



Etablierung eines *Saccharomyces cerevisiae*- basierten Systems zur Herstellung von Biopestiziden gegen agrarökonomisch-relevante Schadinsekten

Dissertation

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

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I
(Biowissenschaften)
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Dennis Arendt

öffentlich verteidigt am 24.10.2025

Gutachter:

Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

Prof. Dr. Gary Sawers

Prof. Dr. Norbert Tautz

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Einfluss einer nachhaltigen Landwirtschaft auf die Nahrungssicherung	1
1.2 RNA-Interferenz (RNAi)	2
1.2.1 Antivirales RNA-silencing in Insekten	3
1.2.2 Dicer und Dicer-like-Proteine - der Initiator der RNAi	4
1.2.3 Steigerung der Effektivität der RNAi-Technologie durch effiziente siRNAs (esiRNAs)	6
1.3 Einsatz von RNAi zur Schädlingsbekämpfung - Fortschritte, Herausforderungen und Perspektiven	7
1.4 Herstellung doppelsträngiger RNA	10
1.4.1 Vergleich verschiedener Herstellungsmöglichkeiten von dsRNA	10
1.4.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – Ein Werkzeug zur Generierung von dsRNA	13
1.5 Motivation und Zielstellung der Arbeit	15
2 Methoden	16
2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
2.2 Puffer und Medien	21
2.3 Molekularbiologische Methoden	23
2.3.1 DNA-Arbeiten	23
2.3.1.1 Plasmidpräparationen	23
2.3.1.2 DNA-Restriktionsverdau	23
2.3.1.3 Reinigung von DNA	24
2.3.1.4 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA	24
2.3.1.5 Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden	24
2.3.1.6 Ligation von DNA	24
2.3.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.3.1.8 Agarose-Gelelektrophorese für DNA	26
2.3.1.9 Sequenzierung	27
2.3.2 RNA-Arbeiten	27
2.3.2.1 <i>In-vitro</i> -Transkription	27
2.3.2.2 Generierung radioaktiv markierter RNA	28
2.3.2.3 Herstellung langer dsRNA	28
2.3.2.4 Reinigung und Präzipitation von RNA mittels Phenol-Chloroform und Ethanol	29
2.3.2.5 Konzentrationsbestimmung	29
2.3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	29
2.3.2.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
2.3.2.8 Autoradiographie	30
2.3.2.9 Isolation von RNA aus Kartoffelkäfern mittels Trizol	31
2.3.2.10 Isolation von RNA aus Hefezellen mittels Trizol	31
2.3.2.11 RNase A/T1-Behandlung	32
2.3.2.12 Silberfärbung	32
2.3.2.13 DNase-Behandlung	33
2.3.2.14 Reverse Transkription	33

2.3.2.15	Bestimmung der Wiedergewinnungsrate von RNA mittels fluoreszenzmarkierter RNA	33
2.3.2.16	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	34
2.3.2.17	<i>Next generation sequencing</i> von sRNAs	35
2.4	Proteinbiochemische Methoden	36
2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
2.4.2	Westernblot	37
2.5	Arbeiten mit Zellen	38
2.5.1	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	38
2.5.2	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	38
2.5.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	39
2.5.4	Heterologe Genexpression in <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	39
2.5.5	LiOAc-DNA-Extraktion aus <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	39
2.5.6	Zellaufschluss von Hefezellen mittels Ultraschall	40
2.5.7	Herstellung von Gefrierstocks von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	40
2.5.8	Fermentation	40
2.5.9	Bestimmung der Glukosekonzentration in Fermentationsproben	43
2.5.10	DCL-Assay	43
2.5.11	<i>In-vitro</i> -Translation	44
2.5.12	Luciferase-Assay	45
2.5.13	<i>Slicer</i> -Assay	45
2.5.14	DCL- <i>Slicer</i> -Assay	46
2.5.15	Hitzeinaktivierung	47
2.5.16	Probenvorbereitung des <i>in-vivo</i> -Experiments	47
2.5.17	Applikation dsRNA-transkribierender Hefe	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Generierung von RNAi-Komponenten in <i>S. cerevisiae</i>	49
3.1.1	Klonierung der codierenden Sequenz der Pflanzengene <i>DCL4</i> und <i>DRB4</i> in Hefevektoren	49
3.1.2	Heterologe Genexpression von <i>DCL4</i> und <i>DRB4</i> sowie Aktivitätsnachweis <i>in vitro</i>	50
3.2	Herstellung effizienter doppelsträngiger RNA (edsRNA).....	52
3.2.1	Design der Modell-edsRNA-Konstrukte	52
3.2.2	<i>Proof-of-concept</i> des Designs der edsRNA-Konstrukte durch T7-Transkription und Nachweis einer Prozessierung und Aktivität <i>in vitro</i>	55
3.2.3	Verwendung unterschiedlicher RNA-Pol II-abhängiger Promotoren zur Transkription der edsRNA <i>in vivo</i>	58
3.2.4	Transkription der edsRNA in <i>S. cerevisiae</i>	59
3.2.5	Bestimmung der Quantität an <i>in vivo</i> transkribierter edsRNA	61
3.2.6	Nachweis einer Prozessierung und Aktivität der <i>in vivo</i> transkribierten edsRNA im DCL- <i>Slicer</i> -Assay	65
3.2.7	Etablierung eines Fermentationsverfahrens zur Produktion von dsRNA in <i>S. cerevisiae</i>	67
3.2.8	Coexpression von <i>DCL4</i> und edsRNA in <i>S. cerevisiae</i> zur direkten Applikation inaktivierter Hefe mit esiRNAs	72
3.3	Anwendung von dsRNA-exprimierenden Hefen zur biotechnologischen Schädlingskontrolle im Labormaßstab	78

