nt langen Überhang des 3'-Endes der jeweiligen sRNA [56]. Das 5'-Ende des sRNA-*guide strands* wird durch die MID-Domäne gebunden. Im humanen *HsAGO2* erfolgt die Koordination der Base des 5'-Nukleotids der gebundenen sRNA mit Hilfe des Y525 der MID-Domäne (siehe Abbildung 1.1C). Weitere konservierte Aminosäurereste der MID- und PIWI-Domäne koordinieren das 5'-Phosphat durch Wasserstoffbrückenbindungen. Die Bindung der restlichen Nukleotide des *guide strands* erfolgt ausschließlich durch Interaktionen verschiedener Aminosäuren mit dem RNA-Rückgrat und ist damit unabhängig von der jeweiligen Base [127].

Die Aufklärung dieser und anderer Kristallstrukturen verdeutlicht, dass die Bindung des sRNA-*guide strands* in Abhängigkeit des 5'-Nukleotids erfolgt, sonst jedoch unabhängig von der Nukleotidsequenz ist. Auch die AGO-Proteine aus *A. thaliana* zeigen eine klare Präferenz für die Bindung verschiedener 5'-Nukleotide. *AtAGO1* bindet sRNAs mit einem 5'-U, wohingegen *AtAGO5* sRNAs mit einem 5'-C bindet, während *AtAGO2* und *AtAGO4* sRNAs mit einem 5'-A binden [88, 146]. Die 5'-Nukleotidbindungsspezifität anderer AGO-Proteine war zu Beginn dieser Arbeit noch weitgehend unbekannt. Die effiziente Bindung einer sRNA hängt des Weiteren von Faktoren wie der Länge einer sRNA ab. So binden *AtAGO1* und *AtAGO2* vor allem sRNAs mit einer Länge von 21 nt, während *AtAGO4* vor allem sRNAs mit einer Länge von 24 nt bindet [88, 146]. Nach dem Einbau des sRNA-Duplexes wird der *passenger strand* aus dem RISC entfernt, wohingegen der *guide strand* im AGO-Protein verbleibt. In Säugern und *D. melanogaster* konnte gezeigt werden, dass der miRNA-Strang mit der thermodynamisch weniger stabilen Basenpaarung am 5'-Ende den bevorzugten *guide strand* des RISC

darstellt [62, 135]. Dabei ist die Selektion des *guide strands* nicht immer vollständig auf einen der beiden RNA-Stränge beschränkt.

Als erstes Exemplar der AGO-Proteinfamilie wurde AGO1 aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert. *AtAGO1*-Mutanten zeigen verschiedene phänotypische Defekte wie schlauchartig geformte Blätter, die in ihrer Form den Tentakeln von Tintenfischen des Genus *Argonauta* ähneln, wodurch diese Proteinfamilie ihren Namen erhielt [16]. Die Sequenzierung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* ermöglichte die Identifizierung von 9 weiteren Mitgliedern dieser Proteinfamilie. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen erlaubt die Einteilung in 3 phylogenetische Gruppen (siehe Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft und Domänenorganisation der AGO-Proteine aus *Arabidopsis thaliana***; modifiziert nach [153]. Die PAZ-Domäne ist in dunkelblau, die PIWI-Domäne in grau dargestellt.

Die spezifische Funktion eines AGO/RISCs wird neben der Identität des beteiligten AGO-Proteins auch durch die jeweils gebundene sRNA bestimmt. Aus diesem Grund sollen im Folgenden die Biogenese und Funktion verschiedener sRNAs im Zusammenspiel mit verschiedenen AGO/RISCs näher beleuchtet werden.

### 1.1.2 Biogenese und Funktion kleiner regulatorischer RNAs

sRNAs können in 3 Klassen unterteilt werden: *micro RNAs* (miRNAs), *small interfering RNAs* (siRNAs) und *piwi-interacting RNAs* (piRNAs). piRNAs besitzen eine wichtige Funktion in der Regulation von Retrotransposons während der Spermatogenese und kommen in Pflanzen nicht vor.

miRNAs wurden zum ersten Mal in *C. elegans* beschrieben [69, 70] und bald darauf auch in Pflanzen entdeckt [122]. Sie vermitteln die post-transkriptionelle Regulierung endogener mRNAs und sind wesentliche Bestandteile der regulatorischen Netzwerke

eukaryotischer Zellen [13]. In Pflanzen regulieren miRNAs häufig Transkriptionsfaktoren und üben Funktionen in Entwicklungsprozessen, Hormon-Signalwegen und der Antwort auf biotischen oder abiotischen Stress aus [81, 143].

In *Arabidopsis thaliana* erfolgt die Prozessierung von 21 - 22 nt langen miRNAs durch DCL1 und dessen Cofaktor HYL1 *hyponastic leaves 1* aus unvollständig komplementären Haarnadel-Transkripten [43]. Aus diesem Grund weisen die resultierenden miRNA-Duplexe meist keine vollständige Komplementarität auf [43]. Nach dem Transport ins Zytoplasma werden diese miRNAs durch AGO/RISCs gebunden und vermitteln die Regulation der Genexpression durch PTGS.

*AtAGO1* stellt das Schlüsselenzym der miRNA-vermittelten posttranskriptionellen Genregulation in *A. thaliana* dar und wird ubiquitär in allen Geweben (am stärksten im Teilungsgewebe und Gefäßsystem) exprimiert [109, 152, 151]. Die Menge des *AtAGO1*-Transkripts wird interessanterweise selbst durch eine miRNA reguliert. Die miR168 ist entscheidend für ein konstantes Level der *AtAGO1*-Expression und eine normale Entwicklung der Pflanze. Es konnte gezeigt werden, dass Pflanzen, die eine miR168-resistente Variante des AGO1-Transkripts synthetisieren, starke Defekte in ihrer Entwicklung aufweisen [151, 152].

Die Funktion von miRNAs kann neben *AtAGO1* auch durch andere AGO/RISCs vermittelt werden. AGO5/RISC bindet beispielsweise die hoch konservierte miR169 und besitzt eine wichtige Funktion in der Entwicklung der Blüten von Petunien (*Petunia*) und Löwenmäulchen (*Antirrhinum*) [22, 24]. *AtAGO10* bindet beispielsweise die miR165 und miR166 und reguliert so die Expression von Transkriptionsfaktoren, die die Entwicklung des Sprossmeristems modulieren [77, 177].

Die Bindung eines miRNA-RISCs an eine *target*-Sequenz kann entweder zur Spaltung der *target*-RNA oder zur Inhibition der Translation der Ziel-mRNA führen (siehe Abbildung 1.3).

Voraussetzung für die Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung der *target*-RNA ist eine Endonuklease-Aktivität des im RISC enthaltenen AGO-Proteins, die oft auch als *slicer*-Aktivität bezeichnet wird. Die endonukleolytische Spaltung der Ziel-RNA findet dabei zwischen den zwei Nukleotiden statt, die sich komplementär zum 10. und 11. Nukleotid des sRNA-*guide strands* befinden [32, 175]. Die Spaltung einer *target*-RNA erfolgt bei einer sehr hohen oder vollständigen Komplementarität zwischen dem miRNA-*guide strand* und der entsprechenden *target*-Sequenz [76] und kommt vor allem bei pflanzlichen miRNAs aber bei auch anderen Klassen kleiner RNAs vor [17, 112, 124, 153]. Nach der RNA-Spaltung dissoziiert der RISC von der Zielsequenz und kann zur Spaltung weiterer *target*-RNAs führen.

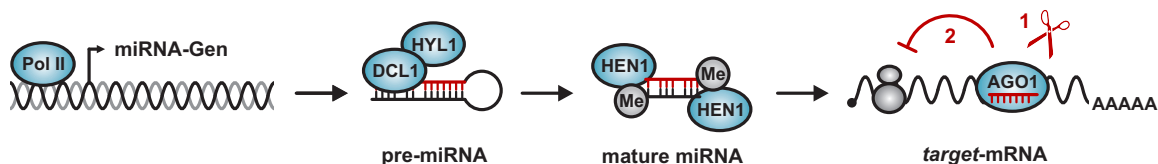
Ein weiterer Wirkungsmechanismus von miRNAs ist die RISC-vermittelte Inhibition der Translation. Am besten untersucht ist die Repression der Translation am Beispiel tieri-



scher miRNAs. Im Gegensatz zu Pflanzen ist in Tieren die Komplementarität in der Hybridstruktur zwischen miRNAs und ihren Ziel-mRNAs meist auf die sogenannte *seed*-Sequenz des miRNA-*guide strands* beschränkt. Dies bedeutet, dass tierische miRNAs oft nur mit den Nukleotiden 2 - 9 an die *target*-RNA binden, wohingegen das 3'-Ende der miRNA eine vergleichsweise schwache Komplementarität zur Bindestelle aufweist [71, 167]. Ein weiterer Unterschied zwischen pflanzlichen und tierischen miRNAs ist die Position der *target*-Sequenz innerhalb der Ziel-mRNA. Während tierische miRNAs häufig mehrere Bindestellen innerhalb der 3'-NTR der Ziel-mRNA aufweisen, besitzen pflanzliche miRNAs meist nur eine miRNA-Bindestelle innerhalb der codierenden Region der *target*-mRNA. Es wird vermutet, dass die Ausprägung der Komplementarität sowie die Position der miRNA-Bindestellen die entscheidenden Faktoren für die Einleitung des letztendlich ausgeführten Regulationsmechanismus sind [169].

Der Mechanismus der translationalen Repression kann zum Einen zu einem frühen Zeitpunkt der Translationsinitiation durch die Interferenz des miRNA-RISCs mit der *cap*-abhängigen Rekrutierung der kleinen ribosomalen Untereinheit erfolgen [54, 63, 148]. Andere Untersuchungen zeigten, dass miRNA-RISCs ebenfalls zu einer Verlangsamung der Elongation und möglicherweise auch zu einer frühzeitigen Termination der Translation führen können [102].

Für Pflanzen wurden bisher nur wenige Fälle dokumentiert, in denen eine miRNA ihr Zielgen durch Repression der Translation reguliert [9, 35]. Aus diesem Grund ist noch unklar, wie groß die biologische Bedeutung dieses Mechanismus in Pflanzen ist.

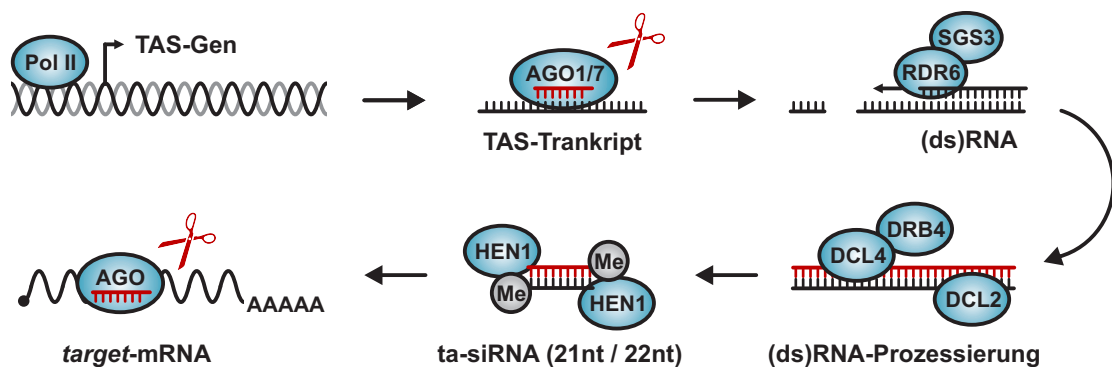


**Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der miRNA-RISC vermittelten posttranskriptionellen Genregulation in *Arabidopsis thaliana*.** miRNAs werden durch DCL1 und HYL1 prozessiert und anschließend durch Methylierung durch HEN1 stabilisiert. Die Bindung eines miRNA/RISCs an eine *target*-Sequenz kann zur endolytischen Spaltung (1) oder der Inhibition der Translation (2) führen.

Im Gegensatz zu miRNAs besitzen siRNAs meist eine vollständige Komplementarität und führen zur Spaltung ihrer *target*-RNA. Endogene siRNAs können in Abhängigkeit ihrer Biogenese und Funktion in *trans-acting* siRNAs (ta-siRNAs), *natural cis-acting transcript* siRNAs (nat-siRNAs) und *repeat-associated small RNAs* (ra-siRNAs) eingeteilt werden.

Die Biogenese von ta-siRNAs erfolgt durch die Spaltung von TAS-Transkripten an de-

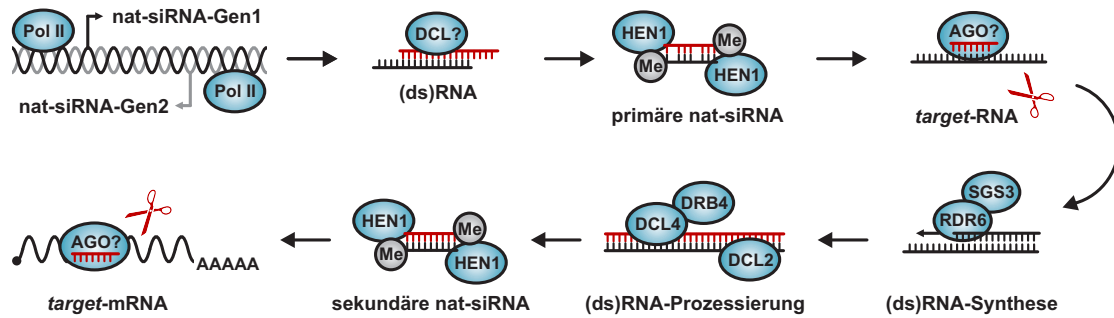
finierten Positionen durch miRNA-RISCs [153, 171] (siehe Abbildung 1.4). Die Spaltfragmente dienen anschließend als Substrat für die RNA-abhängige RNA-Polymerase 6 (RDR6). Diese führt ausgehend von den einzelsträngigen Spaltprodukten der TAS-Transkripte zusammen mit ihrem Cofaktor SGS3 (*Suppressor of Gene Silencing 3*) zur Synthese doppelsträngiger RNA [92, 112, 171]. Die resultierenden doppelsträngigen RNAs werden durch DCL4 oder DCL2 zu ta-siRNAs mit einer Länge von 21 nt und 22 nt prozessiert [5, 6, 34, 92]. Die ta-siRNAs führen zur RISC-vermittelten posttranskriptionellen Regulation der Transkripte verschiedener Auxin-abhängiger Transkriptionsfaktoren und sind in die Regulation der pflanzlichen Entwicklung involviert [164].



**Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der ta-siRNA vermittelten posttranskriptionellen Genregulation in *Arabidopsis thaliana*.** Die Transkripte der TAS-Gene werden durch miRNA-RISCs gespalten. Die resultierenden Spaltfragmente dienen der RNA-abhängigen RNA-Polymerase 6 (RDR6) als Substrate zur Synthese doppelsträngiger RNAs. Diese (ds)RNAs werden durch DCL4 und DCL2 zu ta-siRNAs prozessiert und führen anschließend zur RISC-vermittelten Spaltung ihrer komplementären *target*-RNA.

*Natural cis-acting transcript* siRNAs (nat-siRNAs) werden in Pflanzen vor allem als Antwort auf Stress produziert [17, 60]. Sie werden durch DCL1 und DCL2 aus einem Paar konvergent transkribierter RNAs gebildet (siehe Abbildung 1.5). Üblicherweise wird eines dieser Transkripte konstitutiv exprimiert, während die dazu komplementäre RNA nur bei umweltbedingtem Stress transkribiert wird. Zunächst werden nat-siRNAs mit einer Länge von 24 nt prozessiert, die die Spaltung einer *target*-mRNA vermitteln und so die Produktion von 21 nt langen, sekundären siRNAs herbeiführen können, um die *silencing*-Antwort zu verstärken [17]. Welche AGO/RISCs an diesem Prozess beteiligt sind ist noch unbekannt. nat-siRNA regulieren verschiedene pflanzliche Entwicklungsstadien und besitzen putative Funktionen in der Pathogenabwehr, Salztoleranz und Zellwandsynthese [17, 48, 60].

Die dritte Klasse endogener siRNAs sind *repeat-associated small RNAs* (ra-siRNAs). Diese siRNAs werden durch DCL3 aus Transkripten von Transposons, repetitiven Ele-

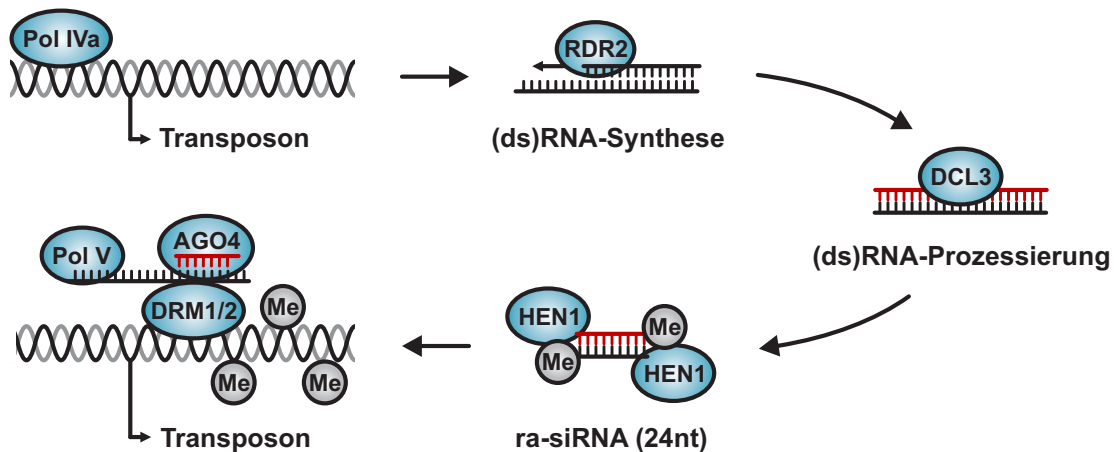


**Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der nat-siRNA vermittelten posttranskriptionellen Genregulation in *Arabidopsis thaliana*.** Die beiden partiell komplementären Transkripte der nat-siRNA-*precursor* werden durch DCL prozessiert. Die resultierenden primären nat-siRNAs führen zur RISC-vermittelten Spaltung der komplementären *target*-RNA. Die resultierenden Spaltfragmente können als Substrate der RDR6 dienen und zur Synthese doppelsträngiger RNA führen. Diese (ds)RNAs werden durch DCL4 und DCL2 zu sogenannten sekundären nat-siRNAs prozessiert, deren *target*-Sequenz auch außerhalb ihres ursprünglichen Transkripts liegen kann.

menten oder *short tandem repeats* prozessiert und besitzen eine Länge von 24 nt [68] (siehe Abbildung 1.6). In pflanzlichen Zellen stellen ra-siRNAs den Hauptanteil endogener siRNAs dar [167]. Sie führen im Zellkern zur Inaktivierung von DNA-Sequenzen durch die Bildung von Heterochromatin durch die Vermittlung von DNA- und Histon-Methylierung am Locus ihres Ursprungs [59, 86, 176, 178]. Dieser Prozess findet im Zellkern statt und wird als transkriptionelles Gen-*silencing* (TGS) bezeichnet. Die transkriptionelle Inaktivierung von Genomsequenzen verhindert in Eukaryoten die Ausbreitung fremder DNA, wie transposabler DNA-Elemente, Retroviren und Transgenen (T-DNAs) [86].

Das TGS wird durch *AtAGO4*, *AtAGO6* und *AtAGO9* vermittelt, die zur dritten phylogenetischen Gruppe der AGO-Proteine aus *A. thaliana* gehören (siehe Abbildung 1.2). *AtAGO4* wird ubiquitär exprimiert [128], ist ausschließlich im Nukleus lokalisiert [72] und bindet ra-siRNAs mit einer Länge von 24 nt und einem 5'-A [88]. Dagegen scheint *AtAGO4* nicht mit der Gruppe der nat-siRNAs zu interagieren, obwohl diese wie ra-siRNAs ebenfalls im Zellkern vorkommen und eine Länge von 24 nt besitzen [167]. *AtAGO9* ist ebenso wie *AtAGO4* an der Stilllegung verschiedener repetitiver DNA-Elemente beteiligt [45]. Defekte dieses Proteins führen zu fortpflanzungsunabhängigen Veränderungen der Samenproduktion [101]. *AtAGO8* ist vermutlich durch eine Duplikation des *AtAGO9*-Gens entstanden, da sich beide Gene in direkter Nachbarschaft auf Chromosom 5 befinden und in den gleichen Geweben exprimiert werden. Es wird jedoch vermutet, dass *AtAGO8* auf Grund einer *frame shift*-Mutation nicht funktionell ist [146].

*AtAGO6* weist eine starke Redundanz zu *AtAGO4* auf. Beide Proteine werden in den



**Abbildung 1.6 Schematische Darstellung der ra-siRNA vermittelten transkriptionellen Genregulation in *Arabidopsis thaliana*.** Durch die RDR2 werden ausgehend von den Transkripten von Transposons, repetitiven Elementen oder *short tandem repeats* doppelsträngige RNAs synthetisiert, die durch DCL3 zu ra-siRNAs mit einer Länge von 24 nt prozessiert werden. Diese führen zusammen mit *AtAGO4/RISC* zur Bildung von Heterochromatin durch DNA- und Histon-Methylierung und so zur Inaktivierung der betroffenen DNA-Elemente.

gleichen Geweben während der gleichen Entwicklungsstadien exprimiert und vermitteln das transkriptionelle Gen-*silencing* der gleichen DNA-Elemente [176]. Im Gegensatz zu *AtAGO4* ist die sRNA-Bindungsspezifität von *AtAGO6* jedoch noch unbekannt.

Neben den bereits beschriebenen endogenen siRNAs können in Pflanzen, Tieren und Pilzen auch exogene siRNAs vorkommen, die aus transgener oder viraler RNA prozessiert werden [32]. Virale siRNAs (vsiRNAs) werden im Zuge des antiviralen RNA-*silencings* gebildet und sind Teil der angeborenen antiviralen Immunantwort in Pflanzen.

## 1.2 Das antivirale RNA-*silencing* in Pflanzen

Die meisten pflanzenpathogenen Viren besitzen ein einzelsträngiges (+)Strang-RNA-Genom, das sowohl als mRNA, als auch als *template* für die virale Replikation innerhalb des Zytoplasmas der Wirtszelle dient [106]. Die Induktion des antiviralen RNA-*silencings* erfolgt durch hoch strukturierte Bereiche innerhalb des viralen Genoms oder durch ein doppelsträngiges Intermediat aus (+) und (-)RNA, welches während der viralen Replikation entsteht und als *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) durch die Wirtszelle erkannt wird [29] (siehe Abbildung 1.8). Diese viralen doppelsträngigen RNAs werden vor allem durch DCL4 und dessen Cofaktor DRB4 zu viralen siRNAs (vsiRNAs) mit einer Länge von 21 nt und 22 nt prozessiert [27, 41, 58, 174]. Alternativ kann die Prozessierung aber auch durch DCL2 erfolgen. Die resultierenden sogenann-

ten primären vsiRNAs können durch verschiedene AGO/RISCs gebunden werden und führen zur Spaltung der viralen *target*-RNA [3, 10, 158].

*AtAGO1* spielt eine zentrale Rolle im antiviralen RNA-*silencing*. *AtAGO1*-defiziente Pflanzen zeigen beispielsweise eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Infektionen des *Cucumber mosaic virus* (CMV) [93]. In AGO1-FLAG-Immunpräzipitationen von *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) infizierten *A. thaliana*-Pflanzen konnten außerdem erhöhte vsiRNA-Level nachgewiesen werden [117].

Neben *AtAGO1* spielt auch *AtAGO2* eine entscheidende Rolle im Virus-induzierten RNA-*silencing*. *AtAGO2* zeigt ein hohes Expressionslevel während der Keim- und Sprossentwicklung und eine moderate Expression in alternden Blättern und Blüten. Es ist sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma lokalisiert [146]. *AtAGO2*-Mutanten zeigen eine höhere Anfälligkeit gegenüber Infektionen des *Turnip crinkle virus* (TCV) und des *Cucumber mosaic virus* (CMV) [44, 158]. Da *AtAGO2* und *AtAGO3* eine hohe Identität ihrer Aminosäuresequenzen aufweisen und sich auf benachbarten Gen-Loci befinden wird vermutet, dass *AtAGO2* und *AtAGO3* durch Genduplikation entstanden sind. Obwohl bisher keine funktionelle Redundanz beider Proteine beschrieben wurde, wird angenommen, dass sie ähnliche Funktionen im RNA-*silencing* ausüben könnten. Aus diesem Grund ist es möglich, dass auch *AtAGO3* eine Funktion im antiviralen RNA-*silencing* besitzt.

Auch die Rolle von *AtAGO5* im antiviralen RNA-*silencing* ist weitgehend unklar. Obwohl gezeigt werden konnte, dass vsiRNAs durch *AtAGO5*/RISC gebunden werden können, zeigen *AtAGO5*-Mutanten keine erhöhte Suszeptibilität gegenüber verschiedenen Pflanzenviren [44, 146, 158]. Dies deutet darauf hin, dass *AtAGO5* keine oder nur eine untergeordnete Funktion in der antiviralen Abwehr besitzt.

Auch *AtAGO7*-Mutanten zeigen ähnlich wie *AtAGO2*-Mutanten eine höhere Anfälligkeit gegenüber Infektionen des TCV [119]. Dies gilt jedoch nicht für andere bisher untersuchte Pflanzenviren. Des Weiteren wurde bisher keine Bindung von vsiRNAs durch *AtAGO7*/RISC beschrieben [92].

Auf Grund ihrer zellulären Lokalisation zeigen AGO-Proteine der 3. phylogenetischen Gruppe, die am transkriptionellen Gen-*silencing* beteiligt sind, keine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Infektionen von (+)RNA-Viren. Es wird jedoch vermutet, dass der *AtAGO4*/RISC durch die Induktion der Chromatin-Kondensation viraler DNA eine Funktion in der Abwehr von DNA-Viren besitzen könnte [154]. Des Weiteren zeigen *AtAGO4*-Mutanten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Bakterium *Pseudomonas syringae* [1]. Dies könnte darauf hindeuten, dass *AtAGO4* außerdem in die Abwehr bakterieller Pathogene involviert ist.

### 1.2.1 Sekundäre vsiRNAs und RNA-abhängige RNA-Polymerasen

Ein weiterer wichtiger Aspekt des Virus-induzierten RNA-silencings ist die Verstärkung des antiviralen Signals durch die Synthese sekundärer vsiRNAs. Diese werden analog zu den primären vsiRNAs durch DCL4 und DCL2 aus doppelsträngigen RNAs prozessiert [94, 119, 134, 158]. Die doppelsträngigen RNAs werden jedoch ausgehend von einzelsträngigen viralen RNAs durch RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RDRs) des Wirtes synthetisiert [2, 173] und nicht durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (vRdRp).

Mitglieder der RDR-Proteinfamilie konnten unter anderem in *Neurospora crassa* [23], *Caenorhabditis elegans* [139] und verschiedenen Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* und *Nicotiana tabacum* identifiziert werden [159].

*Arabidopsis thaliana* codiert für 6 verschiedene RDRs von denen einige eine Funktion in der antiviralen Immunantwort besitzen. So konnte gezeigt werden, dass vor allem RDR6 in die Abwehr viraler Infektionen involviert ist. RDR6-defiziente Pflanzen zeigen eine höhere Anfälligkeit gegenüber Infektionen des *Cucumber mosaic virus* (CMV) [94] oder des *Potato Virus X* [134]. Im Gegensatz dazu führen Viren wie das *Tobacco rattle virus* (TRV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Turnip crinkle virus* (TCV) sowohl in Wildtyp- als auch in RDR6-defizienten *A. thaliana*-Pflanzen zur Ausbildung identischer Symptome [26]. Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Prozessierung sekundärer vsiRNA bei diesen Viren durch andere pflanzliche RDRs erfolgt. Für das *Turnip vein-clearing virus* (TVCV) und das *Tobacco rattle virus* (TRV) konnte beispielsweise eine Funktion der RDR1 in der Synthese sekundärer vsiRNAs nachgewiesen werden [116, 173]. Die Beteiligung verschiedener RDRs in unterschiedlichen viralen Infektionen könnte auf mechanistische Unterschiede in der Abwehr von (+)RNA-Viren hindeuten.

Es wird vermutet, dass die antivirale Wirkung von sekundären vsiRNAs vor allem durch den Transport über das Phloem in entferntere Bereiche der Pflanze hervorgerufen wird, wo sie eine systemische Immunität auslösen können [42, 90, 121]. Dagegen ist noch unklar, ob sekundäre vsiRNAs eine Spaltung der viralen *target*-RNA medieren und somit auch zu einer lokalen Reduktion des Virustiters beitragen können [37, 158].

### 1.2.2 Virale Suppressoren des antiviralen RNA-silencings

Viele Viren haben Mechanismen entwickelt, um dem Virus-induzierten RNA-silencing der Pflanze zu entgehen [136, 155]. Die Inhibition der pflanzlichen antiviralen Immunantwort ist ein klassisches Beispiel für die Coevolution von Wirt und Pathogen. Studien diverser viraler Suppressoren des RNA-silencings (VSRs) ermöglichen nicht nur die Untersuchung der Interaktion zwischen Virus und Wirt, sondern fördern auch das Ver-

ständnis der antiviralen Immunantwort an sich.

Ein weit verbreiteter Mechanismus der Inhibition des Virus-induzierten RNA-*silencings*, der sich mehrmals unabhängig in nicht verwandten Viren entwickelt hat, ist die Bindung von (ds)RNA durch virale Suppressorproteine. Ein Beispiel dafür ist das Tombusvirus-Protein p19. Dieses bindet an siRNAs mit einer Größe von 19-22 nt und verhindert deren Einbau in RISCs [104, 137]. Durch diesen Mechanismus wird außerdem die Ausbildung einer systemischen Immunität durch sekundäre vsiRNAs verhindert. Ein anderer Suppressor des RNA-*silencings* ist das p126-Protein von Tobamoviren. Dieses bindet ebenfalls siRNAs und verhindert deren 3'-Methylierung, was zur Destabilisierung der vsiRNAs führt [25]. Das Protein RNase3 des *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV, *Closteroviridae*) führt ebenfalls zu einem verstärkten Abbau von vsiRNAs [25].

Andere virale Suppressoren beeinflussen dagegen verschiedene Protein-Komponenten des RNA-*silencings*. Das p6-Protein von Caulimoviren bindet beispielsweise an DRB4 (den Cofaktor von DCL4) und inhibiert die Biogenese von vsiRNAs mit einer Länge von 21 nt [40]. Das polerovirale p0-Protein besitzt eine F-box-ähnliche Domäne und führt zur verstärkten Degradation von AGO1 [15, 18].

### 1.3 TBSV (Tomatenzwergbuschvirus)

Das *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) ist ein Pflanzen-Pathogen und wurde erstmals im Jahr 1935 beschrieben [140]. Dieses Virus besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität und ist phylogenetisch in die Gattung Tombusvirus der Familie der *Tombusviridae* einzuordnen (siehe Abbildung ??). Durch den internationalen agrarwirtschaftlichen Anbau infizierbarer Wirtspflanzen wie z.B. Tomate (*Solanum lycopersicum*), Aubergine (*Solanum melongena*) und Paprika (*Capsicum annuum*) ist das TBSV weit verbreitet. Man findet Vertreter dieser Gattung in Nord- und Südamerika, Europa und zahlreichen mediterranen Gebieten [115]. Der experimentelle Wirtskreis umfasst über 100 Pflanzenarten aus 20 verschiedenen Pflanzenfamilien [51]. Die Verbreitung von TBSV kann über den Boden, mechanische Inokulation, Pfropfung und die Pflanzensamen erfolgen [61].

Die von TBSV hervorgerufenen Symptome sind u.a. buschiges Wachstum, Deformation, Nekrosen und Chlorosen der Blätter und eine stark verringerte Fruchtbildung [83]. Auf Grund der verursachten Schäden ergeben sich neben dem wissenschaftlichen Interesse auch ökonomische Beweggründe das TBSV näher zu untersuchen.

### 1.3.1 Morphologie und Genomorganisation von TBSV

Das Genom des TBSV besteht aus einem einzelsträngigen, nicht segmentierten, etwa 4,8 kb-langen RNA-Molekül mit positiver Polarität ((+)RNA). Das virale Genom ist von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, das aus 180 Untereinheiten des Kapsidproteins p41 aufgebaut ist [103] (siehe Abbildung 1.7B).

Die genomische RNA codiert insgesamt fünf Proteine (siehe Abbildung 1.7A). Sie enthält einen ORF (*open reading frame*), der direkt translatiert werden kann und zwei Proteine codiert: p92 und p33 [47]. p33 ist ein essentieller Kofaktor der viralen Replikation. Es interagiert mit spezifischen Signalen in der viralen RNA und rekrutiert diese so zum viralen Replikationskomplex [114]. Das p92-Protein ist die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (vRdRp) und entsteht durch Überlesen des *amber*-Stopcodons am 3'-Ende der für p33 codierenden Sequenz [47]. Somit ist die Aminosäuresequenz des N-Terminus des p92-Proteins identisch mit der Sequenz des p33-Proteins. Das molekulare Verhältnis von p33 und p92 beträgt 20:1 [130].

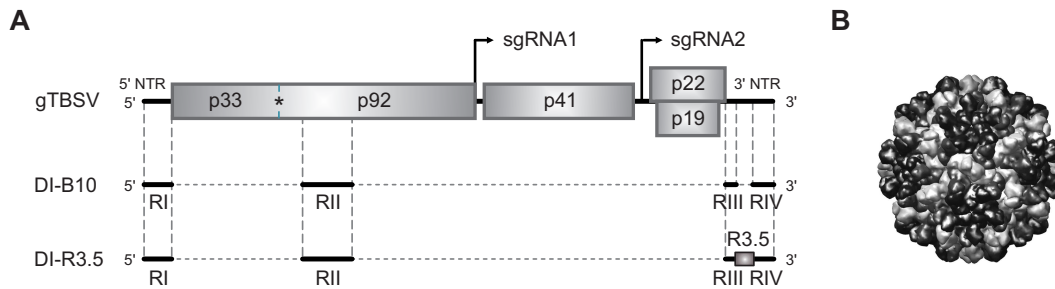
Der ORF des viralen Genoms wird durch 2 nicht translatierte Regionen (NTRs) flankiert. Die 3'-NTR besitzt eine komplexe Sekundärstruktur, die eine *cap*- und Poly(A)-unabhängige Initiation der Translation der viralen RNA ermöglicht und als 3'-CITE (*3'-cap-independent translational enhancer*) bezeichnet wird [97, 166]. Ein zentrales Element der 3'-CITE ist die sogenannte R3.5-Region. Diese besteht aus 3 RNA-Helices, die als *stem loop* A, B und C (SLA, SLB und SLC) bezeichnet werden und zur Ausbildung einer Y-förmigen Sekundärstruktur führen [33] (siehe Abbildung 3.12A). Der *loop* des SLB der R3.5-Region vermittelt die Interaktion der 3'-CITE mit einer *stem loop*-Struktur innerhalb der 5'-NTR und führt zur Zirkularisierung der viralen RNA. Dies ermöglicht die Translationsinitiation in 5'-3'-Richtung [33].

Die drei restlichen Proteine p19, p22 und p41 werden von zwei subgenomischen RNAs (sgRNAs) translatiert (siehe Abbildung 1.7A). Die Synthese dieser subgenomischen RNAs erfolgt ausgehend von einem (-)Strang-Intermediat, welches im Zuge der Replikation synthetisiert wird (siehe Abbildung 1.8). Die kleinere sgRNA2 besitzt 2 ORFs und codiert die beiden Proteine p19 und p22 [75]. Wie bereits beschrieben, wirkt p19 als Suppressor der antiviralen Immunantwort (siehe 1.2.2). p22 ist das sogenannte *movement*-Protein und ermöglicht den interzellulären Transport des Virus [130]. Die größere sgRNA1 wird erst in späteren Stadien der Infektion synthetisiert und ermöglicht die Translation des Kapsidproteins p41 [103].

### 1.3.2 Der Vermehrungszyklus von TBSV

Der Vermehrungszyklus des TBSV beginnt mit dem Eindringen des Virus in die Wirtszelle. Der genaue Mechanismus ist bisher nicht bekannt. Anschließend erfolgt die Frei-





**Abbildung 1.7 Genomorganisation und Morphologie von TBSV. (A)** Genom-Struktur von TBSV. Die *defective interfering*-RNAs DI-B10 und DI-R3.5 bestehen aus einzelnen Regionen des TBSV-Genoms. **(B)** Modell des Kapsids von TBSV (übernommen von [www.cgl.ucsf.edu/Research/virus/capsids/2tbv-5A-large.jpg](http://www.cgl.ucsf.edu/Research/virus/capsids/2tbv-5A-large.jpg)).

setzung der viralen RNA ins Zytoplasma. Da das Genom des TBSV eine positive Polarität besitzt, erfüllt es während der Virusreplikation zwei Funktionen. Zum einen kann es unmittelbar als *template* für die Translation der viralen Replikationsproteine p33 und p92 genutzt werden. Zum anderen ist es Bestandteil des Replikationskomplexes und dient als Matrize für die Synthese eines (-)Strang-Intermediates, welches anschließend für die Bildung neuer (+)Strang-RNA-Moleküle verwendet wird. Die Replikation erfolgt dabei asymmetrisch [156]. Dies bedeutet, dass die Menge gebildeter (+)RNA-Moleküle im Zytoplasma ca. 200-fach höher ist, als die Menge des (-)Strang-Intermediates [39].

Der Replikationskomplex enthält neben viralen Proteinen und dem RNA-*template* auch verschiedene Wirtsproteine, wie z.B. GAPDH [52, 156], Hsp70 [113, 157] oder eEF1 $\alpha$  [74]. Die Assemblierung der viralen Replikase erfolgt an Einstülpungen der peroxisomalen Membranen oder Membranen des endoplasmatischen Retikulums [57, 87]. Diese Membranvesikel schützen das virale Genom vor dem Abbau durch Ribonukleasen während der viralen Replikation. Des Weiteren können die neu synthetisierten Replikationsprodukte sofort für weitere Replikationsschritte rekrutiert werden. Anschließend wird die neu synthetisierte (+)RNA aus dem Replikationskomplex entlassen, in neue Viruspartikel verpackt und aus der Zelle freigesetzt.

### 1.3.3 Die Rolle von DI-RNAs während viraler Infektionen

*Defective interfering* RNAs (DI-RNAs) sind subvirale RNAs vieler (+)RNA-Viren, welche unter anderem durch Rekombinationsprozesse und Deletionen während der viralen Replikation entstehen [38, 64]. Sie sind gegenüber der genomischen RNA stark verkürzt und codieren keine Proteine (siehe Abbildung 1.7) weshalb sie als „*defective*“ *interfering* RNAs bezeichnet werden. Sie enthalten jedoch alle für die Assemblierung des Replikationskomplexes und die Replikation benötigten RNA-Elemente [163]. DI-RNAs werden häufig für Studien der Replikation verschiedener Viren verwendet, da

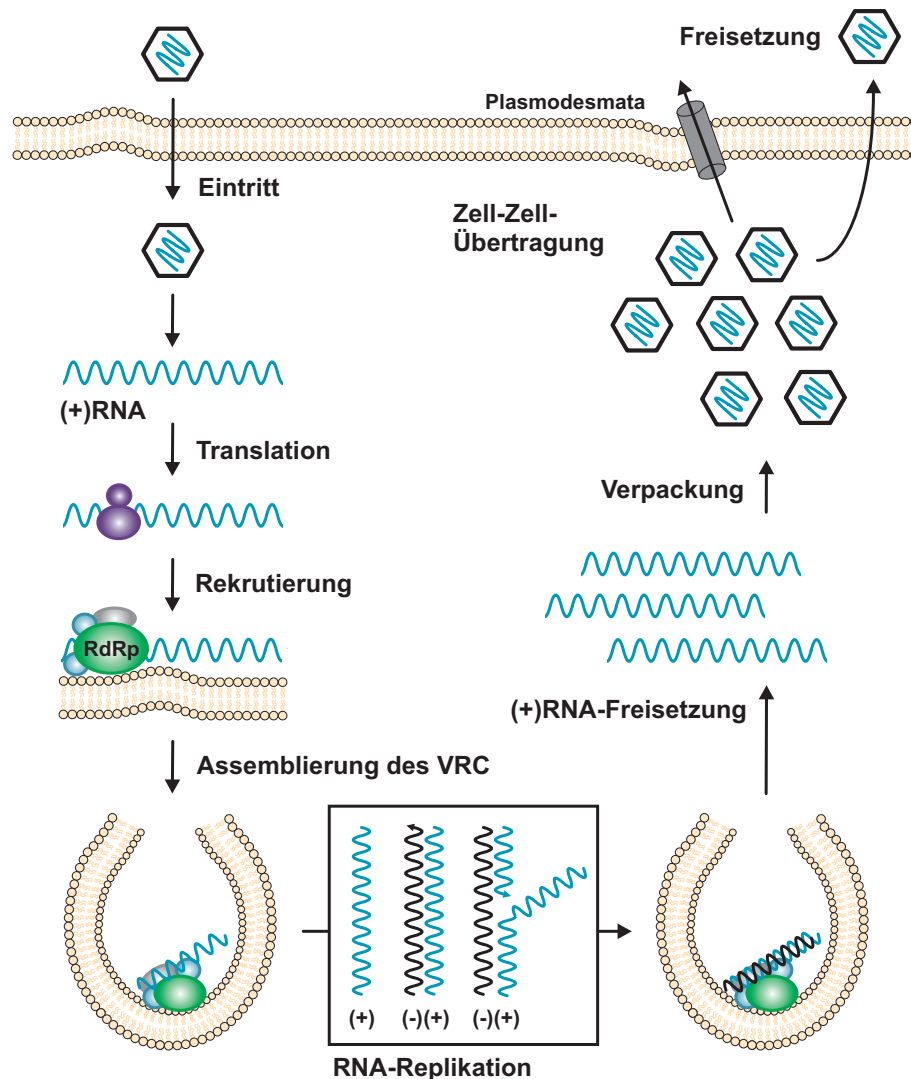


Abbildung 1.8 Schematische Darstellung des Replikationszyklus von (+)RNA-Viren.

sie im experimentellen System eine größere Halbwertszeit zeigen als die genomische RNA und *in vitro* mit höherer Effizienz repliziert werden können. Da sie selbst keine Proteine codieren, besteht außerdem eine bessere Kontrolle über die an der Replikation beteiligten Faktoren.

Die genaue Funktion der DI-RNAs während der viralen Replikation ist jedoch unklar. DI-RNAs treten weniger in natürlichen Infektionen, als in experimentellen Systemen mit hohem Virus-Titer auf [110]. Die Anwesenheit von DI-RNAs während einer Virusinfektion führt oft zur Veränderung des normalen Infektionsverlaufs [138]. Meistens führen DI-RNAs zu einer Abschwächung der viralen Symptome und zur Ausbildung einer persistenten Infektion. Eine naheliegende Erklärung ist die direkte Konkurrenz zwischen Helfer-Virus und DI-RNA um die viralen und zellulären Replikationsfaktoren, die zu einer verminderten Replikation des viralen Genoms und somit zu einer Verminderung des Virustiters führt [138]. Aus diesem Grund werden DI-RNAs als *defective* „interfe-

ring“ RNAs bezeichnet. DI-RNAs des *Broad Bean Mottle Virus* (BBMV) oder des *Turnip Crinkle Virus* (TCV) können statt zu einer Abschwächung auch zu einer Verstärkung der Symptome führen [73, 125].

Ein weiterer Aspekt bei der Untersuchung der Interaktionen zwischen DI-RNA, Helfervirus und Wirt ist die Aktivierung des PTGS durch DI-RNAs [46]. Durch die Anwesenheit großer Mengen an (ds)RNA während der Replikation stellen DI-RNAs effiziente Induktoren des PTGS dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge des durch Tombusviren gebildeten *silencing*-Suppressors p19 nicht ausreicht, um die Menge an vsiRNAs, die aus DI-RNAs gebildet werden, zu binden [46]. Dies führt zur Vermehrung freier vsiRNAs, die in aktive RISCs eingebaut werden können. Entscheidend ist dabei, dass DI-RNAs selbst ein schlechtes *target* für die RISC-vermittelte RNA-Spaltung darstellen [144]. Dies hat 2 mögliche Konsequenzen:

Zum Einen können die in RISC eingebauten vsiRNAs zu einer vermehrten Spaltung des viralen Genoms führen. Dies würde einen Vorteil der DI-RNA gegenüber dem viralen Genom bezüglich der Konkurrenz um die limitierten Replikationsfaktoren bedeuten und die Ausbildung einer persistenten Infektion fördern [111, 138]. Diese These wird gestützt durch Beobachtungen nach denen DI-RNAs bei niedrigen Temperaturen nicht zur Ausbildung persistenter Infektionen führen, da das PTGS bei niedrigen Temperaturen nicht aktiv ist .

Zum Anderen bestehen DI-RNAs aus *cis*-regulatorischen Elementen, die starke Sekundärstrukturen ausbilden und ebenfalls im viralen Genom vorkommen. Wenn die DI-RNA also ein schlechtes *target* für die RISC-vermittelte RNA-Spaltung darstellt, ist es möglich, dass diese RNA-Bereiche auch innerhalb des Genoms ein schlechtes *target* für die RISC-vermittelte Spaltung sind. Die massive Produktion von vsiRNAs aus DI-RNAs könnte also auch zur Absättigung des PTGS mit ineffizienten vsiRNAs führen.

Für TBSV konnten verschiedene DI-RNA-Varianten isoliert werden. Die kleinste bisher identifizierte replikationsaktive DI-RNA des TBSV ist die sogenannte DI-B10-RNA [64] (siehe Abbildung 1.7A). Sie besitzt eine Länge von ca. 600 nt und enthält 4 verschiedene *cis*-regulatorische Elemente der genomischen RNA, die eine essentielle Funktion während der Replikation besitzen und als RI, RII, RIII und RIV bezeichnet werden. Ein weiteres Isolat einer TBSV-DI-RNA ist die sogenannte DI-73-RNA [163]. Sie besitzt zusätzlich zu den Regionen RI - RIV auch noch die sogenannte R3.5-Region und ist fast vollständig identisch mit der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten DI-R3.5-RNA.

## 1.4 Motivation der Arbeit

Insgesamt wurden bis zum Jahr 2005 ca. 450 unterschiedliche pflanzenpathogene Virusspezies beschrieben [142]. Durch steigende Produktion, zunehmenden Transport und wachsende landwirtschaftlich genutzte Ertragsflächen erhält die Schädigung von Kulturpflanzen und deren Ernteprodukten durch Viruserkrankungen eine immer stärkere wirtschaftliche Bedeutung.

Die Aufklärung der Mechanismen der pflanzlichen antiviralen Immunantwort ist deshalb von großem Interesse.

Pflanzliche (+)RNA-Viren modulieren zahlreiche zelluläre Prozesse, um sich effizient vermehren zu können und die Abwehrmechanismen ihres Wirtes zu inhibieren. Auf Grund dieser wechselseitigen Entwicklung von Virulenzmechanismen bzw. pflanzlichen Abwehrmechanismen wird die Analyse verschiedener Aspekte des RNA-*silencings in vivo* erschwert. Aus diesem Grund sollten verschiedene Aspekte des antiviralen RNA-*silencings* in einem pflanzlichen *in vitro*-System untersucht werden.

Als Modellsystem wurde das *Tomato bushy stunt virus* verwendet, welches den Prototypen für (+)RNA-Viren der Gattung Tombusvirus darstellt. Aus diesem Grund wurden schon viele Untersuchungen zur Vermehrung und Replikation, sowie der Funktion verschiedener RNA-Elemente des TBSV durchgeführt.

Vor Beginn dieser Arbeit konnte bereits ein pflanzliches *in vitro*-System aus *Nicotiana tabacum* BY-2-Suspensionskulturen etabliert werden, welches die Replikation von TBSV *in vitro* ermöglicht [39, 65]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass durch Überexpression von AGO1 die RISC-abhängige Spaltung einer GFP-*target*-RNA in diesem *in vitro*-System ermöglicht wird [55].

Auf dieser Grundlage sollte die antivirale Immunantwort *in vitro* rekonstituiert werden, um die Untersuchungen verschiedener Aspekte des RNA-*silencing* zu ermöglichen.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien, Puffer und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind im Anhang unter 6.3 und 6.4 aufgelistet. Die kommerziell erhältlichen Enzyme wurden von den Firmen Thermo Scientific (Bonn, D), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D), Jena Bioscience

(Jena, D), Agilent Technologies (Santa Clara, USA), Hartmann Analytic (Braunschweig, D), MACHEREY-NAGEL GmbH (Düren, D), NEB (Ipswich, USA), Promega (Madison, USA), GE Healthcare (München, D), AppliChem GmbH (Darmstadt, D), PEQLAB (Erlangen, D) und ROBOKLON (Berlin, D) bezogen. Wenn nicht anders angegeben, wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

### 2.2 Arbeiten mit Pflanzen, Zellen und Lysat

#### 2.2.1 Prokaryotische Zellen

Bakterienstamm	Top10 ( <i>Escherichia coli</i> )
Genotyp	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr</i> – <i>hsdRMS</i> – <i>mcrBC</i> )φ80 <i>lacZ</i> ΔM15Δ <i>lacX74recA1araD139</i> Δ( <i>ara</i> – <i>leu</i> )7697 <i>ga/Uga/KrpsL(Str<sup>R</sup>)endA1nupGλ<sup>-</sup></i>
Referenz	Life technologies, Darmstadt, D
Bakterienstamm	GV3101 ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> )
Referenz	Van Larebeke et al. 1974 [150]

##### 2.2.1.1 Kultivierungsbedingungen prokaryotischer Zellen

*Escherichia coli*-Zellen wurden aerob unter Schütteln (Universalschüttler SM 30 A, 250 rpm) in flüssigem Lysogeny-Broth-Medium (LB-Medium) [1% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt; 1% (w/v) NaCl; 1 mM NaOH] oder auf LB-Agar-Platten [LB-Medium; 1,5% (w/v) Bacto-Agar] kultiviert. Dem Medium wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt (siehe 2.1). Die Anzucht der Zellen erfolgte über Nacht bei 37°C.

*Agrobacterium tumefaciens*-Zellen wurden aerob unter Schütteln (Universalschüttler SM 30 A, 250 rpm) in flüssigem Yeast-Extract-Broth-Medium (YEB-Medium) [5% (w/v)

beef-Extrakt; 5% (w/v) Bacto-Pepton; 5% (w/v) Saccharose; 1% (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt; 0,5% (w/v)  $MgCl_2$ ] oder auf YEB-Agar-Platten [YEB-Medium; 1,5% Bacto-Agar] kultiviert. Dem Medium wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Anzucht der Zellen erfolgte über Nacht bei 30°C.

Die Herstellung der Antibiotika-Stammlösungen erfolgte wie in Tabelle 2.1 angegeben. Die Stammlösungen wurden bei -20°C aufbewahrt und den sterilen Medien in den entsprechenden Endkonzentrationen zugesetzt.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in $H_2O_{dd}$	0,1 mg/ml
Spectinomycin	10 mg/ml in $H_2O_{dd}$	0,1 mg/ml
Rifampicin	20 mg/ml in DMSO	0,1 mg/ml

**Tabelle 2.1** Antibiotika-Stammlösungen.

### 2.2.1.2 Herstellung und Transformation prokaryotischer Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 50 ml LB-Medium mit 500  $\mu$ l Bakterienkultur beimpft und bei 200 rpm (Universalschüttler SM 30 A) bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,5 bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakterien-suspension 5 min auf Eis abgekühlt und die Zellen durch Zentrifugation (Rotina 38R, 10 min, 5000 rpm, 4°C) pelletiert. Nach der Resuspension in 15 ml sterilem Transformationspuffer I [100 mM  $RbCl_2$ ; 50 mM  $MnCl_2$ ; 30 mM Kaliumacetat; 10 mM  $CaCl_2$ ; 15% (w/v) Glycerin; pH 5,8] wurden die Zellen für 90 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (Rotina 38R, 10 min, 5000 rpm, 4°C) wurde das Bakterienpellet in 2 ml sterilem, eiskaltem Transformationspuffer II [10 mM MOPS; 10 mM  $RbCl_2$ ; 75 mM  $CaCl_2$ ; 15% (w/v) Glycerin; pH 6,8] resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Transformation der chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurden diese auf Eis aufgetaut. Pro 50  $\mu$ l Zellsuspension wurden entweder 0,5  $\mu$ l Plasmid-DNA oder 3  $\mu$ l Ligationsansatz (siehe 2.3.7) hinzugegeben. Im Folgenden wurden die Reaktionsansätze für 5 min bei 4°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90 s wurden die Ansätze für 2 min bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l LB-Medium ohne Antibiotikum wurden die Zellen für 20 - 60 min bei 37°C geschüttelt (500 rpm). Anschließend wurden 20  $\mu$ l Zellsuspension (bei Plasmid-DNA) bzw. 100  $\mu$ l Zellsuspension (bei Ligationsansätzen) auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion positiver Klone ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

Zur Generierung elektrokompetenter *A. tumefaciens*-Zellen wurden 100 ml YEB-

Medium mit 2 ml einer Übernacht-Kultur beimpft und bei 120 rpm (Universalschüttler SM 30 A) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 30°C kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen für 10 min bei 4°C inkubiert und durch Zentrifugation (Rotina 38R, 20 min, 4000 rpm, 4°C) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> resuspendiert und erneut pelletiert (Mikro 200R, 20 min, 4000 rpm, 4°C). Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 400 µl 10% Glycerin resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (Mikro 200R, 10 min, 4000 rpm, 4°C) erfolgte die Resuspension in 10% Glycerin (1 Volumen des Zellpellets). Die Zellen wurden dann steril in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

Für die Transformation elektrokompeter *A. tumefaciens*-Zellen wurden 50 µl Zellsuspension auf Eis aufgetaut und mit 2 µl Plasmid-DNA versetzt. Anschließend wurden die Zellen in eine Elektroporationsküvette (Gene Pulser Cuvette, Elektrodenabstand 0,2 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser II bei 25 µF, 1,8 kV und 200 Ω. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml gekühltem YEB-Medium (ohne Antibiotikum) versetzt und für 2 h unter Schütteln (Universalschüttler SM 30 A, 500 rpm) bei 30°C inkubiert. Nach der Zentrifugation (Mikro 200, 5 min, 1000 rpm), wurden die Zellen in 100 µl YEB-Medium resuspendiert und auf YEB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden für 48 h bei 30°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

## 2.2.2 Eukaryotische Zellen und Pflanzenmaterial

### 2.2.2.1 Kultivierung pflanzlicher BY-2-Zellen in Suspension

Die *Nicotiana tabacum* BY-2-Suspensionskultur wurde durch freundlicher Weise von Prof. Dr. B. Hause (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden steril in 50 ml BY-2-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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 5,8] im Dunkeln bei 23°C unter leichtem Schütteln (Infors Multitron, 120 rpm) kultiviert. Alle 7 Tage wurden 2 - 3 ml der Suspensionskultur steril in 45 - 47 ml frisches BY-2-Medium überführt und erneut für 7 Tage kultiviert.

### 2.2.2.2 Anzucht und Haltung von *Nicotiana benthamiana*

Die *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Bonas (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) im Rahmen des SFB648 zur Verfügung gestellt. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte durch B. Rosinsky (Martin-Luther-



Universität Halle-Wittenberg) und wurden bis zum Alter von 3 bis 5 Wochen im Gewächshaus angezogen (Lichtperiode: 5.00 - 21.00 Uhr; Tag: 25°C, 60% relative Luftfeuchtigkeit; Nacht: 19°C, 40% relative Luftfeuchtigkeit). Die Pflanzen wurden 1 Tag vor Beginn der Inokulationsversuche in eine Percival Pflanzenzuchtkammer (E41L2) überführt und bei 25°C und einer Lichtperiode von 14 h kultiviert [28].

### 2.2.2.3 Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Für die Transformation von *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* wurde zunächst eine 5 ml Übernachtkultur transformierter *A. tumefaciens*-Zellen in YEB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen. Anschließend wurde die Vorkultur in 50 ml frisches YEB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) überführt und die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 1,0 bei 30°C unter Schütteln angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (Rotina 38R, Winkelrotor 6-fach, 10 min, 4000 rpm) pelletiert und in Inokulationsmedium [10 mM MES; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 150 µM Acetosyringon] resuspendiert. Die Zellen wurden dabei auf eine OD<sub>600</sub> von 0,8 verdünnt. Im Anschluss wurden die *A. tumefaciens*-Zellen für mindestens 2 h bei Raumtemperatur im Inokulationsmedium inkubiert. Anschließend erfolgte die Vakuum-Infiltration in die Blätter von *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen. Dafür wurden die Pflanzen kopfüber in die *A. tumefaciens*-Zellsuspension in einem Exikator getaucht und für 5 min ein Vakuum von 30 mmHg angelegt.

### 2.2.2.4 Inokulation von *Nicotiana benthamiana* mit TBSV

Die Infiltration von *Nicotiana benthamiana* erfolgte mit 1 µg TBSV-RNA oder direkt mit Viruspartikeln nach der *rub in* Infiltrationsmethode. Zu diesem Zweck wurden *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen zur Steigerung der Suszeptibilität für 24h dunkel in einem Klimaschrank (Percival Pflanzenzuchtkammer E41L2) bei 25°C gehalten [28]. Anschließend wurden den Blattoberseiten durch das Auftupfen von Siliziumcarbid Mikroverletzungen zugefügt. Auf diese Bereiche wurden die virale RNA oder die Viruspartikel, die zuvor in 1 x Infektionspuffer (0,05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,05 M Glycin; pH 7,9) verdünnt wurden, aufgebracht und für 3 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung gründlich mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> abgespült und die Pflanzen bei 25°C und einer Lichtperiode von 14 h kultiviert.

### 2.2.2.5 Präparation von TBSV-Viruspartikeln

Die Isolation von Viruspartikeln erfolgte aus infizierten Blättern [100]. Das Blattmaterial wurde in 2,5 Volumen 0,1 M Natriumacetat (pH 5,5) mit 0,1% Thioglycolsäure zerkleinert und das suspendierte Material mit 1 Volumen Chloroform versetzt. Nach 20-

minütigem vorsichtigen Mischen wurden die entstandenen Zelltrümmer durch Zentrifugation (Mikro 200R, 14000 rpm, 30 min, 4°C) pelletiert und entfernt. Die Viruspartikel wurden durch Zentrifugation (Ultrazentrifuge Optima TLX, TLA 100.3-Rotor, 60 min; 50000 rpm; 4°C) des wässrigen Überstandes pelletiert und über Nacht bei 4°C in Kaliumphosphat-Puffer [10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,0] gelöst. Anschließend erfolgte der Nachweis der Viruspartikel mittels Elektronenmikroskopie durch Dr. G. Hause (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) im Rahmen des SFB648. Die Detektion der Viruspartikel erfolgte durch ein Negativ-Kontrast-*staining* nach Uranylacetat-Behandlung.

### 2.2.3 Arbeiten mit dem BYL *in vitro* System

#### 2.2.3.1 Präparation zytoplasmatischer Extrakte aus BY-2-Zellen

Für die Präparation von zytoplasmatischem Extrakt wurden 3 ml der BY-2-Suspensionskultur in 47 ml frisches BY-2-Medium überführt und für 5 Tage im Dunkeln bei 23°C unter leichtem Schütteln (Infors Multitron, 120 rpm) kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Rotina 38R, 1 min, 800 rpm, Beschleunigung 3, Bremse 0, 23°C) pelletiert und 50 ml des BY-2-Zellpellets in 100 ml steriler Protoplastierungslösung [0,312% (w/v) Cellulase Onozuka RS; 0,1% (w/v) Pectolyase Y23] in Protoplasten-Waschpuffer [12,5 mM Natriumacetat; 5 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,37 M Mannitol; pH 5,8] resuspendiert. Die Protoplastierung der Zellen erfolgte durch 3-stündige Inkubation der Zellen bei 27°C unter leichtem Schütteln (Infors Multitron, 70 rpm) im Dunkeln. Der Erfolg der Protoplastierung wurde lichtmikroskopisch überprüft. Anschließend wurden die Protoplasten dreimal mit Protoplasten-Waschpuffer gewaschen. Dazu wurden die Protoplasten durch Zentrifugation (Rotina 38R, 5 min, 800 rpm, Beschleunigung 3, Bremse 0, 23°C) pelletiert und in jeweils 100 ml frischen Protoplasten-Waschpuffer resuspendiert. Anschließend wurden die pelletierten Protoplasten auf 6 Percoll-Gradienten verteilt.

Die Percoll-Gradienten wurden jeweils kurz vor der Verwendung in 14 ml Zentrifugenröhrchen (Beckmann) hergestellt. Die Gradienten setzen sich aus 6 ml eines kontinuierlichen 0 - 30%igen Percoll-Gradienten, 2,1 ml einer 40%igen Percoll-Lösung und 1,9 ml einer 70%igen Percoll-Lösung zusammen. Die Generierung des kontinuierlichen Gradienten erfolgte mit Hilfe eines Gradientenmischers. Zunächst wurde aus einer 0%igen Percoll-Lösung [0,7 M Mannitol; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM PIPES/KOH; pH 7,0] und einer 30%igen Percoll-Lösung [30% (v/v) Percoll; 0,7 M Mannitol; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM PIPES/KOH; pH 7,0] der kontinuierliche Teil des Gradienten generiert. Dieser wurde anschließend mit 2,1 ml einer 40%igen Percoll-Lösung [40% (v/v) Percoll; 0,7 M Mannitol; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM PIPES/KOH; pH 7,0] unterschichtet, die wiederum mit ei-

ner 70%igen Percoll-Lösung [70% (v/v) Percoll; 0,7 M Mannitol; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM PIPES/KOH; pH 7,0] unterschichtet wurde.

Nach der Beladung der Gradienten mit den gewaschenen Protoplasten erfolgte die Zentrifugation (Ultrazentrifuge L8-M, SW40Ti-Rotor, 60 min, 7500 rpm, Beschleunigung 1, Bremse 0, 23°C), um die Vakuolen aus den Protoplasten zu entfernen. Die entvakuolisierten Miniprotoplasten wurden aus der Interphase isoliert, die sich zwischen der 40%igen und 70%igen Percoll-Lösung befindet. Anschließend wurden die Miniprotoplasten zweimal mit Protoplasten-Waschpuffer gewaschen. Dazu wurden die Miniprotoplasten durch Zentrifugation (Rotina 38R, 5 min, 800 rpm, Beschleunigung 3, Bremse 0, 23°C) pelletiert und in 20 ml frischem Protoplasten-Waschpuffer resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Miniprotoplasten in dem 3,75-fachen Volumen TR-Puffer [30 mM HEPES/KOH pH 7,4; 80 mM Kaliumacetat; 1,8 mM Magnesiumacetat; 2 mM DTT; 1 x Protease-Inhibitor (Roche, complete Mini, EDTA free)] vorsichtig resuspendiert und in einem vorgekühlten *dounce homogenizer (tight fit)* mit 70-100 Stößen auf Eis aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zellkerne durch Zentrifugation (Mikro 200R, 10 min, 3000 rpm, 4°C) entfernt. Der Überstand (BY-2-Lysat; BYL) wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.3.2 Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung

Die Mikrokokkus-Nuklease (MN) ist eine Endo-Exo-Nuklease, welche durch Ca<sup>2+</sup>-Ionen aktiviert wird und zum Abbau einzelsträngiger RNA führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Enzym genutzt, um endogene RNAs aus dem BY-2-Lysat zu entfernen. Dies ermöglicht die Steigerung der Effizienz der *in vitro* Translation exogen hinzugefügter mRNAs [39](Daten nicht gezeigt). Zu diesem Zweck wurden 500 µl BYL mit 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> und 37,5U Mikrokokkus-Nuklease (Roche Diagnostics) versetzt und die Reaktion für 15 min bei 20°C inkubiert. Durch Zugabe von 3 mM EGTA wurden die in der Reaktion enthaltenen Ca<sup>2+</sup>-Ionen komplexiert und so die Mikrokokkus-Nuklease inaktiviert. Der Erfolg der MN-Behandlung und die Qualität des verwendeten Lysats wurden mit Hilfe des Luciferase-Assays überprüft (2.2.3.4). Die MN-behandelten Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.3.3 *In vitro* Translation

Die Translationsreaktion wurde wie in Tabelle 2.2 beschrieben durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben wurde MN-behandeltes BYL verwendet (siehe 2.2.3.2), um die Effizienz der *in vitro* Translation zu erhöhen. Der verwendete 4 x TR\*-Puffer [120 mM HEPES/KOH, pH 7,4; 400 mM Kaliumacetat; 7,2 mM Magnesiumacetat; 2 mM DTT; 4 x Protease-Inhibitor (Roche, complete Mini, EDTA free)] enthält, die für die Transla-

tion von AGO-Proteinen optimale Kaliumacetatkonzentration. Die Translation anderer mRNAs kann durch Anpassung der Kaliumacetat-Konzentration des 4 x TR-Puffers verbessert werden. Der verwendete 10 x TM-Puffer enthielt folgende Komponenten: 7,5 mM ATP; 1 mM GTP; 250 mM Kreatinphosphat und 0,8 mM Spermin.

Für die radioaktive Markierung der Translationsprodukte wurden der Reaktion zusätzlich 10  $\mu$ Ci L-[S<sup>35</sup>]-Methionin (1000 Ci/mmol; Hartmann Analytic) zugesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 25°C inkubiert.

Komponenten	
BYL (MN-behandelt)	10 $\mu$ l
Kreatinphosphatkinase (10 mg/ml)	0,4 $\mu$ l
4 x TR*-Puffer	2 $\mu$ l
10 x TM-Puffer	2 $\mu$ l
mRNA	25 ng - 1,5 $\mu$ g
L-[S <sup>35</sup> ]-Methionin (optional)	0,8 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>nf</sub>	ad 20 $\mu$ l

**Tabelle 2.2** Reaktionsansatz einer *in vitro* Translation.

Die Reaktionsprodukte wurden anschließend durch 10% SDS-PAGE (siehe 2.5.1) aufgetrennt und durch Autoradiographie (siehe 2.4.9) oder *Western blotting* (siehe 2.5.3) detektiert.

#### 2.2.3.4 Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay wurde verwendet, um die Qualität eines BY-2-Lysats und den Erfolg einer MN-Behandlung (siehe 2.2.3.2) zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde eine *in vitro* Translationsreaktion (siehe 2.2.3.3) mit 50 ng *firefly* Luciferase-mRNA durchgeführt. Die Reaktion wurde für 1 h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden 5  $\mu$ l des Reaktionsansatzes mit 20  $\mu$ l Luciferase-Assay-Substrat (Luciferase Assay System, Promega) versetzt. Dieses Luciferin-Substrat wird durch die translatierte Luciferase zu Oxyluciferin umgesetzt. Das bei dieser Reaktion emittierte Licht wurde im Luminometer (Berthold *detection systems*) über einen Zeitraum von 20 s als relative Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s) gemessen.

#### 2.2.3.5 DCL-Assay

Der DCL-Assay wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert und ermöglicht die Generierung endogener siRNAs im BYL. Zu diesem Zweck wurden 500 ng RNA für 2 - 5 h bei 25°C in einem 20  $\mu$ l Translationsansatz (siehe 2.2.3.3) inkubiert.

Die Reinigung der im Reaktionsansatz enthaltenen Gesamt-RNA erfolgt durch Behandlung mit 20 µg Proteinase K (Thermo Scientific) in Anwesenheit von 0,5% (w/v) SDS für 30 min bei 37°C. Anschließend wurde das Volumen mit H<sub>2</sub>O<sub>nf</sub> auf 120 µl aufgefüllt und die RNA mit 1 Vol. Chloroform extrahiert. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zugabe von 0,1 Vol. Natriumacetat, 2,9 Vol. Ethanol und 30 µg Hefe-tRNA (GE Healthcare) für mindestens 1 h bei -20°C. Nach der Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 13000 rpm, 30 min, 4°C) wurde das RNA-Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415R, 13000 rpm, 30 min, 4°C). Anschließend wurde der Überstand verworfen, das RNA-Pellet für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und die RNA in 15 µl H<sub>2</sub>O<sub>nf</sub> gelöst. Anschließend wurde die <sup>32</sup>P-markierte RNA auf einem 15%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Gel (siehe 2.4.8) aufgetrennt und mittels Autoradiographie (siehe 2.4.9) detektiert.

### 2.2.3.6 *Cleavage Assay*

Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *cleavage*-Assay ermöglicht die Analyse der siRNA-vermittelten Spaltung einer *target*-RNA durch den AGO/RISC. Zu diesem Zweck wurde eine *in vitro* Translation von 1,5 µg einer AGO-mRNA in Anwesenheit von siRNAs durchgeführt (siehe 2.2.3.3). Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Arten von siRNAs für die Beladung der AGO-Proteine verwendet:

1. synthetische siRNAs der Firma Biomers (Ulm, D) (2 x 50 nM)
2. siRNA-Pools (2 x 500 nM) (siehe 2.4.6)
3. RNAs, die durch die endogene DCL-Aktivität des BYL während der Translationsreaktion prozessiert werden (1 x 500 ng) (siehe 2.2.3.5)

Nach Zugabe der entsprechenden Menge siRNA wurde der Reaktionsansatz für 60 min bei 25°C inkubiert und erneut die jeweilige Menge siRNA hinzugegeben. Anschließend wurde die AGO-Translationsreaktion für weitere 90 min bei 25°C inkubiert. Im Anschluss wurden 2 µg Luciferase-mRNA als Kompetitor-RNA zur Reaktion hinzugegeben. Dies sollte den unspezifischen Abbau der anschließend hinzugegebenen 50 fmol <sup>32</sup>P-markierten *target*-RNA minimieren. Die Spaltung der *target*-RNA erfolgte für 20 min bei 25°C. Die Reinigung der im Reaktionsansatz enthaltenen Gesamt-RNA wurde wie in 2.2.3.5 beschrieben durchgeführt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Analyse der <sup>32</sup>P-markierten RNA erfolgte durch denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 2.4.8) und anschließende Autoradiographie (siehe 2.4.9).

### 2.2.3.7 DCL/cleavage Assay

Der DCL-*cleavage*-Assay kombiniert den *in vitro* DCL-Assay (siehe 2.2.3.5) mit den zuvor beschriebenen *cleavage assay* (siehe 2.2.3.6) und ermöglicht so die Spaltung  $^{32}\text{P}$ -markierter *target*-RNAs durch endogen im BYL generierte siRNAs. Zu diesem Zweck wurde eine *in vitro* Translation von 1,5  $\mu\text{g}$  einer AGO-mRNA in Anwesenheit von 500 ng einer viralen (ss) oder (ds)RNA durchgeführt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 2,5 h bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 2  $\mu\text{g}$  Luciferase-Kompetitor-RNA wurden 50 fmol  $^{32}\text{P}$ -markierter *target*-RNA hinzugegeben. Die Spaltung der *target*-RNA erfolgte für 20 min bei 25°C. Die Reinigung der im Reaktionsansatz enthaltenen Gesamt-RNA wurde wie in 2.2.3.5 beschrieben durchgeführt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Analyse der  $^{32}\text{P}$ -markierten RNA erfolgte durch denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 2.4.8) und anschließende Autoradiographie (siehe 2.4.9).

### 2.2.3.8 *In vitro* Replikation von TBSV

Für die *in vitro* Replikation von TBSV wurden zunächst die beiden Replikase-Proteine p33 und p92 durch *in vitro* Translation (siehe 2.2.3.3) im BYL generiert. Zu diesem Zweck wurden 5 pmol der p33-mRNA und 0,25 pmol der p92-mRNA in einem 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz translatiert. Anschließend wurden für die Replikationsreaktion 40  $\mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes mit 10  $\mu\text{l}$  5 x RdRp-Puffer [50 mM DTT; 500 mg/ml Actinomycin D; 17 mM Magnesiumacetat; 5 mM ATP, GTP und UTP; 0,250 mM CTP; 15  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-CTP (3000 Ci/mmol; Hartmann Analytic)] versetzt. Die Initiation der Replikation erfolgte durch Zugabe von 0,5 pmol an Replikations-*template* wie zum Beispiel (+)DI-B10-RNA oder (+)DI-R3.5-RNA. Die Reaktion wurde für 3 h bei 25°C inkubiert und die Reaktionsprodukte über das RNA Purification Kit (Thermo Scientific) oder NucleoSpin RNA-Kit (Macherey & Nagel) gereinigt, um freies [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-CTP zu entfernen. Die Detektion erfolgte durch Auftrennung der RNA auf einem denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Gel (siehe 2.4.8) und anschließende Autoradiographie (siehe 2.4.9).

### 2.2.3.9 *In vitro* Replikations-Inhibitionsassay

Der *in vitro* Replikations-Inhibitions-Assay ist eine Kombination des *cleavage*-Assays mit einer Replikationsreaktion der TBSV-RNAs, der im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde. Er ermöglicht die Analyse der Wirkung eines RISC auf die virale RNA während der *in vitro* Replikation. Zu diesem Zweck erfolgte die *in vitro* Translation von p33 und p92 in einem Volumen von 25  $\mu\text{l}$  (siehe 2.2.3.3). In einer zweiten Reaktion erfolgte die Translation von 2  $\mu\text{g}$  AGO-mRNA in Anwesenheit von siRNA, um den RISC gegen ei-

ne bestimmte *target site* innerhalb der viralen RNA zu programmieren (siehe 2.2.3.6). Wenn nicht anders beschrieben, wurden beide Reaktion nach 2,5 h gemischt und 40  $\mu$ l der kombinierten Lösung mit 10  $\mu$ l RdRp-Puffer versetzt. Die Initiation der Replikation erfolgte durch Zugabe von 0,5 pmol Replikations-*template*. Die Reinigung und Detektion der Replikationsprodukte erfolgte analog zum Replikationsassay (siehe 2.2.3.8).

## 2.3 Molekulargenetische Arbeiten mit DNA

### 2.3.1 DNA-Isolation

#### 2.3.1.1 Plasmid-Minipräparation

Über Nacht wurden die transformierten Zellen bei 37°C unter Schütteln in 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen. Anschließend wurden 1,5 ml der Kulturlösung zentrifugiert (Mikro 200, 1 min, 10000 rpm) und das Pellet in 100  $\mu$ l Lösung I [25 mM Tris/HCl pH 7,9; 50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 100  $\mu$ g/ml RNase A (AppliChem GmbH)] resuspendiert. Durch die Zugabe von 200  $\mu$ l Lösung II [0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS] und anschließende Inkubation für 5 min bei 4°C wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden 150  $\mu$ l Lösung III [2,55 M Kaliumacetat; pH 4,8] zugegeben und die Zellen erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (Mikro 200, 13000 rpm, 15 min) wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA mit 0,7 Vol. Isopropanol präzipitiert (siehe 2.3.4). Bei nachfolgender Sequenzierung wurden stark verunreinigte Plasmid-Minipräparationen mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kits (Thermo Scientific) entsprechend der Angaben der Hersteller aufgereinigt.

#### 2.3.1.2 Plasmid-Midipräparation

Die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde wie unter 2.3.1.1 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden 50 ml einer Suspensionskultur eingesetzt und das Bakterienpellet mit jeweils 3 ml Lösung I, II und III aufgeschlossen. Die präparierte Plasmid-DNA wurde in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen.

### 2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA nach ihrer Größe. Dazu wurden 1 - 2% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer [40 mM Tris/HCl; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 8,3] gelöst und mit 0,3  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid versetzt. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA-Doppelstränge und emittiert bei UV-Bestrahlung

(260 - 360 nm) Licht mit einer Wellenlänge von 560 nm. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer. Als Ladepuffer wurde der 6 x DNA-loading dye [10 mM Tris/HCl; pH 7,4; 60% (v/v) Glycerin; 60 mM EDTA; 0,03% Bromphenolblau; 0,03% Xylencyanol FF; 60 mM EDTA] verwendet. Als DNA-Größenstandards wurden je nach Bedarf der Gene Ruler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) oder der Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 120 - 140 V durchgeführt. Die Detektion mit dem Geldokumentationssystem (Kodak EDAS 290) erfolgte unter UV-Anregung (UV-Transilluminator UXT-30M-8E, Biostep GmbH).

### 2.3.3 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme (Typ II) katalysieren die sequenzspezifische, endonukleolytische Spaltung des Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats der DNA. Dabei entstehen in Abhängigkeit des verwendeten Enzyms einzelsträngige, überstehende Enden (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*). Die Wahl der Reaktionsbedingungen richtete sich nach den Angaben des Herstellers des verwendeten Enzyms. Restriktionsreaktionen zu analytischen Zwecken wurden mit 1 - 2 µg DNA in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Die Restriktion zu präparativen Zwecken erfolgte mit 15 - 20 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Die Restriktion wurde anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 2.3.2).

### 2.3.4 Reinigung und Präzipitation von DNA

Die Reinigung der DNA erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.4.3) oder aus einem 1%igen Agarosegel mit Hilfe des Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Die Präzipitation der DNA erfolgte mit Hilfe von 2,5 Volumen Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2). Nach einer Plasmid-Minipräparation (2.3.1.1) wurde die DNA mittels 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Proben 20 min bei 4°C (Mikro 200, 13000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend für 10 min zentrifugiert (Mikro 200, 13000 rpm). Das DNA-Pellet wurde 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>nf</sub> resuspendiert. Die DNA-Lösungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren erfolgte mit Hilfe eines Eppendorf-Bio-Photometers bei 260 nm. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein Extinktionswert von 1 einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm



bestimmt, da bei dieser Wellenlänge Proteine absorbieren, die die Probe verunreinigen können. Der Quozient  $A_{260}/A_{280}$  zeigt deshalb die Reinheit der Probe an. Ist dieser Wert kleiner als 1,8, ist die DNA-Präparation verunreinigt, ist der Wert größer als 1,8 weist die DNA-Präparation keine Verunreinigung mit Proteinen auf.

### 2.3.6 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA

Die Phosphorylierung von DNA-Fragmenten erfolgte, um deren Klonierung in einen Vektor zu ermöglichen. Hierfür wurde die T4 Polynukleotid-Kinase (Thermo Scientific) entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet. Die Reaktion wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und das Enzym anschließend durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und anschließende zehninütige Inkubation bei 75°C inaktiviert.

Die Dephosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase (Fast AP, Thermo Scientific) wurde durchgeführt, um eine Rezirkularisierung von linearisierten DNA-Vektoren zu vermeiden. Die entsprechenden Reaktionsansätze (Gesamtvolumen 50 µl) wurden nach dem Restriktionsverdau mit 1 U alkalischer Phosphatase versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die alkalische Phosphatase durch 5-minütige Inkubation bei 75°C inaktiviert.

### 2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4 DNA-Ligase (Thermo Scientific) katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen den 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden doppelsträngiger DNA oder RNA und benötigt dabei ATP als Cofaktor. Die Reaktion wurde entsprechend der Angaben des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Das Verhältnis der molaren Menge von Vektor- zu Fragment-DNA betrug 1:5. Der Reaktionsansatz wurde für mindestens 1 h bei 22°C inkubiert.

Die Ligation von DNA-Fragmenten in den pGEM-T Easy Vektor (Promega, Madison, USA) wurde entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde für mindestens 1 h bei 22°C inkubiert und anschließend in *E.coli*-Zellen transformiert (siehe 2.2.1.2).

### 2.3.8 PCR (*polymerase chain reaction*)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*) ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Amplifikation von DNA-Abschnitten mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Die Spezifität wird durch die verwendeten Primer gewährleistet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zur Amplifikation von cDNAs, für die Klonierung von DNA in Plasmide und zur Herstellung von *template*-DNA für die *in vitro* Transkripti-

on mit der Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (Thermo Scientific) durchgeführt. Die Amplifikation von DNA für analytische Zwecke erfolgte mit Hilfe der DreamTaq DNA-Polymerase (Thermo Scientific). Die verwendeten Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) wurden von der Firma Jena Bioscience bezogen.

Komponenten	Phusion DNA-Polymerase	DreamTaq DNA-Polymerase
Reaktionspuffer	1 x	1 x
dNTP-Mix (10 mM)	200 $\mu$ M	400 $\mu$ M
<i>forward</i> Primer	400 nM	400 nM
<i>reverse</i> Primer	400 nM	400 nM
<i>template</i> -DNA	0,02 - 200 pg/ $\mu$ l	20 - 200 pg/ $\mu$ l
DNA-Polymerase	0,01 U/ $\mu$ l	0,03 U/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>nf</sub>	ad 50 $\mu$ l	ad 20 $\mu$ l

**Tabelle 2.3** Reaktionsansatz einer PCR-Reaktion unter Verwendung der Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase oder DreamTaq DNA-Polymerase.

Die Reaktionsbedingungen wurden der Schmelztemperatur der verwendeten Primer und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments angepasst und folgten dem in Tabelle 2.4 dargestellten Schema. Die Inkubation des PCR-Ansatzes erfolgte in einem MasterCycler Thermocycler (Eppendorf AG).

Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Temperatur	Reaktionszeit
1 initiale Denaturierung	98°C	30 s
2 Denaturierung	98°C	10 s
3 Primer- <i>annealing</i>	T <sub>m</sub> der Primer + 3°C	20 s
4 Elongation	72°C	20 s / kb
5 terminale Elongation	72°C	7 min
DreamTaq DNA-Polymerase	Temperatur	Reaktionszeit
1 initiale Denaturierung	95°C	2 min
2 Denaturierung	95°C	30 s
3 Primer- <i>annealing</i>	T <sub>m</sub> der Primer - 5°C	30 s
4 Elongation	72°C	30 s / kb
5 terminale Elongation	72°C	5 min

**Tabelle 2.4** Reaktionsbedingungen einer PCR-Reaktion unter Verwendung der Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase oder DreamTaq-DNA-Polymerase.

### 2.3.9 Quantitative *real time*-PCR

Die Methode der quantitativen *real time*-PCR (qRT-PCR) erlaubt eine Quantifizierung der Genexpression in Echtzeit. Die Methode beruht auf der Emission von Licht durch

SYBR Green I bei der Bindung doppelsträngiger DNA während der Primer-*extension*. Durch die Messung der Fluoreszenz kann für jeden PCR-Zyklus die Menge der enthaltenen (ds)DNA bestimmt werden. Durch die Amplifikation der DNA während der PCR erhöht sich auch das Fluoreszenzsignal, welches anschließend gegen die Zykluszahl aufgetragen wird. Beim Eintritt in die exponentielle Phase der DNA-Amplifikation steigt das Fluoreszenzsignal der Probe signifikant zur Hintergrundfluoreszenz an. Dieser Punkt wird als  $c_t$ -Wert (*cycle threshold*) bezeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss einer antiviralen siRNA auf die Replikation der TBSV-RNA untersucht. Dafür erfolgte die Quantifizierung der (+)TBSV-RNA, der 18S-rRNA (Referenz-RNA), der überexprimierten pre-siRNAs und der entsprechenden murenen vsiRNAs. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6.1 aufgelistet. Die jeweiligen Reaktionsprodukte besitzen eine Größe zwischen 70 bp und 120 bp. Die *real time*-PCR wurde mit dem Real Time qPCR-Kit (ROBOKLON) am LightCycler 480 II (Roche) durchgeführt. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 10  $\mu$ l. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms LightCycler 480 SW1.5.

Komponenten	
2 x qRT-PCR Master-Mix (ROBOKLON)	5 $\mu$ l
<i>forward</i> Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
<i>reverse</i> Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
<i>template</i> cDNA aus RT	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>nf</sub>	ad 10 $\mu$ l

**Tabelle 2.5** Reaktionsansatz für die qRT-PCR-Reaktionen.

Die Reaktion wurde entsprechend der in Tabelle 2.4 dargestellten Bedingungen durchgeführt. Um die Spezifität der qRT-PCR zu überprüfen, wurde nach jeder Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei erfolgt die Erhöhung der Temperatur von 60°C auf 95°C. Bei der Bildung unspezifischer Produkte oder von Primerdimeren erfolgt die Denaturierung schon bei geringen Temperaturen. Oft treten dann mehrere Peaks oder Peaks mit einem Plateau auf.

### 2.3.9.1 $\Delta\Delta c_t$ -Methode

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mit der  $\Delta\Delta c_t$ -Methode [78]. Diese Methode erlaubt die relative Quantifizierung der Expression eines Zielgens bezogen auf ein weiteres, nicht reguliertes Referenzgen. Die Vorteile der Normierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da experimentelle Schwankungen innerhalb einer Probe gleichermaßen das Zielgen und das Referenzgen betreffen. Wichtig bei diesem Verfahren ist eine vergleichbare Effizienz der beiden beteiligten

PCR-Reaktionen. Zunächst wird für jede der zu untersuchenden Proben der  $c_t$ -Wert des Referenzgens vom  $c_t$ -Wert des Zielgens subtrahiert ( $\Delta c_t$ ). Anschließend wird die Differenz der  $\Delta c_t$ -Werte der einzelnen Proben (behandelte Probe/Kontrollprobe) gebildet ( $\Delta\Delta c_t$ -Wert). Die relative Expressionsrate (*ratio*) ergibt sich aus der Formel 2.3.

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

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

$$\text{ratio} = 2^{-\Delta\Delta c_t} \quad (2.3)$$

### 2.3.10 DNA-Sequenzierung

Nach der Konstruktion neuer Plasmide wurde deren Sequenz überprüft. Die Sequenzierungsreaktionen wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, D) und SEQLAB (Sequence Laboratories, Göttingen, D) durchgeführt. Die Auswertung der Nucleotidsequenzen erfolgte mit dem Programm Clone Manager Professional Suite (Scientific and Educational Software, Cary, USA).

#### 2.3.10.1 RNA-Sequenzierung

Die RNA-Sequenzierung ist eine Form des *next generation sequencing* und ermöglicht die Quantifizierung von Genexpressionsleveln, Transkriptomanalysen, Identifizierung neuer Gene und Transkripte und *small RNA profiling*.

Die RNA wurde entweder aus DCL-Assays (siehe 2.2.3.5) oder AGO-IP-Proben (siehe 2.5.2) isoliert. Die Reinigung der im Reaktionsansatz enthaltenen Gesamt-RNA erfolgte anschließend durch Behandlung mit 20 mg Proteinase K (Thermo Scientific) in Anwesenheit von 0,5% (w/v) SDS für 30 min bei 37°C. Anschließend wurde die RNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt (siehe 2.4.3 und die RNA zweimal mit 2,5 Vol. Ethanol und 0,1 Vol. Natriumacetat präzipitiert (siehe 2.4.4). Die RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Illumina Deep Sequencing durch PD Dr. Knut Krohn vom Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Universität Leipzig durchgeführt. Im Anschluss an die Sequenzierung führte Herr Dr. Krohn eine statistische Qualitätskontrolle mit Hilfe des Statistik-Programms R (University of Auckland, USA) durch und entfernte die Sequenzen der Ligationsadapter aus den

Sequenz-*reads*. Die bioinformatische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms CLC Genomics Workbench (Version 6.5.1) durch die beiden Bioinformatikstudenten Anne Hoffmann und Sebastian Wussow. Dabei erfolgte das *mapping* der Sequenzierungen gegen die (+)TBSV- bzw. die (+)DI-R3.5-RNA, die jeweils als Referenzgenom für die Identifizierung der in den Proben enthaltenen vsiRNAs verwendet wurden.

### 2.3.10.2 Darstellung der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung als *heat map*

Eine *heat map* ist ein Diagramm zur Visualisierung von Daten, deren abhängige Werte als Farben repräsentiert werden. Sie ermöglicht einen schnellen Überblick über große Datenmengen. Die *heat map* wurde mir dem Programm Microsoft Office Excel 2007 erstellt. Dargestellt ist die relative Häufigkeit (*reads per million*) von vsiRNAs entsprechend ihrer Länge (21 nt - 24 nt) und ihrer Lage innerhalb der Nukleotidsequenz der (+)DI-R3.5-RNA. Eingefärbt wurde die Position innerhalb der (+)DI-R3.5-RNA, an der sich das 5'-Nukleotid einer sequenzierten vsiRNA befindet. Die relative Häufigkeit einer vsiRNA innerhalb einer Probe (DCL, AGO1 oder AGO2) wird durch die Färbung (schwarz, grün oder rot) angegeben. Dabei erfolgte die Gewichtung mit einem Quantil von 98.

Das Quantil ist ein Lagemaß der Statistik und legt fest wie viele Werte einer Verteilung über oder unter einer bestimmten Grenze liegen. Die Skalierung der hier dargestellten *heat map* erfolgte mit einem Quantil von 98. Das bedeutet, dass 98% aller Messwerte von schwarz bis grün gefärbt werden, die restlichen 2% werden von grün bis rot gefärbt. Diese Form der Gewichtung erlaubt die Fokussierung auf vsiRNAs, die ausschließlich mit sehr großer Häufigkeit innerhalb einer Probe vorkommen.

## 2.4 Molekulargenetische Arbeiten mit RNA

Für die Arbeiten mit RNA wurden RNase-freie Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, D) sowie Nuklease-freies Wasser (nf) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet.

### 2.4.1 RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Blättern, Stängeln oder Blüten wurden 0,1 g pflanzliches Material mit einem vorgekühltem Mörser zerkleinert und mit 1 ml Trizol [0,8 M Guanidiniumthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 0,1 M Natriumacetat, pH 5,0; 5% (v/v) Glycerin; 38% (v/v) Phenol (wassergesättigt, stabilisiert)] versetzt. Nach 5 min gründlichen Mischens bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform dazugegeben und die Probe erneut für 5 min bei Raumtemperatur gründlich gemischt. Nach der

Zentrifugation (Mikro 200R, 15 min, 13000 rpm, 4°C) wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol für 20 min bei Raumtemperatur präzipitiert (siehe 2.4.4). Anschließend wurde die RNA in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>nf</sub> gelöst.

Um DNA-Kontaminationen zu entfernen wurde die RNA-Lösung gegebenenfalls mit 3,5 µl 10x DNase I Reaktionspuffer (Thermo Scientific) und 0,5 µl DNase I (recombinant, RNase-free, Roche Diagnostics GmbH) versetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde durch Zugabe von 50 mM EDTA und anschließende 10-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.4.2 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription wurde zur Herstellung von unmarkierter und [<sup>32</sup>P]-markierter RNA genutzt. Alle RNA-Konstrukte wurden durch eine *run-off in vitro* Transkription generiert. Die Termination der Transkription erfolgte somit durch Abfallen der RNA-Polymerase von der *template*-DNA. Als *template* dienten gereinigte PCR-Produkte oder linearisierte Plasmide. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Ribonukleosidtriphosphate wurden von Jena Bioscience (Jena, D) bezogen. Der allgemein verwendete *in vitro* Transkriptions-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Komponenten	
5 x Transkriptionspuffer (Agilent Technologies)	10 µl
rNTP-Mix (je 20 mM)	2,5 µl
Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkt	1 µg bzw. 750 ng
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl, Thermo Scientific)	0,75 µl
RNA-Polymerase	30 U
H <sub>2</sub> O <sub>nf</sub>	ad 50 µl

**Tabelle 2.6** Reaktionsansatz einer *in vitro* Transkription.

Die Reaktion wurde für 2,5 h bei 37°C (T7- oder T3-RNA-Polymerase, 50 U/µl, Agilent Technologies) bzw. 40°C (SP6-RNA-Polymerase, 20 U/µl, Thermo Scientific) inkubiert. Anschließend erfolgte die Hydrolyse der *template*-DNA durch Zugabe von 10 U DNase I recombinant RNase free (Roche Diagnostics GmbH) und 30-minütige Inkubation bei 37°C. Die Reinigung der synthetisierten RNA erfolgte durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation (siehe 2.4.3).

### 2.4.2.1 *In vitro* Transkription mit 5'-cap-Analogen

Für die Herstellung von 5'-cap-RNA-Konstrukten wurde dem in Tabelle 2.6 aufgeführten Reaktionsansatz 0,8 mM m<sup>7</sup>GpppG-cap-Analogen (Jena Bioscience) hinzugefügt. Dafür wurde die Konzentration von rGTP im Reaktionsansatz auf 0,2 mM verringert.

### 2.4.2.2 Generierung radioaktiv markierter RNA

Für die Herstellung von radioaktiv-markierter RNA wurde dem in Tabelle 2.6 aufgeführten Reaktionsansatz 25 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-CTP (3000 Ci/mmol, Hartmann Analytic) hinzugefügt. Dafür wurde die Konzentration von rCTP im Reaktionsansatz auf 0,1 mM verringert. Nach 2,5-stündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Hydrolyse der *template*-DNA durch Zugabe von 10 U DNase I recombinant RNase free (Roche Diagnostics GmbH) und 30-minütige Inkubation bei 37°C. Die Reinigung der synthetisierten RNA erfolgte mit Hilfe des Nucleospin RNA II Kits (MACHEREY-NAGEL GmbH) oder des GeneJET RNA Purification Kits (Thermo Scientific) nach Angaben des jeweiligen Herstellers.

### 2.4.3 Reinigung von Nukleinsäuren

Die Phenol/Chloroform-Extraktion ist ein Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren aus Reaktionsansätzen. Phenol und Chloroform denaturieren die in der Lösung enthaltenen Proteine. Diese sammeln sich daraufhin in der Interphase zwischen der oberen hydrophilen und der unteren hydrophoben Phase. Die Nukleinsäuren liegen weiterhin in der wässrigen Phase vor. Auf Grund der hohen Löslichkeit von Phenol in Chloroform bleibt die wässrige Phase weitgehend phenolfrei. Die zu reinigende Nukleinsäurehaltige Lösung wurde zunächst mit dem äquivalenten Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Anschließend wurde die Lösung 1 min gemischt (Vortex Genius 3), um sie homogen zu emulgieren. Daraufhin wurde das Gemisch 5 min zentrifugiert (Mikro 200, 13000 rpm). Nach der Zentrifugation (Mikro 200, 13000 rpm) wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem äquivalenten Volumen Chloroform erneut extrahiert. Nach erneuter 5-minütiger Zentrifugation (Mikro 200, 13000 rpm) wurde die wässrige Phase abermals in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch diesen Schritt wird in der hydrophilen Phase verbliebenes Phenol entfernt. Die Nukleinsäuren wurden anschließend präzipitiert (siehe 2.4.4).

### 2.4.4 Präzipitation von RNA

Zur Fällung der RNA wurden 100 µl der Lösung mit jeweils 18 µl 6 M Ammoniumacetat und 236 µl absolutem Ethanol versetzt, mehrmals invertiert und die RNA für 20 min bei Raumtemperatur präzipitiert. Nach der Zentrifugation (Mikro 200R, 13000 rpm, 15 min,

20°C) wurde der Überstand entfernt und das Pellet zweimal mit je 500 µl 70% Ethanol gewaschen und jeweils für 10 min zentrifugiert (Mikro 200R, 13000 rpm, 20°C). Das RNA-Pellet wurde 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in H<sub>2</sub>O<sub>nf</sub> resuspendiert. Die RNA-Lösungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 2.4.5 Generierung doppelsträngiger RNA

Zur Generierung von siRNA-Duplexen wurden jeweils 20 µM des *guide strands* und *passenger strands* in *annealing*-Puffer [30 mM HEPES-KOH, pH 7,4; 100 mM Kaliumacetat; 2 mM Magnesiumacetat] für 1 min bei 90°C und anschließend für 60 min bei 37°C inkubiert.

Für die Hybridisierung längerer RNAs wie z.B. der R3.5-Region wurden äquimolare Mengen an *sense*- und *antisense*-Transkripten für 2 min bei 94°C in STE-Puffer [10 mM Tris, pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA] denaturiert und innerhalb von 30 min auf 25°C abgekühlt. Die RNA-Lösungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 2.4.6 Generierung von siRNA-Pools mittels ShortCut RNase III

Zur Generierung von siRNA-Pools wurden 20 µg doppelsträngige RNA mit ShortCut RNase III (NEB) behandelt. Die Reaktion erfolgte entsprechend der Anweisungen des Herstellers. Die resultierenden RNA-Fragmente wurden auf einem nativen Tris-Borat Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend in TNES-Puffer [10 mM Tris; 0,1% (w/v) SDS; 300 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 7,5] eluiert.

#### 2.4.7 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe eines Eppendorf-Bio-Photometers bei 260 nm. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein Extinktionswert von 1 einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt, da bei dieser Wellenlänge Proteine absorbieren, die die Probe verunreinigen können. Der Quozient  $A_{260}/A_{280}$  zeigt deshalb die Reinheit der Probe an. Ist dieser Wert kleiner als 1,7, ist die RNA-Präparation verunreinigt, ist der Wert größer als 1,7 weist die RNA-Präparation keine Verunreinigung mit Proteinen auf.

#### 2.4.8 Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Analyse kleinerer RNAs mit einer Größe zwischen 20 nt und 800 nt und



zur Analyse [<sup>32</sup>P]-markierter RNAs verwendet. Die Gele enthielten zwischen 5 - 15% Acrylamid (19:1) (Carl Roth GmbH) sowie 8 M Harnstoff in 1 x TBE-Puffer [89 mM Tris/HCl, pH 8,3; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA]. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,08% (w/v) APS und 0,17% (v/v) TEMED gestartet. Die RNA-Proben wurden mit 2 x RNA-Ladepuffer [90% (v/v) deionisiertes Formamid; 10 mM Tris/HCl pH 7,4; 2 mM EDTA; 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol] versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TBE-Puffer bei 300-500 V. Bei Bedarf wurde das Gel nach Beendigung der Gelelektrophorese durch 30-minütige Inkubation in 5%iger Essigsäure fixiert und auf Whatman-Papier vakuumgetrocknet (Unigeldryer 3545D, Biorad). Die Analyse [<sup>32</sup>P]-markierter RNAs erfolgte durch Autoradiographie (siehe 2.4.9). Die Detektion unmarkierter RNAs erfolgte mit Hilfe einer UV-Lampe (Spectroline) bei 312 nm und einer Dünnschichtchromatographie-Platte (Riedel-Häen). Als RNA-Größenstandard wurde der Low Range RNA Ladder (Thermo Scientific) verwendet. Bei Bedarf wurde dieser nach Angaben des Herstellers vor dem Einsatz radioaktiv markiert.

### 2.4.9 Autoradiographie

Die Autoradiographie wurde zur Detektion radioaktiv markierter RNAs verwendet. Nach der Vakuumtrocknung der Gele wurde ein Storage Phosphor Screen S 230 (GE Healthcare) aufgelegt. Nach der Exposition des Screens wurde dieser mit einem Phosphorimager (Storm 860, Molecular Dynamics) eingelesen. Die Autoradiogramme wurden gegebenenfalls mit dem Programm ImageQuant 5.0 Build 050 (Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, USA) quantitativ ausgewertet.

### 2.4.10 Phosphorylierung von RNA

Die Phosphorylierung von 5'-Hydroxylgruppen von RNA wurde im Rahmen dieser Arbeit zur endständigen radioaktiven RNA-Markierung durchgeführt. Der entsprechende Reaktionsansatz ist in Tabelle 2.7 aufgeführt. Die Reaktion wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und das Enzym anschließend durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 10-minütige Inkubation bei 75°C inaktiviert. Die Reinigung des Reaktionsansatzes erfolgte mit Hilfe der MicroSpin G-25 Columns (GE Healthcare) entsprechend der Angaben des Herstellers. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Komponenten	
10 x T4 PNK Puffer A	2 $\mu$ l
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ )	4 $\mu$ l
ATP (10 $\mu\text{M}$ )	2 $\mu$ l
dephosphorylierte RNA	2 - 4 $\mu\text{g}$
T4 PNK (10 U/ $\mu\text{l}$ , Thermo Scientific)	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>nf</sub>	ad 20 $\mu$ l

**Tabelle 2.7** Reaktionsansatz zur 5'-Phosphorylierung von RNA.

### 2.4.11 Reverse Transkription

Die reverse Transkription (RT) ist eine Methode zur cDNA-Synthese ausgehend von einem RNA-*template*. Dies ermöglicht die Klonierung von Genen oder die Quantifizierung der Genexpression mittels quantitativer *real time*-PCR. Für die reverse Transkription polyadenylierter RNAs wurde ein oligo-dT-Primer verwendet. Die cDNA-Synthese nicht-polyadenylierter RNAs erfolgte mit Hilfe sequenzspezifischer Primer. Die reverse Transkription der vsiRNAs erfolgte nach einem modifizierten Protokoll mit speziellen *stem loop*-Primern.

Die reverse Transkription erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$ . Zunächst wurden 0,1 - 2  $\mu\text{g}$  der zu transkribierenden RNA und 20 pmol des RT-Primers in einem Gesamtvolumen von 12,5  $\mu\text{l}$  gemischt und für 5 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf Eis abgekühlt und die entsprechenden Volumina an Puffer, dNTPs und RiboLock zum Ansatz hinzugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37°C wurden 100 U reverse Transkriptase (RevertAid Reverse Transkriptase, Thermo Scientific) zugesetzt und der Reaktionsansatz 1 h bei 45°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch zehnmünütige Inkubation bei 70°C abgestoppt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

Komponenten	
RNA	0,1 - 2 $\mu\text{g}$
RT-Primer	20 pmol
H <sub>2</sub> O <sub>nf</sub>	ad 12,5 $\mu\text{l}$
5 x RT-Puffer	4 $\mu\text{l}$
dNTP-Mix (je 10 mM)	2 $\mu\text{l}$
RiboLock, RNase-Inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ )	0,25 $\mu\text{l}$
RevertAid Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$

**Tabelle 2.8** Reaktionsansatz einer reversen Transkription zur cDNA-Synthese.

### 2.4.11.1 Reverse Transkription maturer vsiRNAs

Dieses Protokoll wurde für die cDNA-Synthese maturer vsiRNAs mit Hilfe eines *stem loop*-Primers entwickelt und ermöglicht die nachfolgende Quantifizierung durch *real time*-PCR (siehe 2.3.9). Damit die Sekundärstruktur des Primers vor Beginn der Reaktion nicht aufgeschmolzen wird, erfolgt das *annealing* des *stem loop*-Primers an die mature vsiRNA für 30 min bei 16°C. Anschließend erfolgt die cDNA-Synthese durch 30-minütige Inkubation des Reaktionsansatzes bei 42°C. Die Reaktion kann durch 10-minütige Inkubation bei 70°C abgestoppt werden. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die reverse Transkription erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl.