3.3.1	Inaktivierung der Hefe zur sicheren Verbreitung in der Umwelt.....	78
3.3.2	Klonierung und Herstellung der (e)dsRNA-Konstrukte für <i>in-vivo</i> -Experimente gegen CPB	80
3.3.3	Versuchsaufbau des CPB-Experiments	83
3.3.4	Phänotypische Analyse	85
3.3.5	Genotypische Analyse	92
4	Diskussion	94
4.1	Aufbau potenzieller edsRNA-Kandidaten für die Transkription in <i>S. cerevisiae</i> und Aktivitätstests im Pflanzenextrakt	94
4.2	Transkription der Modell-edsRNA in <i>S. cerevisiae</i> sowie Detektion und Quantifizierung unter <i>in-vitro</i> -Bedingungen.....	97
4.3	Fehlerhaftes <i>phased processing</i> von edsRNA durch DCL4 in <i>S. cerevisiae</i>	101
4.4	Funktionalität des Konzepts der Herstellung von edsRNA in <i>S. cerevisiae</i> am Beispiel des Kartoffelkäfers	103
4.5	Potenzial und Biosicherheit von RNAi-basierten Biopestiziden	108
4.5.1	Vorteile von RNAi-basierten Biopestiziden	108
4.5.2	Nachteile und Herausforderungen	109
4.5.3	Aspekte der Biosicherheit	110
4.6	Ausblick.....	111
5	Zusammenfassung	113
6	Literaturverzeichnis	116
7	Anhang	128
7.1	Abbildungen und Tabellen	128
7.2	Plasmide	130
7.3	Plasmidkarten	133
7.4	Oligonukleotide	141
	Abbildungsverzeichnis.....	IV
	Tabellenverzeichnis	VI
	Danksagung.....	VII
	Lebenslauf	IX
	Publikationsliste.....	X
	Eidesstattliche Erklärung	XI

Abkürzungsverzeichnis

AGO	ARGONAUTE-Nuklease
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	Basenpaar
bspw.	beispielsweise
BYL	BY2-Lysat
BY2	<i>bright yellow-2</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i>
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CPB	<i>Colorado Potato Beetle</i>
C _t	Schwellenwertzyklus
CYC	<i>Iso-1-cytochrome c</i>
DCL / DCR	<i>Dicer-like protein / Dicer protein</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonuklease
DNase / dsDNase	Desoxyribonuklease / <i>double-strand specific DNase</i>
dO ₂	gelöster Sauerstoff
ds	doppelsträngig
dsRBD / dsRBM	Doppelstrang-RNA-Bindedomäne / Doppelstrang-RNA-Bindemotiv
DTT	Dithiothreitolpp
edsRNA	effiziente dsRNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
esiRNA	effiziente siRNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	und andere
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
F2F	<i>Farm-to-fork</i>
g	Erdbeschleunigung
GAL	Galaktokinase
ggf	gegebenfalls
GMO	<i>genetically modified organism</i>

GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
h	Stunde
HDV _{IZ}	Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HH _{IZ}	<i>Hammerhead</i> -Ribozym
HIGS	<i>host-induced gene-silencing</i>
HS	Harnstoff
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ivT	<i>in-vitro</i> -Transkription
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
m7G	7-Methylguanosin
min	Minute
miRNA	microRNA
MOPS	3- (N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
nt	Nukleotid
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
NTPs	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
Oligo-dT	oligo-Desoxythymidin
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAZ	Piwi-Argonaute-Zwille
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR / qPCR	(quantitative) Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
PSMB5	20S-Proteasomen-Untereinheit Beta 5
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>

RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolution per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s.	siehe
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SIGS	<i>spray-induced gene silencing</i>
siRNA, siR	<i>small interfering RNA</i>
sRNA	<i>small RNA</i>
ss	einzelsträngig
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
TEF	Translations-Elongationsfaktor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	<i>unit</i>
UV	ultraviolett
VSR	<i>viral suppressor of RNA-silencing</i>
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