Komponenten	
5 x RT-Puffer	4 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	2 µl
RT- <i>stem loop</i> -Primer	20 pmol
RT-Primer für internen Standard	10 pmol
RNA	0,1 µg
RiboLock, RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,25 µl
RevertAid Reverse Transkriptase (200 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>nf</sub>	ad 20 µl

**Tabelle 2.9** Reverse Transkription maturer vsiRNAs.

### 2.4.11.2 5'-RACE (*Rapid amplification of cDNA ends*)

Die 5'-RACE ist eine Methode zur Identifizierung unbekannter 5'-Enden von Nukleinsäuresequenzen ausgehend von einer bereits bekannten 3'-Sequenz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 5'-RACE verwendet, um das 5'-Ende von 3'-Spaltfragmenten der RISC-vermittelten RNA-Spaltung zu identifizieren.

Die zu klonierenden 3'-RNA-Spaltprodukte wurden zunächst mit Hilfe eines 5%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution aus dem Gel erfolgte durch Zugabe von 500 µl TNES-Puffer und anschließende Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht. Die RNA wurde durch zweimalige Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.4.3) gereinigt und durch Zugabe von 3 Vol. Ethanol und 0,1 Vol. Natriumacetat (pH 5,2) präzipitiert. Im Anschluss erfolgte die Ligation eines 5'-Adapter-RNA-Oligonukleotids (5'-GCUG-AUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGCCUUUGAUGAAA-3') an die isolierte

RNA durch die T4 RNA-Ligase (Promega). Anschließend erfolgte die reverse Transkription (siehe 2.4.11) der RNA mit der RevertAid reversen Transkriptase (Thermo Scientific). Der entsprechende RT-Primer bindet dabei an das bekannte 3'-Ende des zu klonierenden RNA-Fragments. Der in der nachfolgenden PCR verwendete *forward* Primer (5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3') bindet innerhalb der 5'-Adaptersequenz. Als *reverse* Primer wurde der zuvor verwendete RT-Primer genutzt. Im Anschluss wurden die PCR-Fragmente entsprechend der Angaben des Herstellers in den pGEM-T Easy Vektor (Promega) kloniert.

## 2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteinproben wurden mit 4 x SDS-Probenpuffer [20 mM Tris/HCl; 12% (w/v) SDS; 40% (v/v) Glycerin; 0,02% (w/v) Bromphenolblau; 10% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol] versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden in der Regel 20  $\mu$ g Protein auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1 x Lämmli-Puffer [25 mM Tris/HCl; 0,1% (w/v) SDS; 192 mM Glycin] verwendet. Die Polyacrylamid-Gele bestanden aus einem 4%igen Sammel- und einem 10%igen Trenngel, deren Zusammensetzungen in der folgenden Tabelle zusammengefasst sind. Die Elektrophorese erfolgte je nach Größe des Polyacrylamidgels bei 30 - 45 mA.

	Sammelgel (4% Acrylamid)	Trenngel (10% Acrylamid)
Trenn- / Sammelgelpuffer	1,25 ml	4,4 ml
H <sub>2</sub> O	3,05 ml	7 ml
AA/Bis (30%)	0,65 ml	6 ml
APS (10%)	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
TEMED	20 $\mu$ l	50 $\mu$ l

4 x Sammelgelpuffer		4 x Trenngelpuffer	
Tris/HCl	250 mM	Tris/HCl	1,5 mM
SDS	0,2% (w/v)	SDS	0,4% (w/v)
pH 6,8		pH 8,8	

### 2.5.2 Immunpräzipitation - Affinitätsreinigung

Die Immunpräzipitation wurde zur Anreicherung von verschiedenen AGO-Proteinen und deren Interaktionspartnern (Proteine, siRNAs) verwendet. Das Prinzip beruht auf der Kopplung des Fc-Teils eines spezifischen IgG-Moleküls an eine Matrix. Anschließend wird die antikörpergekoppelte Matrix mit dem Proteingemisch versetzt. Durch die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung kann das gewünschte Protein aus einem Proteingemisch gereinigt und angereichert werden. Bei starken Protein-Protein-Interaktionen können auch potentielle Interaktionspartner nachgewiesen werden.

Zur Präzipitation von FLAG-AGO-Varianten aus BYL wurde das ANTI-FLAG M2 affinity gel System (Sigma Aldrich) verwendet. Dazu wurde zunächst FLAG-AGO-mRNA *in vitro* für 1 h bei 25°C in BYL translatiert (siehe 2.2.3.3) und anschließend das Reaktionsvolumen mit IPB-Puffer [20 mM HEPES/KOH pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,5% (v/v) NP-40; 1 mM DTT] auf 450 µl aufgefüllt. Die Protein A-Sepharose-beads wurden 3 x mit je 500 µl IPB-Puffer gewaschen und durch Zentrifugation (Mikro 200, 1 min, 5000 rpm, 4°C) pelletiert und mit den 450 µl des BYL versetzt. Die Inkubation erfolgt bei 4°C über Nacht. Anschließend wurden die mit Anti-FLAG-Antikörper gekoppelten Protein A-Sepharose-beads (ANTI-FLAG M2 Affinity Gel, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 5 x mit IPB-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die beads mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und die Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 2.5.1) aufgetrennt.

Für die Analyse co-präzipitierter vsiRNAs wurden die Protein A-Sepharose-beads nach der Immunpräzipitation mit 20 µg Proteinase K (Thermo Scientific) versetzt und in Anwesenheit von 0,5% (w/v) SDS für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reinigung der im Reaktionsansatz enthaltenen RNA wurde wie in 2.2.3.5 beschrieben durchgeführt.

### 2.5.3 Western blotting

Das *Western blotting* ist eine Methode, die eine qualitative und quantitative Bestimmung einzelner Proteine innerhalb eines komplexen Proteingemisches ermöglicht.

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran erfolgte nach dem *semi dry*-Blotverfahren. Zunächst wurden das Whatman-Papier und die Nitrocellulose-Membran (LI-COR) für 2 min in 1 x Transferpuffer [48 mM Tris; 39 mM Glycin; 1,3 mM SDS; 20% (v/v) Methanol] eingelegt. Anschließend erfolgte der Transfer der zuvor durch SDS-PAGE (2.5.1) aufgetrennten Proteine für 2 h bei 0,8 V pro cm<sup>2</sup>. Anschließend wurde die Membran zweimal für je 5 min in TBST-Puffer [20 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% (v/v) Tween 20] gewaschen. Die Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in *blocking*-Lösung [7,5% (w/v) SUCOFIn in TBST] inkubiert. Nach zweimaligem Wa-

schen in TBST-Puffer wurde die Membran für 1 h in *blocking*-Lösung mit dem primären Antikörper inkubiert. Im Folgenden wurde die Membran erneut zweimal für je 15 min mit TBST-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Nach der einstündigen Inkubation der Membran in der *blocking*-Lösung mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran dreimal für je 15 min mit TBST-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Odyssey Infrarot Scanners (LI-COR, Lincoln, USA). Die Auswertung der *Western blots* erfolgte mit Hilfe des Programms Odyssey 2.1 (LI-COR). Im Anschluss wurde die Membran in TBS-Puffer [2 mM Tris/HCl, pH 7,5; 15 mM NaCl] bei 4°C gelagert werden.

I	Anti-AGO1 ( <i>Nicotiana benthamiana</i> ) zur Verfügung gestellt von V. Pantaleo	Kaninchen (polyklonal) 1:1000 in <i>blocking</i> -Lösung
II	Anti-HSP70 ( <i>Nicotiana benthamiana</i> ) Abcam	Maus (monoklonal) 1:1000 in <i>blocking</i> -Lösung
III	Anti-FLAG M2 Stratagene	Maus (monoklonal) 1:5000 in <i>blocking</i> -Lösung
IV	IR-dye 800CW Anti- <i>mouse</i> IgG LI-COR	Affe (monoklonal) 1:10000 in <i>blocking</i> -Lösung
V	IR-dye 800CW Anti- <i>rabbit</i> IgG, LI-COR	Affe (monoklonal) 1:10000 in <i>blocking</i> -Lösung

#### 2.5.4 Silberfärbung

Die SDS-Polyacrylamidgele (10 x 10 cm) wurde nach der Gelelektrophorese für 5 min in 60 ml Lösung I [50% (v/v) Aceton; 1,25% (w/v) Trichloressigsäure; 25 µl (v/v) Formaldehyd (37%)] fixiert und danach 3 x 5 s, 1 x 5 min und nochmals 3 x 5 s mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 5 min in 60 ml 50% Aceton und für 1 min in 60 ml einer 0,03%igen (w/v) Natriumthiocyanat-Lösung inkubiert. Danach wurde das Gel erneut 3 x für 5 s in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen. Die Imprägnierung des Polyacrylamid-Gels erfolgte durch 8-minütige Inkubation in 60 ml Lösung II [0,19% (w/v) Silbernitrat AgNO<sub>3</sub>; 0,6 ml (v/v) Formaldehyd (37%)]. Nach kurzem Waschen des Gels in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> (3 x 5 s) erfolgte die Entwicklung in 60 ml Lösung III [1,2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 25 µl 37%iges (v/v) Formaldehyd; 0,008% (w/v) Natriumthiocyanat]. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Inkubation des Gels in 1%iger Essigsäure.



## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Rekonstitution der RISC-vermittelten RNA-Spaltung *in vitro*

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden in BYL, einem zytoplasmatischen Extrakt aus entvakuolisierten *Nicotiana tabacum*-Protoplasten, durchgeführt. Es konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die Überexpression von *NtAGO1* im BYL in Anwesenheit einer exogenen siRNA die Formierung eines aktiven AGO1/RISCs ermöglicht [55]. Aus diesem Grund wurde zunächst versucht das RNA-*silencing in vitro* zu rekonstituieren.

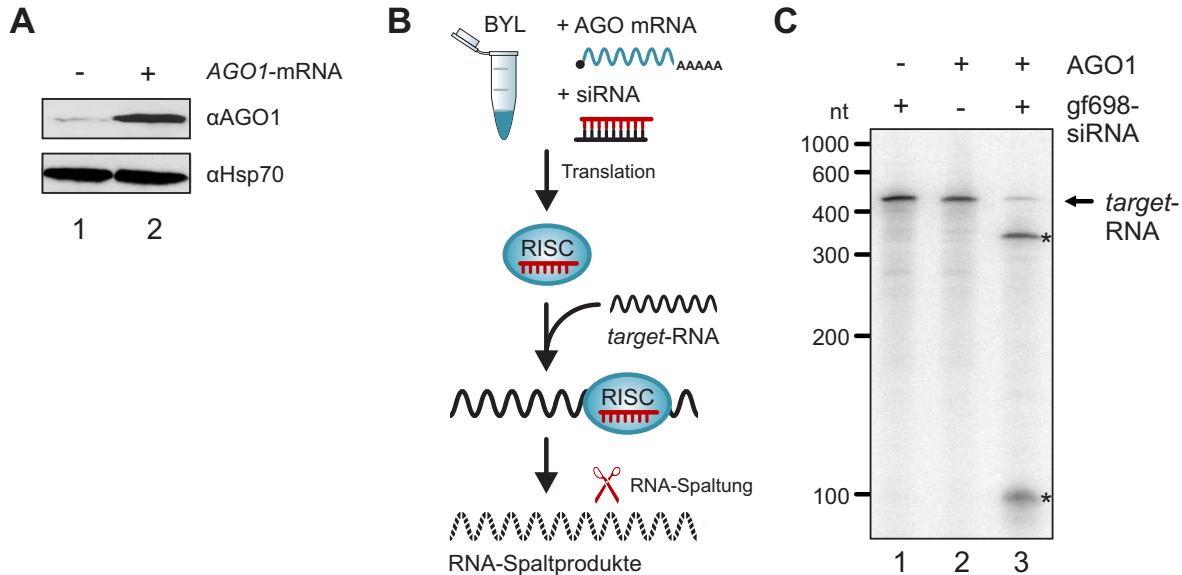
Entsprechend vorhergehender Ergebnisse [55] wurde die Quantität von *NtAGO1* durch *in vitro* Translation im BYL erhöht (siehe Abbildung 3.1A). Zu diesem Zweck wurde der ORF von AGO1 aus *Nicotiana tabacum* in einen modifizierten pSP64-Poly(A)-Vektor (siehe 6) kloniert. Ausgehend von diesem Vektor wurde die *NtAGO1*-mRNA unter Verwendung eines 5'-*cap*-Analogons und mit einem 30 nt langen Poly(A)-Schwanz transkribiert (siehe 2.4.2). Dies führt zu einer Erhöhung der Stabilität und Translationsaktivität der *NtAGO1*-mRNA im BYL (Daten nicht gezeigt). Die Formierung des RISCs erfolgte durch die Zugabe der gf698-siRNA zur *in vitro* Translationsreaktion der *NtAGO1*-mRNA. Die gf698-siRNA besitzt eine Länge von 22 nt und wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben [55]. Nach der Formierung des RISC erfolgte die Bindung des *guide strands* (gs) der gf698-siRNA an eine komplementäre Sequenz innerhalb der GFP- (*green fluorescent protein*) *target*-RNA und die endonukleolytische Spaltung der GFP-RNA. Auf Grund der hohen endogenen Ribonuklease-Aktivität erfolgt im BYL ein schneller, unspezifischer Abbau langer RNAs [39]. Um den unspezifischen RNA-Abbau zu minimieren, wurde ein 432 nt langes Fragment der GFP-mRNA anstelle der Gesamt-mRNA als *target*-RNA verwendet. Der Verlauf dieses Assays, der im Folgenden als „*cleavage assay*“ (siehe 2.2.3.6) bezeichnet wird, ist in Abbildung 3.1B schematisch dargestellt.

Die RISC-vermittelte Spaltung der GFP-RNA konnte *in vitro* reproduziert werden (siehe Abbildung 3.1C). Bei der *NtAGO1*/RISC-Formierung in Anwesenheit der gf698-siRNA konnten Spaltfragmente der <sup>32</sup>P-markierten GFP-*target*-RNA der erwarteten Größe von 335 nt und 98 nt detektiert werden (siehe Abbildung 3.1C, Spur 3). In Abwesenheit von *in vitro* translatiertem *NtAGO1* (Spur 1) oder bei fehlender Beladung von *NtAGO1* mit gf698-siRNA (Spur 2) konnte keine gf698-vermittelte Spaltung der GFP-mRNA detektiert werden.

Durch die fehlende endogene RISC-Aktivität im BYL können verschiedene AGO-Proteine mit unterschiedlichen siRNAs beladen und deren Effekt auf die jeweils verwendete *target*-RNA untersucht werden.



Wie bereits durch Iki et al. gezeigt werden konnte, wurde auch in diesem Experiment deutlich, dass das BYL nur eine geringe endogene RISC-Aktivität aufweist. Durch die Überexpression der AGO-mRNA in Anwesenheit exogener siRNAs können aktive RISCs gegen bestimmte *target*-Sequenzen programmiert werden.



**Abbildung 3.1 In vitro RISC-Aktivität in BYL.** (A) Quantifizierung von *NtAGO1* in BYL. Western Blot von *NtAGO1* in naivem BYL (Spur 1) und *NtAGO1*, welches durch *in vitro* Translation in BYL überexprimiert wurde (Spur 2). Es wurden jeweils gleiche Mengen des Lysats aufgetragen. (B) Schematische Darstellung eines *cleavage assays*. *AGO* wird in Anwesenheit einer exogenen siRNA *in vitro* translatiert. Danach erfolgt die Zugabe einer  $^{32}$ P-markierten *target*-RNA und die Analyse der Spaltfragmente. (C) *Cleavage assay* einer GFP-RNA mit *gf698*-siRNA. Die Spaltung der GFP-RNA erfolgte ausschließlich bei der Beladung von *NtAGO1* mit *gf698*-siRNA (Spur 3). Die resultierenden Spaltfragmente wurden mit einem Stern gekennzeichnet und entsprechen der erwarteten Größe von 335 nt und 98 nt. Ohne die Überexpression von *NtAGO1* (Spur 1) oder bei fehlender Beladung des AGO-Proteins mit einer exogenen siRNA (Spur 2) wurde keine Spaltung der GFP-RNA beobachtet. Die Analyse der RNA erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie.

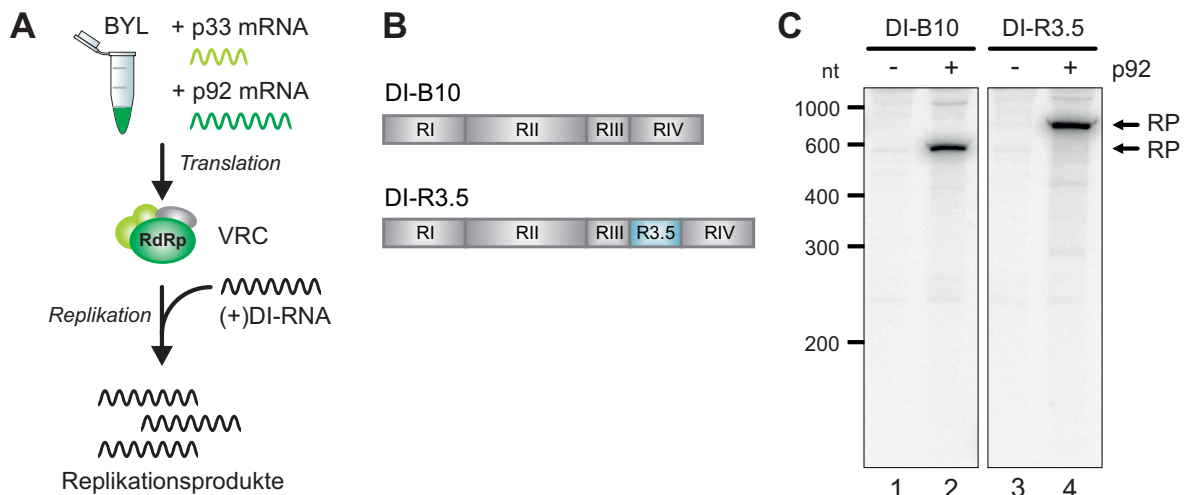
### 3.2 Rekonstitution des antiviralen RNA-silencing in vitro

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das BYL die Formierung eines aktiven RISC ermöglicht, sollte nun das *in vitro* System verwendet werden, um zu untersuchen, ob die generierten RISCs auch die Spaltung einer viralen RNA vermitteln. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine geeignete virale *target*-RNA generiert.

Auf Grund der hohen Stabilität und Replikationsrate von TBSV-DI-RNAs werden diese häufig für Replikationsstudien im BYL verwendet [39]. Allerdings wurden viele DI-RNAs als ungeeignete *targets* für eine RISC-vermittelte Spaltung beschrieben [144].

Um ein RNA-Substrat zu generieren, das zum Einen eine effiziente *in vitro* Replikation

zeigt, zum Anderen aber auch ein gutes *target* für die antivirale Immunantwort darstellt, wurde durch Dr. Torsten Gursinsky eine modifizierte Version der TBSV DI-B10-Wildtyp-RNA generiert. Diese sogenannte DI-R3.5-RNA enthält zusätzlich zu den Regionen RI - RIV die R3.5-Region (siehe Abbildung 3.2A). Diese 180 bp lange Sequenz befindet sich innerhalb des TBSV-Genoms zwischen den Regionen RIII und RIV und enthält die 3'CITE. Das R3.5-Element wurde als *target*-Region für die RISC-vermittelte RNA-Spaltung gewählt, da es bereits für das *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV), einem zum TBSV nahe verwandten (+)Strang-RNA-Virus, als Spaltungs-*hotspot* beschrieben wurde [108, 145]. Um die Funktionalität der DI-R3.5-RNA zu überprüfen wurde zunächst ein Replikationsassay in BYL durchgeführt (siehe Abbildung 3.2A). Es konnte gezeigt werden, dass die DI-R3.5-RNA *in vitro* mit ähnlicher Effizienz repliziert wird wie die DI-B10-RNA (siehe Abbildung 3.2C).

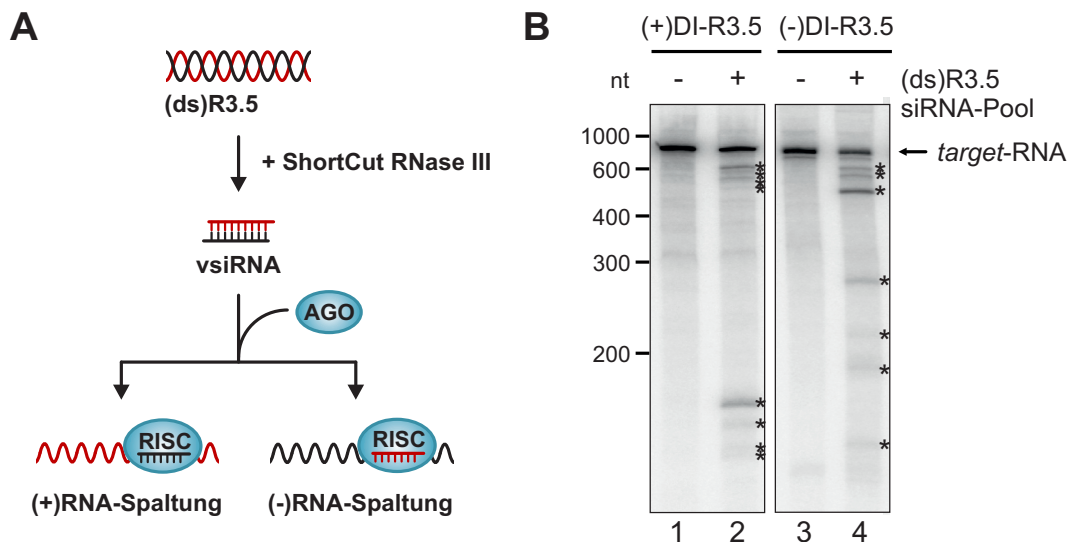


**Abbildung 3.2 Aufbau und *in vitro* Replikation von TBSV-DI-RNAs.** (A) Schematische Darstellung eines Replikationsassays. Die viralen Untereinheiten des viralen Replikationskomplexes (VRC) werden durch *in vitro* Translation der p33- und p92-mRNAs generiert. Die Replikation wird durch Zugabe einer viralen (+)DI-RNA initiiert. (B) Schematische Darstellung der DI-B10- und DI-R3.5-RNA. Die DI-B10-RNA [64] besteht aus den für die Replikation essentiellen Regionen RI - RIV. Das DI-R3.5 enthält zusätzlich die R3.5-Region, die sich zwischen RIII und RIV befindet. (C) Vergleich der Replikationseffizienz des DI-B10 und DI-R3.5. Die Detektion der Replikationsprodukte (RP) erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie des in neue RNA-Moleküle eingebauten [ $\alpha$ - $^{32}$ P]CTPs. DI-B10 und DI-R3.5 replizierten *in vitro* mit vergleichbarer Effizienz (Vergleich Spur 2 und 4). In Abwesenheit von p92 wurden keine Replikationsprodukte detektiert (Spur 1 und 3).

Im Anschluss sollte untersucht werden, ob auch die R3.5-Region von TBSV ein mögliches *target* für die RISC-vermittelte Spaltung darstellen kann. Zu diesem Zweck wurde ein *cleavage assay* mit der DI-R3.5-RNA durchgeführt.

Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Informationen zu vsiRNAs aus der R3.5-Region von TBSV vorlagen, wurde zunächst eine Mischung (Pool) unterschiedlicher vsiRNAs generiert. Zu diesem Zweck wurden die *sense*- und *antisense*-Transkripte der R3.5-

Region hybridisiert (siehe 2.4.5) und die (ds)R3.5-RNA anschließend mit ShortCut RNase III (New England Biolabs, Ipswich, USA) behandelt. Dieses Enzym gehört wie DCL zur RNase III-Familie und prozessiert 18-25 nt lange siRNA-Duplexe aus doppelsträngiger RNA. Auf diese Weise wurden verschiedene vsiRNA-Spezies aus der R3.5-RNA generiert, die nach der Bindung durch *NtAGO1* die Spaltung der DI-R3.5-RNA im Bereich der R3.5-Region medieren sollten. Da diese vsiRNAs (im Folgenden bezeichnet als (ds)R3.5-siRNA-Pool) aus einer doppelsträngigen RNA generiert wurden, besitzt jeweils ein Strang des vsiRNA-Duplexes eine vollständige Komplementarität zur viralen (+)RNA, der jeweils andere entsprechend zur viralen (-)RNA, die als Intermediat während der Replikation gebildet wird. Aus diesem Grund wurde erwartet, dass die vsiRNAs des (ds)R3.5-siRNA-Pools zur Spaltung beider viralen RNA-Stränge führen können (siehe Abbildung 3.3A).



**Abbildung 3.3 Cleavage assay mit (+) und (-)DI-R3.5-RNA und dem (ds)R3.5-siRNA-Pool.** (A) Schematische Darstellung des durchgeführten *cleavage assays* von DI-R3.5-RNA. Der verwendete vsiRNA-Pool wurde mit ShortCut RNase III aus (ds)R3.5-RNA generiert. Diese vsiRNAs können sowohl die (+)DI-R3.5 als auch die (-)DI-R3.5-RNA spalten. Welcher der beiden RNA-Stränge gespalten wird, ist abhängig vom Ursprung des im RISC gebundenen vsiRNA *guide strands*. (B) Aus (ds)R3.5-RNA wurde durch ShortCut RNase III-Verdau ein Pool verschiedener vsiRNAs generiert, der zur Beladung von *in vitro* translatiertem *NtAGO1* verwendet wurde. Im Anschluss erfolgte die Zugabe  $^{32}\text{P}$ -markierter (+)- oder (-)DI-R3.5-*target*-RNA. Die Analyse der RNA erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie. Die Spaltfragmente sind durch Sterne gekennzeichnet (Spur 2 und 4). Bei der Beladung von *NtAGO1* mit gf698-siRNA konnte keine Spaltung der *target*-RNA beobachtet werden (Spur 1 und 3).

Um dies zu überprüfen wurden RISCs durch *in vitro* Translation der *NtAGO1*-mRNA in Anwesenheit des (ds)R3.5-siRNA-Pools assembliert und so gegen die R3.5-Region der DI-R3.5-RNA programmiert. Anschließend wurde ein *cleavage assay* mit *in vitro*

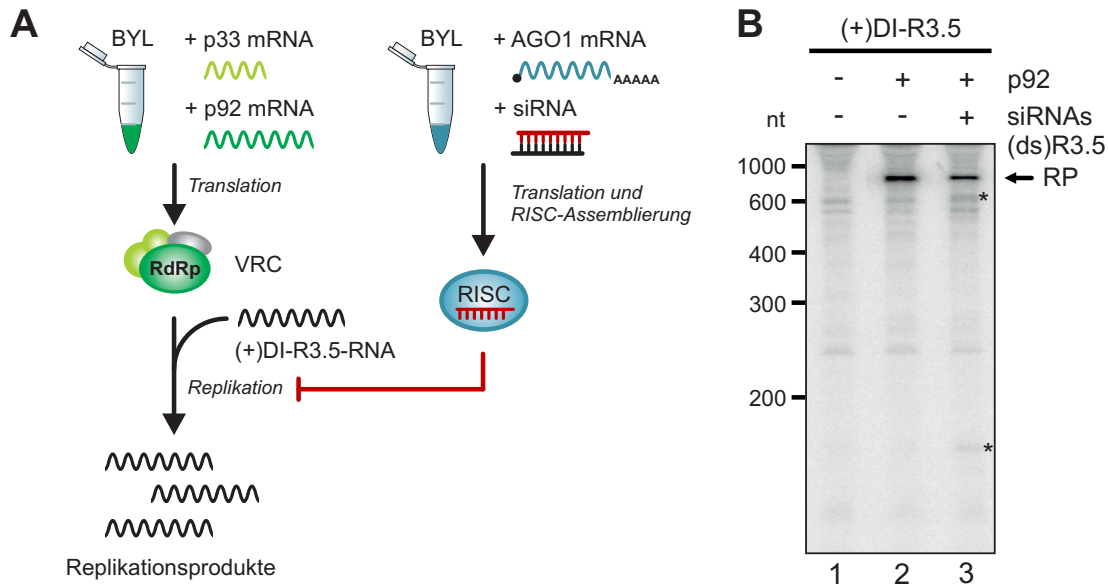
transkribierter und  $^{32}\text{P}$ -markierter (+)DI-R3.5- bzw. (-)DI-R3.5-RNA durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Beladung von *NtAGO1* mit dem (ds)R3.5-siRNA-Pool zur Spaltung beider *target*-RNAs führt (siehe Abbildung 3.3B, Spur 2 und 4). Bei Beladung von *NtAGO1* mit gf698-siRNA konnten dagegen keine Spaltfragmente detektiert werden, da diese keine komplementäre *target*-Sequenz innerhalb der DI-R3.5-RNA besitzt (siehe Abbildung 3.3B, Spur 1 und 3).

Interessanterweise konnten in beiden Reaktionen jeweils nur 3 - 4 verschiedene 5'- und 3'-Spaltfragmente detektiert werden, obwohl im (ds)R3.5-siRNA-Pool eine Vielzahl verschiedener vsiRNA-Spezies enthalten sind (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde ein Großteil der viralen *input*-RNA nicht gespalten. Dies deutet darauf hin, dass viele der durch ShortCut RNase III generierten vsiRNAs keine oder nur eine ineffiziente Spaltung der *target*-RNA vermitteln.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der (ds)R3.5-siRNA-Pool eine effiziente Spaltung der nicht replizierenden DI-R3.5-RNA vermittelt, sollte untersucht werden, ob die Beladung von *NtAGO1* mit dem (ds)R3.5-siRNA-Pool zu einer Inhibition der Replikation der DI-R3.5-RNA führen kann. Zu diesem Zweck wurde ein Replikations-Inhibitionsassay etabliert, der in Abbildung 3.4A schematisch dargestellt ist. In diesem Assay wurde die virale Replikation mit der antiviralen RISC-Aktivität *in vitro* kombiniert. Dies ermöglichte die direkte Analyse des Einflusses des RISC auf die replizierende RNA.

Zur Rekonstitution des viralen Replikationskomplexes wurden die p33-mRNA und die p92-mRNA *in vitro* translatiert. In einer 2. separaten Reaktion erfolgte die Programmierung der *NtAGO1*/RISCs mit dem (ds)R3.5-siRNA-Pool. Im Anschluss wurden beide Reaktionsansätze gemischt und die Replikation durch Zugabe von (+)DI-R3.5-RNA initiiert. Durch die Verwendung  $^{32}\text{P}$ -markierter Nukleotide wurden, die während der Replikation neu synthetisierten (+)RNA-Moleküle, nachgewiesen.

Wie in Abbildung 3.4B (Spur 3) gezeigt ist, führte die Beladung von *NtAGO1* mit dem (ds)R3.5-siRNA-Pool zu einer leichten Abnahme der Menge des gebildeten Replikationsproduktes. Zusätzlich konnten die Spaltfragmente neu synthetisierter RNA-Moleküle detektiert werden. Dieser leichte inhibitorische Effekt des RISC auf die virale Replikation war der erste Hinweis darauf, dass das BYL die *in vitro* Rekonstitution des RISC-vermittelten antiviralen RNA-silencings ermöglicht.



**Abbildung 3.4 Antivirales RNA-silencing in vitro.** (A) Schematische Darstellung eines Replikations-Inhibitionsassays. In einem Reaktionsansatz erfolgt die Formierung des *NtAGO1*/RISC. In einem separaten Ansatz erfolgt die *in vitro* Translation der Replikase-Proteine p33 und p92 und die Rekonstitution des viralen Replikationskomplexes (VRC). Die virale Replikation wird durch die Kombination der beiden Reaktionen und Zugabe der (+)DI-R3.5-RNA als Replikations-*template* initiiert. (B) Replikations-Inhibitionsassay mit (ds)R3.5-siRNA-Pool. In Abwesenheit von p92 fand keine virale Replikation statt (Spur 1). Die Replikation in Anwesenheit von gf698-siRNA beladenem *NtAGO1* erfolgte mit höherer Effizienz als bei der Beladung von *NtAGO1* mit dem (ds)R3.5-siRNA-Pool. Die Replikationsprodukte (RP) und die detektierbaren Spaltfragmente (Stern) sind gekennzeichnet.

### 3.2.1 Die Inhibition der viralen Replikation erfolgt durch die Spaltung neu synthetisierter (+)RNA

In den vorhergehenden Experimenten konnte das antivirale RNA-silencing *in vitro* rekonstituiert werden. Da das BYL die Programmierung des RISC gegen eine spezifische *target*-Sequenz ermöglicht, sollte nun untersucht werden, ob sowohl (+) als auch (-)RNA während der Replikation durch RISC gespalten werden können. Dies ist von Bedeutung, da während der viralen Replikation sowohl (-)RNA-Replikationsintermediate, als auch neue (+)RNA-Moleküle generiert werden, sodass beide RNA-Spezies potentielle *targets* des antiviralen RNA-silencings darstellen.

Diese Untersuchung erforderte die eindeutige Unterscheidung der (+) und (-)RNA-Spaltung während der viralen Replikation. Dies ist möglich, wenn nach der Bindung durch *NtAGO1* ausschließlich einer der beiden RNA-Stränge eines vsiRNA-Duplexes als *guide strand* selektiert wird. Im Fall der gf698-siRNA wurde bereits beschrieben, dass ausschließlich der gf698-*guide strand* durch *NtAGO1* gebunden werden kann [55]. Aus diesem Grund erlaubt die Insertion der gf698-*target*-Sequenz in *sense*-Orientierung ausschließlich die Spaltung der (+)DI-R3.5-RNA, während die Insertion der

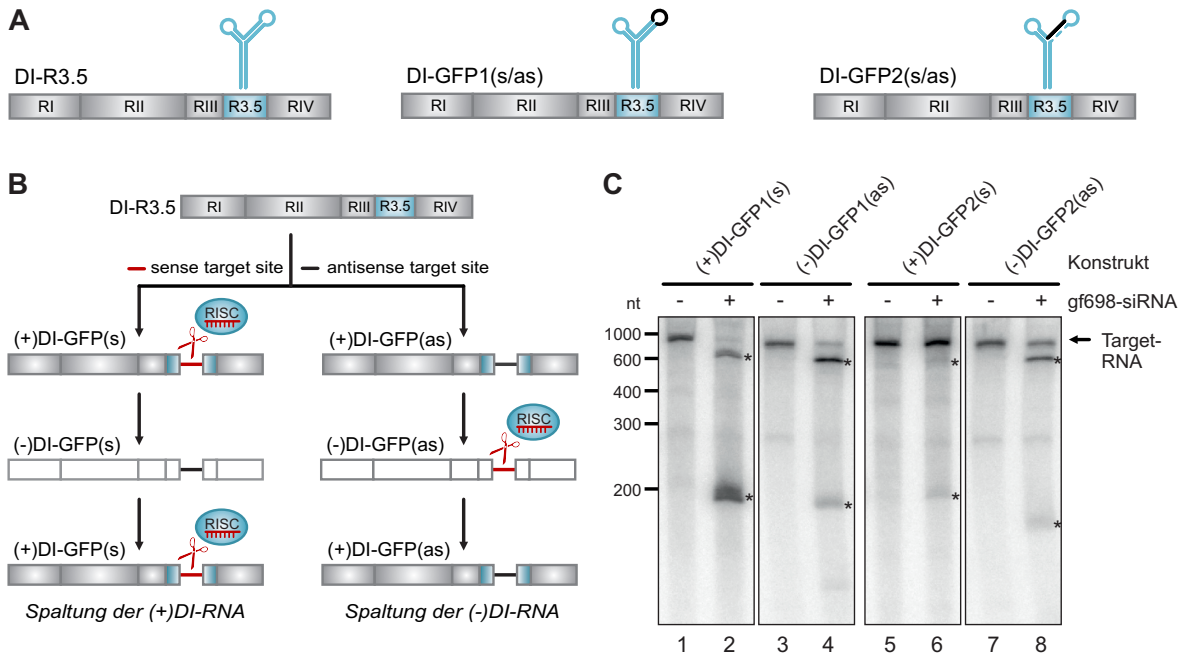
gf698-*target*-Sequenz in *antisense*-Orientierung ausschließlich die Spaltung der (-)RNA ermöglicht (siehe Abbildung 3.5B).

Zusätzlich sollte der Einfluss der Sekundärstruktur der *target*-RNA auf die Effizienz der RISC-vermittelten RNA-Spaltung untersucht werden, da in den vorhergehenden Experimenten Unterschiede in der Effizienz der Spaltung der (+) und (-)DI-R3.5-RNA durch den (ds)R3.5-siRNAPool beobachtet wurden (siehe Abbildung 3.3B). Eine mögliche Ursache für diese Unterschiede könnte eine unterschiedlich stark ausgeprägte Sekundärstruktur beider *target*-RNAs darstellen. Aus diesem Grund wurde die gf698-*target*-Sequenz mit Hilfe eines (ds)DNA-Oligonukleotids in einen einzel- oder doppelsträngigen Bereich der R3.5-Region inseriert (siehe Abbildung 3.5A). Dabei sollte durch die Berechnung der theoretischen Sekundärstruktur der R3.5-Region der DI-GFP-Varianten durch das Strukturvorhersageprogramm *mfold* [180] eine Veränderung der Sekundärstruktur der R3.5-RNA durch die durchgeführten Nucleinsäuresubstitutionen vermieden werden.

Um zu überprüfen, ob alle DI-R3.5-Varianten durch den *NtAGO1*/RISC gespalten werden können, wurde zunächst ein *cleavage assay* der <sup>32</sup>P-markierten, nicht replizierenden Transkripte durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass alle 4 RNA-Varianten durch die gf698-siRNA gespalten werden können (siehe Abbildung 3.5C). Dabei wurde deutlich, dass die Effizienz der Spaltung stark von der Sekundärstruktur der *target*-RNA abhängt. Die (+)DI-GFP2(s)-RNA enthält die GFP-*target*-Sequenz innerhalb eines doppelsträngigen RNA-Motivs und wurde mit geringer Effizienz gespalten. Dagegen befindet sich die gf698-*target*-Sequenz der (+)DI-GFP1(s)-RNA in einem einzelsträngigen, ungepaarten Bereich der R3.5-Region. Aus diesem Grund wurde die (+)DI-GFP1(s)-RNA mit einer deutlich höheren Effizienz gespalten als die (+)DI-GFP2(s)-RNA (siehe Abbildung 3.5C; Vergleich Spur 2 und 6).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Replikation der DI-GFP-RNAs durch *NtAGO1*/RISC inhibiert werden kann. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein *in vitro* Replikationsassay durchgeführt, um zu überprüfen ob alle generierten DI-GFP-Varianten *in vitro* replizieren können. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die DI-GFP1- als auch die DI-GFP2-RNAs mit der gleichen Effizienz wie die DI-R3.5-RNA replizieren (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurde ein Replikations-Inhibitionsassay wie zuvor beschrieben durchgeführt (siehe Abbildung 3.4A). Die Programmierung der *NtAGO1*/RISCs erfolgte durch die gf698-siRNA. Da die Replikation ausschließlich durch Zugabe von (+)RNA initiiert werden kann [133], wurde die Replikation ausgehend von der jeweiligen (+)DI-GFP-Variante gestartet.

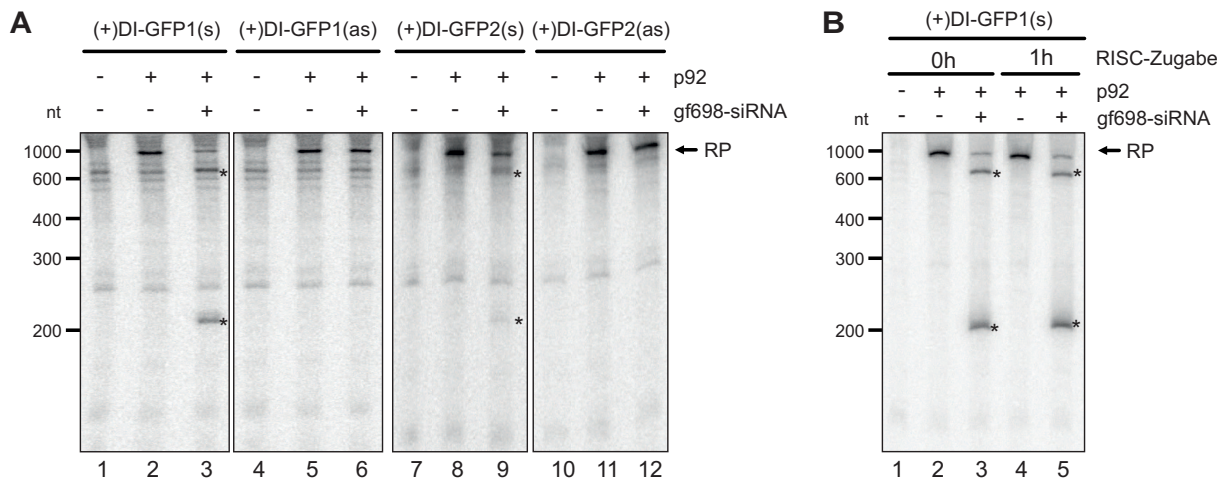


**Abbildung 3.5 Insertion der gf698-target-Sequenz in DI-RNAs. (A)** Schematische Darstellung der verwendeten DI-Varianten DI-GFP1 und DI-GFP2. Diese enthalten die gf689-target-Sequenz (schwarze Linie) an verschiedenen Positionen innerhalb der R3.5-Region. Die gestrichelte Linie repräsentiert eine Sequenz, die komplementär zur gf698-target-Sequenz innerhalb der DI-GFP2-RNA ist. **(B)** Schematische Darstellung der Replikation mit DI-GFP(s) und DI-GFP(as). Die gf698-target-Sequenz wurde sowohl in *sense* (s) als auch in *antisense* (as) in die beiden target-RNAs DI-GFP1 und DI-GFP2 inseriert. Dies ermöglicht die Unterscheidung zwischen der Spaltung von (+) und (-)RNA während der Replikation. **(C)** *Cleavage assay* mit gf698-siRNA und DI-GFP-RNAs. Der Assay wurde wie in Abbildung 1B mit gf698-siRNA und <sup>32</sup>P-markierten (+) und (-)DI-GFP-RNAs durchgeführt. Die target-RNA (Pfeil) und die Spaltprodukte (Stern) wurden durch denaturierende PAGE und Autoradiographie detektiert.

Zunächst wurden die DI-GFP1(s)- und die DI-GFP2(s)-RNA untersucht. Diese RNAs enthalten die GFP-target-Sequenz in *sense*-Orientierung, sodass während der viralen Replikation ausschließlich die (+)RNA gespalten werden kann. Die Programmierung des NtAGO1/RISC mit der gf698-siRNA führte bei der Verwendung beider DI-GFP(s)-Konstrukte zu einer verminderten Bildung neuer Replikationsprodukte. Des Weiteren konnten Spaltfragmente der erwarteten Größe detektiert werden (siehe Abbildung 3.6A, Spur 3 und 9). Analog zum *cleavage assay* zeigten die (+)DI-GFP1(s)-RNA und die (+)DI-GFP2(s)-RNA jedoch strukturbedingte Unterschiede in der Replikationsinhibition (siehe Abbildung 3.5C). So fiel der Effekt der Replikationsinhibition bei der (+)DI-GFP1(s)-RNA deutlich stärker aus als bei der (+)DI-GFP2(s)-RNA (siehe Abbildung 3.6A; Vergleich Spur 3 und 9). Mit Hilfe dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur der jeweiligen target-RNA einen direkten Einfluss auf die Effizienz des antiviralen RNA-silencings besitzt.

Anschließend wurden die DI-GFP1(as)- und die DI-GFP2(as)-RNA untersucht. Die-

se RNAs enthalten die GFP-*target*-Sequenz in *antisense*-Orientierung, sodass während der viralen Replikation ausschließlich die (-)RNA gespalten werden kann. Bei Verwendung dieser Konstrukte kann die Inhibition der Replikation nur indirekt nachgewiesen werden, da die Replikation von TBSV asymmetrisch verläuft und die Menge der (-)RNA während der *in vitro* Replikation 200-fach geringer ist als die Menge der (+)RNA [39]. Da die (-)RNA jedoch die Matrize für die Synthese neuer (+)RNA-Moleküle darstellt, kann die Spaltung der (-)RNA der DI-GFP(as)-Konstrukte indirekt durch Abnahme des (+)RNA-Replikationsproduktes detektiert werden. Bei der Verwendung der DI-GFP(as)-RNAs konnte jedoch keine Abnahme der Quantität der neu synthetisierten (+)RNA beobachtet werden (siehe Abbildung 3.6A; Vergleich Spur 5 und 6, und 11 und 12). Dies steht im Gegensatz zu den durchgeführten *cleavage assays*, in denen die nicht replizierenden DI-GFP(as)-Konstrukte mit hoher Effizienz gespalten werden konnten (siehe Abbildung 3.5C).



**Abbildung 3.6 Das RNA-silencing erfolgt auf Ebene der (+)RNA. (A)** Replikations-Inhibitionsassay mit DI-GFP-RNA. Die Replikationsprodukte (RP) und die detektierbaren Spaltfragmente (Stern) sind gekennzeichnet. In Abwesenheit von p92 findet keine virale Replikation statt (Negativkontrolle; Spur 1, 4, 7 und 10). Bei fehlender Programmierung des *NtAGO1/RISC* mit der gf698-siRNA konnten keine Spaltprodukte detektiert werden (Spur 2, 5, 8 und 11). Bei Beladung von *NtAGO1/RISC* mit gf698-siRNA war ausschließlich bei den DI-GFP(s)-Konstrukten ein Effekt auf die virale Replikation detektierbar (Spur 3 und 9). **(B)** Die Replikationsinhibition ist nicht auf die Spaltung der *input*-RNA zurückzuführen. Bei diesem Replikations-Inhibitionsassay erfolgte die Zugabe des *NtAGO1/RISCs* gleichzeitig (0 h; Spur 1 - 3) oder 1 h nach Initiation der Replikation der (+)DI-GFP1-RNA (Spur 4 und 5). In beiden Reaktionen konnte eine vergleichbare Verminderung gebildeter Replikationsprodukte (RP) als auch die Bildung von Spaltfragmenten (Stern) beobachtet werden. Bei fehlender Programmierung des *NtAGO1/RISC* mit der gf698-siRNA konnten keine Spaltprodukte detektiert werden (Spur 2 und 4). In Abwesenheit von p92 findet keine virale Replikation statt (Negativkontrolle; Spur 1).



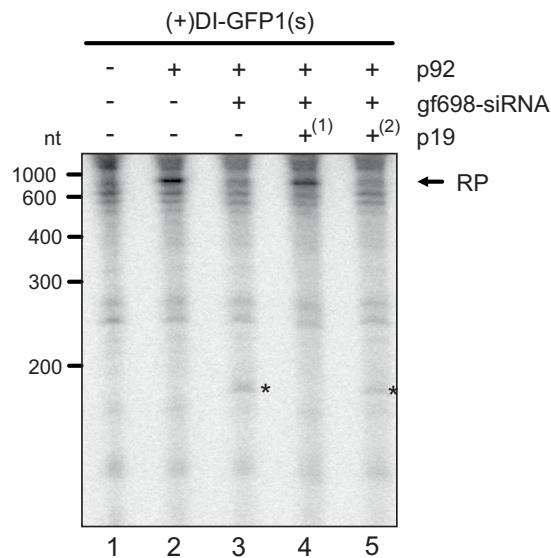
Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass das (-)RNA-Replikationsintermediat während der viralen Replikation kein Substrat für die RISC-vermittelte Spaltung darstellt und die Inhibition der Replikation ausschließlich durch die Spaltung der (+)RNA erfolgte.

Eine naheliegende Erklärung der beobachteten inhibitorischen Effekte des *NtAGO1*/RISC auf die Replikation der DI-GFP(s)-Konstrukte wäre, dass die rekonstituierten RISCs lediglich zur Spaltung der *input*-RNA führen könnten. Um dies zu überprüfen wurde der *NtAGO1*/RISC zu verschiedenen Zeitpunkten zur Replikationsreaktion hinzugegeben. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des *NtAGO1*/RISC auch 1 h nach Beginn der Replikationsreaktion zu einer effizienten Inhibition der Replikation führte (siehe Abbildung 3.6B; Spur 3 und 5). Aus diesem Grund kann die Spaltung der *input*-RNA zu Beginn der Replikation nicht maßgeblich für den zuvor beobachteten Effekt auf die DI-GFP(s)-RNAs verantwortlich sein.

Auf Grund dieser Daten wurde geschlussfolgert, dass die RISC-vermittelte Inhibition der viralen Replikation im Wesentlichen über die Spaltung der (+)RNA erfolgt.

#### **3.2.2 Die Repression der RISC-vermittelten Replikationsinhibition durch den *silencing*-Suppressor p19**

Wie bereits beschrieben wurde, ist das virale p19-Protein ein Antagonist der antiviralen Immunantwort. Es sollte untersucht werden, ob die Wirkung von p19 auch, in dem im Rahmen des in dieser Arbeit etablierten *in vitro* Replikations-Inhibitionsassays zu beobachten ist. Zu diesem Zweck wurden 25 U p19-Protein (NEB) zu verschiedenen Zeitpunkten zur *NtAGO1*/RISC-Formierung hinzugegeben. Die Zugabe von p19 zu Beginn der *in vitro* Translation der *NtAGO1*-mRNA führte zu einer verminderten Inhibition der Replikation der (+)DI-GFP1(s)-RNA. Im Gegensatz dazu hatte die Zugabe von p19 1,5 h nach Beginn der 2,5-stündigen *NtAGO1*/RISC-Formierung keinen detektierbaren negativen Effekt auf die Replikationsinhibition durch gf698-beladenen *NtAGO1*/RISC (siehe Abbildung 3.7; Vergleich Spur 4 und 5). Diese Ergebnisse bestätigen frühere Studien aus *D. melanogaster*, die darauf hindeuteten, dass die Inhibition des antiviralen RNA-*silencings* durch p19 durch die Bindung freier siRNAs erfolgt [67]. Im Fall der späteren Zugabe von p19 zur RISC-Formierung sind die siRNAs bereits durch die neu-assemblierten *NtAGO1*/RISCs gebunden, sodass sie nicht mehr durch p19 gebunden werden können.

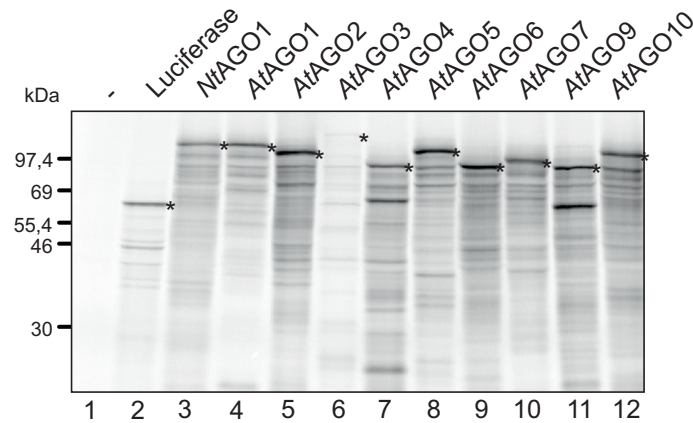


**Abbildung 3.7 Suppression des antiviralen RNA-silencings durch p19.** Die Replikations-Inhibitionsreaktion wurde mit (+)DI-GFP1(s)-RNA durchgeführt. Die Beladung von *NtAGO1* erfolgte mit gf698-siRNA. Die Zugabe des p19-Proteins erfolgte zu Beginn (1) und zum Ende (2) der *NtAGO1*/RISC-Formierung. Spur 1: In Abwesenheit von p92 wurde kein Replikationsprodukt (RP) synthetisiert. Spur 2: *NtAGO1* wurde in Abwesenheit der gf698-siRNA translatiert, sodass keine Inhibition der Replikation stattfinden konnte (Negativkontrolle). Spur 3: Die Programmierung des *NtAGO1*/RISC mit der gf698-siRNA führte zu einer deutlichen Verminderung an gebildetem Replikationsprodukt (Positivkontrolle der Replikationsinhibition). Spur 4: Die Zugabe von p19 zu Beginn der RISC-Formierung führte zur Bildung von Replikationsprodukten. Spur 5: Die Zugabe von p19 90 min nach Beginn der RISC-Formierung führte zur Inhibition der Replikation vergleichbar zu Spur 3. Die durch die Spaltung der Replikationsprodukte entstandenen RNA-Fragmente sind durch Sterne gekennzeichnet.

### 3.3 Untersuchung verschiedener AGO/RISCs bezüglich ihres antiviralen Potentials

Durch die Etablierung des *cleavage assays* und des Replikations-Inhibitionsassays konnten nun auch andere pflanzliche AGO-Proteine systematisch bezüglich ihrer RNA-Spaltungsaktivität und inhibitorischen Wirkung auf die virale Replikation *in vitro* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden 9 der 10 bekannten AGO-Gene aus *Arabidopsis thaliana* und AGO2 aus *Nicotiana benthamiana* (*NbAGO2*) analog zu *NtAGO1* in den bereits beschriebenen modifizierten pSP64-Poly(A)-Vektor (siehe 6) kloniert und in den beschriebenen Assays getestet. Die zu untersuchenden AGO-Proteine wurden jeweils durch *in vitro* Translation der entsprechenden mRNAs in BYL überexprimiert (siehe Abbildung 3.8).

Nachdem gezeigt wurde, dass alle AGO-mRNAs erfolgreich im BYL *in vitro* translatiert werden können, wurde zunächst ein *cleavage assay* mit der GFP-target-RNA



**Abbildung 3.8 Expression verschiedener AGO-Proteine in BYL.** Die AGO-Proteine wurden durch *in vitro* Translation der entsprechenden mRNAs in Anwesenheit von L-[<sup>35</sup>S]-Methionin synthetisiert. Eine Translationsreaktion ohne Zugabe exogener mRNA diente als Negativkontrolle (Spur 1). Die Translation der *firefly*-Luciferase-mRNA diente als Positivkontrolle (Spur 2). Die Analyse der Translationsprodukte erfolgte durch SDS-PAGE und Autoradiographie. Die durch einen Stern markierten Proteinbanden entsprechen der erwarteten Größe der einzelnen AGO-Proteine.

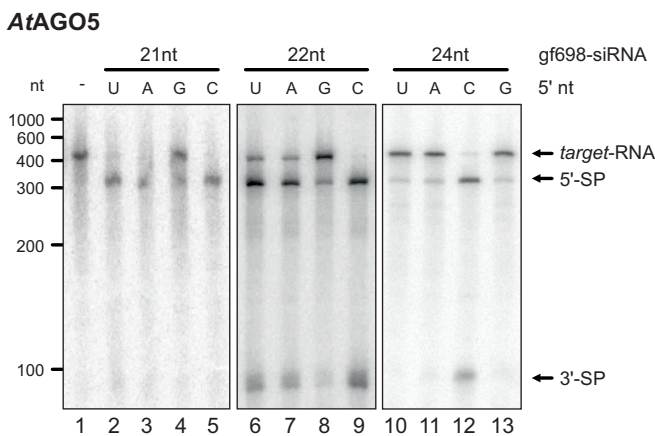
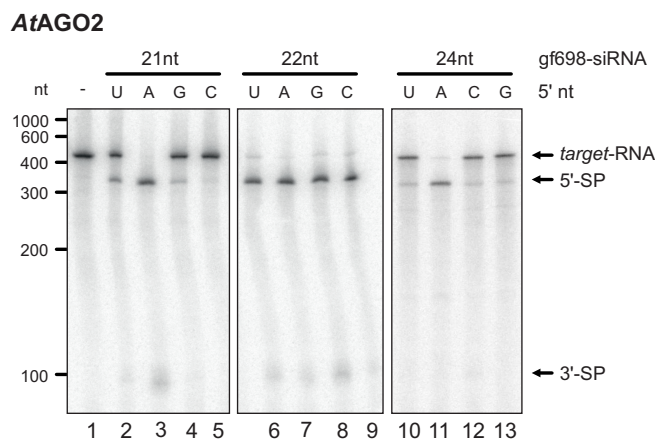
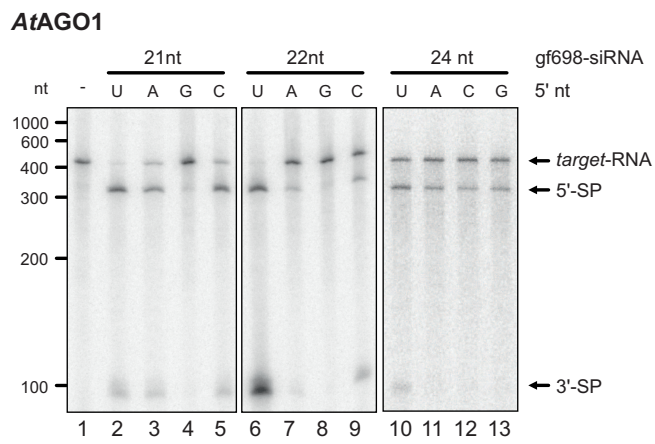
und der gf698-siRNA durchgeführt. Wie bereits beschrieben hängt die Bindung einer siRNA durch ein AGO-Protein stark von dem 5'-Nukleotid und der Länge der siRNA ab. Um die Bindungsspezifität der verschiedenen AGO-Proteine zu untersuchen, wurden 21 nt, 22 nt und 24 nt lange Varianten der gf698-siRNA in die *cleavage assays* eingesetzt. Zusätzlich wurde jeweils das 5'-Nukleotid des gf698-*guide strands* durch die 3 anderen Basen substituiert.

Die Ergebnisse der *cleavage* und Replikations-Inhibitionsassays sind in Abbildung 3.9 exemplarisch für *AtAGO1*, *AtAGO2* und *AtAGO5* dargestellt. Die Ergebnisse, der anderen in Tabelle 3.1 aufgelisteten AGO-Proteine, sind im Anhang in Abbildung 6.1, 6.2 und 6.3 dargestellt.

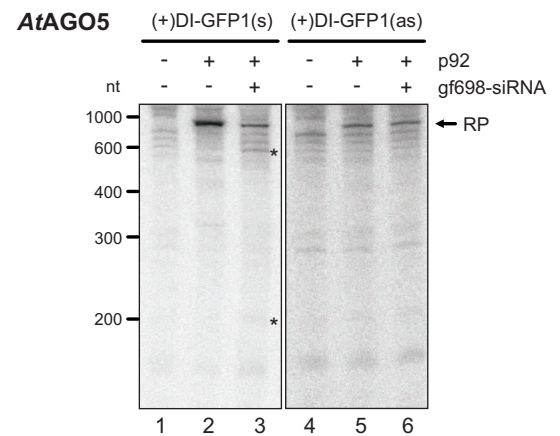
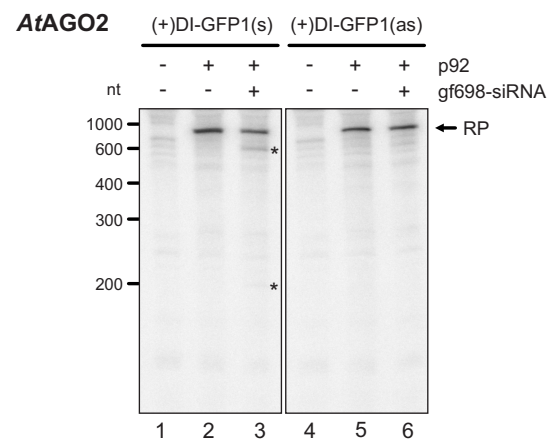
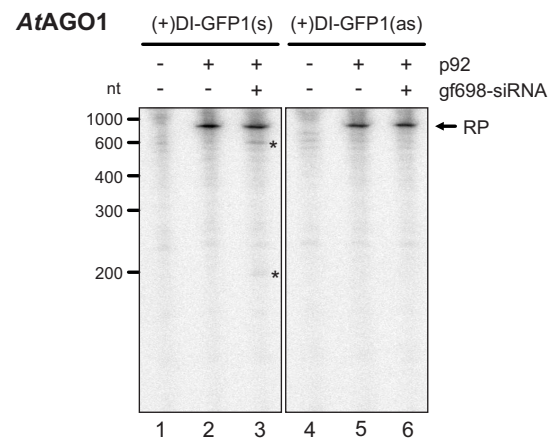
Es konnte gezeigt werden, dass *AtAGO1*, *AtAGO2*, *AtAGO3*, *AtAGO4*, *AtAGO5*, *AtAGO7*, *AtAGO9* und *AtAGO10* bei Bindung der gf698-siRNA eine detektierbare Spaltung der GFP-*target*-RNA hervorrufen können. Die Spaltung der GFP-*target*-RNA erfolgte bei *AtAGO1*, *AtAGO2*, *AtAGO3*, *AtAGO5* und *AtAGO10* besonders effizient bei der Bindung von siRNAs mit einer Länge von 21 nt oder 22 nt. Die Spaltung der GFP-*target*-RNA durch *AtAGO4* und *AtAGO9* erfolgte ausschließlich bei der Verwendung 24 nt langer gf698-siRNA. Des Weiteren wurde deutlich, dass *AtAGO1* und *AtAGO10* vor allem siRNAs mit einem 5'-U binden, während *AtAGO2*, *AtAGO3*, *AtAGO4*, *AtAGO7* und *AtAGO9* vor allem siRNAs mit einem 5'-A binden. Die Bindung von siRNAs mit 5'-C erfolgte nur bei *AtAGO5* mit hoher Effizienz. Für *AtAGO6* konnte keine Spaltungsaktivität mit der gf698-siRNA gezeigt werden, sodass keine Aussagen über die durch *AtAGO6* präferierte siRNA-Länge oder das bevorzugte 5'-Nukleotid getroffen werden können.

### 3.3 Untersuchung verschiedener AGO/RISCs bezüglich ihres antiviralen Potentials

#### A Cleavage Assay



#### B Replikations-Inhibitionsassay



**Abbildung 3.9 Antivirales RNA-silencing durch verschiedene AGO-Proteine. (A) Cleavage assays für AtAGO1, AtAGO2 und AtAGO5 unter Verwendung verschiedener gf698-siRNA-Varianten und <sup>32</sup>P-markierter GFP-target-RNA. Die Formierung der AGO/RISCs erfolgte mit 21 nt (Spuren 2-5), 22 nt (Spuren 6-9) und 24 nt (Spuren 10-13) langen gf698-siRNAs. Das 5'-Nukleotid der entsprechenden gf698-siRNAs wurde dabei variiert. Die Detektion der Spaltprodukte (SP) erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein cleavage assay in Abwesenheit der gf698-siRNA durchgeführt. (B) Replikations-Inhibitionsassay mit (+)DI-GFP1 RNA und AtAGO1, AtAGO2 und AtAGO5. Die Formierung der AGO/RISCs erfolgte mit verschiedenen 21 nt gf698-siRNA-Varianten, die ein 5'-U (AtAGO1), 5'-A (AtAGO2) oder 5'-C (AtAGO5) aufwiesen. Die die Replikation durch Zugabe von (+)DI-GFP1(s) oder (+)DI-GFP1(as) initiiert. Die Replikationsprodukte (RP) und Spaltprodukte (Stern) sind markiert.**

siRNA	21 nt				22 nt				24 nt			
	U	A	G	C	U	A	G	C	U	A	G	C
<i>NtAGO1</i>	+++	++	+	++	+++	++	+	++	++	++	++	++
<i>AtAGO1</i>	+++	++	+	++	+++	++	+	+	++	++	++	++
<i>NbAGO2</i>	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++
<i>AtAGO2</i>	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+
<i>AtAGO3</i>	-	++	-	-	-	++	-	-	-	+	-	-
<i>AtAGO4</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-
<i>AtAGO5</i>	++	++	++	+++	+++	++	+	+++	+	+	+	+++
<i>AtAGO6</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>AtAGO7</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>AtAGO9</i>	-	-	-	-	-	++	-	-	-	++	-	-
<i>AtAGO10</i>	++	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+

**Tabelle 3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener *cleavage assays*.** Die *cleavage assays* wurden mit verschiedenen AGO-Proteinen aus *A. thaliana* (*At*), *N. tabacum* (*Nt*) und *N. benthamiana* (*Nb*) mit unterschiedlich langen gf698-siRNAs, die sich in ihrem 5'-Nukleotid unterscheiden, durchgeführt. (+++) bezeichnet eine sehr starke Spaltung, (++) eine starke Spaltung, (+) eine schwache Spaltung und (-) eine fehlende Spaltung der GFP-*target*-RNA.

Als nächstes wurden die AGO-siRNA-Kombinationen mit der stärksten Spaltungsaktivität im Replikations-Inhibitionsassay mit (+)DI-GFP1(s)- und (+)DI-GFP1(as)-RNA getestet. So erfolgte die Formierung des *NtAGO1*/RISC mit der gf698-siRNA mit einer Länge von 21 nt und einem 5'-U, während *AtAGO4*/RISC und *AtAGO9*/RISC mit der gf698-siRNA-Variante mit einem 5'-A und einer Länge von 24 nt getestet wurde. Es konnte gezeigt werden, dass alle AGO-Proteine, die eine sehr starke (+++) bis starke (++) Spaltung der nicht-replizierenden *target*-RNA vermittelten (siehe Tabelle 3.1) auch eine Inhibition der Replikation viraler RNA hervorriefen. Analog zu den Ergebnissen von *NtAGO1* (siehe 3.2.1) führten *AtAGO1*, *AtAGO2*, *AtAGO3*, *AtAGO4* und *AtAGO5* nur bei Verwendung der DI-GFP1(s)-RNA, die ausschließlich die Spaltung der (+)RNA ermöglicht, zu einer Verminderung des gebildeten Replikationsproduktes. Bei der Verwendung der DI-GFP1(as)-RNA, die ausschließlich die Spaltung der (-)RNA ermöglicht, konnte dagegen keine Replikationsinhibition detektiert werden. Dies bedeutet, dass die Replikationsinhibition aller bisher untersuchten AGO/RISC-Varianten, die das antivirale RNA-*silencing* vermitteln können, ausschließlich durch die Spaltung der (+)RNA erfolgt.

### 3.4 Identifizierung effizienter viraler siRNAs

In vorangegangenen Experimenten, in denen ein Pool verschiedener vsiRNAs zur Spaltung der DI-R3.5-RNA verwendet wurde, wurde deutlich, dass nur wenige der im Pool enthaltenen vsiRNAs zu einer effizienten Spaltung der viralen *target*-RNA führen. Aus diesem Grund sollten in den folgenden Experimenten vsiRNAs identifiziert werden, die das antivirale RNA-*silencing* effizient vermitteln können.

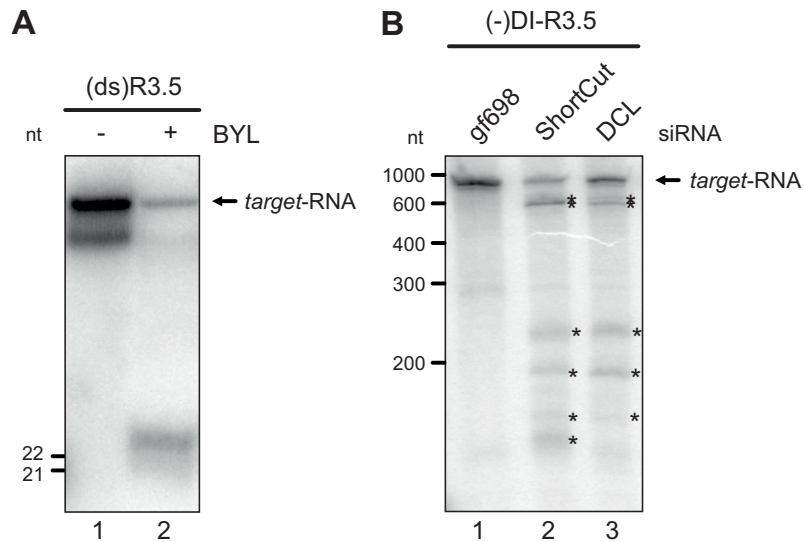
#### 3.4.1 Untersuchung der DCL-Aktivität *in vitro*

In den vorhergehenden Experimenten wurde der (ds)R3.5-siRNA-Pool mit Hilfe der ShortCut RNaseIII aus der doppelsträngigen *in vitro* transkribierten R3.5-RNA generiert. Da die Verwendung der ShortCut RNaseIII ein artifizielles System zur Synthese von vsiRNAs aus doppelsträngiger RNA darstellt, sollte zunächst untersucht werden, ob das BYL eine endogene *in vitro* DCL-Aktivität besitzt, um vsiRNAs direkt im BYL aus viraler RNA generieren zu können.

Für diesen sogenannten DCL-Assay (siehe 2.2.3.5) wurde <sup>32</sup>P-markierte (ds)R3.5-RNA für 5 h im BYL inkubiert und die RNA anschließend mittels denaturierender PAGE und Autoradiographie analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass das BYL die Prozessierung von vsiRNAs aus doppelsträngiger RNA ermöglicht. Der Großteil der generierten vsiRNA besitzt eine Länge von 24 nt. Dies deutet darauf hin, dass das BYL aktives DCL3 enthält. Es konnten jedoch auch kleinere vsiRNA-Spezies mit einer Länge von 21 nt oder 22 nt detektiert werden (siehe Abbildung 3.10), die durch DCL2 oder DCL4 gebildet werden könnten [4]. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* DCL-Aktivität außerdem die Bildung von vsiRNAs aus einzelsträngigen viralen RNAs wie der (+)DI-B10-, (+)DI-R3.5- oder des vollständigen TBSV-Genoms ermöglicht (Daten nicht gezeigt).

Als nächstes sollte untersucht werden, ob diese endogen durch DCL generierten vsiRNAs eine Spaltung der viralen *target*-RNA hervorrufen können und so der vollständige Prozess des RNA-*silencing* *in vitro* rekonstituiert werden kann. Zu diesem Zweck wurde ein *in vitro* DCL-Assay mit (ds)R3.5-RNA durchgeführt. Gleichzeitig erfolgte im gleichen Reaktionsansatz die *in vitro* Translation der AtAGO2-mRNA. Auf diese Weise wurden die AtAGO2/RISCs gegen die R3.5-Region der DI-R3.5-*target*-RNA programmiert. Im Anschluss wurde ein *cleavage assay* mit <sup>32</sup>P-markierter (-)DI-R3.5-RNA durchgeführt. Dieser Assay wird im Folgenden als DCL-*cleavage assay* bezeichnet.



**Abbildung 3.10 Das BYL besitzt eine *in vitro* DCL-Aktivität.** (A) Prozessierung von (ds)R3.5-RNA zu vsiRNAs mit einer Größe von 21 nt - 24 nt.  $^{32}\text{P}$ -markierte (ds)R3.5-RNA wurde für 5 h in BYL (Spur 2) oder als Kontrolle in 1x TR-Puffer (Spur 1) inkubiert. Die Analyse der Spaltprodukte (Stern) erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie. Als Größenstandard wurden  $^{32}\text{P}$ -markierte 21 nt und 22 nt lange gf698-siRNAs verwendet. (B) *Cleavage Assay* mit *AtAGO2/RISC* und verschiedenen vsiRNA-Pools. Die Generierung der vsiRNAs erfolgte aus (ds)R3.5-RNA durch ShortCut RNaseIII-Verdau (Spur 2) oder durch endogene DCL-Aktivität des BYL (Spur 3). Die Beladung des *AtAGO2/RISC* mit gf698-siRNA diente als Negativkontrolle (Spur 1). Als *target*-RNA wurde  $^{32}\text{P}$ -markierte (-)DI-R3.5-RNA verwendet.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die ShortCut RNaseIII im Vergleich zur endogenen DCL-Aktivität ein authentisches System zur Generierung von vsiRNAs darstellt. Zu diesem Zweck sollte untersucht werden, ob sich die Muster der Spaltfragmente der durch ShortCut RNaseIII- bzw. endogenes DCL erzeugten vsiRNAs voneinander unterscheiden.

Es konnte gezeigt werden, dass die endogen generierten vsiRNAs durch *AtAGO2/RISC* gebunden werden und eine Spaltung der *target*-RNA hervorrufen können (siehe Abbildung 3.10B). Des Weiteren wiesen die Spaltfragmente der *target*-RNA bei Verwendung beider vsiRNA-Pools, die durch ShortCut RNaseIII bzw. endogenes DCL erzeugt wurden, jeweils die gleichen Größen auf. Die Programmierung des *AtAGO2/RISC* mit der gf698-siRNA führte hingegen nicht zur endonukleolytischen Spaltung der RNA, da diese keine komplementäre gf698-*target*-Sequenz enthält.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass unabhängig von der Herstellungsmethode jeweils die gleichen vsiRNA-Spezies zur Spaltung der *target*-RNA führten. Dies deutet darauf hin, dass die ShortCut RNase III und die endogene DCL-Aktivität zur Bildung vergleichbarer vsiRNA-Spezies führt, sodass die ShortCut RNase III als System zur Generierung authentischer vsiRNAs verwendet werden kann.

In diesen Experimenten wurde jedoch deutlich, dass die endogen generierten vsiRNAs

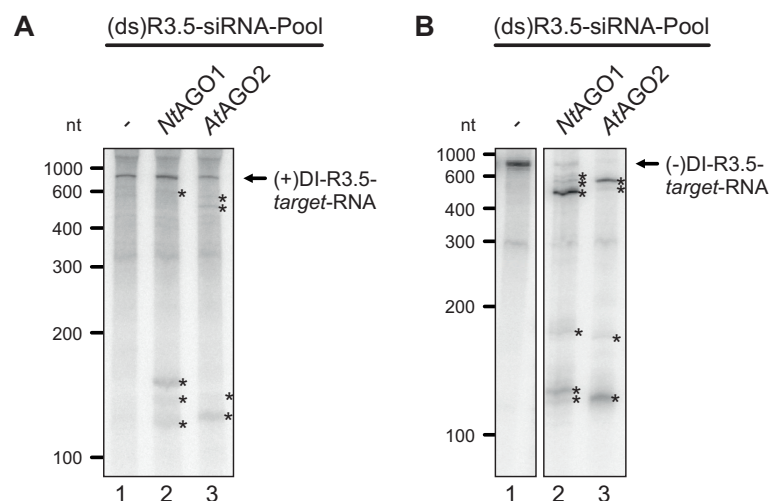
zu einer schwächeren Spaltung der *target*-RNA führen (siehe Abbildung 3.10; Vergleich Spur 2 und 3). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass zu Beginn der *AtAGO2*-Translation die Menge der gebildeten vsiRNAs im Vergleich zu den endogenen nicht-viralen sRNAs im Lysat zunächst sehr gering ist. Die Menge der vsiRNAs steigt erst durch die Prozessierung der (ds)R3.5-RNA an, wodurch erst im späteren Verlauf der *AtAGO2*-Translation vsiRNAs in den RISC eingebaut werden können. Im Gegensatz dazu liegen die ShortCut RNase III-generierten vsiRNAs bereits zu Beginn der Translationsreaktion in ausreichender Menge im Reaktionsansatz vor.

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass *NtAGO1* im Vergleich zu *AtAGO2* oder *AtAGO5* in allen bisher durchgeführten DCL-*cleavage assays* keine oder nur eine sehr schwache Spaltung der jeweiligen *target*-RNA zeigte (Daten nicht gezeigt). Die Ursachen dafür sind bisher noch unklar.

### 3.4.2 Identifizierung effizienter vsiRNAs der (ds)R3.5-Region

Mit Hilfe der folgenden Experimente sollten nun vsiRNAs aus dem (ds)R3.5-siRNA-Pool identifiziert werden, die für die effiziente RISC-vermittelte Spaltung der DI-R3.5-RNA verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurde ein *cleavage assay* mit *NtAGO1* und *AtAGO2* durchgeführt (siehe Abbildung 3.11).

Aus den oben erläuterten Gründen wurden auch in diesem Experiment ShortCut RNaseIII-generierte vsiRNAs für die Programmierung des RISC verwendet. Als *target*-RNAs wurden sowohl die (+)DI-R3.5-RNA als auch die (-)DI-R3.5-RNA verwendet.



**Abbildung 3.11 Cleavage assay mit dem (ds)R3.5-siRNA-Pool.** Die Generierung der vsiRNAs erfolgte aus (ds)R3.5-RNA durch ShortCut RNaseIII-Verdau. Als Negativkontrolle wurde keine AGO-mRNA zur *in vitro* Translationsreaktion hinzugegeben (Spur 1). Die Analyse der Spaltprodukte (Stern) erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie. **(A)** Cleavage assay mit  $^{32}\text{P}$ -markierter (+)DI-R3.5-*target*-RNA. **(B)** Cleavage assay mit  $^{32}\text{P}$ -markierter (-)DI-R3.5-*target*-RNA.

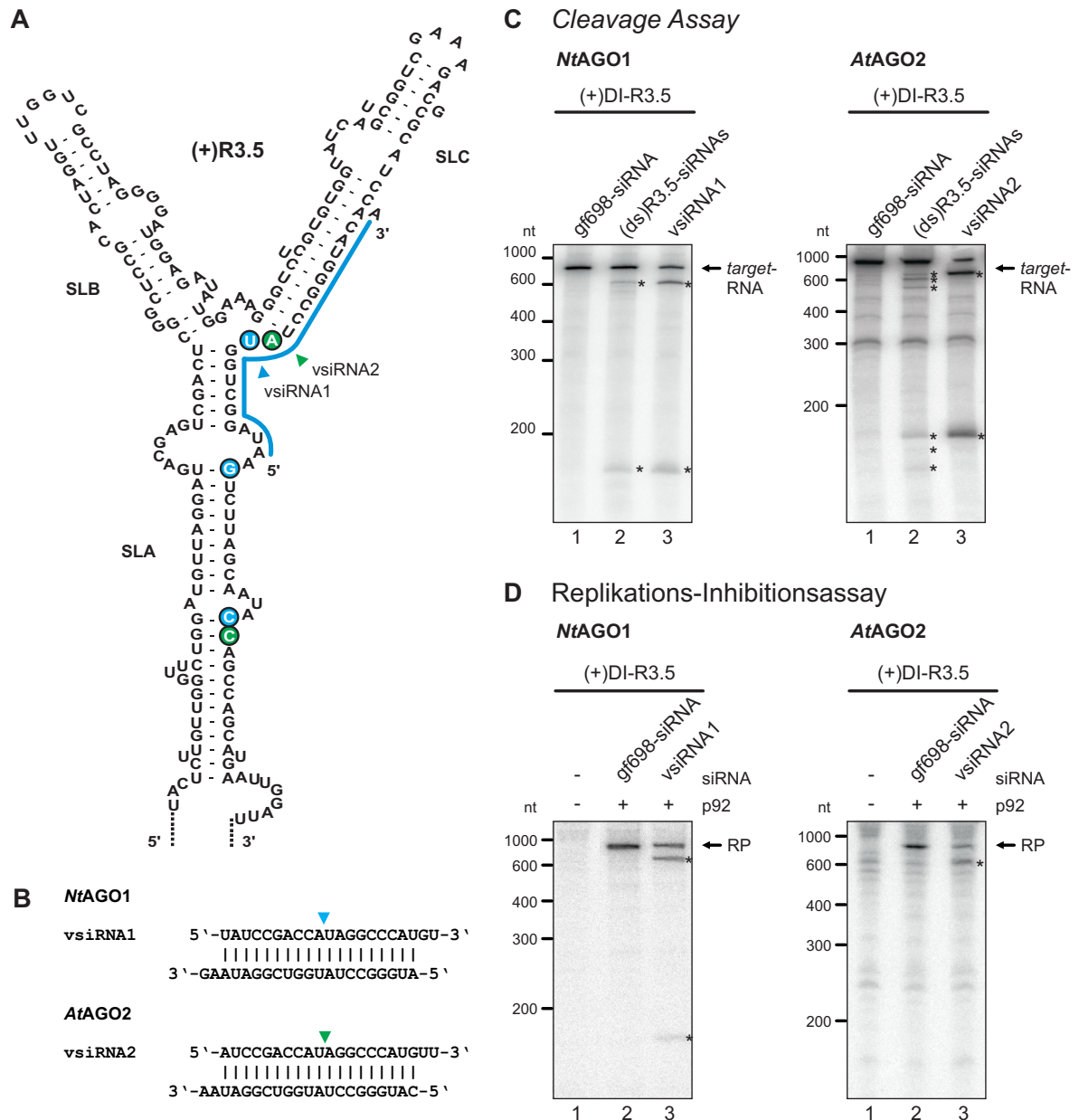


Es konnte gezeigt werden, dass sowohl *NtAGO1/RISC* als auch *AtAGO2/RISC* bei Beladung mit dem (ds)R3.5-siRNA-Pool die Spaltung der DI-R3.5-RNA vermitteln können. Dabei wurde die (-)DI-R3.5-RNA mit höherer Effizienz gespalten als die (+)DI-R3.5-RNA. Wie bereits in vorhergehenden Experimenten beobachtet werden konnte, konnte auch in diesem *cleavage assay* nur eine relativ geringe Anzahl an Spaltfragmenten detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass nur wenige vsiRNAs eine Spaltung der *target*-RNA vermitteln können. Um diese vsiRNAs identifizieren zu können, wurden die detektierbaren 3'-Spaltprodukte aus einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel isoliert und die jeweilige cDNA durch 5'-RACE kloniert (siehe 2.4.11.2). Da die RNA-Spaltung zwischen den zwei Nukleotiden der *target*-RNA stattfindet, die sich gegenüber der Nukleotide 10 und 11 des siRNA-*guide strands* befinden [66, 124], konnte der jeweilige vsiRNA-*guide strand*, direkt durch die Identifizierung des 5'-Nukleotids des 3'-Spaltfragments abgeleitet werden. Da die Generierung des verwendeten siRNA-Pools aus doppelsträngiger R3.5-RNA erfolgte, konnte der korrespondierende *passenger strand* als vollständig komplementärer Gegenstrang abgeleitet werden. Auf diese Weise sollten zunächst vsiRNAs des (ds)R3.5-siRNA-Pools identifiziert werden, die zu einer effizienten Spaltung der (+)DI-R3.5-RNA führen. Durch den *NtAGO1/RISC* konnten drei effiziente vsiRNAs und mit Hilfe des *AtAGO2/RISCs* konnten zwei effiziente vsiRNAs identifiziert werden.

Wie erwartet, beginnen die *guide strands*, der mit Hilfe von *NtAGO1/RISC* identifizierten vsiRNAs, mit einem 5'-U. Die *guide strands*, der mit *AtAGO2/RISC* identifizierten vsiRNAs, beginnen erwartungsgemäß mit einem 5'-A (siehe Abbildung 3.12B und Daten nicht gezeigt). Des Weiteren spalten alle identifizierten vsiRNAs innerhalb des gleichen Bereiches der R3.5-Region und sind interessanterweise nur einige Nukleotide zueinander versetzt. Außerdem befinden sich sowohl die Spaltstellen, als auch die Bindestellen für das 5'-Nukleotid des *guide strands* in nicht gepaarten Bereichen der (+)R3.5-Sekundärstruktur.

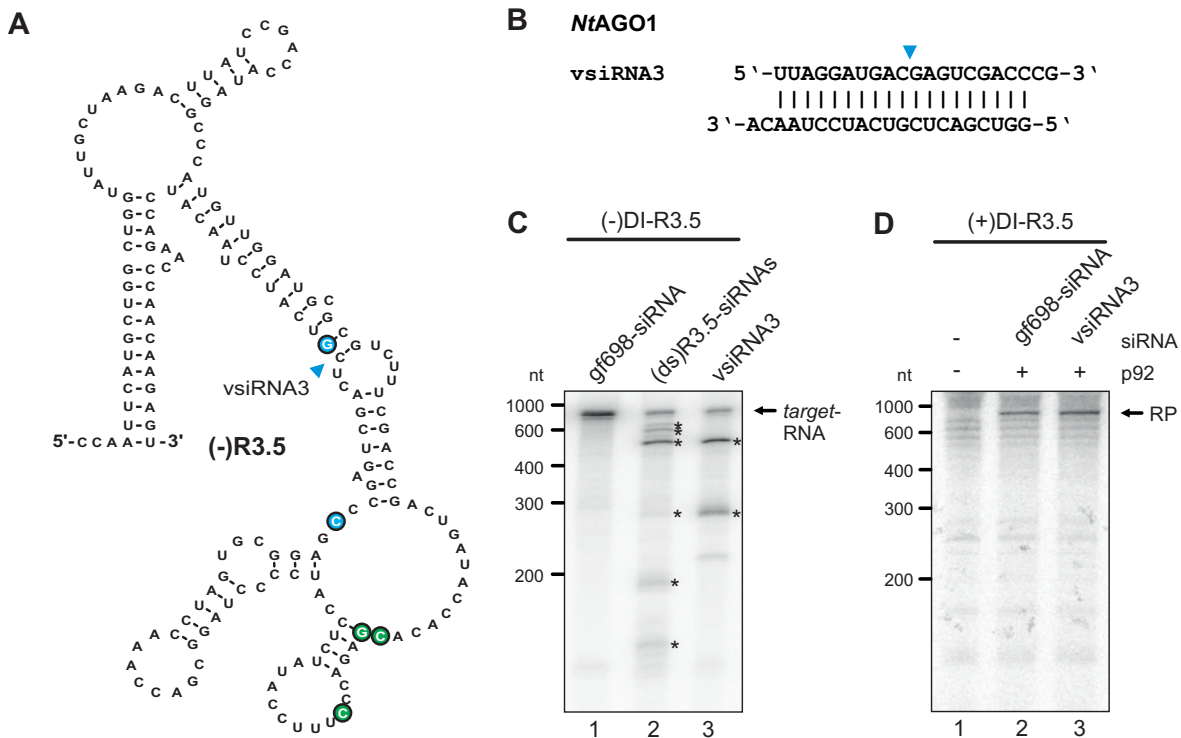
Im Anschluss wurden zwei der identifizierten vsiRNAs synthetisiert und in einem *cleavage assay* getestet (siehe Abbildung 3.12C). Die als vsiRNA1 bezeichnete siRNA wurde mit Hilfe des *NtAGO1/RISC* identifiziert und getestet, die Identifizierung der vsiRNA2 erfolgte durch den *AtAGO2/RISC*.

Es konnte gezeigt werden, dass beide vsiRNAs zu einer effizienten Spaltung der (+)DI-R3.5-*target*-RNA führen. Die jeweiligen Spaltfragmente entsprachen der erwarteten Größe von 607 nt und 172 nt. Als Kontrolle erfolgte die RISC-Formierung in Anwesenheit des (ds)R3.5-siRNA-Pools. Die jeweils prominentesten Spaltfragmente der Kontrollreaktion besaßen die gleiche Größe wie die Spaltfragmente der Reaktionen mit vsiRNA1 und vsiRNA2. Aus diesem Grund wurde geschlussfolgert, dass die jeweils effizientesten vsiRNAs des (ds)R3.5-siRNA-Pools identifiziert werden konnten.



**Abbildung 3.12 Identifizierung von vsiRNAs, die eine effiziente Spaltung der (+)R3.5-Region vermitteln. (A)** Sekundärstruktur der (+)R3.5-RNA (modifiziert aus [33]). Die Kreise markieren die 5'-Nukleotide der 3'-Spaltprodukte. Spaltstellen, die in Experimenten mit *NtAGO1*/RISC identifiziert wurden, sind blau, *AtAGO2*/RISC-Schnittstellen sind grün markiert. Die Position der Bindung des vsiRNA1-guide strands an die R3.5-RNA wurde durch eine blaue Linie gekennzeichnet. **(B)** Sequenzen der identifizierten vsiRNA1 und vsiRNA2. Die Spaltung der target-RNA erfolgt zwischen den Nukleotiden, die sich gegenüber den Nukleotiden 10 und 11 des siRNA-guide strands befinden (Dreieck). **(C)** Cleavage assays mit *NtAGO1*/RISC und vsiRNA1 und *AtAGO2*/RISC und vsiRNA2. Als target-RNA wurde die  $^{32}$ P-markierte (+)DI-R3.5-RNA verwendet. Als Kontrolle erfolgte die RISC-Formierung in Anwesenheit des (ds)R3.5-siRNA-Pools. Die Spaltprodukte wurden mit einem Stern gekennzeichnet. **(D)** Replikations-Inhibitionsassay mit *NtAGO1*/RISC und vsiRNA1 und *AtAGO2*/RISC und vsiRNA2. Die Replikation wurde mit (+)DI-R3.5-RNA durchgeführt. In Abwesenheit von p92 fand keine virale Replikation statt (Spur 1). Die Replikation in Anwesenheit von gf698-siRNA beladenem RISC erfolgte mit höherer Effizienz, als bei der Beladung des *NtAGO1*RISC mit der vsiRNA1 bzw. des *AtAGO2*RISC mit der vsiRNA2 (Vergleich Spur 2 und 3). Die Replikationsprodukte (RP) und die detektierbaren Spaltfragmente (Stern) sind gekennzeichnet.

Im Anschluss wurden beide vsiRNAs in einem Replikations-Inhibitionsassay getestet. Dabei zeigten sowohl vsiRNA1 als auch vsiRNA2 eine Inhibition der Replikation der (+)DI-R3.5-*target*-RNA.



**Abbildung 3.13** Identifizierung von vsiRNAs, die eine effiziente Spaltung der (-)R3.5-Region vermitteln. **(A)** Mögliche Sekundärstruktur der (-)R3.5-RNA (berechnet mit mfold [180]). Die blauen Kreise markieren die 5'-Nukleotide der mit *NtAGO1*/RISC identifizierten 3'-Spaltprodukte. Schnittstellen, die mit *AtAGO2*/RISC identifiziert wurden, sind grün markiert. **(B)** Sequenz der identifizierten vsiRNA3. Die Position zwischen Nucleotid 10 und 11 des siRNA-guide strands wurde durch ein Dreieck gekennzeichnet. **(C)** Cleavage assays mit vsiRNA3 und  $^{32}$ P-markierter (-)DI-R3.5-*target*-RNA. Als Negativkontrolle erfolgte die Programmierung des *NtAGO1*/RISC mit der gf698-siRNA. Als Positivkontrolle diente die Programmierung des *NtAGO1*/RISC mit dem (ds)R3.5-siRNA-Pool. Die Spaltprodukte wurden mit einem Stern gekennzeichnet. **(D)** Replikations-Inhibitionsassay mit *NtAGO1*/RISC und vsiRNA3. Die Replikation wurde durch Zugabe der (+)DI-R3.5-RNA initiiert. In Abwesenheit von p92 fand keine virale Replikation statt (Spur 1). Die Replikation in Anwesenheit von gf698-siRNA beladenem RISC erfolgte mit höherer Effizienz, als bei der Beladung des *NtAGO1*RISC mit der vsiRNA3 (Vergleich Spur 2 und 3). Die Replikationsprodukte (RP) wurden gekennzeichnet.

Analog zu den vorhergehenden Experimenten wurden auch vsiRNAs identifiziert, die die spezifische Spaltung des (-)Strangs der R3.5-Region vermitteln (siehe Abbildung 3.12). Die vsiRNA3, die mit Hilfe des *NtAGO1*/RISCs identifiziert wurde, wurde synthetisiert und anschließend in einem *cleavage assay* mit der (-)DI-R3.5-*target*-RNA getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die vsiRNA3 zur einer effizienten *NtAGO1*/RISC-vermittelten Spaltung der (-)DI-R3.5-RNA führt (siehe Abbildung 3.12C). Die jeweiligen Spaltfragmente besaßen die erwarteten Größen von 499 nt und 280 nt und ent-

sprachen den jeweils prominentesten Spaltfragmenten der Kontrollreaktion, die mit dem (ds)R3.5-siRNA-Pool durchgeführt wurde. Der Einsatz der vsiRNA3 in einem Replikations-Inhibitionsassay zeigte jedoch, dass der *NtAGO1/RISC*, der mit der vsiRNA3 programmiert wurde, *in vitro* keinen inhibitorischen Effekt auf die virale Replikation ausübt. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der früher durchgeführten Experimente (siehe 3.2.1) und zeigten erneut, dass die Inhibition der viralen Replikation nur durch die Spaltung der (+)RNA erfolgen kann.

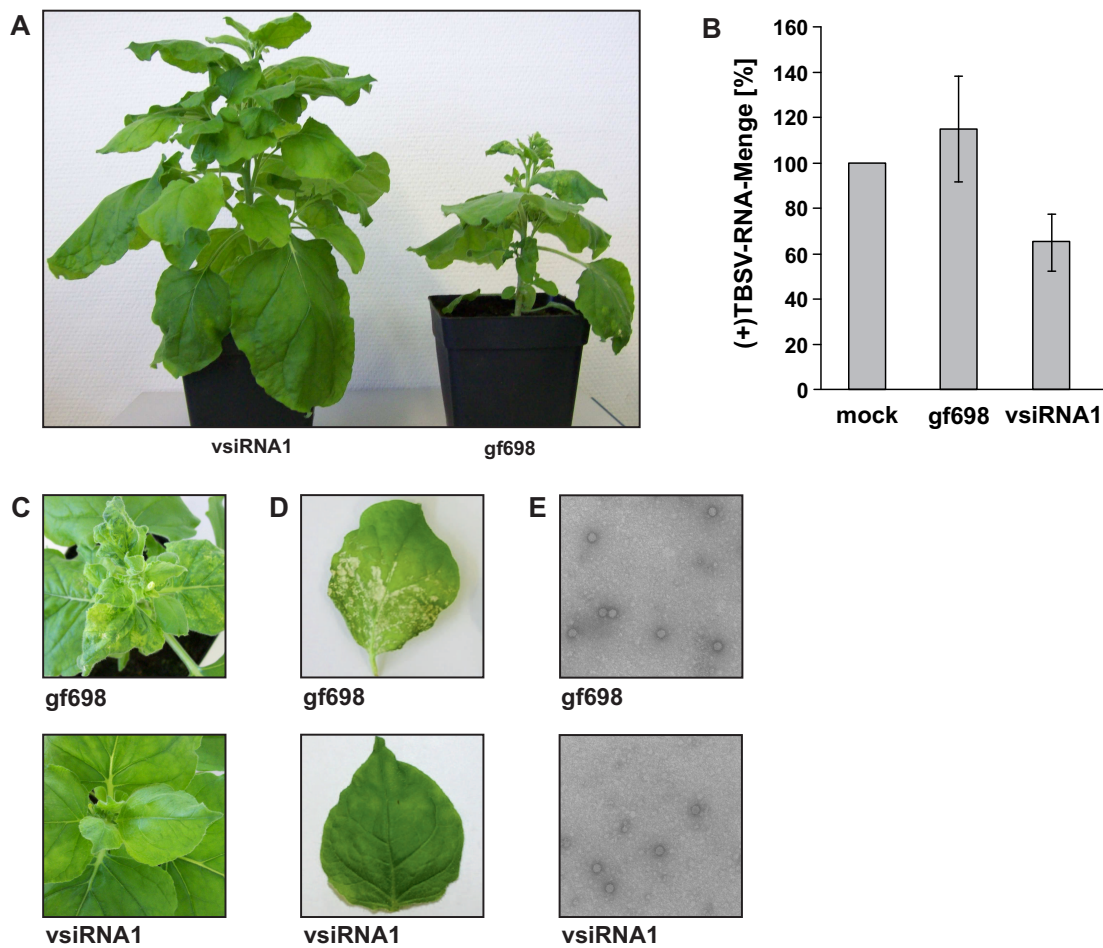
### 3.4.3 Untersuchung der antiviralen Wirkung von vsiRNA1 *in vivo*

Nachdem die vsiRNA1 *in vitro* als effiziente antivirale siRNA identifiziert und charakterisiert werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob die vsiRNA1 auch *in vivo* zur Inhibition der TBSV-Replikation führt. Zu diesem Zweck sollten die vsiRNA1 und als Negativkontrolle die gf698-siRNA transient mittels *Agrobacterium tumefaciens* in *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen überexprimiert werden (siehe 2.2.2.3). In anderen Arbeiten wurde bereits beschrieben, dass der *precursor* der miR164a aus *Arabidopsis thaliana* zur Überexpression exogener miRNAs in *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen genutzt werden kann [7]. Solche modifizierten miRNA-*precursor* werden als *artificial* miRNAs (amiRNAs) bezeichnet. Die Sequenz der miR164a wurde durch die vsiRNA1- und gf698-siRNA-Sequenzen substituiert und in den binären pBGWFS7-Überexpressionsvektor (siehe 6) kloniert. Dieser enthält einen 35S-Promotor und wurde freundlicher Weise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Bonas (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) im Rahmen des GRK1591 zur Verfügung gestellt. Anschließend erfolgte die transiente Überexpression der *artificial* siRNAs (asiRNAs) in Blättern von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen mittels Vakuum-Infiltration (siehe 2.2.2.3). Nach 3 Tagen erfolgte die Infektion mit TBSV-RNA durch *rub inoculation* (siehe 2.2.2.4). Bei dieser Methode werden der Blattoberseite mechanisch Mikroverletzungen zugefügt. Diese Bereiche wurden anschließend mit 10 µg TBSV-RNA inkubiert. Die systemische TBSV-Infektion wurde nach weiteren 7 Tagen (7 dpi; 7 days post TBSV inoculation) überprüft. Zu diesem Zweck wurde die Menge an (+)TBSV-RNA durch qRT-PCR quantifiziert (siehe 2.3.9). Als Referenz wurde die Menge an 18S-rRNA bestimmt. Die Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR erfolgte mittels der  $\Delta\Delta c_t$ -Methode (siehe 2.3.9.1).

Die Kontrollpflanzen, in denen die agf698-siRNA überexprimiert wurde, zeigten 7 Tage nach der TBSV-Inokulation stärkere Symptome einer TBSV-Infektion als Pflanzen, in denen die avsiRNA1 überexprimiert wurde. Die agf698-Kontrollpflanzen zeigten ein vermindertes und buschiges Wachstum sowie Chlorosen und Nekrosen der Blätter (siehe Abbildung 3.14A und B). Des Weiteren zeigte die Quantifizierung der (+)TBSV-RNA, dass die Menge viraler RNA in den jungen Blättern der avsiRNA1-Pflanzen im

Vergleich zu den agf698-Kontrollpflanzen reduziert war. Diese Ergebnisse bestätigen die antivirale Aktivität der vsiRNA1 *in vivo*.

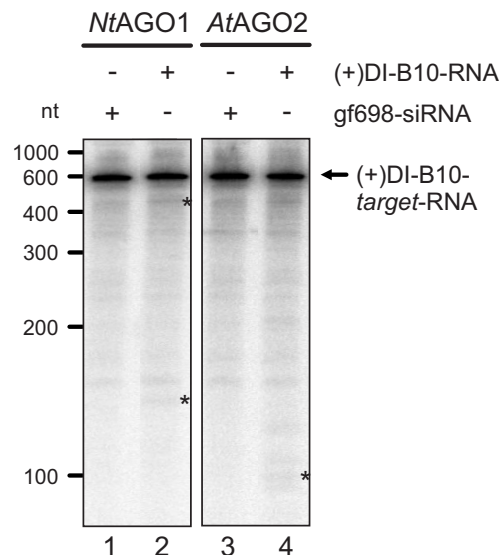
Allerdings wurde die TBSV-Infektion nicht vollständig durch die Überexpression der vsiRNA verhindert. Obwohl die Symptome in den vsiRNA1-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen reduziert waren, konnten 12 Tage nach der TBSV-Inokulation sowohl die genomische TBSV-RNA (Daten nicht gezeigt), als auch virale Viruspartikel (siehe Abbildung 3.14E) in den jungen Blättern dieser Pflanzen nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.14 Untersuchung der antiviralen Wirkung von vsiRNA1 *in vivo*.** (A) *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen 7 Tage nach der Infektion mit TBSV-RNA (7 dpi). Die Überexpression von vsiRNA1 (links) verzögert die Ausbildung der TBSV-Infektionssymptome. Die Überexpression der gf698-siRNA führt im Vergleich zur vsiRNA1-Überexpression zu einer schnelleren Ausbildung der Infektionssymptome wie verringertes und buschiges Wachstum der Pflanze. (B) Quantifizierung von TBSV-RNA mittels qRT-PCR in jungen Blättern (7 dpi). Die mock-behandelten Pflanzen wurden mit TBSV-inokuliert, aber nicht mit *A. tumefaciens* infiziert. (C) Aufsicht auf *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen (7 dpi). (D) Junge Blätter bei vsiRNA1- oder gf698-Überexpression (7 dpi). (E) Isolation von TBSV-Viruspartikeln aus jungen Blättern (12 dpi). Die isolierten Viruspartikel besitzen einen Durchmesser von 25-30 nm.

### 3.4.4 Charakterisierung von (+)vsiRNAs aus der (+)DI-R3.5-RNA

Auf Grund der großen Menge der im Zytoplasma vorhanden viralen (+)Strang-RNA wird ein Großteil der gebildeten viralen siRNAs aus dem (+)Strang generiert. Es wurde lange Zeit vermutet, dass diese (+)vsiRNAs zur Spaltung des (-)RNA-Replikationsintermediates führen. Da im Rahmen dieser Arbeit jedoch gezeigt werden konnte, dass die replizierende (-)RNA nicht zugänglich für die RISC-vermittelte RNA-Spaltung ist, sollte untersucht werden, ob vsiRNAs aus dem (+)Strang auch zu einer Spaltung des (+)Strangs führen könnten. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein DCL-*cleavage assay* von Dr. Torsten Gursinsky durchgeführt. In diesem Experiment wurden *NtAGO1*/RISCs oder *AtAGO2*/RISCs in Anwesenheit von (+)DI-B10-RNA assembliert. Anschließend wurde ein *cleavage assay* mit  $^{32}\text{P}$ -markierter (+)DI-B10-*target*-RNA durchgeführt. Die Detektion der Reaktionsprodukte erfolgte mittels denaturierender PAGE und Autoradiographie.



**Abbildung 3.15** DCL-*cleavage assays* mit *NtAGO1* und *AtAGO2*. Die Synthese endogener durch DCL prozessierter vsiRNAs erfolgte durch Zugabe von 500 ng (+)DI-B10-RNA zur *in vitro* Formierung des *NtAGO1*/RISCs bzw. des *AtAGO2*/RISCs. Als Negativkontrolle erfolgte die Beladung mit gf698-siRNA (Spur 1 und Spur 4). Als *target*-RNA wurde  $^{32}\text{P}$ -markierte (+)DI-B10-RNA verwendet. Die Analyse der Spaltprodukte (Stern) erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie.

In diesem Experiment konnte nur eine sehr schwache Spaltung der (+)DI-B10-RNA durch (+)vsiRNAs detektiert werden (siehe Abbildung 3.15). Auf Grund der geringen Effizienz der RNA-Spaltung konnte die genauen Spaltfragmente jedoch nicht eindeutig durch 5'- oder 3'-RACE identifiziert werden. Deshalb konnten keine vsiRNA-Sequenzen aus diesem Experiment abgeleitet werden.

Um trotzdem einen Überblick über, die aus der (+)RNA generierten vsiRNAs zu bekommen, wurde ein Illumina *RNA sequencing* durchgeführt (siehe 3.4.4.2).

Die RNA-Sequenzierung ist eine Form des *next generation sequencings* (NGS) und ermöglicht die Quantifizierung von Genexpressionsleveln, Transkriptomanalysen, die Identifizierung neuer Transkripte und das *small RNA profiling*. Mit dieser Methode sollten verschiedene Aspekte untersucht werden:

1. Welche vsiRNAs werden durch DCL aus den TBSV (+)Strang-RNAs generiert?  
Da es sich bei der (+)DI-R3.5-RNA um ein einzelsträngiges RNA-Molekül handelt, welches unterschiedlich stark ausgeprägte Sekundärstrukturen aufweist, ist es wahrscheinlich, dass verschiedene (+)vsiRNA-Spezies mit unterschiedlicher Häufigkeit aus der (+)DI-R3.5-RNA prozessiert werden. Um dies zu untersuchen wurde ein DCL-Assay mit (+)DI-R3.5- bzw. (+)TBSV-RNA durchgeführt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und durch NGS analysiert. Diese Untersuchung ermöglicht einen Gesamtüberblick über alle vsiRNAs, die im BYL aus der (+)RNA gebildet werden.
2. Welche, der durch DCL prozessierten vsiRNAs, können durch AGO/RISC gebunden werden?  
Voraussetzung für die Funktionalität einer siRNA ist die effiziente Bindung der siRNA durch den AGO/RISC. Um zu untersuchen welche der im DCL-Assay gebildeten (+)vsiRNAs durch *NtAGO1* und *AtAGO2* gebunden werden können, wurde eine Immunpräzipitation (IP) von funktionellem RISC etabliert (siehe 3.4.4.1). Anschließend wurden, die durch *NtAGO1/RISC* und *AtAGO2/RISC* gebundenen vsiRNAs, isoliert und durch ein Illumina *RNA sequencing* analysiert. Durch diese Methode werden siRNA-Einzelstränge identifiziert, die überwiegend den *guide strand* des ursprünglichen siRNA-Duplexes repräsentieren, da nach der Bindung des siRNA-Duplexes der *passenger strand* gespalten und aus dem RISC entfernt wird.

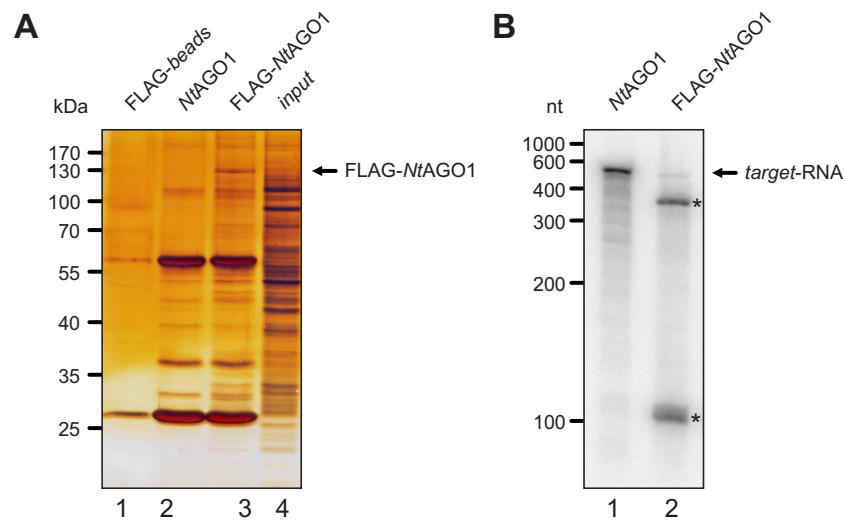
Nach der Auswertung der Sequenzierungsergebnisse sollten verschiedene vsiRNA-Kandidaten bezüglich ihrer Spaltungsaktivität getestet werden.

#### **3.4.4.1 Immunpräzipitation von funktionellem RISC**

Um die Isolierung, der durch AGO-Proteine gebundenen siRNAs zu ermöglichen, sollten funktionelle RISCs präzipitiert werden. Dazu wurden verschiedene AGO-Proteine

mit einem N-terminalen FLAG-*tag* versehen und durch *in vitro* Translation in Anwesenheit von gf698-siRNA im BYL synthetisiert. Nach der Präzipitation mit Anti-FLAG-Antikörper (siehe 2.5.2) wurde eine Fraktion der Proben mittels 10%iger SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Silberfärbung (siehe 2.5.4) detektiert, um den Erfolg der Immunpräzipitation zu überprüfen.

Das restliche Probenvolumen wurde mit FLAG-Peptid versetzt, um die präzipitierten RISCs zu eluieren und in einem *cleavage assay* mit  $^{32}\text{P}$ -markierter GFP-*target*-RNA auf ihre Spaltungsaktivität untersuchen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass auch nach der Immunpräzipitation eine effiziente Spaltung der GFP-RNA durch die präzipitierten RISCs erfolgen kann. In Abbildung 3.16 sind die Ergebnisse der Immunpräzipitation von FLAG-*NtAGO1* dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten jedoch auch andere aktive FLAG-AGO/RISCs präzipitiert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.16** FLAG-Immunpräzipitation von FLAG-*NtAGO1*/RISC und Analyse auf Aktivität im *in vitro cleavage assay*. **(A)** *NtAGO1*/RISC und FLAG-*NtAGO1*/RISC wurden in Anwesenheit der gf698-siRNA *in vitro* assembliert und mit Anti-FLAG Antikörper immunpräzipitiert. Es wurden 0,5  $\mu\text{l}$  (0,5%) der Translationsreaktion (*input*) bzw. 5  $\mu\text{l}$  (10%) der Elution mittels 10%iger SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung detektiert. **(B)** Analyse auf Aktivität von FLAG-*NtAGO1* nach einer Immunpräzipitation. FLAG-*NtAGO1* wurde eluiert und 5  $\mu\text{l}$  des Überstandes in einem *cleavage assay* einer GFP-mRNA eingesetzt. Die Analyse der RNA erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie.

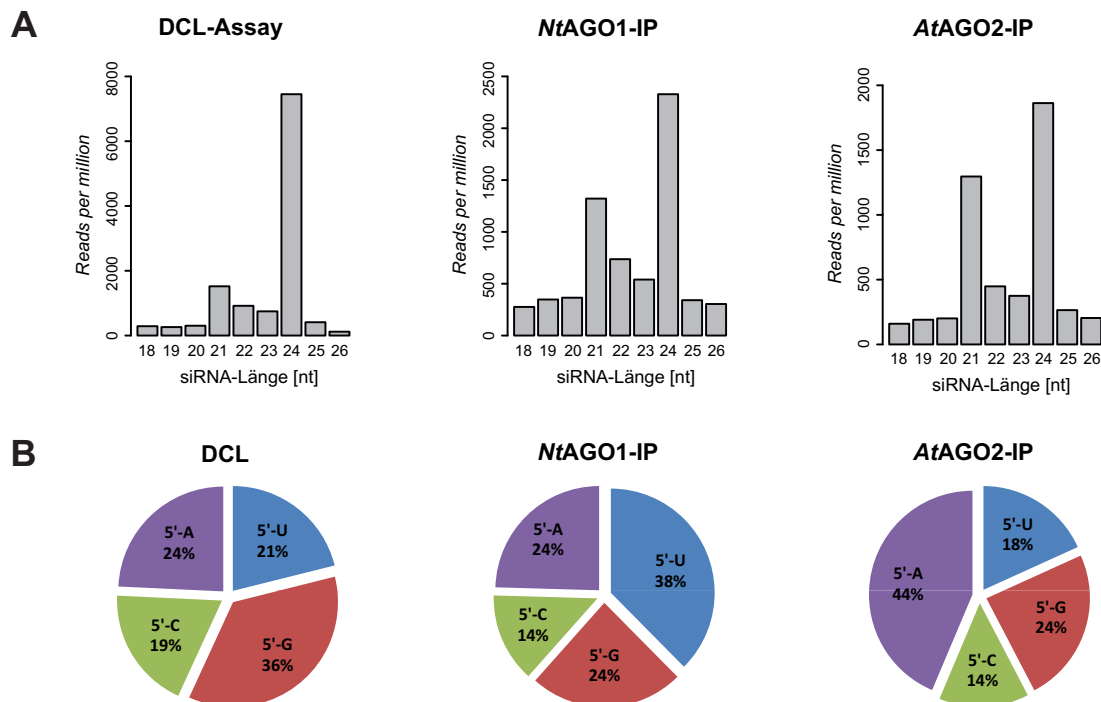
#### 3.4.4.2 Illumina RNA sequencing BYL-generierter vsiRNAs

Das Illumina *deep sequencing* wurde durch PD Dr. Knut Krohn vom Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Universität Leipzig durchgeführt. Die bioinformatische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms CLC Genomics Workbench (Version 6.5.1) durch die beiden Bioinformatikstudenten Anne Hoffmann und Sebastian Wussow. Dabei erfolgte das *mapping* der Sequenzierungen gegen die (+)TBSV- bzw.



die (+)DI-R3.5-RNA, die jeweils als Referenzgenom für die Identifizierung der in den Proben enthaltenen vsiRNAs verwendet wurden. Die identifizierten vsiRNAs machten dabei einen Gesamtanteil von 1-3% der gesamten sRNA-Population aus. Im Folgenden sollen die Ergebnisse für die (+)DI-R3.5-RNA betrachtet werden.

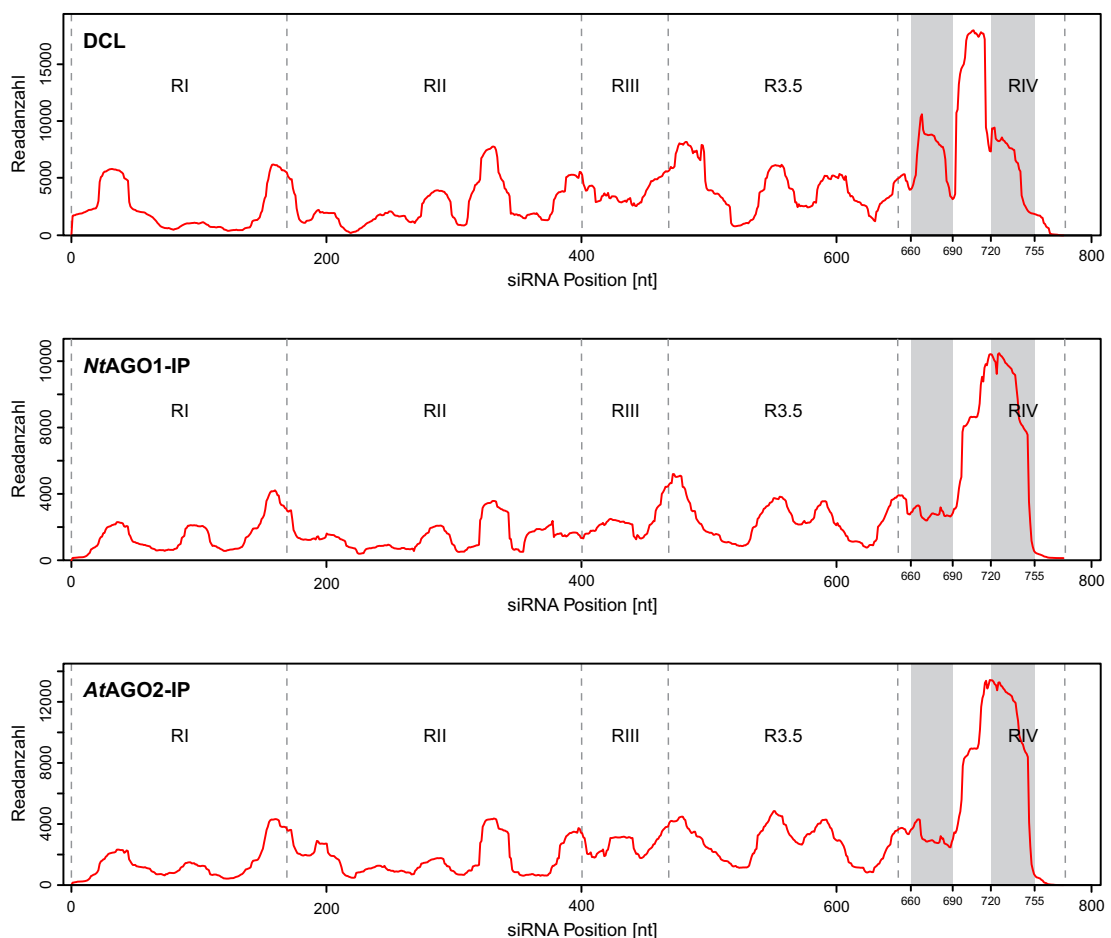
In Abbildung 3.17A ist die relative Häufigkeit sequenzierter vsiRNAs aus der (+)DI-R3.5-RNA in Abhängigkeit ihrer Länge dargestellt. Betrachtet wurden dabei alle *reads* des DCL-Assays, der *NtAGO1*- und *AtAGO2*-IP mit einer Länge von 18-26 nt. Dabei ist zu erkennen, dass der Großteil der identifizierten vsiRNAs eine Länge von 24 nt besitzt. Dies steht in Übereinstimmung mit den Daten der zuvor durchgeführten DCL-Assays, in denen schon eine vermehrte Bildung von 24 nt langen vsiRNAs beobachtet wurde (siehe 3.4.1). Anschließend folgen vsiRNAs mit einer Länge von 21 nt und 22 nt. Dagegen konnten nur wenige vsiRNAs sequenziert werden, die kleiner als 21 nt oder größer als 24 nt waren. Des Weiteren ist die Menge der analysierten vsiRNAs mit einer Länge von 21 nt in den *NtAGO1*- und *AtAGO2*-IPs im Vergleich zu den 24 nt vsiRNAs erhöht. Sowohl für *NtAGO1* als auch *AtAGO2* wurde bereits beschrieben, dass vor allem sRNAs mit einer Größe von 21 nt gebunden werden.



**Abbildung 3.17** Ergebnisse des Illumina *deep sequencings* von vsiRNAs aus der (+)DI-R3.5-RNA. **(A)** Größenverteilung der identifizierten vsiRNAs des DCL-Assays, der *NtAGO1*- und *AtAGO2*-IP. Die meisten der identifizierten vsiRNAs besitzen eine Länge von 24 nt. Anschließend folgen vsiRNAs mit einer Länge von 21 nt und 22 nt. In der *NtAGO1*- und *AtAGO2*-IP ist der Anteil der vsiRNAs mit einer Länge von 21 nt im Verhältnis zum DCL-Assay erhöht. **(B)** Verteilung der 5'-Nukleotide der identifizierten vsiRNAs des DCL-Assays, der *NtAGO1*- und *AtAGO2*-IP mit einer Länge von 21 - 24 nt.

In Abbildung 3.17B sind die Häufigkeiten der sequenzierten vsiRNAs in Abhängigkeit ihres 5'-Nukleotids dargestellt. Dabei entspricht die Häufigkeit der 5'-Nukleotide der identifizierten vsiRNAs des DCL-Assays in etwa der Häufigkeit der einzelnen Nukleotide innerhalb der (+)DI-R3.5-RNA (26% U, 28% G, 22% C, 24% A). Dies deutet darauf hin, dass die Prozessierung der vsiRNAs aus der (+)DI-R3.5-RNA unabhängig vom 5'-Nukleotid der resultierenden vsiRNA erfolgt.

In der *NtAGO1*-IP wurden dagegen vor allem vsiRNAs mit 5'-U sequenziert. Dies entspricht den zuvor beschriebenen Resultaten (siehe Tabelle 3.1) [88, 132, 146]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die erhöhte Menge sequenzierter vsiRNAs mit einer Länge von 21 nt auf die bevorzugte Bindung durch *NtAGO1*/RISC und *AtAGO2*/RISC zurückzuführen ist.



**Abbildung 3.18** RNA-Profile der identifizierten vsiRNAs des DCL-Assays, der *NtAGO1*- und *AtAGO2*-IP der (+)DI-R3.5-RNA. Dargestellt ist die Häufigkeit sequenzierter vsiRNAs mit einer Länge von 21 - 24 nt in Abhängigkeit ihrer Position innerhalb der (+)DI-R3.5-RNA (Abszisse). Die meisten der identifizierten vsiRNAs entstehen aus der 3'-Region der (+)DI-R3.5-RNA. Die grauen Felder markieren Bereiche, in denen sich die siRNA-Profile der AGO-IPs vom DCL-Assay unterscheiden.

Anschließend sollte die Verteilung der identifizierten vsiRNAs innerhalb der Sequenz der (+)DI-R3.5-RNA analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde ein RNA-Profil erstellt (siehe Abbildung 3.18). Es wurden die Häufigkeiten sequenzierter 21 nt - 24 nt langer vsiRNAs des DCL-Assays, der *NtAGO1*- und *AtAGO2*-IP mit einer Länge von 21 - 24 nt in Abhängigkeit ihrer Position innerhalb der (+)DI-R3.5-RNA dargestellt. Die Positionen der Regionen RI-RIV und der R3.5-Region sind gekennzeichnet.

Im RNA-Profil des DCL-Assays ist zu erkennen, dass die meisten vsiRNAs aus der 3'-Region der (+)DI-R3.5-RNA prozessiert werden. Diese werden außerdem proportional zu ihrer Menge besonders häufig durch *NtAGO1*/RISC und *AtAGO2*/RISC gebunden.

Bei genauer Betrachtung zeigen sich Unterschiede zwischen den RNA-Profilen des DCL-Assays und der AGO-IPs. Innerhalb der RIV-Region im Bereich von 660 - 690 nt werden viele vsiRNAs generiert, die jedoch mit geringerer Häufigkeit durch *NtAGO1* und *AtAGO2* gebunden werden. Solche vsiRNAs sind für die folgenden Analysen von geringem Interesse, da sie nicht in RISCs inseriert werden und somit auch keinen antiviralen Effekt auslösen können. Im Gegensatz dazu entstehen aus der Region RIV im Bereich von 720 - 750 nt relativ wenig vsiRNAs. Die vsiRNAs aus diesem Bereich konnten im Vergleich zu anderen vsiRNAs jedoch sehr effizient durch die untersuchten AGO/RISCs gebunden werden und sind damit für weitere Analysen von großem Interesse.

Um einen detaillierteren Überblick über die jeweiligen vsiRNA-Spezies innerhalb des DCL-Assays (DCL), der AGO1-IP (AGO1) und der AGO2-IP (AGO2) zu erhalten, wurde eine *heat map* generiert (siehe Abbildung 3.19). Die relative Häufigkeit einer vsiRNA (*reads per million*) ist durch die Farbcodierung von schwarz (vsiRNAs mit geringer Häufigkeit) über grün (vsiRNAs mit mittlerer Häufigkeit) bis rot (vsiRNAs mit großer Häufigkeit) dargestellt. Die farbliche Skalierung der hier dargestellten *heat map* erfolgte mit einem Quantil von 98. Das bedeutet, dass 98% aller Messwerte von schwarz bis grün gefärbt werden, die restlichen 2% werden von grün bis rot gefärbt. Diese Form der Gewichtung erlaubt die Fokussierung auf vsiRNAs, die mit sehr großer Häufigkeit innerhalb einer Probe vorkommen.

Aus dieser *heat map* lässt sich neben der relativen Häufigkeit auch die Position einer vsiRNA innerhalb der (+)DI-R3.5-RNA ablesen. Es wurde jeweils die Position innerhalb der (+)DI-R3.5-RNA angefärbt, an der sich das 5'-Nukleotid einer sequenzierten vsiRNA befindet. Betrachtet wurden jeweils vsiRNAs mit einer Länge von 21 nt (Zeile 1), 22 nt (Zeile 2), 23 nt (Zeile 3), 24 nt (Zeile 4) und die Gesamtheit aller vsiRNAs mit einer Länge von 21 nt - 24 nt (Zeile 5). Durch die Angabe der jeweiligen Länge der vsiRNA kann ausgehend vom 5'-Nukleotid auch das 3'-Ende und somit die vollständige Sequenz einer vsiRNA aus der *heat map* abgelesen werden.

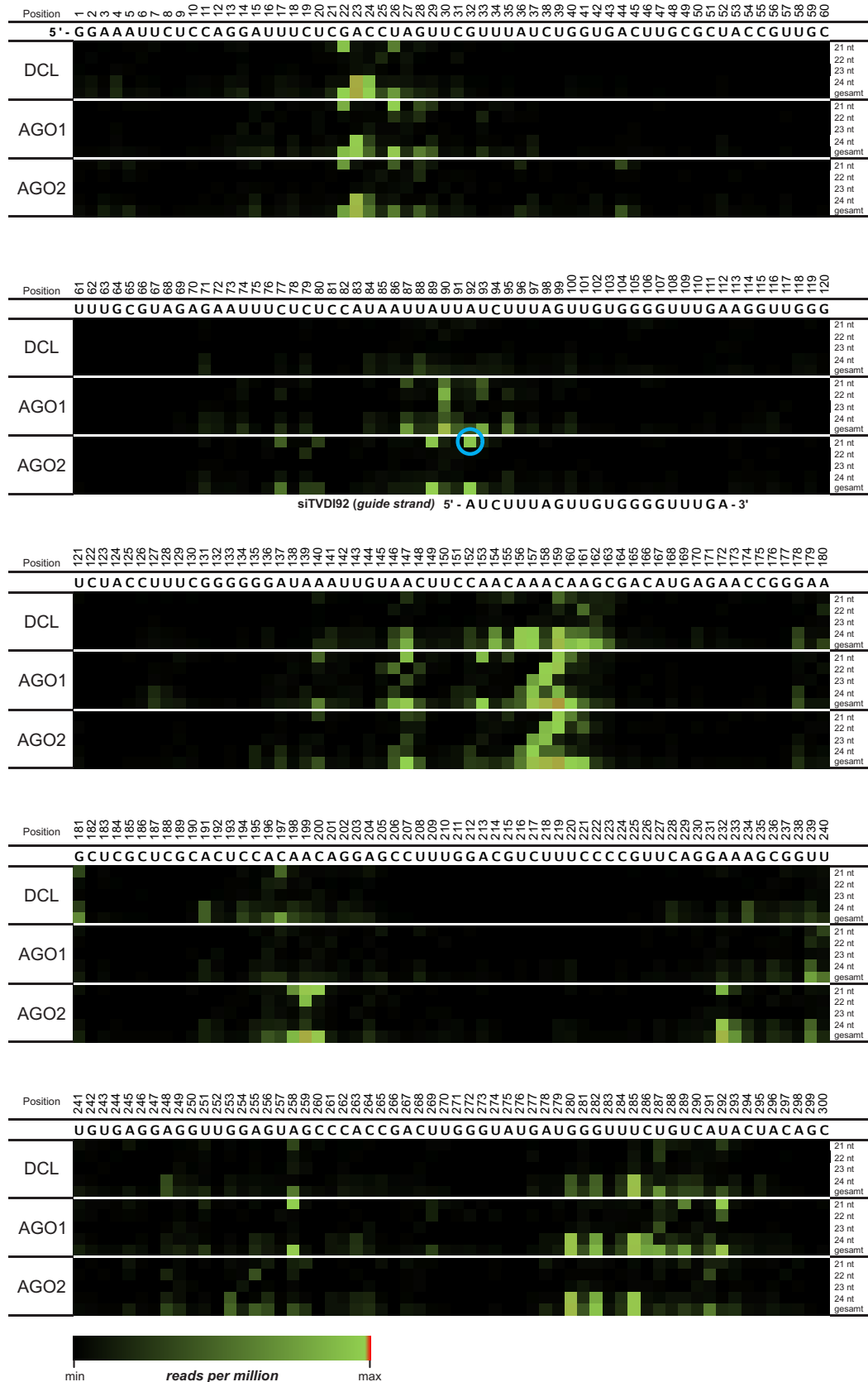
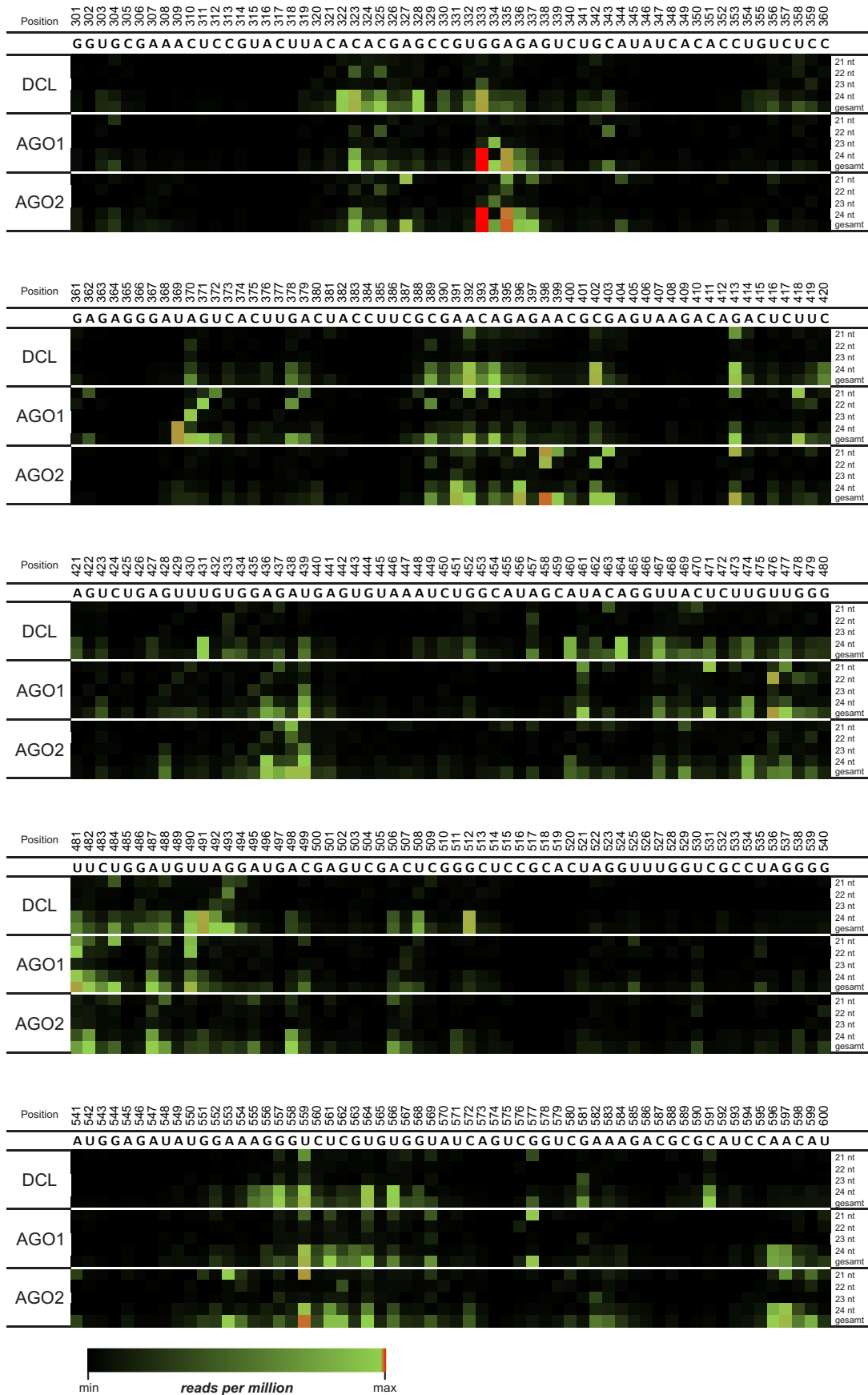
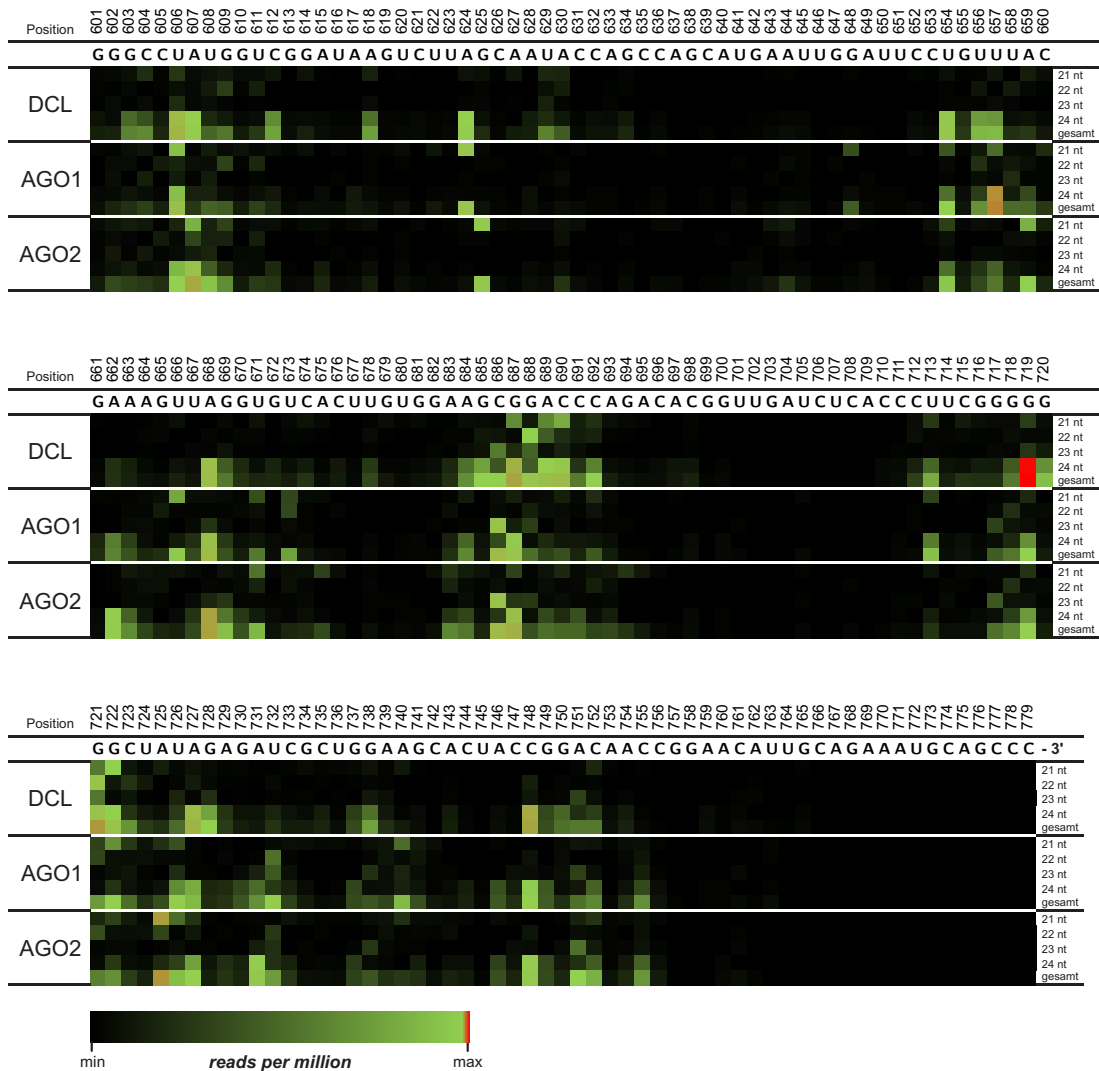


Abbildung 3.19 Heat map der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung des DCL-Assays und der *Nt*AGO1- und *At*AGO2-Immunpräzipitationen der (+)DI-R3.5-RNA. Die Abbildung wird auf der nächsten Seite fortgesetzt (3.20).

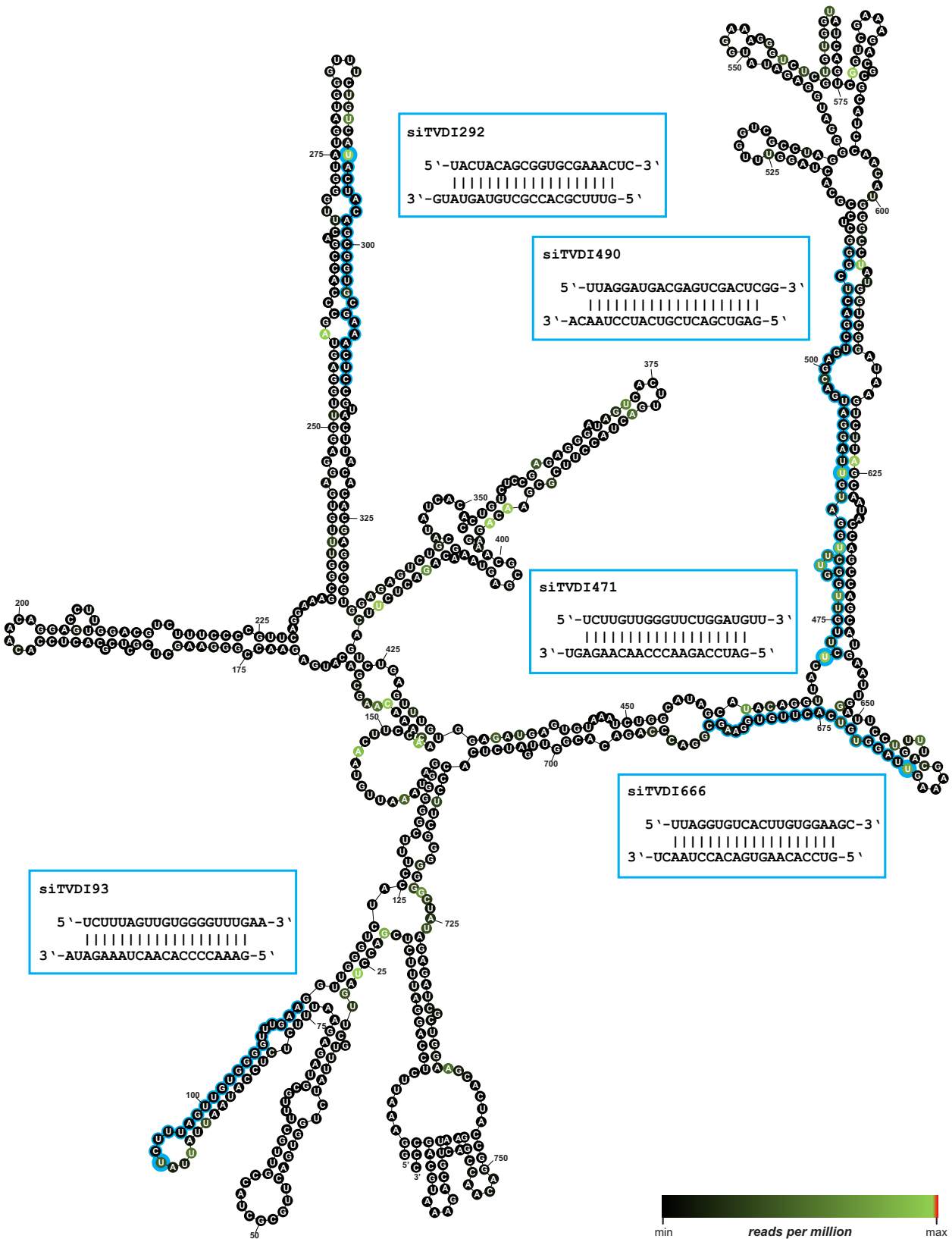
### 3 ERGEBNISSE



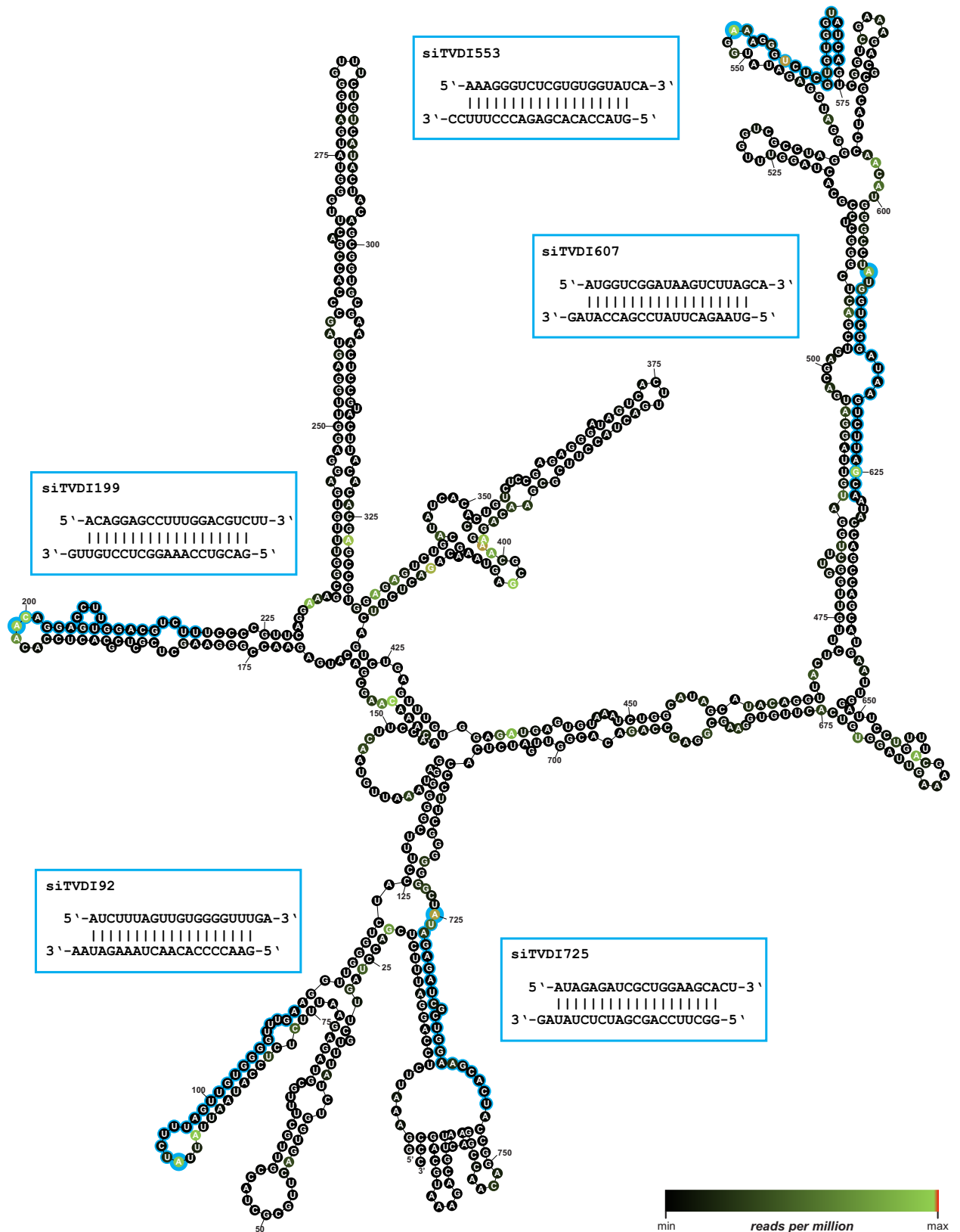
**Abbildung 3.20** Heat map der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung des DCL-Assays und der *Nt*AGO1- und *At*AGO2-Immünpräzipitationen der (+)DI-R3.5-RNA. Die Abbildung wird auf der nächsten Seite fortgesetzt (3.21).



**Abbildung 3.21** Heat map der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung des DCL-Assays und der *Nt*AGO1- und *At*AGO2-Immunitätspräzipitationen der (+)DI-R3.5-RNA. Dargestellt ist die relative Häufigkeit einer vsiRNA (*reads per million*) in Abhängigkeit ihrer Position innerhalb der Nukleotidsequenz der (+)DI-R3.5-RNA. Betrachtet wurden alle *reads* mit einer Länge von 21-24 nt. Die Häufigkeit einer vsiRNA ist durch die Färbung ihres 5'-Nukleotids von schwarz (vsiRNAs mit geringer Häufigkeit) über grün (vsiRNAs mit mittlerer Häufigkeit) bis rot (vsiRNAs mit großer Häufigkeit) dargestellt.



**Abbildung 3.22** Postulierte Sekundärstruktur der (+)DI-R3.5-RNA. Die einzelnen Nukleotide der (+)DI-R3.5-RNA wurden entsprechend der *heat map* der *NtAGO1*-Immunpräzipitation gefärbt. Betrachtet wurden jeweils nur vsiRNA-Sequenzen mit einer Länge von 21 nt. Die 5 vsiRNAs, die in späteren Experimenten untersucht wurden sind blau markiert. Die Sequenzen der korrespondierenden vsiRNA-Duplexe sind angegeben. Die Nummer der jeweiligen TVDI-siRNA entspricht der Position ihres 5'-Nukleotids innerhalb der (+)DI-R3.5-RNA.



**Abbildung 3.23** Postulierte Sekundärstruktur der (+)DI-R3.5-RNA. Die einzelnen Nucleotide der (+)DI-R3.5-RNA wurden entsprechend der *heat map* der *AtAGO2*-Immunpräzipitation gefärbt. Betrachtet wurden jeweils nur vsiRNA-Sequenzen mit einer Länge von 21 nt. Die 5 vsiRNAs, die in späteren Experimenten untersucht wurden sind blau markiert. Die Sequenzen der korrespondierenden vsiRNA-Duplexe sind angegeben. Die Nummer der jeweiligen TVDI-siRNA entspricht der Position ihres 5'-Nucleotids innerhalb der (+)DI-R3.5-RNA.



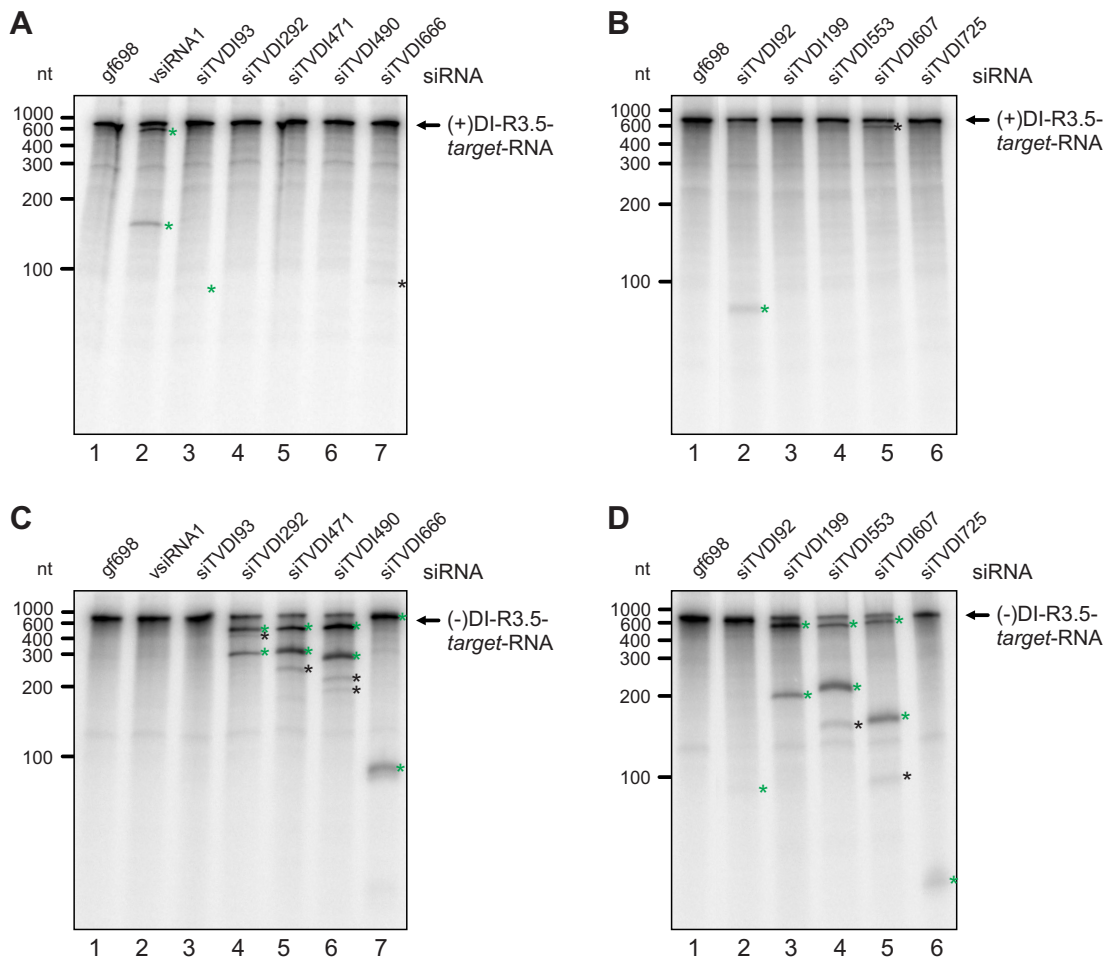
Dies soll am Beispiel der vsiRNA siTVDI92 erläutert werden (siehe Abbildung 3.19, blauer Kreis). Diese vsiRNA besitzt eine Länge von 21 nt. Das 5'-Nukleotid des *guide strands* (5'-AUCUUUAGUUGUGGGGUUUGA-3') befindet sich an Position 92 innerhalb der Nukleotidsequenz der (+)DI-R3.5-RNA. Innerhalb der vsiRNA-Population der AGO2-IP kommt diese vsiRNA mit mittlerer Häufigkeit vor. Aus diesem Grund ist der entsprechende Datenpunkt grün eingefärbt. Dagegen wurde die gleiche vsiRNA innerhalb der DCL-Probe und der AGO1-IP nur mit sehr geringer Häufigkeit sequenziert und ist deshalb schwarz eingefärbt. Dies bedeutet, dass diese vsiRNA innerhalb der AGO2-IP im Vergleich zur DCL- oder AGO1-Probe angereichert ist. Dagegen wurde die vsiRNA mit dem gleichen 5'-Nukleotid und einer Länge von 22 nt nicht in der AGO2-IP angereichert.

Als nächstes sollte untersucht werden, welche der identifizierten vsiRNAs, die effizient von *NtAGO1* und *AtAGO2* gebunden werden, auch eine effiziente Spaltung der (+)DI-R3.5-RNA vermitteln können. Wie bereits beschrieben hängt die Effizienz der RNA-Spaltung sehr stark von der Struktur der *target*-RNA ab. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe des Programms mfold [180] eine mögliche Sekundärstruktur der (+)DI-R3.5 bei einer Temperatur von 25°C berechnet.

Dabei wurden die Nukleotide der (+)DI-R3.5-RNA innerhalb dieser Struktur analog zur *heat map* gefärbt. Betrachtet wurden diesmal jedoch nur 21 nt lange vsiRNAs der *NtAGO1*-IP (siehe Abbildung 3.22) und *AtAGO2*-IP (siehe Abbildung 3.22). Dies erlaubt die Kombination der Strukturvorhersage der (+)DI-R3.5-RNA mit den Ergebnissen der vsiRNA-Sequenzierung. Anhand dieser Strukturen wurden jeweils 5 vsiRNAs für *NtAGO1* und *AtAGO2* ausgewählt. Dabei sollte die Bindungsstelle des 5'-Nukleotids des siRNA-*guide strands* ungepaart innerhalb der Sekundärstruktur der (+)DI-R3.5-RNA vorliegen.

Nach der Bindung eines vsiRNA-Duplexes wird der *passenger strand* aus dem RISC entfernt, während der *guide strand* im AGO-Protein verbleibt und die sequenzspezifische Spaltung einer *target*-RNA vermittelt. Aus diesem Grund enthalten die RNA-Sequenzen der *NtAGO1*- und *AtAGO2*-Immunpräzipitationen keine Informationen über die *passenger strands* der jeweiligen vsiRNAs. Die effiziente Bindung von siRNAs durch AGO-Proteine erfolgt jedoch ausgehend von doppelsträngigen siRNA-Duplexen. Aus diesem Grund wurden die identifizierten vsiRNA-*guide strands* mit jeweils vollständig komplementären RNA-Oligonukleotiden hybridisiert, um den unbekanntem authentischen *passenger strand* zu ersetzen (siehe Abbildung 3.22 und 3.23).

Anschließend wurden die 10 ausgewählten vsiRNAs in einem *cleavage assay* auf ihre Spaltungsaktivität getestet (siehe Abbildung 3.24). Die *cleavage assays* wurden sowohl mit (+)DI-R3.5-RNA als auch (-)DI-R3.5-RNA durchgeführt. Die erwarteten Größen der jeweiligen Spaltfragmente sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.



**Abbildung 3.24** Spaltung der DI-R3.5-RNAs durch vsiRNAs, die aus dem (+)Strang prozessiert wurden ((+)vsiRNAs). Als Negativkontrolle erfolgte die Programmierung der AGO/RISCs mit der gf698-siRNA (Spur1). Als Positivkontrolle erfolgte die Programmierung des *Nt*AGO1/RISC mit der vsiRNA bzw. die Programmierung des *At*AGO2/RISC mit der vsiRNA2. Die Analyse der Spaltprodukte erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie. Spaltfragmente der erwarteten Größe wurden mit einem grünen Stern, Spaltfragmente, die nicht der erwarteten Größe entsprechen wurden mit einem schwarzen Stern gekennzeichnet. **(A)** Spaltung der (+)DI-R3.5-RNA mit *Nt*AGO1/RISC. **(B)** Spaltung der (+)DI-R3.5-RNA mit *At*AGO2/RISC. **(C)** Spaltung der (-)DI-R3.5-RNA mit *Nt*AGO1/RISC. **(D)** Spaltung der (-)DI-R3.5-RNA mit *At*AGO2/RISC.

Da die ausgewählten vsiRNAs aus der (+)DI-R3.5-RNA abgeleitet wurden, besitzen sie innerhalb der (-)DI-R3.5 eine vollständig komplementäre *target*-Sequenz. Des Weiteren konnte in früheren Experimenten gezeigt werden, dass die nicht replizierende (-)DI-R3.5-RNA ein besseres *target* für die RISC-medierte Spaltung ist, als die (+)DI-R3.5-RNA. Die Spaltung der (-)DI-R3.5-RNA diente somit als Kontrolle für die erfolgreiche Bindung der vsiRNA durch *Nt*AGO1 bzw. *At*AGO2. Als Negativkontrolle erfolgte die Beladung der AGO-Proteine mit gf698-siRNA und vsiRNA1, da diese siRNAs keine Spaltung der (-)DI-R3.5-RNA vermitteln.

Es konnte gezeigt werden, dass 8 der 10 untersuchten vsiRNAs zur Spaltung der

(-)DI-R3.5-RNA durch *NtAGO1* bzw. *AtAGO2* führen. Es ist zu erkennen, dass neben den erwarteten Spaltfragmenten (grüne Sterne) auch Banden mit geringerer Größe (schwarze Sterne) detektiert werden können (siehe Abbildung 3.24A). Diese können zum Einen durch den exonukleolytischen Abbau der eigentlichen Spaltprodukte entstehen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass der „falsche“ Strang des siRNA Duplexes, der eigentlich als *passenger strand* gedacht war, im AGO verbleibt. Dieser „falsche“ *guide strand* könnte anschließend die RNA-Spaltung innerhalb einer partiell komplementären Region der (-)DI-R3.5-RNA auslösen. Dies könnte in weiterführenden Untersuchungen durch die Klonierung der RNA-Fragmente mittels 5'- oder 3'-RACE analysiert werden.

siRNA	(+DI-R3.5		(-)DI-R3.5	
	5'-SF	3'-SF	5'-SF	3'-SF
gf698	-	-	-	-
vsiRNA1	606 nt	173 nt	-	-
siTVDI93	83 nt	696 nt	677 nt	102 nt
siTVDI292	264 nt	515 nt	478 nt	301 nt
siTVDI471	634 nt	145 nt	299 nt	480 nt
siTVDI490	616 nt	163 nt	280 nt	499 nt
siTVDI666	466 nt	313 nt	104 nt	675 nt
siTVDI92	84 nt	697 nt	678 nt	101 nt
siTVDI199	191 nt	588 nt	571 nt	208 nt
siTVDI553	543 nt	236 nt	217 nt	562 nt
siTVDI607	499 nt	280 nt	163 nt	616 nt
siTVDI725	13 nt	766 nt	45 nt	734 nt

**Tabelle 3.2** Größen der erwarteten Spaltfragmente des *cleavage assays* von (+)DI-R3.5-RNA und (-)DI-R3.5-RNA und den untersuchten (+)vsiRNAs. Die Berechnung der Spaltfragmente der (+)DI-R3.5 erfolgte auf Grundlage der durch mfold berechneten und in Abbildung 3.22 dargestellten Sekundärstruktur der (+)DI-R3.5-RNA. Auf Grund der vollständigen Komplementarität der *guide strands* der (+)vsiRNAs mit der *target*-Sequenz der (-)DI-R3.5-RNA kann die Größe der erwarteten Spaltfragmente unabhängig von der Sekundärstruktur der (-)DI-R3.5-RNA bestimmt werden. Die Spaltung erfolgt dabei immer zwischen den 2 Nukleotiden der *target*-RNA, die sich gegenüber des 10. und 11. Nukleotids des siRNA-*guide strands* befinden.

Nachdem gezeigt wurde, dass viele der untersuchten (+)vsiRNAs eine Spaltung der (-)DI-R3.5-RNA vermitteln können, wurden die (+)vsiRNAs im *cleavage assay* mit der (+)DI-R3.5-RNA getestet. Als Negativkontrolle diente die Beladung der AGO-Proteine mit gf698-siRNA. Als Positivkontrolle erfolgte die Beladung von *NtAGO1* mit vsiRNA1, da bereits gezeigt werden konnte, dass diese vsiRNA eine effiziente Spaltung der (+)DI-R3.5-RNA vermittelt (siehe 3.12).

Im *cleavage assay* der (+)DI-R3.5-RNA sind Spaltfragmente der vsiRNAs siTVDI93 und siTVDI666 für *NtAGO1* sowie der siTVDI92 und siTVDI607 für *AtAGO2* detektierbar. Allerdings entsprechen nur die Spaltfragmente der siTVDI93 und siTVDI92 der erwarteten Größe von 83 nt und 696 nt bzw. 84 nt und 697 nt. Die Spaltung der (+)DI-R3.5-RNA durch siTVDI666 und siTVDI607 könnte durch den eigentlich als *passenger strand* gedachten vsiRNA-Strang der jeweiligen vsiRNA ausgelöst werden. Eine andere Erklärung wäre, dass der *guide strand* an eine andere partiell komplementäre Sequenz innerhalb der (+)DI-R3.5-RNA bindet, als die durch mfold berechnete Sekundärstruktur der (+)DI-R3.5-RNA impliziert. Damit würden auch Spaltfragmente mit einer anderen Größe entstehen. Dies sollte durch Klonierung der RNA-Fragmente durch 5'- oder 3'-RACE untersucht werden.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass vsiRNAs, die durch die DCL-Aktivität innerhalb des BYL aus der (+)DI-R3.5-RNA generiert werden, auch eine Spaltung der (+)Strang-RNA vermitteln können. Die Spaltung der bisher untersuchten vsiRNAs sind jedoch sehr ineffizient. Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass die Effekte anderer bisher noch nicht analysierter (+)vsiRNA-Kandidaten stärker ausfallen könnten und sollte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.



## 4 DISKUSSION

Virale Infektionen rufen sowohl bei Tieren als auch bei Pflanzen vielfältige krankheitsbedingte Schädigungen hervor. Aus diesem Grund sind die Verläufe viraler Infektionen und Abwehrstrategien der infizierten Wirte Gegenstand intensiver Forschungen. Kulturpflanzen können von vielen verschiedenen Viren befallen werden. Dies führt zu empfindlichen Ertragsverlusten durch die Schädigung von Früchten oder die Wachstumshemmung der infizierten Wirtspflanze. Die Aufklärung der Mechanismen der pflanzlichen antiviralen Immunantwort ist deshalb von großem Interesse. Diese Arbeit soll dazu beitragen das Verständnis der zu Grunde liegenden Prozesse zu verbessern.

### 4.1 Das BYL als *in vitro* System zur Untersuchung des antiviralen RNA-silencings

Pflanzliche (+)RNA-Viren wie das TBSV modifizieren und modulieren zahlreiche zelluläre Prozesse, um sich effizient vermehren zu können und die Abwehrmechanismen ihres Wirtes zu inhibieren. Diese wechselseitige Entwicklung von Virulenzmechanismen bzw. pflanzlichen Abwehrmechanismen kann als Ping-Pong-Mechanismus betrachtet werden [58].

So führt die Replikation von (+)RNA-Viren zur Generierung großer Mengen (ds)RNA, die als *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) durch die Wirtszelle erkannt wird und zur Aktivierung des antiviralen RNA-silencings führt. Neben der Abwehr viraler Infektionen dient dieser Mechanismus des RNA-silencings außerdem der Regulation der zellulären Genexpression durch transkriptionelles und posttranskriptionelles *gene silencing* (TGS und PTGS). Aus diesem Grund besitzen Pflanzen ein umfangreiches regulatorisches Netzwerk dieses Prozesses.

Das Genom des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* codiert für 4 verschiedene DCL-Proteine, 10 AGO-Proteine und 6 RDRs, deren Funktionen durch verschiedene Cofaktoren, Bindungspartner und transkriptionelle sowie posttranskriptionelle Mechanismen reguliert werden. Viele dieser Komponenten besitzen außerdem redundante Funktionen [27, 41]. Auch die Beteiligung verschiedener AGO-Proteine im antiviralen RNA-silencing ist bisher nur unvollständig aufgeklärt. So konnte gezeigt werden, dass *AtAGO1* und *AtAGO2* eine antivirale Funktion besitzen. *AtAGO2* wirkt dabei wahrscheinlich durch die endonukleolytische Spaltung der viralen RNA, während für *AtAGO1* auch eine miRNA-abhängige Funktion in diesem Prozess diskutiert wird [29]. Die Beteiligung anderer AGO/RISCs wird dagegen noch weitreichend diskutiert. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass *AtAGO7*-Mutanten eine höhere Anfällig-

keit gegenüber Infektionen des *Turnip crinkle virus* (TCV) zeigen als Wildtyp-Pflanzen [119]. Dies konnte bisher jedoch nicht für andere untersuchte Pflanzenviren bestätigt werden.

Zusätzlich haben viele Viren Suppressoren des RNA-silencings (VSRs) entwickelt, um der antiviralen Immunantwort der Pflanze zu entgehen. Diese Coevolution von Virulenzmechanismen und pflanzlichen Abwehrmechanismen erschwert die Analyse verschiedener Aspekte des RNA-silencings *in planta*.

Eine Alternative dazu ist die Untersuchung des RNA-silencings in pflanzlichen Protoplasten. Dieses zellbasierte System ermöglicht die virale Replikation [126] und eine transiente Genexpression [170] und kann die Analyse des RNA-silencings vereinfachen. Aus diesem Grund wurden Protoplasten beispielsweise für die Untersuchung der Funktionsweise verschiedener RNA-silencing-Suppressoren verwendet [118, 137]. Allerdings hängt die Qualität der zu untersuchenden Protoplasten stark von den Kultivierungsbedingungen und dem Zustand der Pflanzen ab, aus denen die Protoplasten präpariert werden. Des Weiteren können die Untersuchungsbedingungen in solchen *in vivo* Systemen nicht variiert und die Wirkung einzelner Komponenten des RNA-silencings nur schwer analysiert werden. Aus diesem Grund ist die Verwendung eines authentischen *in vitro* Systems zur Untersuchung des antiviralen RNA-silencings von großem Vorteil.

Für die Untersuchung der RNA-Interferenz in Säugern und *Drosophila melanogaster* stehen verschiedene *in vitro* Systeme zur Verfügung. In Pflanzen konnte bisher jedoch kein vergleichbares System etabliert werden. Ein Großteil der bisher durchgeführten *in vitro* Studien erfolgte im Weizenkeimextrakt [85]. Dieses System besitzt eine *in vitro* RDR- und DCL-Aktivität [147]. Allerdings weisen diese zytoplasmatischen Extrakte Defizite in der Formierung funktioneller RISCs mit exogenen siRNAs auf [81, 147]. Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden in BYL, einem zytoplasmatischen Extrakt aus entvakuolisierten *Nicotiana tabacum*-Protoplasten, durchgeführt. Dieses *in vitro* System wurde bereits in früheren Arbeiten für die Untersuchung der Replikationsmechanismen verschiedener Pflanzenviren genutzt [39, 65, 133]. Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass das BYL die Prozessierung doppel- und einzelsträngiger RNA zu sRNAs mit einer Größe von 21 nt - 24 nt durch eine endogene DCL-Aktivität vermittelt. Zusätzlich erlaubt die *in vitro* Translation von AGO-mRNAs die Rekonstitution aktiver RISCs [55, 132].

Ein großer Vorteil des BY-2-Lysats ist die Abwesenheit einer detektierbaren endogenen RISC-Aktivität. Es konnte gezeigt werden, dass ohne die *in vitro* Translation von AGO-Proteinen in Anwesenheit von spezifischen siRNAs keine endogene RISC-Aktivität detektiert werden kann (siehe Abbildung 3.1). Mögliche Ursachen können eine geringe Expression endogener AGO-Proteine oder eine bereits erfolgte Beladung der RISCs

mit endogenen sRNAs sein [55, 132]. Die *in vitro* Translation unterschiedlicher AGO-mRNAs in Anwesenheit verschiedener exogener siRNAs erhöht die Menge aktiver RISCs im *in vitro* System und erlaubt die Programmierung spezifischer AGO/RISCs gegen eine bestimmte *target*-Sequenz. Aus diesem Grund können die beobachteten Effekte eindeutig einem bestimmten AGO-Protein und einer definierten siRNA zugeordnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Vorteile des BYL genutzt, um das RNA-*silencing* verschiedener DI-RNA-Varianten des TBSV *in vitro* unter definierten Bedingungen zu untersuchen.

### 4.2 Charakterisierung verschiedener AGO/RISCs bezüglich ihrer antiviralen Funktion *in vitro*

Mit Hilfe des BYL wurden verschiedene AGO-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana benthamiana* bezüglich ihrer 5'-Nukleotid-Bindungsspezifität und ihrer endonukleolytischen Aktivität in einem *cleavage assay* untersucht. In diesem Assay erfolgte die *in vitro* Translation einer AGO-mRNA in Anwesenheit einer exogenen siRNA. Da die exogene siRNA in großer Menge zum Reaktionsansatz hinzugefügt wurde, kann diese mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die *in vitro* synthetisierten AGO-Proteine gebunden werden, sodass der resultierende RISC gegen eine bestimmte *target*-Sequenz „programmiert“ werden konnte.

Voraussetzungen für eine detektierbare RISC-vermittelte Spaltung einer *target*-RNA sind die korrekte Translation und Faltung des AGO-Proteins und die Beladung des RISC mit den jeweiligen sRNA-Duplexen im *in vitro* System. Dies setzt die Funktionalität aller an diesen Prozessen beteiligten Faktoren im BYL voraus.

Für die Beladung der RISCs wurde in den durchgeführten Assays die gf698-siRNA verwendet, da diese siRNA die effiziente Spaltung einer GFP-*target*-RNA vermittelt [55, 132]. Da die Bindung einer siRNA durch ein AGO-Protein stark von der Länge und dem jeweiligen 5'-Nukleotid des sRNA-*guide strands* abhängt [88, 146], wurde das 5'-U des gf698-*guide strands* durch die drei anderen Basen substituiert. Des Weiteren wurden gf698-siRNA-Varianten mit einer Länge von 21 nt, 22 nt und 24 nt getestet, da vor allem vsiRNAs dieser Längen eine Funktion im RNA-*silencing* besitzen [29]. Die Verwendung von gf698-siRNA-Varianten, die sich ausschließlich in ihrer Länge und ihrem 5'-Nukleotid unterscheiden, ermöglicht den direkten Vergleich der endonukleolytischen Aktivität verschiedener AGO-Proteine (siehe Tabelle 3.1).

Für AtAGO1 (5'-U), AtAGO2 (5'-A), AtAGO4 (5'-A) und AtAGO5 (5'-C) konnten die bereits beschriebenen Bindungsspezifitäten der sRNA-5'-Nukleotide bestätigt werden



[88, 146].

Die 5'-Bindungsspezifität anderer AGO-Proteine war bisher jedoch unbekannt. Für *AtAGO7* wurde beispielsweise nur die Bindung der miR390 beschrieben, die jedoch nicht durch die Substitution des 5'-A zu 5'-U beeinflusst wird und möglicherweise unabhängig vom 5'-Nukleotid des miRNA-*guide strands* verläuft [92, 171]. Aus diesem Grund wird spekuliert, dass sich der sRNA-Bindungsmechanismus von *AtAGO7* von dem anderer AGO-Proteine unterscheiden könnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *AtAGO7* zur endonukleolytischen Spaltung der GFP-*target*-RNA führen kann, wenn es die gf698-siRNA mit einem 5'-A und einer Länge von 21 nt bindet. Bei der Verwendung von gf698-siRNAs mit einem anderen 5'-Nukleotid oder längeren gf698-siRNA-Varianten konnte dagegen keine Spaltung der *target*-RNA detektiert werden (siehe Abbildung 6.3).

Das BYL kann auch zum direkten Vergleich von AGO-Proteinen aus verschiedenen Organismen verwendet werden. Dabei zeigten sowohl *AtAGO1* und *NtAGO1*, als auch *AtAGO2* und *NbAGO2* jeweils die gleiche Bindungsspezifität für das 5'-Nukleotid der sRNA und eine vergleichbare *slicer*-Aktivität. Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch *AtAGO3* (5'-A, 21 nt), *AtAGO4* (5'-A, 24 nt), *AtAGO9* (5'-A, 24 nt) und *AtAGO10* (5'-U, 21 nt) eine endonukleolytische Aktivität besitzen. Allerdings entstehen bei der Spaltung der GFP-*target*-RNA durch *AtAGO4* und *AtAGO9* nicht nur die Spaltfragmente der erwarteten Größen von 98 nt und 335 nt (siehe Abbildung 6.2 und 6.3).

Die Anzahl der detektierbaren 3'-Spaltfragmente deutet darauf hin, dass die Spaltung der *target*-RNA auch 20 - 50 nt *upstream* der gf698-*target*-Sequenz stattfinden kann. Dabei ist unklar, durch welche Determinanten dieser Effekt hervorgerufen werden könnte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich der Mechanismus der endonukleolytischen Spaltung der *target*-RNA durch *AtAGO4*/RISC und *AtAGO9*/RISC von der *slicer*-Aktivität anderer AGO-Proteine unterscheidet. Die Identität der resultierenden Spaltfragmente könnte durch RACE-Experimente untersucht werden.

Im Vergleich zu anderen AGO-Proteinen sind sowohl *AtAGO4* als auch *AtAGO9* im Zellkern lokalisiert [72] und vermitteln dort das transkriptionelle Gen-*silencing* [167, 179]. Auf Grund ihrer zellulären Lokalisation besitzen diese AGO-Proteine wahrscheinlich keine Funktion in der Abwehr von (+)RNA-Viren, da deren Replikation im Zytoplasma infizierter Zellen stattfindet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *AtAGO4*-defiziente Pflanzen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber DNA-Viren besitzen [154]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *cleavage assays* zeigen, dass die Abwehr von DNA-Viren wie Gemini- oder Pararetroviren durch *AtAGO4*/RISCs oder *AtAGO9*/RISCs zusätzlich zur Methylierung der viralen DNA potentiell auch durch die Spaltung der korrespondierenden viralen Transkripte erfolgen könnte.

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten AGO-Proteinen konnte für *AtAGO6* bisher

keine *in vitro slicer*-Aktivität nachgewiesen werden (siehe Abbildung 6.2). Dies könnte darauf hindeuten, dass *AtAGO6* keine endonukleolytische Aktivität besitzt. Es ist jedoch auch möglich, dass das BYL die Formierung eines funktionellen *AtAGO6/RISCs* nicht vermitteln kann. Ursachen könnten eine fehlerhafte Proteinfaltung oder fehlende Komponenten des RISCs sein, die essentiell für die *AtAGO6*-Funktion sein könnten. Eine andere Möglichkeit ist, dass die *gf698*-siRNA nicht durch *AtAGO6* gebunden werden kann. In diesem Fall wäre die Bindung einer siRNA durch *AtAGO6* nicht ausschließlich von der Identität des 5'-Nukleotids und der Länge der siRNA abhängig. Um dies zu untersuchen könnten die *AtAGO6*-Experimente in einem *in vitro* System aus *Arabidopsis thaliana* wiederholt werden, welches vor Kurzem etabliert werden konnte [95].

Im Folgenden sollten die AGO-Proteine bezüglich ihres antiviralen Potentials untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde der *in vitro* Replikations-Inhibitionsassay etabliert. Im Vergleich zum *cleavage assay*, der für die Untersuchung der RISC-vermittelten Spaltung nicht replizierender *in vitro* Transkripte verwendet wurde, ermöglicht der Replikations-Inhibitionsassay die Untersuchung des antiviralen Effekts des RISCs auf eine replizierende RNA.

Um die Ergebnisse dieses Assays mit denen des zuvor beschriebenen *cleavage assays* vergleichen zu können, wurde auch im Replikations-Inhibitionsassay die *gf698*-siRNA verwendet. Dabei wurden die AGO-mRNAs jeweils in Anwesenheit der *gf698*-siRNA-Variante translatiert, mit der im *cleavage assay* die deutlichste *slicer*-Aktivität detektiert werden konnte. Damit die *gf698*-siRNA eine Spaltung der replizierenden DI-RNA vermitteln konnte, wurde die entsprechende GFP-*target*-Sequenz in die R3.5-Region der DI-R3.5-RNA inseriert. Da in diesem Assay jeweils die gleiche siRNA und die gleiche *target*-RNA verwendet wurden, kann die antivirale Aktivität verschiedener AGO/RISCs direkt miteinander verglichen werden.

Obwohl die *in vivo* Funktion eines AGO-Proteins durch verschiedene Faktoren wie die Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben und die zelluläre Lokalisation bestimmt wird, erlauben die durchgeführten *in vitro* Experimente eine Aussage über das antivirale Potential verschiedener AGO-Proteine. Es konnte gezeigt werden, dass alle AGO-Proteine, die eine effiziente RNA-Spaltung im *cleavage assays* vermitteln konnten, auch eine detektierbare antivirale Aktivität besitzen. So zeigten RISCs mit *NtAGO1*, *AtAGO1*, *NbAGO2*, *AtAGO2*, *AtAGO3*, *AtAGO4*, *AtAGO5* und *AtAGO9* eine Reduktion der Menge des gebildeten Replikationsproduktes, wohingegen RISCs mit *AtAGO6*, *AtAGO7* und *AtAGO10* zu keiner detektierbaren Inhibition der Replikation führten. Für *AtAGO1*, *NbAGO2* und *AtAGO2* wurde bereits eine Funktion in der Abwehr von (+)RNA-Viren beschrieben [44, 93, 129, 158]. Dagegen wur-

de bisher kein reprimierender Effekt von *AtAGO3* und *AtAGO5* auf die Infektion von (+)RNA-Viren beobachtet [44, 146, 158]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen jedoch, dass sowohl *AtAGO3* als auch *AtAGO5* die Replikation von TBSV *in vitro* inhibieren können (siehe Abbildung 6.2). Aus diesem Grund wäre auch *in vivo* eine antivirale Wirkung dieser AGO-Proteine vorstellbar.

### 4.3 Die Inhibition der viralen Replikation erfolgt auf (+)RNA-Ebene

Die meisten pflanzenpathogenen Viren sind (+)RNA-Viren [53]. Die Replikation dieser Viren erfolgt durch die Synthese eines zum viralen Genom vollständig komplementären (-)RNA-Intermediates durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (vRdRp). Diese (-)RNA dient anschließend als Matrize für die Synthese neuer (+)RNA-Moleküle.

Des Weiteren verläuft die virale Replikation asymmetrisch. Das bedeutet, dass die Menge des gebildeten (-)RNA-Intermediates deutlich geringer ist als die Menge der neu synthetisierten (+)RNA. Für das humanpathogene Hepatitis-C-Virus (HCV) konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein viraler Replikationskomplex jeweils ein (-)RNA-Molekül und fünf (+)RNA-Moleküle enthält [120]. Das Verhältnis der replizierenden (+) und (-)TBSV-RNA beträgt 100:1 (*in vivo*) und 200:1 (*in vitro*) [39, 162]. Die Spaltung eines (-)RNA-Moleküls hätte damit wesentlich größere Auswirkungen auf die virale Replikation als die Spaltung viraler (+)RNA. Damit könnte das (-)RNA-Intermediat ein optimales *target* der RISC-vermittelten Immunantwort der jeweiligen Wirtspflanze darstellen. Entsprechend wird vermutet, dass die langen doppelsträngigen Replikationsintermediate zur Induktion des antiviralen RNA-*silencings* führen und das Substrat für die Prozessierung doppelsträngiger vsiRNAs durch DCLs sind [26, 160]. Je nachdem, welcher der beiden vsiRNA-Stränge als *guide strand* im RISC verbleibt, könnten sowohl die virale (+) als auch die (-)RNA gespalten werden. Dabei würde die Spaltung des (-)RNA-Intermediates wie zuvor beschrieben zu einer sehr effizienten Inhibition der Replikation führen (siehe Abbildung 3.3).

Um zu untersuchen, ob sowohl die virale (+) als auch (-)RNA während der Replikation ein *target* für die RISC-vermittelte Spaltung sein können, wurden Replikations-Inhibitionsexperimente durchgeführt, die eine direkte Unterscheidung der (+) und (-)RNA-Spaltung ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde die *gf698-target*-Sequenz sowohl in *sense* als auch *antisense* Orientierung in die DI-R3.5-RNA inseriert. Da ausschließlich der *guide strand* der *gf698*-siRNA durch AGO gebunden werden kann [55], kann im Falle der DI-GFP(s)-Konstrukte ausschließlich der (+)RNA-Strang gespalten werden. Die inhibitorische Wirkung des RISC kann im Fall der (+)RNA-Spaltung durch die Abnahme der Menge des Replikationsproduktes und durch die Detektion der re-

sultierenden Spaltprodukte nachgewiesen werden. Im Fall der (-)RNA-Spaltung der DI-GFP(as)-Konstrukte kann der inhibitorische Effekt nur indirekt nachgewiesen werden, da die virale Replikation asymmetrisch verläuft. Die Spaltung der (-)RNA würde zur Inaktivierung des viralen Replikationsintermediates führen, was eine verringerte Bildung der detektierbaren (+)RNA-Replikationsprodukte zur Folge hätte. Die resultierenden Spaltfragmente der (-)RNA können auf Grund der geringen Konzentration des Replikationsintermediates mit dieser Methode nicht detektiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der TBSV-Replikation auch bei Verwendung unterschiedlicher AGO-Proteine ausschließlich durch die RISC-vermittelte Spaltung der viralen (+)RNA erfolgt. Dabei konnten sowohl eine Abnahme der Menge des Replikationsproduktes als auch die resultierenden Spaltprodukte detektiert werden. Dagegen konnte kein inhibitorischer Effekt des gf698-RISCs auf die Replikation der DI-GFP(as)-RNA nachgewiesen werden. Dies war überraschend, da die nicht replizierenden DI-GFP(s)- und DI-GFP(as)-Konstrukte beide mit hoher Effizienz im *in vitro cleavage assay* gespalten werden konnten (Vergleich Abbildungen 3.5 und 3.6).

Diese Ergebnisse konnten auch bei der Verwendung viraler siRNAs bestätigt werden. Die drei im Rahmen dieser Arbeit identifizierten vsiRNAs (vsiRNA1-3) führten in einem *in vitro cleavage assay* zu einer effizienten RISC-vermittelten Spaltung der nicht replizierenden DI-R3.5-*target*-RNA ermöglichen. Allerdings konnte nur bei der Beladung der AGO/RISCs mit vsiRNA1 und vsiRNA2, die zu einer Spaltung der (+)DI-R3.5-RNA führen, eine antivirale Funktion im *in vitro* Replikations-Inhibitionsassay. Bei der Verwendung der vsiRNA3, die zur Spaltung der (-)DI-R3.5-RNA führt, konnte dagegen keine Reduktion des Replikationsproduktes beobachtet werden.

Die Ergebnisse der Replikationsinhibitions-Versuche deuten insgesamt darauf hin, dass die *in vitro* beobachtete antivirale Immunantwort überwiegend auf der Spaltung neu synthetisierter (+)RNA-Moleküle basiert. Dies würde die Formierung weiterer Replikationskomplexe ausgehend von den freigesetzten neu synthetisierten (+)RNA-Molekülen verhindern und zu der beobachteten Verminderung der Menge an gebildetem Replikationsprodukt führen.

Ob es sich bei dem hier beschriebenen Effekt um einen allgemeinen Mechanismus handelt, sollte durch die Durchführung analoger Experimente mit anderen (+)RNA-Viren oder in anderen pflanzlichen *in vitro* Systemen weiter untersucht werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das BYL neben TBSV auch die *in vitro* Replikation des *Brome mosaic virus* (BMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) und *Turnip crinckle virus* (TCV) ermöglicht [65]. Des Weiteren konnte ein translationsaktiver zytoplasmatischer Extrakt aus *A. thaliana*-Protoplasten gewonnen werden, der ebenfalls die *in vitro* Replikation verschiedener RNA-Viren ermöglichen könnte [95].

Die wahrscheinlichste Erklärung für die fehlende Spaltung des (-)RNA-Intermediates durch RISC ist, dass die virale Replikation von (+)RNA-Viren an Membranen der Mitochondrien, Peroxisomen, Chloroplasten, Vakuolen oder des endoplasmatischen Retikulums stattfindet [80, 99]. Viele (+)RNA-Viren modulieren dabei die ursprüngliche Membranstruktur durch die Rekrutierung verschiedener Wirtsproteine [96].

Die Replikation von TBSV findet an den Membranen der Peroxisomen statt [20, 57]. Die Rekrutierung verschiedener ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*)-Proteine und deren Cofaktoren durch TBSV führt zur kugelförmigen Einstülpung und Vesikelbildung der peroxisomalen Membran [11, 12]. Dies ermöglicht die Steigerung der lokalen Konzentration des viralen RNA-*templates*, der viralen RdRp und der für die Replikation essentiellen Wirtsfaktoren. Zusätzlich schützt die Replikation innerhalb von Membranvesikeln die Replikationskomponenten vor dem Abbau durch zelluläre Proteasen und Nukleasen [57, 87, 96].

Die Replikation in Membranvesikeln hat weitreichende Konsequenzen für die RNAi-vermittelte Immunantwort der Zelle, da das Replikationsintermediat mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht nur vor der endonukleolytischen Spaltung durch RISC, sondern auch vor der Prozessierung durch DCL geschützt ist. Um die Assemblierung viraler Partikel zu ermöglichen, müssen die neu synthetisierten (+)RNA-Moleküle jedoch aus dem viralen Replikationskomplex entlassen und ins Zytoplasma der Zelle freigesetzt werden. Dort könnten sie Ausgangspunkt für die Generierung von vsiRNAs und potentielle *targets* des antiviralen RNA-*silencings* darstellen.

Wenn das Replikationsintermediat von der Prozessierung durch DCL geschützt ist, gibt es für die Generierung von vsiRNAs zwei alternative Möglichkeiten. Zum Einen könnten die vsiRNAs direkt aus dem viralen Genom prozessiert werden. So wurde beobachtet, dass der Großteil der vsiRNAs verschiedener Pflanzenviren aus der viralen (+)RNA stammen [31, 49, 91]. Ein direkter Nachweis, dass die (+)RNA ein Substrat für die Prozessierung von vsiRNAs durch DCLs darstellen kann, konnte bisher jedoch nicht erbracht werden. Außerdem ist unklar, ob diese vsiRNAs eine aktive Rolle in der Abwehr der viralen Infektion spielen. Auf Grund der starken Sekundärstruktur des viralen Genoms ist es denkbar, dass diese sogenannten (+)vsiRNAs selbst zur Spaltung des viralen Genoms führen könnten [31, 49, 91]. Eine weitere Möglichkeit ist, dass diese vsiRNAs keine oder nur eine geringe antivirale Wirkung besitzen und zu einer Sättigung der RNA-*silencing* Maschinerie mit ineffizienten vsiRNAs führen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass nur ein geringer Prozentsatz der aus *Grapevine fleck virus* (GFkV) und *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) gebildeten vsiRNAs zu einer endonukleolytischen Spaltung der viralen RNA führt [89].

Die andere Möglichkeit ist die Generierung von vsiRNAs aus doppelsträngiger RNA, welche ausgehend vom viralen Genom durch pflanzlichen RNA-abhängigen RNA-

Polymerasen (RDRs) synthetisiert wird. Diese vsiRNAs sind verantwortlich für die Verbreitung und Verstärkung des RNA-silencings. Dabei ist jedoch unklar, ob die antivirale Funktion der sekundären vsiRNAs ausschließlich durch das Auslösen einer systemischen Immunität oder auch durch die lokale endonukleolytische Aktivität dieser vsiRNAs vermittelt wird [29].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl vsiRNAs aus doppelsträngiger als auch aus einzelsträngiger RNA identifiziert und hinsichtlich ihrer antiviralen Wirkung analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen im Folgenden diskutiert werden.

#### 4.4 Identifizierung effizienter vsiRNAs aus doppelsträngiger RNA

Zunächst sollten mit Hilfe des BYL vsiRNAs identifiziert werden, die aus einer doppelsträngigen RNA stammen und zu einer effizienten Spaltung der viralen *target*-RNA führen können. Die Untersuchungen konzentrierten sich dabei auf die R3.5-Region, da diese bereits in Untersuchungen des *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV), einem zu TBSV nahe verwandten (+)RNA-Virus, als *hotspot* der RISC-vermittelten RNA-Spaltung beschrieben wurde [108, 145].

Da zu diesem Zeitpunkt noch keine vsiRNAs aus dieser Region des TBSV bekannt waren, wurde die ShortCut RNaseIII zur Generierung eines Pools verschiedener vsiRNAs aus der (ds)R3.5-RNA verwendet. In späteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch im BYL vsiRNAs aus diesem Bereich durch die *in vitro* DCL-Aktivität generiert werden können (siehe Abbildung 3.10). Diese *in vitro* generierten vsiRNAs besitzen eine Länge von 21 - 24 nt, wobei überwiegend vsiRNAs mit einer Länge von 24 nt gebildet werden. Dies lässt darauf schließen, dass das BYL vor allem aktives DCL3 enthält, welches zur Synthese 24 nt langer siRNAs führt.

Ausgehend von dem ShortCut RNaseIII-generierten (ds)R3.5-siRNA-Pool sollten die vsiRNAs identifiziert werden, die zu einer effizienten Spaltung dieser R3.5-Region der DI-R3.5-*target*-RNA führen. Zu diesem Zweck wurde ein *cleavage assay* mit verschiedenen AGO/RISCs durchgeführt. Dabei wurde sowohl die (+)DI-R3.5- als auch die (-)DI-R3.5-RNA als *target*-RNA verwendet. Dies erlaubt die Identifizierung von vsiRNAs, die zur effizienten Spaltung der (+) oder der (-)RNA führen.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die (+)DI-R3.5-, als auch die (-)DI-R3.5-RNA effizient durch verschiedene AGO/RISCs gespalten werden können. Dabei erfolgte die Spaltung der (-)DI-R3.5-RNA mit höherer Effizienz als die Spaltung der (+)DI-R3.5-RNA (siehe Abbildung 3.11). Es wird vermutet, dass dieser Unterschied durch die unterschiedlich stark ausgeprägten Sekundärstrukturen der (+) und (-)DI-R3.5-RNA hervorgerufen wird.

Die Berechnung der Sekundärstrukturen der (+) und (-)DI-R3.5-RNA bei 25°C durch

das Strukturvorhersage-Programm *mfold* [180] ergibt für die (+)DI-R3.5-RNA eine freie Enthalpie ( $\Delta G$ ) von -319,04 kcal/mol, während die freie Enthalpie der (-)DI-R3.5 nur -265,99 kcal/mol beträgt. Obwohl die Strukturvorhersagen für lange RNAs oft ungenau sind [165], zeigen diese Berechnungen, dass es deutliche thermodynamische Unterschiede in den Sekundärstrukturen der (+) und (-)DI-R3.5-RNA gibt.

Trotzdem konnte auch für die (+)DI-R3.5-RNA eine RISC-vermittelte Spaltung detektiert werden. Die Spaltstellen lagen auch bei Verwendung unterschiedlicher AGO/RISCs innerhalb ähnlicher Bereiche der R3.5-Region. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Sekundärstruktur der *target*-RNA einen maßgeblichen Einfluss auf die Effizienz der RISC-vermittelten RNA-Spaltung besitzt [8].

Die Identifizierung der effizienten vsiRNAs erfolgte durch die Klonierung der 3'-Spaltfragmente der *NtAGO1*/RISC- und *AtAGO2*/RISC-vermittelten Spaltung der (+) bzw. (-)DI-R3.5-RNA durch 5'-RACE.

Die Spaltung einer *target*-RNA findet zwischen den beiden Nukleotiden statt, die komplementär zum 10. und 11. Nukleotid des sRNA-*guide strands* sind [32, 175]. Aus diesem Grund kann durch die Identifizierung des 5'-Nukleotids des 3'-Spaltfragments die Sequenz des korrespondierenden vsiRNA-*guide strands* abgeleitet werden. Da die Generierung der vsiRNA aus der doppelsträngigen R3.5-RNA erfolgte, besitzt der korrespondierende *passenger strand* eine vollständige Komplementarität zum identifizierten *guide strand*. Erwartungsgemäß besitzen alle mit Hilfe von *NtAGO1*/RISC identifizierten vsiRNAs ein 5'-U, alle vsiRNAs, die mit Hilfe des *AtAGO2*/RISC identifiziert wurden, beginnen mit einem 5'-A. Diese Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe der 5'-RACE mit hoher Wahrscheinlichkeit die richtigen vsiRNA-Sequenzen identifiziert werden konnten. Interessanterweise befinden sich die 3'-Enden der identifizierten *target*-Sequenzen jeweils in einem einzelsträngigen Bereich der R3.5-RNA (siehe Abbildung 3.12). Dies könnte die Bindung des 5'-Endes des siRNA-*guide strands* an die *target*-RNA erleichtern und so im Vergleich zu weniger zugänglichen RNA-Bereichen zu einer vermehrten Spaltung dieser RNA-Region führen. Dies könnte bedeuten, dass die Bindung des 5'-Endes einer siRNA ähnlich wie die *seed*-Region tierischer miRNAs eine höhere Bedeutung für die Funktionalität der jeweiligen siRNA besitzen als die Bindung des 3'-Endes, obwohl pflanzliche sRNA häufig eine vollständige Komplementarität zu ihrer *target*-RNA aufweisen. Der Einfluss der *target*-Sequenz auf die Effizienz der RISC-vermittelten RNA-Spaltung könnte durch die Kombination des *in vitro cleavage assays* mit experimentellen und theoretischen Analysen von RNA-Sekundärstrukturen weiter untersucht werden.

Neben der Sekundärstruktur können auch andere Faktoren wie die Ausbildung von Tertiärstrukturen oder die Bindung viraler Proteine oder zellulärer Wirtsfaktoren die Zugänglichkeit einer RNA-*target*-Sequenz beeinflussen. So konnte beispielsweise

gezeigt werden, dass die terminale *loop*-Struktur des *stem loops* B (SLB) der R3.5-Region eine RNA-RNA-Interaktion mit der 5'-NTR des TBSV-Genoms bzw. der RI-Region der (+)DI-R3.5-RNA vermittelt und so die Translationsinitiation am 5'-Ende des viralen Genoms ermöglicht [33]. Dies könnte erklären, warum nur vsiRNAs, die gegen die SLA-Helix der R3.5-Region gerichtet sind, eine effiziente RNA-Spaltung ermöglichen, obwohl auch der SLB und SLC partiell einzelsträngige Bereiche und ungepaarte Nukleotide besitzen (siehe Abbildung 3.12).

#### 4.5 vsiRNA1 zeigt eine antivirale Wirkung *in vivo*

Um die Replikation und Verbreitung von pathogenen Pflanzenviren zu unterbinden werden häufig transgene Pflanzen erzeugt, die Teile eines viralen Genoms exprimieren. Eine Möglichkeit ist die Überexpression langer doppelsträngiger RNAs. Diese werden anschließend durch die wirtseigene DCL-Aktivität zu sRNAs prozessiert. Diese (ds)RNA können beispielsweise als komplementäre Transkripte oder als lange *hairpin*-Konstrukte exprimiert werden. Diese Expression langer *hairpin*-Konstrukte ist vor allem schnell und kostengünstig durchführbar. Ein Nachteil dieser Methode ist die Gefahr von *off target* Effekten. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass vsiRNAs des *Grapevine fleck virus* (GFkV) und des *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) zur Spaltung wirtseigener mRNAs von *Vitis vinifera*-Pflanzen führen können [89]. Die Expression langer viraler *hairpin*-Konstrukte könnte so zu einer Modulation zellulärer Prozesse führen und das Wachstum und die Entwicklung der jeweiligen Wirtspflanzen beeinflussen. Des Weiteren besitzen nicht alle, die aus den langen *hairpin*-Konstrukten prozessierten vsiRNAs, die gleiche Effizienz der Spaltung der viralen *target*-RNA, da diese nicht allein von der siRNA, sondern auch von lokalen Strukturen innerhalb der viralen *target*-RNA abhängt [79, 107, 131]. Außerdem gibt es bei dieser Methode oft Bedenken bezüglich der biologischen Sicherheit, da eine Komplementation der inserierten Sequenzen mit anderen Pflanzenviren nicht ausgeschlossen werden kann [36].

Eine andere Möglichkeit ist die Überexpression kurzer *hairpin*-RNAs, die auf dem *backbone* eines pflanzlichen miRNA-*precursors* basieren und als *artificial* miRNAs (amiRNAs) bezeichnet werden. Auf Grund der kurzen Sequenz dieser Konstrukte sinkt die Wahrscheinlichkeit von *off target* Effekten. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Überexpression einer amiRNA zu einer Resistenz von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen gegenüber Infektionen des *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) und des *Turnip mosaic virus* (TMV) führt [98]. Dagegen führte die Überexpression einer amiRNA, die gegen die RNA-Sequenz des *silencing* Suppressors 2b des *Cucumber mosaic*



*virus* (CMV) gerichtet ist, zur Ausbildung unterschiedlicher Phänotypen. So zeigen einige Pflanzen eine Resistenz gegenüber einer CMV-Infektion oder einen verzögerten Infektionsverlauf. Andere Pflanzen zeigten hingegen eine höhere Suszeptibilität gegenüber der CMV-Infektion [123].

Um zu untersuchen, ob die *in vitro* identifizierte vsiRNA1 auch *in vivo* eine antivirale Aktivität besitzt, wurde die vsiRNA1-Sequenz transient mittels *Agrobacterium tumefaciens* in *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen überexprimiert. Als Negativkontrolle wurde die gf698-siRNA verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der avsiRNA1 im Vergleich zu den gf698-Kontrollpflanzen zu einem verzögerten Infektionsverlauf und einer verminderten Menge viraler (+)RNA in jungen Blättern führte (siehe Abbildung 3.14). So zeigten avsiRNA1-behandelte Pflanzen 7 Tage nach der Inokulation der TBSV-RNA keine sichtbaren äußeren Symptome einer TBSV-Infektion. Allerdings konnte zu diesem Zeitpunkt bereits die (+)TBSV-RNA durch qRT-PCR nachgewiesen werden. Obwohl in den jungen Blättern der avsiRNA1-behandelten Pflanzen eine geringere Menge (+)RNA als in den agf698-behandelten Pflanzen nachgewiesen werden konnte, zeigen diese Ergebnisse, dass sich auch in den avsiRNA1-behandelten Pflanzen eine systemische TBSV-Infektion etablieren konnte. Aus diesem Grund zeigten auch die avsiRNA1-behandelten Pflanzen 12 Tage nach der Inokulation der TBSV-RNA erste Symptome einer TBSV-Infektion. Zusätzlich konnten zu diesem Zeitpunkt virale Partikel aus den jungen Blättern der avsiRNA1-behandelten Pflanzen isoliert werden.

Es sind verschiedene Ursachen für die unvollständige Resistenz der avsiRNA1-behandelten Pflanzen gegenüber der TBSV-Infektion denkbar. Zum Einen erfolgte die Inokulation der TBSV-RNA durch die *rub in* Methode. Dabei werden der Blattoberseite auf einer Fläche von 1 cm<sup>2</sup> mechanisch kleine Mikroverletzungen zugefügt. Anschließend wird das behandelte Areal mit 10 µg TBSV-RNA versetzt. Diese Methode ist schnell und kostengünstig durchführbar, lässt sich jedoch schlecht standardisieren. Des Weiteren ist eine relativ große Menge TBSV-RNA notwendig, um eine Infektion des behandelten Blattbereichs hervorzurufen. Es ist denkbar, dass auf Grund der hohen Menge an TBSV-*input*-RNA keine vollständige Spaltung der viralen RNA innerhalb des behandelten Blattbereichs möglich ist, sodass sich trotz der Überexpression der avsiRNA1 eine TBSV-Infektion etablieren konnte. Als Alternative könnte die TBSV-RNA mittels *gene gun* in die Blätter der *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen eingebracht werden. Bei dieser Methode werden Goldpartikel mit der jeweiligen Nukleinsäure beschichtet und das Blattmaterial durch Luftdruck mit den Goldpartikeln beschossen, die dabei die Zellen durchdringen und die Nukleinsäuren freisetzen. Die Verwendung der Genkanone könnte die Menge an TBSV-*input*-RNA vermindern und eine höhere Reproduzierbarkeit der Experimente als die *rub in* Inokulation gewährleisten.

Eine weitere mögliche Ursache für die unvollständige TBSV-Resistenz der avsiRNA1-behandelten Pflanzen könnte das Fehlen einer funktionellen RDR in *Nicotiana benthamiana* sein [168]. Aus diesem Grund werden in *Nicotiana benthamiana* im Gegensatz zu anderen *Nicotiana*-Spezies keine sekundären vsiRNAs gebildet, sodass keine systemische Immunität und Verstärkung der antiviralen Immunantwort ausgelöst werden kann. Die Verwendung eines anderen pflanzlichen Systems für die *in vivo* Experimente könnte dieses Problem umgehen. Des Weiteren könnte die Co-Expression weiterer avsiRNAs wie der vsiRNA2 zu einer Verstärkung der TBSV-Resistenz behandelter Pflanzen führen, da auch andere AGO/RISCs an der antiviralen Immunabwehr beteiligt wären. So wird beispielsweise vermutet, dass *NbAGO2* in *Nicotiana benthamiana* eine bedeutendere Rolle im antiviralen RNA-silencing spielt als *NbAGO1* [129]. Aus diesem Grund könnte die Überexpression der avsiRNA2 zur Ausbildung einer stärkeren Resistenz der behandelten Pflanzen gegenüber der TBSV-Infektion führen als die Überexpression der avsiRNA1. Außerdem würde die Expression unterschiedlicher avsiRNAs einer möglichen Resistenzentwicklung des TBSV gegenüber der avsiRNA1 entgegenwirken.

Obwohl die durchgeführten *in vivo* Experimente bisher nicht soweit optimiert wurden, um eine vollständige Resistenz der *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen gegenüber einer TBSV-Infektion zu vermitteln, stellt das BYL ein effizientes und schnelles System zur Identifizierung antiviraler vsiRNAs dar. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da die Identifizierung effizienter vsiRNAs die Voraussetzung für eine erfolgreiche Vaccinierung von Pflanzen durch avsiRNAs ist.

#### **4.6 vsiRNAs können direkt aus dem viralen Genom prozessiert werden**

Nachdem in den vorhergehenden Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass das BYL ein geeignetes System zur Identifizierung effizienter vsiRNAs aus doppelsträngiger viraler RNA darstellt, sollte anschließend untersucht werden, ob auch das virale Genom ein direktes Substrat für die DCL-abhängige vsiRNA-Generierung darstellen kann. Dies ist von Bedeutung, da für verschiedene Pflanzenviren gezeigt werden konnte, dass der Großteil gebildeter vsiRNAs aus den jeweiligen (+)RNAs stammt [31, 49, 91, 145]. Ursprünglich wurde vermutet, dass die Ursache für die Anreicherung der (+)vsiRNAs ein besonders effizienter Einbau der (+)vsiRNAs in RISCs [158] oder ein verstärkter Abbau der RISCs ist, die (-)vsiRNAs enthalten [29].

Ein erster indirekter Hinweis dafür, dass vsiRNAs auch aus stark strukturierten Bereichen der (+)RNA stammen könnten, wurde durch vsiRNA-Profil-Analysen von CymRSV

erbracht. Es konnte gezeigt werden, dass 93% der während einer CymRSV-Infektion gebildeten vsiRNAs der Sequenz der viralen (+)RNA entsprechen [91]. Des Weiteren zeigten die Duplexe der isolierten vsiRNAs keine vollständige Basenpaarung, wie es bei der Prozessierung doppelsträngiger RNA zu erwarten gewesen wäre. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Großteil der CymRSV-vsiRNAs in *Nicotiana benthamiana* direkt aus dem viralen Genom prozessiert wird [91, 145].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die (+)RNA von TBSV *in vitro* ein direktes Substrat für die DCL-vermittelte vsiRNA-Generierung sein kann. Dabei wurden vsiRNAs mit einer Länge von 21 nt - 24 nt detektiert (siehe Abbildung ref-fig:Verteilung). Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit CymRSV, bei denen vor allem vsiRNAs mit einer Länge von 21 nt und 22 nt identifiziert wurden [91], führte die *in vitro* Prozessierung der (+)DI-R3.5-RNA im BYL vor allem zur Bildung von vsiRNAs mit einer Länge von 24 nt. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass das BYL sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Proteine enthalten kann, während *in vivo* nur DCL2 und DCL4 im Zytoplasma der Zelle lokalisiert sind und dort zur Prozessierung der viralen RNA zu vsiRNAs mit einer Länge von 21 nt und 22 nt führen [13].

Neben den vsiRNAs mit einer Länge von 24 nt entstehen im BYL ebenfalls vsiRNAs mit einer Länge von 21 nt und 22 nt, die wahrscheinlich durch DCL4 und DCL2 prozessiert werden. Da die Sekundärstruktur der viralen (+)RNA viele ungepaarte Bereiche wie *bulges* und *loops* aufweist und damit der Struktur von miRNA-*precursors* ähnelt, kann jedoch auch eine Beteiligung von DCL1 bei der *in vitro* vsiRNA-Prozessierung aus der viralen (+)RNA nicht ausgeschlossen werden.

Sowohl die vsiRNA-Profile der DI-R3.5-RNA (siehe Abbildung 3.18) als auch des TBSV-Genoms (Daten nicht gezeigt) zeigen, dass ähnlich wie bei CymRSV vor allem vsiRNAs aus der 3'-NTR der viralen RNA generiert werden. Eine mögliche Ursache ist, dass die virale RNA in diesem Bereich eine ausgeprägte Sekundärstruktur aufweist und damit einen *hotspot* für die vsiRNA-Generierung darstellt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das virale Genom ein direktes Substrat für die vsiRNA-Generierung sein kann, sollte untersucht werden, ob diese (+)vsiRNAs auch die Spaltung der viralen (+)RNA vermitteln können. Zu diesem Zweck wurden Immunpräzipitationen von AGO/RISCs durchgeführt, die mit den zuvor beschriebenen (+)vsiRNAs programmiert wurden. Anschließend wurden die coimmunpräzipitierten vsiRNAs isoliert und durch Illumina *next generation sequencing* identifiziert (siehe Abbildung 3.19).

Da nach der Bindung einer vsiRNAs durch ein AGO-Protein ein Strang des vsiRNA-Duplexes entfernt wird, können mit dieser Methode nur vsiRNA-*guide strands* identi-

fiziert werden. Aus diesem Grund kann keine Aussage über die Identität der authentischen *passenger strands* getroffen werden. Deshalb wurden die *passenger strands* als vollständig komplementäre RNA-Stränge von den jeweiligen *guide strands* abgeleitet, die identifizierten (+)vsiRNAs in einem *cleavage assay* auf ihre Spaltungseffizienz testen zu können.

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass 2 der 10 untersuchten vsiRNAs (siTVDI92 und siTVDI93) zu einer detektierbaren RISC-vermittelten Spaltung der (+)DI-R3.5-RNA führen können. Die Spaltung der (-)DI-R3.5-RNA durch die restlichen 8 (+)vsiRNAs zeigt jedoch, dass auch diese (+)vsiRNAs durch AGO/RISC gebunden werden können. Aus diesem Grund kann eine fehlende Bindung dieser (+)vsiRNAs durch AGO/RISC als Ursache für die fehlende (+)RNA-Spaltung ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 3.24).

Wie bereits erläutert könnte die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen der (+)DI-R3.5-RNA eine mögliche Ursache für die fehlende Spaltung der (+)RNA durch diese 8 vsiRNAs darstellen. Da es sich bei der DI-R3.5-RNA um eine relativ kurze virale RNA handelt, die zusätzlich viele RNA-Elemente enthält, die die Bindung verschiedener Komponenten des Replikationskomplexes vermitteln, könnte die Zugänglichkeit der vsiRNA-*target*-Sequenzen zusätzlichen durch die Bindung viraler und wirtseigener Proteine an die (+)DI-R3.5-RNA vermindert werden. Aus diesen Gründen könnten DI-RNAs allgemein schlechte *targets* der RISC-vermittelten RNA-Spaltung darstellen [144]. Aus diesem Grund sollen in zukünftigen Experimenten zusätzlich zu den (+)vsiRNAs der (+)DI-R3.5-RNA auch (+)vsiRNAs aus weniger stark strukturierten Regionen der genomischen TBSV-RNA untersucht werden.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Das RNA-*silencing* ist ein Mechanismus der Genregulation in Eukaryoten, der durch kleine RNAs mediiert wird. Er spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen, wie z.B. der Abwehr von Viren. Auf Grund der vielschichtigen Wechselwirkungen zwischen Wirt und Pathogen, handelt es sich beim antiviralen RNA-*silencing*, um einen komplexen Prozess, in dem viele der beteiligten Faktoren redundante Funktionen besitzen.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden in BYL, einem zytoplasmatischen Extrakt aus entvakuolisierten *Nicotiana tabacum*-Protoplasten durchgeführt. Dieses System erlaubt die Rekonstitution des antiviralen RNA-*silencings in vitro*.

- Das BYL besitzt eine endogene DCL-Aktivität. Diese ermöglicht die *in vitro* Prozessierung von vsiRNAs mit einer Länge von 21 nt - 24 nt aus doppel- und einzelsträngigen viralen RNAs. In weitergehenden Analysen könnte untersucht werden welche DCL-Proteine die Prozessierung der vsiRNAs vermitteln.
- Die *in vitro* Translation einer AGO-mRNA in Anwesenheit einer exogenen siRNA oder eines siRNA-Pools erlaubt die Formierung aktiver RISCs. Dies erlaubt die Programmierung spezifischer AGO/RISCs gegen eine bestimmte *target*-Sequenz mit Hilfe definierter siRNAs. Auf diese Weise wurden verschiedene AGO-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana benthamiana* bezüglich ihrer 5'-Nukleotid-Bindungsspezifität und ihrer endonukleolytischen Aktivität untersucht. Dabei verbleiben Unklarheiten bezüglich des Mechanismus der RNA-Spaltung von *AtAGO4/RISC* und *AtAGO9/RISC*. Für *AtAGO6* konnte bisher keine endonukleolytische Aktivität im BYL nachgewiesen werden.
- Die Sekundärstruktur der *target*-Sequenz hat einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz der RISC-vermittelten RNA-Spaltung. Ungepaarte Sequenzbereiche werden mit einer höheren Effizienz gespalten als doppelsträngige RNA-Helices.
- Die endogene DCL-Aktivität und die RISC-vermittelte RNA-Spaltung erlauben die vollständige Rekonstitution des antiviralen RNA-*silencings in vitro*. Dies ermöglicht die Untersuchung des direkten Einflusses von AGO/RISCs auf die virale Replikation. Alle untersuchten AGO/RISCs, die eine effiziente Spaltung nicht-replizierender RNA-Transkripte vermittelten, führten auch zu einer verminderten Bildung von Replikationsprodukten und besitzen damit *in vitro* eine antivirale Aktivität.

- Das BYL ermöglicht die Identifizierung von vsiRNAs, die sowohl aus doppelsträngiger als auch einzelsträngiger RNA gebildet werden können. Es wurde gezeigt, dass solche vsiRNAs auch *in vivo* eine antivirale Aktivität besitzen können. Langfristig könnte das BYL genutzt werden, um effiziente vsiRNAs aus TBSV und anderen (+)RNA-Viren zu identifizieren und diese für die Erzeugung virusresistenter transgener Pflanzen zu nutzen.
- Die Inhibition der Replikation von (+)RNA-Viren erfolgt durch die RISC-vermittelte Spaltung neu synthetisierter (+)RNA-Moleküle. Das (-)RNA-Replikationsintermediat stellt dagegen während der Replikation kein *target* der RISC-vermittelte RNA-Spaltung dar, obwohl das entsprechende nicht replizierende (-)RNA-Transkript mit großer Effizienz durch verschiedene AGO/RISCs gespalten werden kann. Dies ist von Bedeutung, da der Großteil an vsiRNAs bei verschiedenen viralen Infektionen aus der (+)RNA generiert wird. Dabei ist unklar, ob diese (+)vsiRNAs eine Funktion im antiviralen RNA-*silencing* besitzen
- Es wurden erste Hinweise erhalten, dass (+)vsiRNAs zu einer RISC-vermittelten Spaltung der (+)RNA führen können. Diese (+)RNA-Spaltung erfolgte bisher jedoch mit geringer Effizienz. Aus diesem Grund werden zukünftig weitere (+)vsiRNAs auf ihre Spaltungseffizienz untersucht.

Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit konnten bereits verschiedene Projekte zur Aufklärung weiterführender Aspekte des RNA-*silencings* etabliert werden.

So konnte gezeigt werden, dass das BYL auch die Funktion des viralen *silencings*-Suppressors p19 mediiert. Aus diesem Grund wird das BYL in weiterführenden Analysen genutzt, um die Funktion des p19 und anderer viraler *silencing*-Suppressoren zu untersuchen. In weiterführenden Experimenten konnten gezeigt werden, dass das BYL auch zur Untersuchung der Funktion anderer sRNAs wie miRNAs (persönliche Mitteilung von Dr. T. Gursinsky) oder nat-siRNAs geeignet ist und so die Analyse zu Grunde liegenden Mechanismen des posttranskriptionellen Gen-*silencings* ermöglichen könnte. Des Weiteren könnte die Kombination funktioneller *in vitro* Untersuchungen der RNA-Spaltung im BYL mit experimentellen und theoretischen Sekundärstruktur-Analyse[4] lisen verschiedener *target*-RNAs das Verständnis des Einflusses der Sekundärstruktur auf die Effizienz der RNA-Spaltung erweitern und die *in silico* Vorhersage effizienter pflanzlicher siRNAs verbessern. Dabei müsste die Analyse der RISC-vermittelten RNA-Spaltung nicht auf virale RNAs beschränkt bleiben, sondern könnte auch auf andere RNA-Spezies ausgeweitet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass das BYL ein authentisches pflanzliches *in vitro* System für die Untersuchung des antiviralen RNA-*silencings* darstellt. Die

---

Etablierung des BYL stellt damit vor allem einen entscheidenden Beitrag zur mechanistischen Analyse verschiedener Aspekte des antiviralen RNA-*silencings* dar.

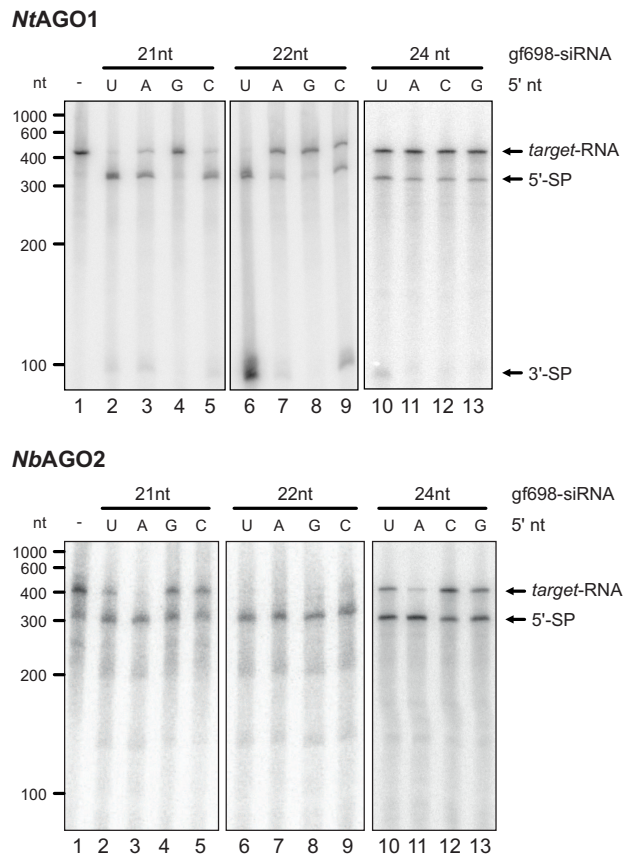




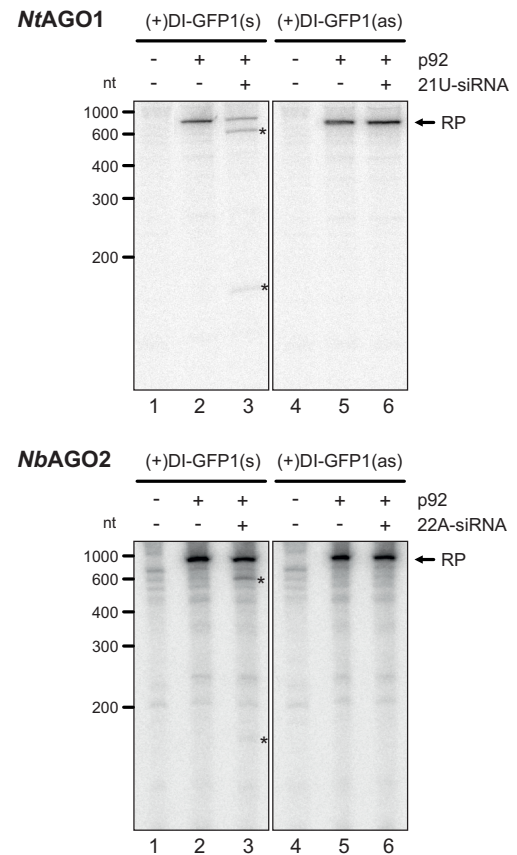
## 6 ANHANG

### Antivirales RNA-silencing durch verschiedene AGO/RISCs

#### A Cleavage Assay



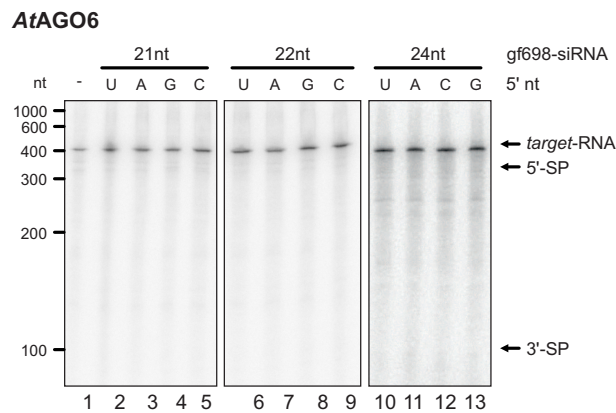
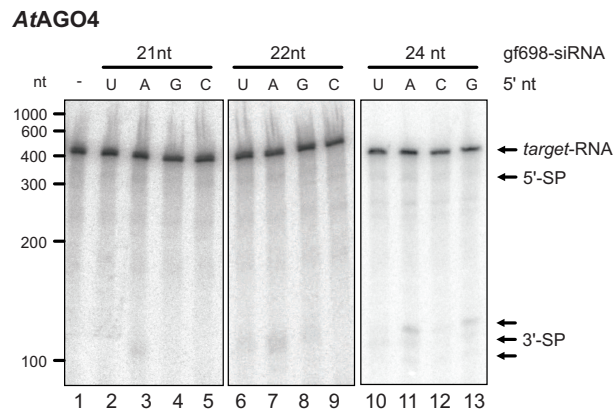
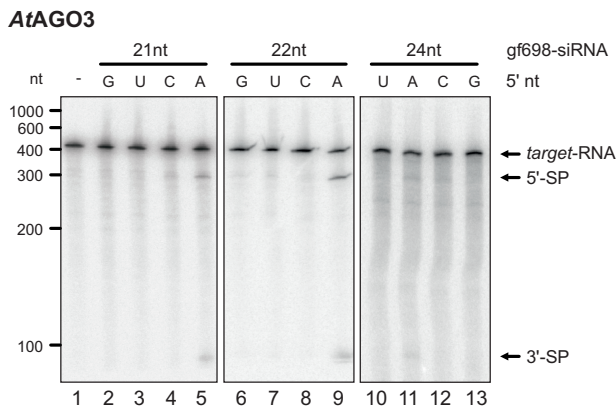
#### B Replikations-Inhibitionsassay



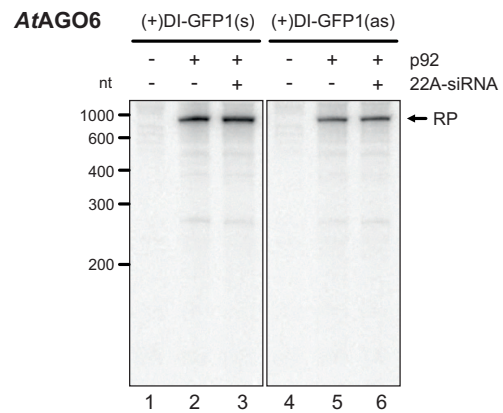
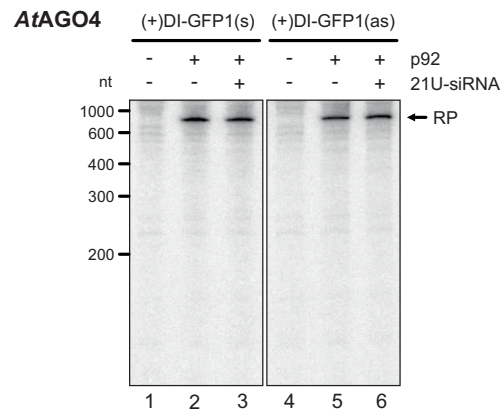
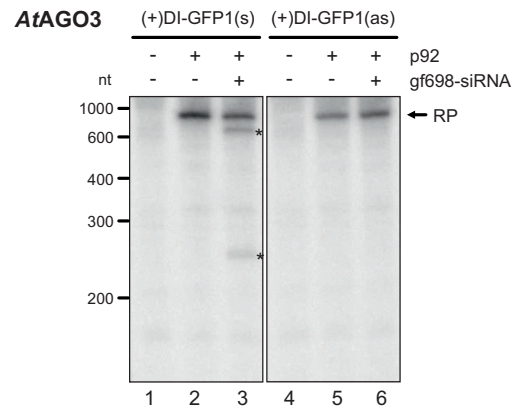
#### Abbildung 6.1 Antivirales RNA-silencing durch NtAGO1/RISC und NbAGO2/RISC.

(A) Cleavage assays für NtAGO1/RISC und NbAGO2/RISC unter Verwendung verschiedener gf698-siRNA-Varianten und <sup>32</sup>P-markierter GFP-target-RNA. Die Beladung der *in vitro* translatierten AGO-Proteine erfolgte mit 21 nt (Spuren 2-5), 22 nt (Spuren 6-9) und 24 nt (Spuren 10-13) langen gf698-siRNAs. Das 5'-Nukleotid der entsprechenden gf698-siRNAs wurde dabei variiert. Die Detektion der Spaltprodukte (SP) erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein cleavage assay in Abwesenheit der gf698-siRNA durchgeführt. (B) Replikations-Inhibitionsassay mit (+)DI-GFP1 RNA und NtAGO1/RISC und NbAGO2/RISC. Die Beladung der RISCs erfolgte mit verschiedenen 21 nt gf698-siRNA-Varianten, die ein 5'-U (NtAGO1) und 5'-A (NbAGO2) aufwiesen. Die programmierten RISCs wurden zu TBSV-Replikationsreaktionen hinzugeben und die Replikation durch Zugabe von (+)DI-GFP1(s) oder (+)DI-GFP1(as) initiiert. Die Replikationsprodukte (RP) und Spaltprodukte (Stern) sind gekennzeichnet.

**A Cleavage Assay**

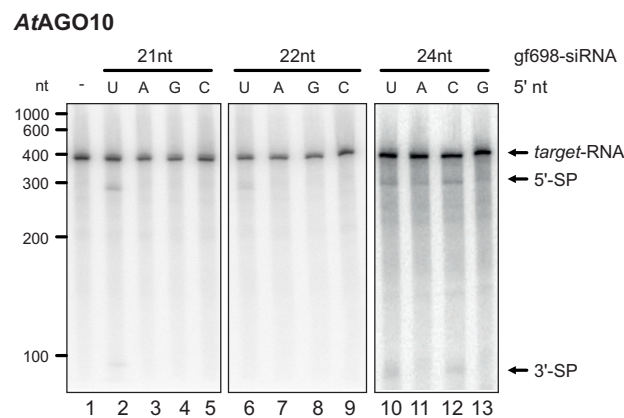
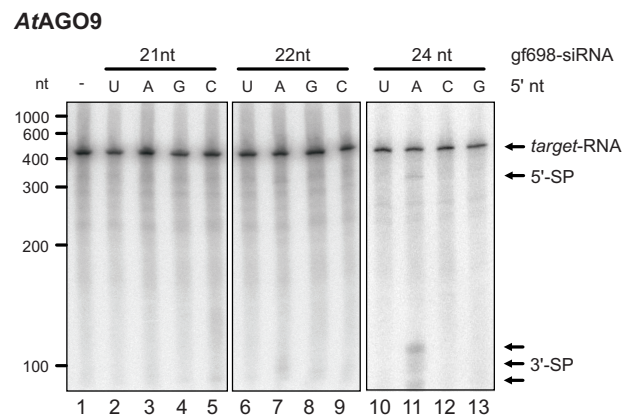
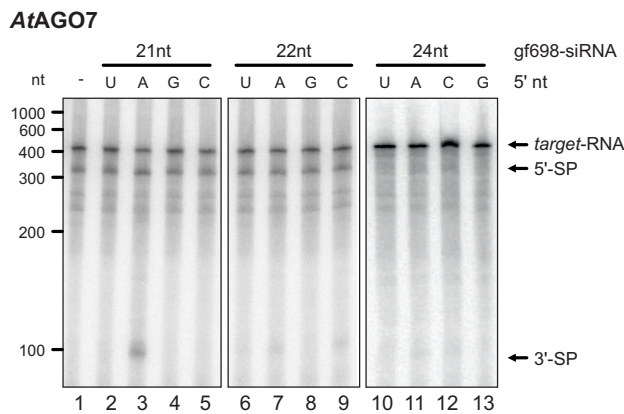


**B Replikations-Inhibitionsassay**

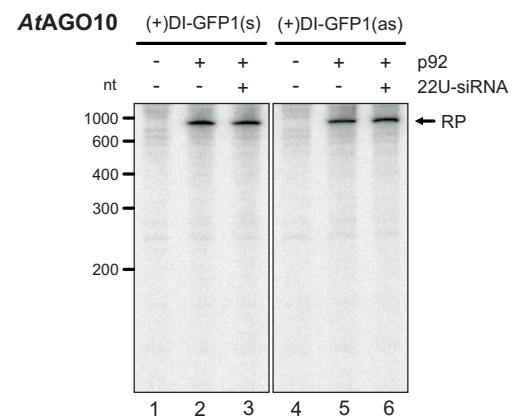
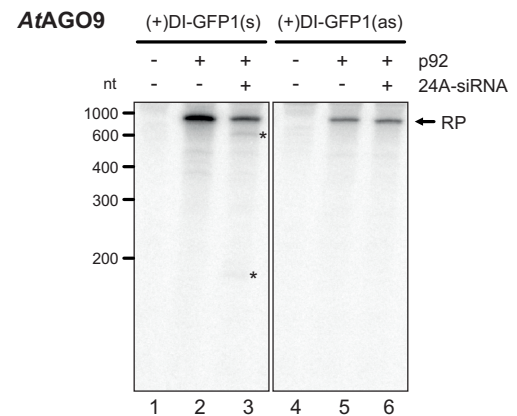
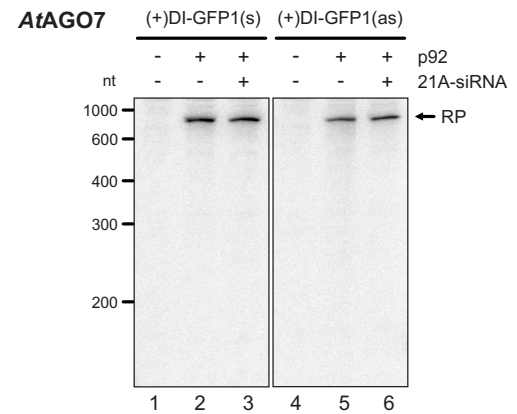


**Abbildung 6.2 Antivirales RNA-silencing durch AtAGO3/RISC, AtAGO4/RISC und AtAGO6/RISC. (A) Cleavage assays** für AtAGO3/RISC, AtAGO4/RISC und AtAGO6/RISC unter Verwendung verschiedener gf698-siRNA-Varianten und <sup>32</sup>P-markierter GFP-target-RNA. Die Beladung der *in vitro* translatierten AGO-Proteine erfolgte mit 21 nt (Spuren 2 - 5), 22 nt (Spuren 6 - 9) und 24 nt (Spuren 10 - 13) langen gf698-siRNAs. Das 5'-Nukleotid der entsprechenden gf698-siRNAs wurde dabei variiert. Die Detektion der Spaltprodukte (SP) erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein *cleavage assay* in Abwesenheit der gf698-siRNA durchgeführt. **(B) Replikations-Inhibitionsassay** mit (+)DI-GFP1 RNA und AtAGO3/RISC, AtAGO4/RISC und AtAGO6/RISC. Die Beladung der RISCs erfolgte mit verschiedenen 21 nt gf698-siRNA-Varianten, die ein 5'-U (*NtAGO1*) und 5'-A (*NbAGO2*) aufwiesen. Die programmierten RISCs wurden zu TBSV-Replikationsreaktionen hinzugeben und die Replikation durch Zugabe von (+)DI-GFP1(s) oder (+)DI-GFP1(as) initiiert. Die Replikationsprodukte (RP) und Spaltprodukte (Stern) sind gekennzeichnet.

## A Cleavage Assay



## B Replikations-Inhibitionsassay



**Abbildung 6.3 Antivirales RNA-silencing durch AtAGO7/RISC, AtAGO9/RISC und AtAGO10/RISC. (A) Cleavage assays** für AtAGO7/RISC, AtAGO9/RISC und AtAGO10/RISC unter Verwendung verschiedener gf698-siRNA-Varianten und <sup>32</sup>P-markierter GFP-target-RNA. Die Beladung der *in vitro* translatierten AGO-Proteine erfolgte mit 21 nt (Spuren 2 - 5), 22 nt (Spuren 6 - 9) und 24 nt (Spuren 10 - 13) langen gf698-siRNAs. Das 5'-Nukleotid der entsprechenden gf698-siRNAs wurde dabei variiert. Die Detektion der Spaltprodukte (SP) erfolgte durch denaturierende PAGE und Autoradiographie. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein *cleavage assay* in Abwesenheit der gf698-siRNA durchgeführt. **(B) Replikations-Inhibitionsassay** mit (+)DI-GFP1 RNA und AtAGO3/RISC, AtAGO4/RISC und AtAGO6/RISC. Die Beladung der RISCs erfolgte mit verschiedenen 21 nt gf698-siRNA-Varianten, die ein 5'-U (*NtAGO1*) und 5'-A (*NbAGO2*) aufwiesen. Die programmierten RISCs wurden zu TBSV-Replikationsreaktionen hinzugeben und die Replikation durch Zugabe von (+)DI-GFP1(s) oder (+)DI-GFP1(as) initiiert. Die Replikationsprodukte (RP) und Spaltprodukte (Stern) sind gekennzeichnet.

## Vektoren und Plasmidkonstruktion

pGEM-T Easy	Promega, Madison, USA
pUC18	Thermo Scientific, Bonn, D
pSP64-Poly(A)	Promega, Madison, USA
pGFP-C1	Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg, D
pSP-luc	Promega, Madison, USA
pBGWFS7	Karimi et al. 2002 [150]

Der pBGWFS7-Vektor enthält einen 35S-Promotor und wurde freundlicher Weise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Bonas (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) im Rahmen des GRK1591 zur Verfügung gestellt.

## Plasmidkonstruktion

**NtAGO1-pSP64-Poly(A)LF2:** Die kodierende Sequenz von *NtAGO1* (AB542739) wurde mit den Primern AGO1Nt1f und AGO1Nt1r mittels PCR aus einer *tobacco leaf* cDNA-Bibliothek (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) amplifiziert und durch den Restriktionsverdau mit XbaI und SmaI in den modifizierten pSP64-Poly(A)-Vektor kloniert. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit SmaI (Thermo Scientific).

**AtAGO1-pSP64-Poly(A)LF2:** Die kodierende Sequenz von *AtAGO1* (NM\_179453) wurde mit den Primern AGO1At1f und AGO1At1r mittels RT-PCR von RNA aus Blättern von *A. thaliana* amplifiziert und durch den Restriktionsverdau mit NheI und SmaI in den modifizierten pSP64-Poly(A)-Vektor kloniert, der zuvor mit XbaI und SmaI verdaut wurde. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit SmaI (Thermo Scientific).

**NbAGO2-pSP64-Poly(A)LF2:** Die kodierende Sequenz von *NbAGO2* [129] wurde mit den Primern AGO2Nb1f und AGO2Nb1r mittels RT-PCR von RNA aus Blättern von *N. benthamiana* amplifiziert und durch den Restriktionsverdau mit XbaI und SmaI in den modifizierten pSP64-Poly(A)-Vektor kloniert. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit SmaI (Thermo Scientific).

**AtAGO2-pSP64-Poly(A)LF2:** Die kodierende Sequenz von *AtAGO2* (NM\_102866) wurde mit den Primern AGO2At1f und AGO2At1r mittels RT-PCR von RNA aus Blättern von *A. thaliana* amplifiziert und durch den Restriktionsverdau mit XbaI und SmaI in den

---

modifizierten pSP64-Poly(A)-Vektor kloniert. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit Smil (Thermo Scientific).

**AtAGO3-pSP64-Poly(A)LF2:** Die kodierende Sequenz von *AtAGO3* (NM\_102867) wurde durch Joanna Jagoda mit den Primern AGO3At1f und AGO3At1r mittels RT-PCR von RNA aus Blättern von *A. thaliana* amplifiziert und durch den Restriktionsverdau mit Sall und Smal in den modifizierten pSP64-Poly(A)-Vektor kloniert. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit Smil (Thermo Scientific).

**AtAGO4-pSP64-Poly(A)LF2:** Die kodierende Sequenz von *AtAGO4* (NM\_128262) wurde mit den Primern AGO4At1f und AGO4At1r mittels RT-PCR von RNA aus Blättern von *A. thaliana* amplifiziert und durch den Restriktionsverdau mit XbaI und Smal in den modifizierten pSP64-Poly(A)-Vektor kloniert. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit Smil (Thermo Scientific).

**AtAGO5-pSP64-Poly(A)LF2:** Die kodierende Sequenz von *AtAGO5* (NM\_179779) wurde mit den Primern AGO5At1f und AGO5At1r mittels RT-PCR von RNA aus Blättern von *A. thaliana* amplifiziert und durch den Restriktionsverdau mit XbaI und Smal in den modifizierten pSP64-Poly(A)-Vektor kloniert. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit Smil (Thermo Scientific).

**AtAGO6-pSP64-Poly(A)LF2:** Die kodierende Sequenz von *AtAGO6* (NM\_128854) wurde durch Joanna Jagoda mit den Primern AGO6At1f und AGO6At1r mittels RT-PCR von RNA aus Blättern von *A. thaliana* amplifiziert und durch den Restriktionsverdau mit XbaI und Smal in den modifizierten pSP64-Poly(A)-Vektor kloniert. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit Smil (Thermo Scientific).

**AtAGO7-pSP64-Poly(A)LF2:** Die kodierende Sequenz von *AtAGO7* (NM\_105611) wurde mit den Primern AGO7At1f und AGO7At1r mittels RT-PCR von RNA aus Blättern von *A. thaliana* amplifiziert und durch den Restriktionsverdau mit XbaI und Smal in den modifizierten pSP64-Poly(A)-Vektor kloniert. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit Smil (Thermo Scientific).

**AtAGO9-pSP64-Poly(A)LF2:** Die kodierende Sequenz von *AtAGO9* (NM\_122122) wurde mit den Primern AGO9At1f und AGO9At1r mittels RT-PCR von RNA aus Blättern von *A. thaliana* amplifiziert und durch den Restriktionsverdau mit XbaI und Smal in den

modifizierten pSP64-Poly(A)-Vektor kloniert. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit SmaI (Thermo Scientific).

**AtAGO10-pSP64-Poly(A)LF2:** Die kodierende Sequenz von AtAGO10 (NM\_123748) wurde mit den Primern AGO10At1f und AGO10At1r mittels RT-PCR von RNA aus Blättern von *A. thaliana* amplifiziert und durch den Restriktionsverdau mit XbaI und SmaI in den modifizierten pSP64-Poly(A)-Vektor kloniert. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit SmaI (Thermo Scientific).

**TBSV-Genom:** Der cDNA-Klon des (+)TBSV-Genoms (T100) wurde freundlicher Weise von Herman Scholthof (A&M University, Texas, USA) zur Verfügung gestellt. Die Konstruktion wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben [47]. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit SmaI (Thermo Scientific). Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* der (-)TBSV-Sequenz erfolgte mittels PCR unter Verwendung der Primer TVmTra1f und T7TVmTra1r.

**pSPTVP33:** Das Plasmid kodiert für die p33-mRNA von TBSV und wurde freundlicher Weise von Dr. Torsten Gursinsky zur Verfügung gestellt. Die Konstruktion wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben [47]. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit XhoI (Thermo Scientific).

**pSPTVP92Y:** Das Plasmid kodiert für die p92-mRNA von TBSV und wurde freundlicher Weise von Dr. Torsten Gursinsky zur Verfügung gestellt. Die Konstruktion wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben [47]. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit XhoI (Thermo Scientific).

**DI-B10:** Der cDNA-Klon der (+)DI-B10-RNA wurde freundlicher Weise von Herman Scholthof (A&M University, Texas, USA) zur Verfügung gestellt. Die Konstruktion wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben [64]. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* der (+)DI-B10-Sequenz erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit SmaI (Thermo Scientific). Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* der (-)DI-B10-Sequenz erfolgte mittels PCR unter Verwendung der Primer TVmTra1f und T7TVmTra1r.

**DI-R3.5:** Die Sequenz der DI-R3.5-DNA wurde durch Dr. Torsten Gursinsky mit den Primern TV5UTR1f und TV3UTR1r mittels PCR amplifiziert und durch Restriktionsverdau

---

mit XbaI und SmaI in den pUC18-Vektor kloniert. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* der (+)DI-R3.5-Sequenz erfolgte durch Linearisierung des Plasmids mit SmaI (Thermo Scientific). Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* der (-)DI-R3.5-Sequenz erfolgte mittels PCR unter Verwendung der Primer TVmTra1f und T7TVmTra1r.

**(+)DI-GFP1(s):** Die 5'-Sequenz des DI-R3.5-DNA wurde durch die Primer TV5UTR1f und DIGFPFus4r mittels PCR amplifiziert und mit XbaI und BpI behandelt. Die 3'-Sequenz des DI-R3.5-DNA wurde durch die Primer DIGFPFus4f und TV3UTR1r amplifiziert und mit BpI und SmaI behandelt. Für die Insertion der GFP-*target*-Sequenz wurden die Primer GFPsiFus3f und GFPsiFus3r hybridisiert und zusammen mit den 5'- und 3'-PCR-Fragmenten in den XbaI- und SmaI-behandelten pUC18-Vektor kloniert. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* der (-)DI-GFP1(s)-Sequenz erfolgte mittels PCR unter Verwendung der Primer TVmTra1f und T7TVmTra1r.

**(+)DI-GFP2(s):** Die 5'-Sequenz des DI-R3.5-DNA wurde durch die Primer TV5UTR1f und DIGFPFus5r mittels PCR amplifiziert und mit XbaI und BpI behandelt. Die 3'-Sequenz des DI-R3.5-DNA wurde durch die Primer DIGFPFus5f und TV3UTR1r amplifiziert und mit BpI und SmaI behandelt. Für die Insertion der GFP-*target*-Sequenz wurden die Primer GFPsiFus4f und GFPsiFus4r hybridisiert und zusammen mit den 5'- und 3'-PCR-Fragmenten in den XbaI- und SmaI-behandelten pUC18-Vektor kloniert. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* der (-)DI-GFP2(s)-Sequenz erfolgte mittels PCR unter Verwendung der Primer TVmTra1f und T7TVmTra1r.

**(+)DI-GFP(as):** Die Konstruktion der (+)DI-GFP1(as)- und (+)DI-GFP2(as)-Konstrukte erfolgte durch Dr. Torsten Gursinsky. Die Generierung des *in vitro* Transkriptions-*templates* der (-)DI-GFP(as)-Sequenzen erfolgte mittels PCR unter Verwendung der Primer TVmTra1f und T7TVmTra1r.



## DNA-Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma MWG Eurofins Operon.

Name	Sequenz (5'→3')
<b>Primer für die Klonierung von DNA-Fragmenten</b>	
AGO1Nt1f	gctagctagcgccatggtgcggaagaagaactg
AGO1Nt1r	tccccggggaattaacaataaaaacataaccctcttgac
AGO1At1f	gctagctagcgccatggtgagaaagagaagaacgg
AGO1At1r	tccccggggaattagcagtagaacatgacacgcttc
AGO2Nb1f	gctctagagccatgggtcattcaaccagcaac
AGO2Nb1r	ggggaattaggatcctcagacaaagaac
AGO2At1f	gctctagagccatggagagaggtggttatcgagg
AGO2At1r	tccccggggaattagacgaagaacataacatttcaag
AGO3At1f	acgcgtcgacgccatggatcgaggtggttaccgag
AGO3At1r	tccccggggaattagacaaagaacataaagtctcgatg
AGO4At1f	gctctagagccatggattcaacaaatggtaacggag
AGO4At1r	tccccggggaattaacagaagaacatggagttggc
AGO5At1f	gctctagagccatgtcaaactgtggtggtggtg
AGO5At1r	tccccggggaattagcaataaaaacataaccctcttgac
AGO6At1f	gctagctagcgccatggagacatcttcatctctgc
AGO6At1r	tccccggggaattagcagaagaacatggtgccttcg
AGO7At1f	gctctagagccatggaagaaaaactcatcatcatc
AGO7At1r	tccccggggaattagcagtaaaacatgagattcttgac
AGO9At1f	gctctagagccatggattctgatgaaccgaatgg
AGO9At1r	tccccggggaattaacagaagaacatggaggttgaaac
AGO10At1f	gctctagagccatgccgattaggcaaatgaaagatag
AGO10At1r	tccccggggaattagcagtagaacattactctcttc
FLAG1f	tcgacgtatcccggcggcggtttgagttattaccatggactacaaggatgacgatgacaagtc
FLAG1r	catggacttgcacatcctttagtccatggttaataactcaaaaccgccgcccgggatacg
avsiRNA1f	atccgggtgagaatctccatcttaccgacctagggccatgtaaccaacaacacga
avsiRNA1r	gatttcgtgtttgtggtacatggcctatggtcggataagatggagattctcacc
avsiRNA2f	aatccgtctcatttgcttattacatgggactaaagtccgataagatgagctctcacc
avsiRNA2r	aagcgggtgaagagctcatcttaccgacttagtcccatgtaataagcaaatgagacg
agf6981f	atccgggtgagaatctccatctttagttcatccatgccatgtgtaaccaacaacacga

---

agf6981r	gatttcgtgtttgttggttacacatggcatggatgaactaaaatggagattctcacc
agf6982f	aatccgtctcatttgcttattacacatgacataaatgaactataatgagctctcacc
agf6982r	aagcgggtgaagagctcattatagttcatttatgtcatgtgtaataagcaaatgagacg
TV5UTR1f	aactgcaggggccctaatacgaactcactatag
TV3UTR1r	tcccccggtgcatttctgcaatgtcc
GFPsiFus3f	tatagttcatccatgcatg
GFPsiFus3r	tacacatggcatggatgaac
DIGFPFus4f	gaccatgaagactctgtagacgcgcatccaacatgggcc
DIGFPFus4r	gaccatgaagactctatagaccgactgataccacacgag
GFPsiFus4f	gaaatacacatgcatgtatcatgactagatatagttcatccatgcatgtgta
GFPsiFus4r	ccattacacatggcatggatgaactatatctagtcatacatgcatgtgta
DIGFPFus5f	gaccatgaagactcatggtcggataagtcttagcaatac
DIGFPFus5r	gaccatgaagactcttccatctccatcccctag
TVmTra1f	ggaaattctccaggatttctcgac
T7TVmTra1r	ccctaatacgaactcactatagggctgcatttctgcaatgtcc

#### **Primer für RT und qRT-PCR-Reaktionen**

18sRNAs	aaacggctaccacatccaag
18sRNAa	cctccaatggatcctcgta
TVGM RTP5s	gtgcggaagaaggaggtaag
TVGM RTP5a	cgccaactcaactctatcagc
oligo-dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

#### **Oligonukleotide für die RNA-Klonierung**

5'-Adapter-RNA	gcugauggcgaugaauaagaacacugcguuugcuggcuuugaugaaa
17.93	TCTGCAATGTTCCGGTTGTC
15.22	TATCTGGTGACTTGCGCTACC

---

**Tabelle 6.1** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer.

## RNA-Oligonukleotide

Die Synthese der verwendeten RNA-Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Biomers (Ulm, D). Es wurden vorwiegend nicht- linebreak[4] phosphorylierte siRNA-Varianten in den *in vitro* Assays verwendet, da diese die gleiche Spaltungseffizienz wie die phosphorylierten siRNA-Varianten zeigten (Daten nicht gezeigt).

siRNA	Länge	<i>guide strand</i> (5'→3')	<i>passenger strand</i> (5'→3')
gf698	22 nt	uaguucauccaugccaugugua	cacauggcauggaugaacuaua
gf698	21 nt	uaguucauccaugccaugugu	acauggcauggaugaacuaua
vsRNA1	22 nt	uauccgaccgauaggccauguu	caugggccuauuggucggauaag
vsRNA1	21 nt	uauccgaccgauaggccaugu	augggccuauuggucggauaag
vsRNA2	22 nt	auccgaccgauaggccauguu	caugggccuauuggucggauaa
vsRNA3	21 nt	cuuauccgaccgauaggccaau	gggccuauuggucggauaaguc
vsRNA4	21 nt	uuaggauagacgagucgacccg	ggucgacucgucauccuaaca
siTVDI92	21 nt	aucuuuaguuguggguuuga	gaaccccacaacuaaagauaa
siTVDI93	21 nt	ucuuuaguuguggguuugaa	gaaaccccacaacuaaagaua
siTVDI199	21 nt	acaggagccuuuggacgucuu	gacgucuaaaggcuccuguug
siTVDI292	21 nt	uacuacagcggugcgaaacuc	guuucgcaccgcuguaguauag
siTVDI471	21 nt	ucuuguuggguucuggauguu	gauccagaaccaacaagagu
siTVDI490	22 nt	uuaggauagacgagucgacucgg	gagucgacucgucauccuaaca
siTVDI553	21 nt	aaagggucucgugugguauca	guaccacacgagaccuuucc
siTVDI607	21 nt	auggucggauaagucuuagca	guaagacuuauccgaccuauag
siTVDI666	21 nt	uuaggugucacuuguggaagc	guccacaagugacaccuaacu
siTVDI725	21 nt	auagagaucgcuggaagcacu	ggcuuccagcgauucucuauag

**Tabelle 6.2** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten siRNAs wurden vorwiegend als nicht-phosphorylierte siRNA-Duplexe eingesetzt, da keine Unterschiede in der Effizienz phosphorylierter und nicht-phosphorylierter siRNAs im *cleavage assay* detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Bei der Verwendung verschiedener siRNA-Varianten mit unterschiedlichen 5'-Nukleotiden erfolgte die Anpassung der komplementären siRNA-Sequenz des *passenger strands*, so dass die vollständige Komplementarität des siRNA-Duplexes erhalten bleibt.

---

## Chemikalien

Aceton	VWR International, Darmstadt, D
Acetosyringon (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Acrylamid / Bisacrylamid Rotiphorese 30 (37,5 : 1)	Roth, Karlsruhe, D
Acrylamid / Bisacrylamid Rotiphorese 40 (19 : 1)	Roth, Karlsruhe, D
Actinomycin D	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agarose low EEO	AppliChem, Darmstadt, D
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumthiocyanat	AppliChem, Darmstadt, D
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, D
Bacto-Agar	Becton, Dickinson & Co., MD, USA
Bacto-Hefe-Extrakt	Becton, Dickinson & Co., MD, USA
Bacto-Trypton	Becton, Dickinson & Co., MD, USA
Bacto-Pepton	Becton, Dickinson & Co., MD, USA
<i>beef</i> -Extrakt	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Borsäure	AppliChem, Darmstadt, D
Bradford, Protein assay dye reagent	Bio-Rad, Hercules, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
Chloroform	Roth, Karlsruhe, D
Cellulase Onozuka RS	Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL
Coomassie Brilliant Blau R250	Roth, Karlsruhe, D
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL
Dikaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ )	AppliChem, Darmstadt, D
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt, D
Ethanol	VWR International, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, D
Essigsäure	VWR International, Darmstadt, D
Ethanol	VWR International, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, D
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	AppliChem, Darmstadt, D

Formaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Formamid (deionisiert)	Roth, Karlsruhe, D
Glukose	Merck, Darmstadt, D
Glycerin (wasserfrei)	AppliChem, Darmstadt, D
Glycin	AppliChem, Darmstadt, D
Guanidiniumthiocyanat	AppliChem, Darmstadt, D
Harnstoff	AppliChem, Darmstadt, D
HCl	VWR International, Darmstadt, D
HEPES	AppliChem, Darmstadt, D
Isoamylalkohol	VWR International, Darmstadt, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Thermo Scientific, Bonn, D
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt, D
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Kreatinphosphat	AppliChem, Darmstadt, D
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Mannitol	AppliChem, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
Methanol	VWR International, Darmstadt, D
MOPS	AppliChem, Darmstadt, D
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	AppliChem, Darmstadt, D
Murashige & Skoog Basal Medium	Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL
Myo-Inositol	Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Natriumthiocyanat	Merck, Darmstadt, D
Nonidet P40	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pectolyase	Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL
Percoll	GE Healthcare, München, D

---

Phenol (wassergesättigt, stabilisiert)	AppliChem, Darmstadt, D
PIPES	AppliChem, Darmstadt, D
Protease-Inhibitor (Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor)	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Rifampicin	AppliChem, Darmstadt, D
Saccharose	Merck, Darmstadt, D
Silbernitrat	Thermo Scientific, Bonn, D
Siliziumcarbid	Roth, Karlsruhe, D
Spectinomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Spermin	Roth, Karlsruhe, D
SUCOFiN (Magermilchpulver)	TSI GmbH & Co. KG, Zeven, D
TEMED	Roth, Karlsruhe, D
Thiaminhydrochlorid	Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, NL
Thioglycolsäure	AppliChem, Darmstadt, D
Trichloressigsäure (TCA)	J. T. Baker Chemicals, Phillipsburg, USA
Tris	Roth, Karlsruhe, D
tRNA (from yeast)	GE Healthcare, München, D
Tween 20	Merck, Darmstadt, D
Wasser (Nuklease-frei)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Xylencyanol	AppliChem, Darmstadt, D

## Geräte und Verbrauchsmaterialien

BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, D
Dounce Homogenizer (tight fit)	KONTES GLASS, Vineland, USA
DC-Karten Kieselgel 60 F 254	Riedel-Häen, Seelze, D
Einmalküvetten PLASTIBRAND, Polystyrol	Roth, Karlsruhe, D
Elektrophorese Power Supply Consort EV233	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, D
Feinwaage ABJ 120-4M	KERN & SOHN GmbH, Balingen, D
Gel-Dokumentationsanlage EDAS 290	Kodak, Stuttgart, D
Gene Pulser II	Bio-Rad, Hercules, USA
Gene Pulser Cuvette	Bio-Rad, Hercules, USA
Gradientenmischer	Hofer, Holliston, USA

Infors Multitron II HT	Infors AG, Bottmingen, CH
Lichtmikroskop	Thermo Scientific, Bonn, D
Magnetrührer IKA Reo basic C	IKA, Staufen, D
MasterCycler Thermocycler	Eppendorf AG, Hamburg, D
Micro 200 (Zentrifuge)	Hettich, Tuttlingen, D
Micro 200R (Zentrifuge)	Hettich, Tuttlingen, D
Nitrocellulose-Membran	LI-COR, Lincoln, USA
pH-Meter / pH-Elektrode Blueline 14 pH	Schott Instruments, Mainz, D
Percival Pflanzenzuchtkammer E41L2	CLF PlantClimatics GmbH, Emersacker, D
PowerSupply Pack P25	Biometra, Göttingen, D
Rotina 38R (Zentrifuge)	Hettich, Tuttlingen, D
Rotor SW40Ti	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
Rotor TLA 100.3	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
Storage Phosphor Screen S 230	GE Healthcare, München, D
Storm 860 Phosphoimager	Molekular Dynamics, Sunnyvale, USA
Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Ultrazentrifuge L8-M	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
Uni-Geldryer 3545D	Bio-Rad, Hercules, USA
Universalschüttler SM 30 A	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D
UVette	Eppendorf, Hamburg, D
UV-Lampe LONGLIFE FILTER	Spectroline, Westbury, USA
UV-Transilluminator UXT-30M-8E, 312 nm	Biostep GmbH, Jansdorf, D
Vortex Genius 3	IKA, Staufen, D
Waage accu-622	Thermo Scientific, Bonn, D
Whatman-Papier GB 005	GE Healthcare, München, D
Winkelrotor 6-fach	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifugenröhrchen Ultra clear (14 x 95 mm)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D

---

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Sven-Erik Behrens bedanken, der mir die Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht und durch seine Unterstützung maßgeblich zu ihrem Entstehen beigetragen hat.

Frau Prof. Dr. Ulla Bonas und Herrn PD Dr. Michael Wassenegger danke ich für die freundliche Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens.

Ganz besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. Torsten Gursinsky, der durch seine engagierte Betreuung, seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft die Entstehung dieser Arbeit maßgeblich gefördert hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ulla Bonas und Frau Dr. Heike Berndt, für die zur Verfügung gestellten *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen und den pBGWFS7-Vektor bedanken. Bei Frau Bianca Rosinsky bedanke ich mich für die zur Verfügung gestellten *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen.

Bei Herrn Dr. Gerd Hause des Biozentrums der Martin-Luther-Universität möchte ich mich für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Bilder der TBSV-Partikel bedanken.

Herrn Dr. Vitantonio Pantaleo des Instituts für Pflanzenvirologie in Bari (Italien) danke ich mich für den zur Verfügung gestellten NbAGO1-Antikörper.

Bei Frau Prof. Dr. Andrea Sinz und Herrn Dr. Christian Ihling der Instituts für Pharmazie möchte ich mich recht herzlich für die Durchführung der massen-spektrometrischen Analysen der FLAG-AGO/RISCs bedanken, auch wenn diese aus Platzgründen nicht im Rahmen dieser Dissertation erwähnt wurden.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitgliedern des GRK1591 und des SFB698 bedanken meine Daten regelmäßig in einer angenehmen wissenschaftlichen Atmosphäre präsentieren und diskutieren zu können.

Zu guter Letzt bedanke ich mich herzlich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung Mikrobielle Biotechnologie für ein freundliches und angenehmes Arbeitsklima. Vor allem Danke ich Herrn Dr. Gursinsky und Frau Anika Penzel für die Unterstützung und das Korrekturlesen meiner Arbeit sowie die tolle Laboratmosphäre. Auch bei Herrn PD Dr. Ralph Golbik möchte ich mich rest herzlich für seinen Einsatz bedanken.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und Herrn Andreas Kutschke für die konstante und in jeder Form gewährte Unterstützung während meines Studiums und der Anfertigung dieser Dissertation.



## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

Name                      Jana Schuck  
Geburtsdatum            17. März 1986  
Staatsangehörigkeit    deutsch

### AUSBILDUNG

10/2005 - 10/2010    Diplomstudium Biochemie  
                              Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
                              Diplomarbeit: Die Rolle der mikroRNA-122 und des  
                              NF90/NF45-Komplexes in der HCV-Replikation  
                              Abschluss: Diplom-Biochemikerin  
1998 - 2005            Humboldt-Gymnasium, Potsdam  
                              Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### ARBEITSERFAHRUNG

seit 11/2013            Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
                              im Rahmen des SFB648  
                              Institut für Biochemie und Biotechnologie  
                              Abteilung Mikrobielle Biotechnologie  
                              Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
                              Betreuer: Sven-Erik Behrens  
                              Untersuchungen der antiviralen Immunantwort  
                              in einem pflanzlichen *in vitro* System  
10/2010 - 10/2013    Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
                              im Rahmen des GRK1591  
                              Institut für Biochemie und Biotechnologie  
                              Abteilung Mikrobielle Biotechnologie  
                              Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
                              Betreuer: Sven-Erik Behrens  
                              Untersuchungen der antiviralen Immunantwort  
                              in einem pflanzlichen *in vitro* System  
01/2010 - 09/2010    Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
                              Institut für Biochemie und Biotechnologie  
                              Abteilung Mikrobielle Biotechnologie  
                              Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
                              Betreuer: Sven-Erik Behrens  
                              Untersuchungen zur miR122 in der HCV Replikation

---

## **PUBLIKATIONSLISTE**

### **VERÖFFENTLICHUNGEN IN FACHZEITSCHRIFTEN**

Schuck, J., Gursinsky, T., Pantaleo, V., Burgyán, J., Behrens, S.-E. 2013. AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant *in vitro* system. *Nucleic acids research* 41(9):5090-103

### **TAGUNGSBEITRÄGE-VORTRÄGE**

Schuck, J., Gursinsky, T., Behrens, S.-E.: AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant *in vitro* system. "23. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie", 06.-09.03.2013, Kiel.

### **TAGUNGSBEITRÄGE-POSTER**

Schuck J., Gursinsky T., Hacke M., Behrens S.-E.: RNAi-based antiviral immunity in a plant *in vitro* system. "22. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie", 14.-17.03.2012, Essen.

Schuck, J., Gursinsky, T., Behrens, S.-E.: AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant *in vitro* system. International Meeting "Posttranscriptional Control of Gene Expression - Mechanisms and Role in Pathogenesis", 15.-17.03.2012, Halle (Saale).

Schuck, J., Gursinsky, T., Behrens, S.-E.: Viral replication and antiviral immune response in a plant *in vitro* system. International Meeting "Communication in Plants and their Responses to the Environment" 19.-22.05.2011, Halle (Saale).

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

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

Halle (Saale), 16.06.2014

Jana Schuck

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	Struktur des humanen AGO2 . . . . .	3
1.2	Schematische Darstellung der AGO-Proteine aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
1.3	Schematische Darstellung der miRNA-RISC vermittelten posttranskriptionellen Genregulation . . . . .	6
1.4	Schematische Darstellung der ta-siRNA vermittelten posttranskriptionellen Genregulation . . . . .	7
1.5	Schematische Darstellung der nat-siRNA vermittelten posttranskriptionellen Genregulation . . . . .	8
1.6	Schematische Darstellung der ra-siRNA vermittelten transkriptionellen Genregulation . . . . .	9
1.7	Genomorganisation und Morphologie von TBSV . . . . .	14
1.8	Schematische Darstellung des Replikationszyklus von (+)RNA-Viren .	15
3.1	<i>In vitro</i> RISC-Aktivität in BYL . . . . .	46
3.2	Aufbau und <i>in vitro</i> Replikation von TBSV-DI-RNAs . . . . .	47
3.3	<i>Cleavage assay</i> mit der DI-R3.5-RNA und dem (ds)R3.5-siRNA-Pool .	48
3.4	Antivirales RNA- <i>silencing in vitro</i> . . . . .	50
3.5	Insertion der <i>gf698-target</i> -Sequenz in DI-RNAs . . . . .	52
3.6	Das RNA- <i>silencing</i> erfolgt auf Ebene der (+)RNA. . . . .	53
3.7	Suppression des antiviralen RNA- <i>silencings</i> durch p19 . . . . .	55
3.8	Expression verschiedener AGO-Proteine in BYL . . . . .	56
3.9	Antivirales RNA- <i>silencing</i> durch verschiedene AGO-Proteine . . . . .	57
3.10	Das BYL besitzt eine <i>in vitro</i> DCL-Aktivität . . . . .	60
3.11	<i>Cleavage assay</i> mit dem (ds)R3.5-siRNA-Pool . . . . .	61
3.12	Identifizierung von vsiRNAs zur Spaltung der (+)R3.5-Region . . . . .	63
3.13	Identifizierung von vsiRNAs zur Spaltung der (-)R3.5-Region . . . . .	64
3.14	Untersuchung der antiviralen Wirkung von vsiRNA1 <i>in vivo</i> . . . . .	66
3.15	DCL- <i>cleavage assays</i> mit <i>NtAGO1</i> und <i>AtAGO2</i> . . . . .	67
3.16	FLAG-Immunpräzipitation von FLAG- <i>NtAGO1</i> /RISC . . . . .	69
3.17	Illumina <i>deep sequencing</i> von vsiRNAs aus der (+)DI-R3.5-RNA . . . . .	70
3.18	RNA-Profile der vsiRNAs aus der (+)DI-R3.5-RNA . . . . .	71
3.19	<i>Heat map</i> der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung . . . . .	73
3.20	<i>Heat map</i> der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung (Fortsetzung 1) . .	74
3.21	<i>Heat map</i> der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung (Fortsetzung 2) . .	75
3.22	Sekundärstruktur der (+)DI-R3.5-RNA mit <i>NtAGO1</i> -IP vsiRNAs . . . . .	76
3.23	Sekundärstruktur der (+)DI-R3.5-RNA mit <i>AtAGO2</i> -IP vsiRNAs . . . . .	77
3.24	Spaltung der DI-R3.5-RNAs durch (+)vsiRNAs . . . . .	79
6.1	Antivirales RNA- <i>silencing</i> durch <i>NtAGO1</i> /RISC und <i>NbAGO2</i> /RISC . .	103
6.2	Antivirales RNA- <i>silencing</i> durch <i>AtAGO3</i> /RISC, <i>AtAGO4</i> /RISC und <i>AtAGO6</i> /RISC . . . . .	104
6.3	Antivirales RNA- <i>silencing</i> durch <i>AtAGO7</i> /RISC, <i>AtAGO9</i> /RISC und <i>AtAGO10</i> /RISC . . . . .	105



# TABELLENVERZEICHNIS

1.1	Übersicht über die AGO-Proteine verschiedener Organismen. . . . .	2
2.1	Antibiotika-Stammlösungen. . . . .	20
2.2	Reaktionsansatz einer <i>in vitro</i> Translation. . . . .	25
2.3	Reaktionsansatz einer PCR-Reaktion . . . . .	31
2.4	Reaktionsbedingungen einer PCR-Reaktion . . . . .	31
2.5	Reaktionsansatz für die qRT-PCR-Reaktionen. . . . .	32
2.6	Reaktionsansatz einer <i>in vitro</i> Transkription. . . . .	35
2.7	Reaktionsansatz zur 5'-Phosphorylierung von RNA. . . . .	39
2.8	Reaktionsansatz einer reversen Transkription zur cDNA-Synthese. . . .	39
2.9	Reverse Transkription maturer vsiRNAs. . . . .	40
3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener <i>cleavage assays</i> . . .	58
3.2	Größen der erwarteten Spaltfragmente des <i>cleavage assays</i> der DI-R3.5- RNA und den (+)vsiRNAs . . . . .	80
6.1	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer. . . . .	111
6.2	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs. . . . .	112



## Literaturverzeichnis

- [1] Astrid Agorio and Pablo Vera. Argonaute4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 19(11):3778–3790, 2007. (Zitiert auf Seite 10.)
- [2] Paul Ahlquist. Rna-dependent rna polymerases, viruses, and rna silencing. *Science*, 296(5571):1270–1273, 2002. (Zitiert auf Seite 11.)
- [3] Rashid Akbergenov, Azeddine Si-Ammour, Todd Blevins, Imran Amin, Claudia Kutter, Herve Vanderschuren, Peng Zhang, Wilhelm Grissem, Frederick Meins, and Thomas et al. Hohn. Molecular characterization of geminivirus-derived small rnas in different plant species. *Nucleic acids research*, 34(2):462–471, 2006. (Zitiert auf Seite 10.)
- [4] Roghiyh Aliyari and Shou-Wei Ding. Rna-based viral immunity initiated by the dicer family of host immune receptors. *Immunological reviews*, 227(1):176–188, 2009. (Zitiert auf Seite 59.)
- [5] Edwards Allen and Miya D Howell. mirnas in the biogenesis of *trans*-acting sirnas in higher plants. In *Seminars in cell & developmental biology*, volume 21, pages 798–804. Elsevier, 2010. (Zitiert auf Seite 7.)
- [6] Edwards Allen, Zhixin Xie, Adam M Gustafson, and James C Carrington. microRNA-directed phasing during *Trans*-acting sirna biogenesis in plants. *Cell*, 121(2):207–221, 2005. (Zitiert auf Seite 7.)
- [7] John Paul Alvarez, Irena Pekker, Alexander Goldshmidt, Eyal Blum, Ziva Amsellem, and Yuval Eshed. Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *The Plant Cell Online*, 18(5):1134–1151, 2006. (Zitiert auf Seite 65.)
- [8] Stefan Ludwig Ameres, Javier Martinez, and Renée Schroeder. Molecular basis for target rna recognition and cleavage by human risc. *Cell*, 130(1):101–112, 2007. (Zitiert auf Seite 92.)
- [9] Milo J Aukerman and Hajime Sakai. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *apetala2*-like target genes. *The Plant Cell Online*, 15(11):2730–2741, 2003. (Zitiert auf Seite 6.)
- [10] Jacinthe Azevedo, Damien Garcia, Dominique Pontier, Stephanie Ohnesorge, Agnes Yu, Shahinez Garcia, Laurence Braun, Marc Bergdoll, Mohamed Ali Hakimi, and Thierry et al. Lagrange. Argonaute quenching and global changes in dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded gw repeat protein. *Genes & development*, 24(9):904–915, 2010. (Zitiert auf Seite 10.)
- [11] Daniel Barajas, Yi Jiang, and Peter D Nagy. A unique role for the host escrt proteins in replication of *Tomato bushy stunt virus*. *PLoS pathogens*, 5(12):e1000705, 2009. (Zitiert auf Seite 90.)
- [12] Daniel Barajas and Peter D Nagy. Ubiquitination of tombusvirus p33 replication protein plays a role in virus replication and binding to the host vps23p escrt protein. *Virology*, 397(2):358–368, 2010. (Zitiert auf Seite 90.)
- [13] David P Bartel. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2):281–297, 2004. (Zitiert auf Seiten 5 und 96.)



- [14] David Baulcombe. Rna silencing in plants. *Nature*, 431(7006):356–363, 2004. (Zitiert auf Seite 1.)
- [15] Nicolas Baumberger, Ching-Hsui Tsai, Miranda Lie, Ericka Havecker, and David C Baulcombe. The polerovirus silencing suppressor p0 targets argonaute proteins for degradation. *Current Biology*, 17(18):1609–1614, 2007. (Zitiert auf Seite 12.)
- [16] Karen Bohmert, Isabelle Camus, Catherine Bellini, David Bouchez, Michel Caboche, and Christoph Benning. Ago1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *The EMBO journal*, 17(1):170–180, 1998. (Zitiert auf Seite 4.)
- [17] Omar Borsani, Jianhua Zhu, Paul E Verslues, Ramanjulu Sunkar, and Jian-Kang Zhu. Endogenous sirnas derived from a pair of natural *cis*-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, 123(7):1279–1291, 2005. (Zitiert auf Seiten 5 und 7.)
- [18] Diane Bortolamiol, Maghsoud Pazhouhandeh, Katia Marrocco, Pascal Genschik, and Véronique Ziegler-Graff. The polerovirus f box protein p0 targets argonaute1 to suppress rna silencing. *Current Biology*, 17(18):1615–1621, 2007. (Zitiert auf Seite 12.)
- [19] Stéphanie Boutet, Franck Vazquez, Jun Liu, Christophe Béclin, Mathilde Fagard, Ariane Gratias, Jean-Benoit Morel, Patrice Crété, Xuemei Chen, and Hervé Vaucheret. *Arabidopsis HEN1*: A genetic link between endogenous mirna controlling development and sirna controlling transgene silencing and virus resistance. *Current Biology*, 13(10):843–848, 2003. (Zitiert auf Seite 1.)
- [20] Jozsef Burgyan, Luisa Rubino, and Marcello Russo. The 5'-terminal region of a tombusvirus genome determines the origin of multivesicular bodies. *Journal of General Virology*, 77(8):1967–1974, 1996. (Zitiert auf Seite 90.)
- [21] Annelie Carlsbecker, Ji-Young Lee, Christina J Roberts, Jan Dettmer, Satu Lehesranta, Jing Zhou, Ove Lindgren, Miguel A Moreno-Risueno, Anne Vatén, Siripong Thitamadee, et al. Cell signalling by microrna165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*, 465(7296):316–321, 2010. (Zitiert auf Seite 1.)
- [22] Maria Cartolano, Rosa Castillo, Nadia Efremova, Markus Kuckenberger, Jan Zethof, Tom Gerats, Zsuzsanna Schwarz-Sommer, and Michiel Vandenbussche. A conserved microrna module exerts homeotic control over *Petunia hybrida* and *Antirrhinum majus* floral organ identity. *Nature genetics*, 39(7):901–905, 2007. (Zitiert auf Seite 5.)
- [23] Carlo Cogoni and Giuseppe Macino. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to rna-dependent rna polymerase. *Nature*, 399(6732):166–169, 1999. (Zitiert auf Seite 11.)
- [24] Jean-Philippe Combiér, Florian Frugier, Françoise de Billy, Adnane Boualem, Fikri El-Yahyaoui, Sandra Moreau, Tatiana Vernié, Thomas Ott, Pascal Gamas, Martin Crespi, et al. *MtHAP2-1* is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microrna169 in *Medicago truncatula*. *Genes & development*, 20(22):3084–3088, 2006. (Zitiert auf Seite 5.)
- [25] Wilmer J Cuellar, Jan F Kreuze, Minna-Liisa Rajamäki, Karin R Cruzado, Milton Untiveros, and Jari PT Valkonen. Elimination of antiviral defense by viral rnase iii. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25):10354–10358, 2009. (Zitiert auf Seite 12.)

- [26] Tamas Dalmay, Andrew Hamilton, Stephen Rudd, Susan Angell, and David C Baulcombe. An rna-dependent rna polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, 101(5):543–553, 2000. (Zitiert auf Seiten 11 und 88.)
- [27] Angélique Deleris, Javier Gallego-Bartolome, Jinsong Bao, Kristin D Kasschau, James C Carrington, and Olivier Voinnet. Hierarchical action and inhibition of plant dicer-like proteins in antiviral defense. *Science*, 313(5783):68–71, 2006. (Zitiert auf Seiten 9 und 83.)
- [28] Bénédicte Desvoyes and Herman B Scholthof. Host-dependent recombination of a *Tomato bushy stunt virus* coat protein mutant yields truncated capsid subunits that form virus-like complexes which benefit systemic spread. *Virology*, 304(2):434–442, 2002. (Zitiert auf Seite 22.)
- [29] Shou-Wei Ding. Rna-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology*, 10(9):632–644, 2010. (Zitiert auf Seiten 9, 83, 85, 91, und 95.)
- [30] Shou-Wei Ding and Olivier Voinnet. Antiviral immunity directed by small rnas. *Cell*, 130(3):413–426, 2007. (Zitiert auf Seite 1.)
- [31] Livia Donaire, Yu Wang, Daniel Gonzalez-Ibeas, Klaus F Mayer, Miguel A Aranda, and César Llave. Deep-sequencing of plant viral small rnas reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology*, 392(2):203–214, 2009. (Zitiert auf Seiten 90 und 95.)
- [32] Sayda M Elbashir, Winfried Lendeckel, and Thomas Tuschl. Rna interference is mediated by 21- and 22-nucleotide rnas. *Genes & development*, 15(2):188–200, 2001. (Zitiert auf Seiten 5, 9, und 92.)
- [33] Marc R Fabian and K Andrew White. 5'-3' rna-rna interaction facilitates cap- and poly(a) tail-independent translation of tomato bushy stunt virus mrna a potential common mechanism for tombusviridae. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28):28862–28872, 2004. (Zitiert auf Seiten 13, 63, und 93.)
- [34] Noah Fahlgren, Taiowa A Montgomery, Miya D Howell, Edwards Allen, Sarah K Dvorak, Amanda L Alexander, and James C Carrington. Regulation of *AUXIN RESPONSE FACTOR3* by *TAS3* ta-sirna affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. *Current biology*, 16(9):939–944, 2006. (Zitiert auf Seite 7.)
- [35] Madhuri Gandikota, Rainer P Birkenbihl, Susanne Höhmann, Guillermo H Cardon, Heinz Saedler, and Peter Huijser. The mirna156/157 recognition element in the 3' utr of the *Arabidopsis* sbp box gene *spl3* prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *The Plant Journal*, 49(4):683–693, 2007. (Zitiert auf Seite 6.)
- [36] Juan Antonio García and Carmen Simón-Mateo. A micropunch against plant viruses. *Nature biotechnology*, 24(11):1358–1358, 2006. (Zitiert auf Seite 93.)
- [37] Hernan Garcia-Ruiz, Atsushi Takeda, Elisabeth J Chapman, Christopher M Sullivan, Noah Fahlgren, Katherine J Bremmelis, and James C Carrington. *Arabidopsis* rna-dependent rna polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering rna biogenesis during *Turnip Mosaic Virus* infection. *The Plant Cell Online*, 22(2):481–496, 2010. (Zitiert auf Seite 11.)
- [38] Michael V Graves, Judit Pogany, and Javier Romero. Defective interfering rnas and defective viruses associated with multipartite rna viruses of plants. In *seminars in VIROLOGY*, volume 7, pages 399–408. Elsevier, 1996. (Zitiert auf Seite 14.)

- [39] Torsten Gursinsky, Beate Schulz, and Sven-Erik Behrens. Replication of tomato bushy stunt virus rna in a plant *in vitro* system. *Virology*, 390(2):250–260, 2009. (Zitiert auf Seiten 14, 17, 24, 45, 46, 53, 84, und 88.)
- [40] Gabrielle Haas, Jacinthe Azevedo, Guillaume Moissiard, Angele Geldreich, Christophe Himber, Marina Bureau, Toshiyuki Fukuhara, Mario Keller, and Olivier Voinnet. Nuclear import of camv p6 is required for infection and suppression of the rna silencing factor drb4. *The EMBO journal*, 27(15):2102–2112, 2008. (Zitiert auf Seite 12.)
- [41] Andrew Hamilton, Olivier Voinnet, Louise Chappell, and David Baulcombe. Two classes of short interfering rna in rna silencing. *The EMBO Journal*, 21(17):4671–4679, 2002. (Zitiert auf Seiten 9 und 83.)
- [42] Andrew J Hamilton and David C Baulcombe. A species of small antisense rna in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science*, 286(5441):950–952, 1999. (Zitiert auf Seite 11.)
- [43] Meng-Hsuan Han, Saiprasad Goud, Liang Song, and Nina Fedoroff. The *Arabidopsis* double-stranded rna-binding protein hyl1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(4):1093–1098, 2004. (Zitiert auf Seite 5.)
- [44] Jagger JW Harvey, Mathew G Lewsey, Kanu Patel, Jack Westwood, Susanne Heimstädt, John P Carr, and David C Baulcombe. An antiviral defense role of ago2 in plants. *PLoS One*, 6(1):e14639, 2011. (Zitiert auf Seiten 10, 87, und 88.)
- [45] Ericka R Havecker, Laura M Wallbridge, Thomas J Hardcastle, Maxwell S Bush, Krystyna A Kelly, Ruth M Dunn, Frank Schwach, John H Doonan, and David C Baulcombe. The *Arabidopsis* rna-directed dna methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *The Plant Cell Online*, 22(2):321–334, 2010. (Zitiert auf Seite 8.)
- [46] Zoltán Havelda, Csaba Hornyik, Anna Válóczy, and József Burgyán. Defective interfering rna hinders the activity of a tombusvirus-encoded posttranscriptional gene silencing suppressor. *Journal of virology*, 79(1):450–457, 2005. (Zitiert auf Seite 16.)
- [47] Patrick Q Hearne, David A Knorr, Bradley I Hillman, and Thomas J Morris. The complete genome structure and synthesis of infectious rna from clones of tomato bushy stunt virus. *Virology*, 177(1):141–151, 1990. (Zitiert auf Seiten 13 und 108.)
- [48] Michael A Held, Bryan Penning, Amanda S Brandt, Sarah A Kessans, Weidong Yong, Steven R Scofield, and Nicholas C Carpita. Small-interfering rnas from natural antisense transcripts derived from a cellulose synthase gene modulate cell wall biosynthesis in barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51):20534–20539, 2008. (Zitiert auf Seite 7.)
- [49] Thien Ho, Denise Pallett, Rachel Rusholme, Tamas Dalmay, and Hui Wang. A simplified method for cloning of short interfering rnas from *Brassica juncea* infected with *Turnip mosaic potyvirus* and *Turnip crinkle carmovirus*. *Journal of virological methods*, 136(1):217–223, 2006. (Zitiert auf Seiten 90 und 95.)
- [50] Julia Höck and Gunter Meister. The argonaute protein family. *Genome Biol*, 9(2):210, 2008. (Zitiert auf Seite 2.)

- [51] M Hollings and OLWEN M STONE. The long-term survival of some plant viruses preserved by lyophilization. *Annals of Applied Biology*, 65(3):411–418, 1970. (Zitiert auf Seite 12.)
- [52] Tyng-Shyan Huang and Peter D Nagy. Direct inhibition of tombusvirus plus-strand rna synthesis by a dominant negative mutant of a host metabolic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in yeast and plants. *Journal of virology*, 85(17):9090–9102, 2011. (Zitiert auf Seite 14.)
- [53] R Hull. In *Matthews' Plant Virology*, volume 4, page 1001. Academic Press, San Diego, CA, 2002. (Zitiert auf Seite 88.)
- [54] David T Humphreys, Belinda J Westman, David IK Martin, and Thomas Preiss. Micrnas control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4e/cap and poly(a) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47):16961–16966, 2005. (Zitiert auf Seite 6.)
- [55] Taichiro Iki, Manabu Yoshikawa, Masaki Nishikiori, Mauren C Jaudal, Eiko Matsumoto-Yokoyama, Ichiro Mitsuhara, Tetsuo Meshi, and Masayuki Ishikawa. In vitro assembly of plant rna-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone hsp90. *Molecular cell*, 39(2):282–291, 2010. (Zitiert auf Seiten 17, 45, 50, 84, 85, und 88.)
- [56] Martin Jinek and Jennifer A Doudna. A three-dimensional view of the molecular machinery of rna interference. *Nature*, 457(7228):405–412, 2009. (Zitiert auf Seite 3.)
- [57] Magdalena Jonczyk, Kunj B Pathak, Monika Sharma, and Peter D Nagy. Exploiting alternative subcellular location for replication: Tombusvirus replication switches to the endoplasmic reticulum in the absence of peroxisomes. *Virology*, 362(2):320–330, 2007. (Zitiert auf Seiten 14 und 90.)
- [58] Jonathan DG Jones and Jeffery L Dangl. The plant immune system. *Nature*, 444(7117):323–329, 2006. (Zitiert auf Seiten 9 und 83.)
- [59] Tatsuo Kanno, M Florian Mette, David P Kreil, Werner Aufsatz, Marjori Matzke, and Antonius JM Matzke. Involvement of putative snf2 chromatin remodeling protein drd1 in rna-directed dna methylation. *Current Biology*, 14(9):801–805, 2004. (Zitiert auf Seite 8.)
- [60] Surekha Katiyar-Agarwal, Rebekah Morgan, Douglas Dahlbeck, Omar Borsani, Andy Villegas, Jian-Kang Zhu, Brian J Staskawicz, and Hailing Jin. A pathogen-inducible endogenous sirna in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(47):18002–18007, 2006. (Zitiert auf Seite 7.)
- [61] G Kegler, H-H Schimanski, et al. Investigations on the spread and seed transmissibility of *tomato bushy stunt virus* in pome and stone fruit in the gdr. *Archiv fur Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 18(2):105–109, 1982. (Zitiert auf Seite 12.)
- [62] Anastasia Khvorova, Angela Reynolds, and Sumedha D Jayasena. Functional sirnas and mirnas exhibit strand bias. *Cell*, 115(2):209–216, 2003. (Zitiert auf Seite 4.)
- [63] Marianthi Kiriakidou, Grace S Tan, Styliani Lamprinaki, Mariangels De Planell-Saguer, Peter T Nelson, and Zissimos Mourelatos. An mrna m7g cap binding-like motif within human ago2 represses translation. *Cell*, 129(6):1141–1151, 2007. (Zitiert auf Seite 6.)

- [64] DA Knorr, RH Mullin, PQ Hearne, and TJ Morris. *De novo* generation of defective interfering rnas of tomato bushy stunt virus by high multiplicity passage. *Virology*, 181(1):193–202, 1991. (Zitiert auf Seiten 14, 16, 47, und 108.)
- [65] Keisuke Komoda, Satoshi Naito, and Masayuki Ishikawa. Replication of plant rna virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7):1863–1867, 2004. (Zitiert auf Seiten 17, 84, und 89.)
- [66] Lóránt Lakatos, Tibor Csorba, Vitantonio Pantaleo, Elisabeth J Chapman, James C Carrington, Yu-Ping Liu, Valerian V Dolja, Lourdes Fernández Calvino, Juan José López-Moya, and József Burgyán. Small rna binding is a common strategy to suppress rna silencing by several viral suppressors. *The EMBO journal*, 25(12):2768–2780, 2006. (Zitiert auf Seite 62.)
- [67] Lóránt Lakatos, György Szittyá, Daniel Silhavy, and József Burgyán. Molecular mechanism of rna silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *The EMBO journal*, 23(4):876–884, 2004. (Zitiert auf Seite 54.)
- [68] Julie A Law and Steven E Jacobsen. Establishing, maintaining and modifying dna methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11(3):204–220, 2010. (Zitiert auf Seite 8.)
- [69] Rosalind C Lee and Victor Ambros. An extensive class of small rnas in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543):862–864, 2001. (Zitiert auf Seite 4.)
- [70] Rosalind C Lee, Rhonda L Feinbaum, and Victor Ambros. The *c. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small rnas with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5):843–854, 1993. (Zitiert auf Seite 4.)
- [71] Benjamin P Lewis, I-hung Shih, Matthew W Jones-Rhoades, David P Bartel, Christopher B Burge, et al. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115(7):787–798, 2003. (Zitiert auf Seite 6.)
- [72] Carey Fei Li, Olga Pontes, Mahmoud El-Shami, Ian R Henderson, Yana V Bernatavichute, Simon W-L Chan, Thierry Lagrange, Craig S Pikaard, and Steven E Jacobsen. An argonaute4-containing nuclear processing center colocalized with cajal bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 126(1):93–106, 2006. (Zitiert auf Seiten 8 und 86.)
- [73] Xiao Hua Li, Louis A Heaton, T Jack Morris, and Anne E Simon. Turnip crinkle virus defective interfering rnas intensify viral symptoms and are generated *de novo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(23):9173–9177, 1989. (Zitiert auf Seite 16.)
- [74] Zhenghe Li, Judit Pogany, Steven Tupman, Anthony M Esposito, Terri Goss Kinzy, and Peter D Nagy. Translation elongation factor 1a facilitates the assembly of the tombusvirus replicase and stimulates minus-strand synthesis. *PLoS pathogens*, 6(11):e1001175, 2010. (Zitiert auf Seite 14.)
- [75] Han-Xin Lin and K Andrew White. A complex network of rna-rna interactions controls subgenomic mrna transcription in a tombusvirus. *The EMBO journal*, 23(16):3365–3374, 2004. (Zitiert auf Seite 13.)
- [76] Jidong Liu, Michelle A Carmell, Fabiola V Rivas, Carolyn G Marsden, J Michael Thomson, Ji-Joon Song, Scott M Hammond, Leemor Joshua-Tor, and Gregory J Hannon. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian rna. *Science*, 305(5689):1437–1441, 2004. (Zitiert auf Seite 5.)

- [77] Qili Liu, Xiaozhen Yao, Limin Pi, Hua Wang, Xiaofeng Cui, and Hai Huang. The *ARGONAUTE10* gene modulates shoot apical meristem maintenance and establishment of leaf polarity by repressing mir165/166 in arabidopsis. *The Plant Journal*, 58(1):27–40, 2009. (Zitiert auf Seite 5.)
- [78] KJ Livark and TD Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the  $2^{-\Delta\Delta c_t}$  method. *Methods*, 25(4):402–408, 2001. (Zitiert auf Seiten 1 und 32.)
- [79] Kathy Q Luo and Donald C Chang. The gene-silencing efficiency of sirna is strongly dependent on the local structure of mrna at the targeted region. *Biochemical and biophysical research communications*, 318(1):303–310, 2004. (Zitiert auf Seite 93.)
- [80] Jason Mackenzie. Wrapping things up about virus rna replication. *Traffic*, 6(11):967–977, 2005. (Zitiert auf Seite 90.)
- [81] Allison C Mallory, Brenda J Reinhart, Matthew W Jones-Rhoades, Guiliang Tang, Phillip D Zamore, M Kathryn Barton, and David P Bartel. MicroRNA control of phabulosa in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *The EMBO Journal*, 23(16):3356–3364, 2004. (Zitiert auf Seiten 5 und 84.)
- [82] Colin D Malone and Gregory J Hannon. Small rnas as guardians of the genome. *Cell*, 136(4):656–668, 2009. (Zitiert auf Seite 1.)
- [83] G P Martelli, D Gallitelli, and M Russo. Tombusviruses. *R. Koenig (ed). New York*, pages 13–72, 1988. (Zitiert auf Seite 12.)
- [84] Javier Martinez and Thomas Tuschl. Risc is a 5' phosphomonoester-producing rna endonuclease. *Genes & development*, 18(9):975–980, 2004. (Zitiert auf Seite 2.)
- [85] C Matranga and Phillip D Zamore. Plant rna interference in vitro. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, volume 69, pages 403–408. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. (Zitiert auf Seite 84.)
- [86] Marjori Matzke, Tatsuo Kanno, Lucia Daxinger, Bruno Huettel, and Antonius JM Matzke. Rna-mediated chromatin-based silencing in plants. *Current opinion in cell biology*, 21(3):367–376, 2009. (Zitiert auf Seite 8.)
- [87] Andrew W McCartney, John S Greenwood, Marc R Fabian, K Andrew White, and Robert T Mullen. Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *The Plant Cell Online*, 17(12):3513–3531, 2005. (Zitiert auf Seiten 14 und 90.)
- [88] Shijun Mi, Tao Cai, Yugang Hu, Yemiao Chen, Emily Hodges, Fangrui Ni, Liang Wu, Shan Li, Huanyu Zhou, and Chengzu Long. Sorting of small rnas into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, 133(1):116–127, 2008. (Zitiert auf Seiten 3, 8, 71, 85, und 86.)
- [89] Laura Miozzi, Giorgio Gambino, Jozsef Burgyan, and Vitantonio Pantaleo. Genome-wide identification of viral and host transcripts targeted by viral sirnas in vitis vinifera. *Molecular plant pathology*, 14(1):30–43, 2013. (Zitiert auf Seiten 90 und 93.)
- [90] Guillaume Moissiard and Olivier Voinnet. Viral suppression of rna silencing in plants. *Molecular plant pathology*, 5(1):71–82, 2004. (Zitiert auf Seite 11.)

- [91] Attila Molnár, Tibor Csorba, Lóránt Lakatos, Éva Várallyay, Christophe Lacomme, and József Burgyán. Plant virus-derived small interfering rnas originate predominantly from highly structured single-stranded viral rnas. *Journal of virology*, 79(12):7812–7818, 2005. (Zitiert auf Seiten 90, 95, und 96.)
- [92] Taiowa A Montgomery, Miya D Howell, Josh T Cuperus, Dawei Li, Jesse E Hansen, Amanda L Alexander, Elisabeth J Chapman, Noah Fahlgren, Edwards Allen, and James C Carrington. Specificity of argonaute7-mir390 interaction and dual functionality in *TAS3* Trans-acting sirna formation. *Cell*, 133(1):128–141, 2008. (Zitiert auf Seiten 7, 10, und 86.)
- [93] Jean-Benoit Morel, Christian Godon, Philippe Mourrain, Christophe Béclin, Stéphanie Boutet, Frank Feuerbach, Florence Proux, and Hervé Vaucheret. Fertile hypomorphic *ARGONAUTE* (*ago1*) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *The Plant Cell Online*, 14(3):629–639, 2002. (Zitiert auf Seiten 10 und 87.)
- [94] Philippe Mourrain, Christophe Béclin, Taline Elmayan, Frank Feuerbach, Christian Godon, Jean-Benoit Morel, David Jouette, Anne-Marie Lacombe, Snezana Nikic, Nathalie Picault, et al. *Arabidopsis* *SGS2* and *SGS3* genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, 101(5):533–542, 2000. (Zitiert auf Seite 11.)
- [95] Katsunori Murota, Yuka Hagiwara-Komoda, Keisuke Komoda, Hitoshi Onouchi, Masayuki Ishikawa, and Satoshi Naito. *Arabidopsis* cell-free extract, ace, a new *in vitro* translation system derived from *Arabidopsis* callus cultures. *Plant and Cell Physiology*, 52(8):1443–1453, 2011. (Zitiert auf Seiten 87 und 89.)
- [96] Peter D Nagy and Judit Pogany. The dependence of viral rna replication on co-opted host factors. *Nature Reviews Microbiology*, 10(2):137–149, 2012. (Zitiert auf Seite 90.)
- [97] Beth L Nicholson, Baodong Wu, Irina Chevtchenko, and K Andrew White. Tombusvirus recruitment of host translational machinery via the 3' utr. *RNA*, 16(7):1402–1419, 2010. (Zitiert auf Seite 13.)
- [98] Qi-Wen Niu, Shih-Shun Lin, Jose Luis Reyes, Kuan-Chun Chen, Hui-Wen Wu, Shyi-Dong Yeh, and Nam-Hai Chua. Expression of artificial micrnas in transgenic *arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nature biotechnology*, 24(11):1420–1428, 2006. (Zitiert auf Seite 93.)
- [99] Reyes R Novoa, Gloria Calderita, Rocío Arranz, Juan Fontana, Harald Granzow, and Cristina Risco. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biology of the Cell*, 97(2):147–172, 2005. (Zitiert auf Seite 90.)
- [100] Takehiro Ohki, Seiji Uematsu, Dietrich-Eckhardt Lesemann, Yohachiro Honda, Shinya Tsuda, and Ichiro Fujisawa. Characterization of *Tomato bushy stunt virus* newly isolated from nipplefruit (*Solanum mammosum*) in japan. *Journal of General Plant Pathology*, 71(1):74–79, 2005. (Zitiert auf Seite 22.)
- [101] Vianey Olmedo-Monfil, Noé Durán-Figueroa, Mario Arteaga-Vázquez, Edgar Demesa-Arévalo, Daphné Autran, Daniel Grimanelli, R Keith Slotkin, Robert A Martienssen, and Jean-Philippe Vielle-Calzada. Control of female gamete formation by a small rna pathway in *Arabidopsis*. *Nature*, 464(7288):628–632, 2010. (Zitiert auf Seite 8.)

- 
- [102] Philip H Olsen and Victor Ambros. The *lin-4* regulatory rna controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking lin-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental biology*, 216(2):671–680, 1999. (Zitiert auf Seite 6.)
- [103] AJ Olson, G Bricogne, and SC Harrison. Structure of tomato bushy stunt virus iv: The virus particle at 2.9 resolution. *Journal of molecular biology*, 171(1):61–93, 1983. (Zitiert auf Seite 13.)
- [104] Rustem Omarov, Kim Sparks, Lindsay Smith, Jelena Zindovic, and Herman B Scholthof. Biological relevance of a stable biochemical interaction between the tombusvirus-encoded p19 and short interfering rnas. *Journal of virology*, 80(6):3000–3008, 2006. (Zitiert auf Seiten 1 und 12.)
- [105] Rustem T Omarov, Jessica J Ciomperlik, and Herman B Scholthof. Rnai-associated ssrna-specific ribonucleases in *Tombusvirus* p19 mutant-infected plants and evidence for a discrete sirna-containing effector complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5):1714–1719, 2007. (Zitiert auf Seite 1.)
- [106] Juan Ortín and Francisco Parra. Structure and function of rna replication. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60:305–326, 2006. (Zitiert auf Seiten 1 und 9.)
- [107] Marita Overhoff, Martina Alken, Rosel Kretschmer-Kazemi Far, Marc Lemaitre, Bernard Lebleu, Georg Sczakiel, and Ian Robbins. Local rna target structure influences sirna efficacy: a systematic global analysis. *Journal of molecular biology*, 348(4):871–881, 2005. (Zitiert auf Seite 93.)
- [108] Vitantonio Pantaleo, György Szittyá, and József Burgyán. Molecular bases of viral rna targeting by viral small interfering rna-programmed risc. *Journal of virology*, 81(8):3797–3806, 2007. (Zitiert auf Seiten 1, 47, und 91.)
- [109] Wonkeun Park, Junjie Li, Rentao Song, Joachim Messing, and Xuemei Chen. Carpel factory, a dicer homolog, and hen1, a novel protein, act in microrna metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 12(17):1484–1495, 2002. (Zitiert auf Seite 5.)
- [110] Kunj B Pathak and Peter D Nagy. Defective interfering rnas: foes of viruses and friends of virologists. *Viruses*, 1(3):895–919, 2009. (Zitiert auf Seite 15.)
- [111] Kunj B Pathak, Zsuzsanna Sasvari, and Peter D Nagy. The host pex19p plays a role in peroxisomal localization of tombusvirus replication proteins. *Virology*, 379(2):294–305, 2008. (Zitiert auf Seite 16.)
- [112] Angela Peragine, Manabu Yoshikawa, Gang Wu, Heidi L Albrecht, and R Scott Poethig. *SGS3* and *SGS2/SDE1/RDR6* are required for juvenile development and the production of *trans*-acting sirnas in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 18(19):2368–2379, 2004. (Zitiert auf Seiten 5 und 7.)
- [113] Judit Pogany, Jozsef Stork, Zhenghe Li, and Peter D Nagy. In vitro assembly of the *Tomato bushy stunt virus* replicase requires the host heat shock protein 70. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50):19956–19961, 2008. (Zitiert auf Seite 14.)
- [114] Judit Pogany, K Andrew White, and Peter D Nagy. Specific binding of tombusvirus replication protein p33 to an internal replication element in the viral rna is essential for replication. *Journal of virology*, 79(8):4859–4869, 2005. (Zitiert auf Seite 13.)
- [115] RE Pontis, OLGA GRACIA, JM FELDMANN, et al. Tomato bushy stunt virus on tomato crops in argentina. *Plant Disease Reporter*, 52(9):676–677, 1968. (Zitiert auf Seite 12.)



- [116] Xiaopeng Qi, Forrest Sheng Bao, and Zhixin Xie. Small rna deep sequencing reveals role for *Arabidopsis thaliana* rna-dependent rna polymerases in viral sirna biogenesis. *PLoS One*, 4(3):e4971, 2009. (Zitiert auf Seite 11.)
- [117] Yijun Qi, Ahmet M Denli, and Gregory J Hannon. Biochemical specialization within *Arabidopsis* rna silencing pathways. *Molecular cell*, 19(3):421–428, 2005. (Zitiert auf Seite 10.)
- [118] Yijun Qi, Xuehua Zhong, Asuka Itaya, and Biao Ding. Dissecting rna silencing in protoplasts uncovers novel effects of viral suppressors on the silencing pathway at the cellular level. *Nucleic acids research*, 32(22):e179–e179, 2004. (Zitiert auf Seite 84.)
- [119] Feng Qu, Xiaohong Ye, and T Jack Morris. *Arabidopsis* drb4, ago1, ago7, and rdr6 participate in a dcl4-initiated antiviral rna silencing pathway negatively regulated by dcl1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38):14732–14737, 2008. (Zitiert auf Seiten 10, 11, und 84.)
- [120] Doris Quinkert, Ralf Bartenschlager, and Volker Lohmann. Quantitative analysis of the hepatitis c virus replication complex. *Journal of virology*, 79(21):13594–13605, 2005. (Zitiert auf Seite 88.)
- [121] Frank Ratcliff, Bryan D Harrison, and David C Baulcombe. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, 276(5318):1558–1560, 1997. (Zitiert auf Seite 11.)
- [122] Brenda J Reinhart, Earl G Weinstein, Matthew W Rhoades, Bonnie Bartel, and David P Bartel. Micrnas in plants. *Genes & development*, 16(13):1616–1626, 2002. (Zitiert auf Seite 4.)
- [123] Angela Reynolds, Devin Leake, Queta Boese, Stephen Scaringe, William S Marshall, and Anastasia Khvorova. Rational sirna design for rna interference. *Nature biotechnology*, 22(3):326–330, 2004. (Zitiert auf Seite 94.)
- [124] Matthew W Rhoades, Brenda J Reinhart, Lee P Lim, Christopher B Burge, Bonnie Bartel, and David P Bartel. Prediction of plant microrna targets. *Cell*, 110(4):513–520, 2002. (Zitiert auf Seiten 5 und 62.)
- [125] Javier Romero, Qi Huang, Judit Pogany, and Jozef J Bujarski. Characterization of defective interfering rna components that increase symptom severity of *broad bean mottle virus* infections. *Virology*, 194(2):576–584, 1993. (Zitiert auf Seite 16.)
- [126] Marcello Russo, Jozsef Burgyan, and Giovanni P Martelli. The molecular biology of toombusviridae. *Advances in virus research*, 44:382–428, 1994. (Zitiert auf Seite 84.)
- [127] Nicole T Schirle and Ian J MacRae. The crystal structure of human argonaute2. *Science*, 336(6084):1037–1040, 2012. (Zitiert auf Seiten 2 und 3.)
- [128] Markus Schmid, Timothy S Davison, Stefan R Henz, Utz J Pape, Monika Demar, Martin Vingron, Bernhard Schölkopf, Detlef Weigel, and Jan U Lohmann. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature genetics*, 37(5):501–506, 2005. (Zitiert auf Seite 8.)
- [129] Herman B Scholthof, Veria Y Alvarado, Julio C Vega-Arreguin, Jessica Ciomperlik, Denis Odokonyero, Chantal Brosseau, Marianne Jaubert, Alejandro Zamora, and Peter Moffett. Identification of an ARGONAUTE for antiviral rna silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant physiology*, 156(3):1548–1555, 2011. (Zitiert auf Seiten 87, 95, und 106.)

- [130] Karen-Beth G Scholthof, Herman B Scholthof, and AO Jackson. The *tomato bushy stunt virus* replicase proteins are coordinately expressed and membrane associated. *Virology*, 208(1):365–369, 1995. (Zitiert auf Seite 13.)
- [131] Steffen Schubert, Arnold Grünweller, Volker A Erdmann, and Jens Kurreck. Local rna target structure influences sirna efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *Journal of molecular biology*, 348(4):883–893, 2005. (Zitiert auf Seite 93.)
- [132] Jana Schuck, Torsten Gursinsky, Vitantonio Pantaleo, Jozsef Burgyán, and Sven-Erik Behrens. Ago/risc-mediated antiviral rna silencing in a plant *in vitro* system. *Nucleic acids research*, 41(9):5090–5103, 2013. (Zitiert auf Seiten 71, 84, und 85.)
- [133] B Schulz. Untersuchungen zum *Tomato bushy stunt virus*-replikationszyklus in einem *Nicotiana tabacum*-basierten, zellfreien *in vitro* system. *Dissertation*, pages 1–139, 2014. (Zitiert auf Seiten 51 und 84.)
- [134] Frank Schwach, Fabian E Vaistij, Louise Jones, and David C Baulcombe. An rna-dependent rna polymerase prevents meristem invasion by potato virus x and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiology*, 138(4):1842–1852, 2005. (Zitiert auf Seite 11.)
- [135] Dianne S Schwarz, György Hutvágner, Tingting Du, Zuoshang Xu, Neil Aronin, and Phillip D Zamore. Asymmetry in the assembly of the rnai enzyme complex. *Cell*, 115(2):199–208, 2003. (Zitiert auf Seite 4.)
- [136] Dániel Silhavy and József Burgyán. Effects and side-effects of viral rna silencing suppressors on short rnas. *Trends in plant science*, 9(2):76–83, 2004. (Zitiert auf Seite 11.)
- [137] Dániel Silhavy, Attila Molnár, Alessandra Lucioli, György Szittyá, Csaba Hornyik, Mario Tavazza, and József Burgyán. A viral protein suppresses rna silencing and binds silencing-generated, 21-to 25-nucleotide double-stranded rnas. *The EMBO Journal*, 21(12):3070–3080, 2002. (Zitiert auf Seiten 12 und 84.)
- [138] Anne E Simon, Marilyn J Roossinck, and Zoltán Havelda. Plant virus satellite and defective interfering rnas: new paradigms for a new century. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42:415–437, 2004. (Zitiert auf Seiten 15 und 16.)
- [139] Anne Smardon, Jill M Spoerke, Steven C Stacey, Marcia E Klein, Nancy Mackin, and Eleanor M Maine. Ego-1 is related to rna-directed rna polymerase and functions in germline development and rna interference in *C. elegans*. *Current Biology*, 10(4):169–178, 2000. (Zitiert auf Seite 11.)
- [140] K M Smith. Strains of tomato bushy stunt virus. *Ann. Appl. Biol.*, (22):731–741, 1935. (Zitiert auf Seite 12.)
- [141] Ji-Joon Song, Stephanie K Smith, Gregory J Hannon, and Leemor Joshua-Tor. Crystal structure of argonaute and its implications for risc slicer activity. *science*, 305(5689):1434–1437, 2004. (Zitiert auf Seite 2.)
- [142] Jennifer LM Soosaar, Tessa M Burch-Smith, and Savithamma P Dinesh-Kumar. Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10):789–798, 2005. (Zitiert auf Seite 17.)

- [143] Ramanjulu Sunkar, Yong-Fang Li, and Guru Jagadeeswaran. Functions of micrnas in plant stress responses. *Trends in plant science*, 17(4):196–203, 2012. (Zitiert auf Seiten 1 und 5.)
- [144] György Szittya, Attila Molnár, Dániel Silhavy, Csaba Hornyik, and József Burgyán. Short defective interfering rnas of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *The Plant Cell Online*, 14(2):359–372, 2002. (Zitiert auf Seiten 16, 46, und 97.)
- [145] Gyorgy Szittya, Simon Moxon, Vitantonio Pantaleo, Gabor Toth, Rachel L Rusholme Pilcher, Vincent Moulton, Jozsef Burgyan, and Tamas Dalmay. Structural and functional analysis of viral sirnas. *PLoS pathogens*, 6(4):e1000838, 2010. (Zitiert auf Seiten 47, 91, 95, und 96.)
- [146] Atsushi Takeda, Shintaro Iwasaki, Toshiaki Watanabe, Maki Utsumi, and Yuichiro Watanabe. The mechanism selecting the guide strand from small rna duplexes is different among argonaute proteins. *Plant and cell physiology*, 49(4):493–500, 2008. (Zitiert auf Seiten 3, 8, 10, 71, 85, 86, und 88.)
- [147] Guiliang Tang, Brenda J Reinhart, David P Bartel, and Phillip D Zamore. A biochemical framework for rna silencing in plants. *Genes & development*, 17(1):49–63, 2003. (Zitiert auf Seite 84.)
- [148] Rolf Thermann and Matthias W Hentze. Drosophila mir2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature*, 447(7146):875–878, 2007. (Zitiert auf Seite 6.)
- [149] Yukihide Tomari and Phillip D Zamore. Perspective: machines for rna. *Genes & development*, 19(5):517–529, 2005. (Zitiert auf Seite 1.)
- [150] N Van Larebeke, G Engler, M Holsters, S Van den Elsacker, I Zaenen, RA Schilperoort, and J Schell. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. 1974. (Zitiert auf Seiten 19 und 106.)
- [151] Hervé Vaucheret, Allison C Mallory, and David P Bartel. Ago1 homeostasis entails coexpression of *MIR168* and *AGO1* and preferential stabilization of mir168 by ago1. *Molecular cell*, 22(1):129–136, 2006. (Zitiert auf Seite 5.)
- [152] Hervé Vaucheret, Franck Vazquez, Patrice Crété, and David P Bartel. The action of argonaute1 in the mirna pathway and its regulation by the mirna pathway are crucial for plant development. *Genes & development*, 18(10):1187–1197, 2004. (Zitiert auf Seite 5.)
- [153] Franck Vazquez. *Arabidopsis* endogenous small rnas: highways and byways. *Trends in plant science*, 11(9):460–468, 2006. (Zitiert auf Seiten 4, 5, und 7.)
- [154] Olivier Voinnet. Induction and suppression of rna silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics*, 6(3):206–220, 2005. (Zitiert auf Seiten 10 und 86.)
- [155] Olivier Voinnet, Yvonne M Pinto, and David C Baulcombe. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse dna and rna viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24):14147–14152, 1999. (Zitiert auf Seite 11.)
- [156] Robert Yung-Liang Wang and Peter D Nagy. *Tomato bushy stunt virus* co-opts the rna-binding function of a host metabolic enzyme for viral genomic rna synthesis. *Cell host & microbe*, 3(3):178–187, 2008. (Zitiert auf Seite 14.)

- [157] Robert Yung-Liang Wang, Jozsef Stork, and Peter D Nagy. A key role for heat shock protein 70 in the localization and insertion of tombusvirus replication proteins to intracellular membranes. *Journal of virology*, 83(7):3276–3287, 2009. (Zitiert auf Seite 14.)
- [158] Xian-Bing Wang, Juan Jovel, Petchthai Udomporn, Ying Wang, Qingfa Wu, Wan-Xiang Li, Virginie Gascioli, Herve Vaucheret, and Shou-Wei Ding. The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering rnas direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Online*, 23(4):1625–1638, 2011. (Zitiert auf Seiten 10, 11, 87, 88, und 95.)
- [159] Michael Wassenegger and Gabi Krczal. Nomenclature and functions of rna-directed rna polymerases. *Trends in plant science*, 11(3):142–151, 2006. (Zitiert auf Seite 11.)
- [160] Peter M Waterhouse, Michael W Graham, and Ming-Bo Wang. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense rna. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23):13959–13964, 1998. (Zitiert auf Seite 88.)
- [161] Kai-Fa Wei, Ling-Juan Wu, Juan Chen, Yan-feng Chen, and Dao-xin Xie. Structural evolution and functional diversification analyses of argonaute protein. *Journal of cellular biochemistry*, 113(8):2576–2585, 2012. (Zitiert auf Seite 2.)
- [162] K Andrew White and Peter D Nagy. Advances in the molecular biology of tombusviruses: gene expression, genome replication, and recombination. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 78:187–226, 2004. (Zitiert auf Seite 88.)
- [163] KA White and TJ Morris. Defective and defective interfering rnas of monopartite plus-strand rna plant viruses. In *Satellites and Defective Viral RNAs*, pages 1–17. Springer, 1999. (Zitiert auf Seiten 14 und 16.)
- [164] Leor Williams, Cristel C Carles, Karen S Osmont, and Jennifer C Fletcher. A database analysis method identifies an endogenous *trans*-acting short-interfering rna that targets the arabidopsis *ARF2*, *ARF3*, and *ARF4* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27):9703–9708, 2005. (Zitiert auf Seite 7.)
- [165] Baodong Wu, Jörg Grigull, Moriam O Ore, Sylvie Morin, and K Andrew White. Global organization of a positive-strand rna virus genome. *PLoS pathogens*, 9(5):e1003363, 2013. (Zitiert auf Seite 92.)
- [166] Baodong Wu and K Andrew White. A primary determinant of cap-independent translation is located in the 3'-proximal region of the tomato bushy stunt virus genome. *Journal of virology*, 73(11):8982–8988, 1999. (Zitiert auf Seite 13.)
- [167] Zhixin Xie, Lisa K Johansen, Adam M Gustafson, Kristin D Kasschau, Andrew D Lellis, Daniel Zilberman, Steven E Jacobsen, and James C Carrington. Genetic and functional diversification of small rna pathways in plants. *PLoS biology*, 2(5):e104, 2004. (Zitiert auf Seiten 6, 8, und 86.)
- [168] Shu-Jun Yang, Shelly A Carter, Anthony B Cole, Ning-Hui Cheng, and Richard S Nelson. A natural variant of a host rna-dependent rna polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16):6297–6302, 2004. (Zitiert auf Seite 95.)

- [169] Soraya Yekta, I-hung Shih, and David P Bartel. MicroRNA-directed cleavage of *hoxb8* mrna. *Science*, 304(5670):594–596, 2004. (Zitiert auf Seite 6.)
- [170] Sang-Dong Yoo, Young-Hee Cho, and Jen Sheen. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature protocols*, 2(7):1565–1572, 2007. (Zitiert auf Seite 84.)
- [171] Manabu Yoshikawa, Angela Peragine, Mee Yeon Park, and R Scott Poethig. A pathway for the biogenesis of *trans*-acting sirnas in *Arabidopsis*. *Genes & development*, 19(18):2164–2175, 2005. (Zitiert auf Seiten 7 und 86.)
- [172] Bin Yu, Zhiyong Yang, Junjie Li, Svetlana Minakhina, Maocheng Yang, Richard W Padgett, Ruth Steward, and Xuemei Chen. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 307(5711):932–935, 2005. (Zitiert auf Seite 1.)
- [173] Diqiu Yu, Baofang Fan, Stuart A MacFarlane, and Zhixiang Chen. Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* rna-dependent rna polymerase in antiviral defense. *Molecular plant-microbe interactions*, 16(3):206–216, 2003. (Zitiert auf Seite 11.)
- [174] Jixian Zhai, Dong-Hoon Jeong, Emanuele De Paoli, Sunhee Park, Benjamin D Rosen, Yupeng Li, Alvaro J González, Zhe Yan, Sherry L Kitto, Michael A Grusak, et al. MicroRNAs as master regulators of the plant *NB-LRR* defense gene family via the production of phased, *trans*-acting sirnas. *Genes & Development*, 25(23):2540–2553, 2011. (Zitiert auf Seite 9.)
- [175] Xiuren Zhang, Yu-Ren Yuan, Yi Pei, Shih-Shun Lin, Thomas Tuschl, Dinshaw J Patel, and Nam-Hai Chua. *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & development*, 20(23):3255–3268, 2006. (Zitiert auf Seiten 5 und 92.)
- [176] Xianwu Zheng, Jianhua Zhu, Avnish Kapoor, and Jian-Kang Zhu. Role of *Arabidopsis* ago6 in sirna accumulation, dna methylation and transcriptional gene silencing. *The EMBO journal*, 26(6):1691–1701, 2007. (Zitiert auf Seiten 8 und 9.)
- [177] Hongliang Zhu, Fuqu Hu, Ronghui Wang, Xin Zhou, Sing-Hoi Sze, Lisa Wen Liou, Ashley Barefoot, Martin Dickman, and Xiuren Zhang. *Arabidopsis* argonaute10 specifically sequesters mir166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell*, 145(2):242–256, 2011. (Zitiert auf Seite 5.)
- [178] Daniel Zilberman, Xiaofeng Cao, and Steven E Jacobsen. Argonaute4 control of locus-specific sirna accumulation and dna and histone methylation. *Science*, 299(5607):716–719, 2003. (Zitiert auf Seite 8.)
- [179] Daniel Zilberman, Xiaofeng Cao, Lisa K Johansen, Zhixin Xie, James C Carrington, and Steven E Jacobsen. Role of *Arabidopsis* ARGONAUTE4 in rna-directed dna methylation triggered by inverted repeats. *Current Biology*, 14(13):1214–1220, 2004. (Zitiert auf Seite 86.)
- [180] Michael Zuker. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*, 31(13):3406–3415, 2003. (Zitiert auf Seiten 51, 64, 78, und 92.)