1 Einleitung

1.1 Einfluss einer nachhaltigen Landwirtschaft auf die Nahrungssicherung

Im Jahr 2022 lebten erstmals mehr als acht Milliarden Menschen auf der Erde (1). Zudem wird geschätzt, dass die Weltbevölkerung die Grenze von zehn Milliarden bis zum Ende des Jahrhunderts erreichen wird (2). Eines der Hauptprobleme wird dann die gesicherte Ernährung aller sein, da bereits zum jetzigen Zeitpunkt mehr als zwei Milliarden Menschen keinen ausreichenden Zugang zu Nahrung haben (3). Zusätzlich reduziert die Klimakrise den Ernteertrag erheblich und wirkt sich auch indirekt durch gesteigerte Viren- oder Pilzinfektionen oder erhöhte Population von Schadinsekten auf den Ertragsverlust aus (4). Im Allgemeinen lassen sich die Ursachen für Ernteverluste in abiotische, biotische sowie anthropogene Faktoren einteilen. Schadinsekten, welche zu den biotischen Faktoren gehören, haben einen besonders großen Anteil an den Ertragsverlusten. In natürlichen Ökosystemen spielen sie eigentlich eher eine untergeordnete Rolle, aber durch das rasante Wachstum der Weltbevölkerung sowie Profitgier muss eine intensivere Landwirtschaft betrieben werden. Dies resultiert in einem Anstieg an Ertragsverlust durch Schadinsekten. Laut Schätzungen entfallen jährlich etwa 20 % der globalen Ertragsverluste in der Landwirtschaft auf die Wirkung von Schadinsekten, was einem wirtschaftlichen Verlust von etwa 470 Milliarden US-Dollar entspricht. (5,6).

Der Einsatz chemischer Pestizide stellt nach wie vor eine der am häufigsten genutzten Strategien zur Bekämpfung von Schadinsekten dar. Chemische Pestizide weisen jedoch eine eingeschränkte Selektivität auf und beeinträchtigen daher auch Nutzinsekten wie bspw. Bienen. Dies hat zur Folge, dass die Biodiversität drastisch abnimmt (7). Weiterhin führt die übermäßige Anwendung chemischer Pestizide zur Resistenzbildung im Zielorganismus, sodass weitere Wirkstoffe verwendet werden müssen und die Effektivität der Schädlingsbekämpfung deutlich sinkt (8,9). Zudem wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass chemische Pestizide auch der menschlichen Gesundheit schaden (10).

Aus diesen und weiteren, hier nicht genannten Gründen gibt es seit einigen Jahrzehnten Bestrebungen, die Landwirtschaft nachhaltiger zu gestalten. Im Zeichen der nachhaltigen Landwirtschaft entwickelten die Vereinten Nationen 2015 sogenannte Nachhaltigkeitsziele (*sustainable development goals*), die bis zum Jahr 2030 erreicht werden sollen (11). Weiterhin beschloss auch die Europäische Union 2019 den *European Green Deal*, bei welchem die *Farm-to-fork*-Strategie (F2F, zu Deutsch „vom Hof auf den Tisch“) im Mittelpunkt steht. Diese beinhaltet unter anderem das Verringern des Einsatzes und des Risikos von chemischen Pestiziden um 50 % und die Erhöhung ökologischen Farmlandes um 25 % bis zum Jahr 2030 (12). Ein vollständiger Verzicht auf chemische Pestizide stellt jedoch keine praktikable Option dar, da dies, je nach Kulturpflanze, zu Ertragseinbußen von bis zu 30 % führen kann (13). Vor

diesem Hintergrund besteht ein dringender Handlungsbedarf zur Entwicklung wirksamer Alternativen, allerdings sind die Anforderungen an diese hoch. Idealerweise sollten sie biologisch abbaubar, hochspezifisch gegenüber Zielorganismen und zugleich kosteneffizient in der Anwendung sein. Eine vielversprechende Strategie, die diesen Kriterien gerecht werden kann, stellt die RNA-Interferenz (RNAi)-Technologie dar.

RNAi ist seit 1998 bekannt und wurde seither in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten als mögliche Alternative zu konventionellen chemischen Pflanzenschutzmitteln untersucht. Eine zentrale Herausforderung bisheriger Forschungsansätze besteht in der Entwicklung von Verfahren zur Herstellung RNAi-basierter Wirkstoffe, die unabhängig von transgenen Pflanzen funktionieren und gleichzeitig eine kostengünstige Anwendung in der Landwirtschaft ermöglichen. Eine transgene Pflanze ist ein genetisch veränderter Organismus (GMO), in dessen Genom mittels gentechnischer Verfahren ein oder mehrere artfremde Gene (Transgene) stabil integriert wurden, um gezielt neue Eigenschaften wie bspw. eine Resistenz gegen Schädlinge, Herbizide oder abiotischen Stress zu vermitteln. Ziel dieser Arbeit ist es daher, das Potenzial von *Saccharomyces cerevisiae* als Produktionssystem für RNAi-basierte Wirkstoffe eingehend zu analysieren.

1.2 RNA-Interferenz (RNAi)

Vor mehr als 30 Jahren wurde RNAi, wenn auch unwissentlich, bei Experimenten zur Verstärkung der Blütenfärbung von Petunien entdeckt (14). 1998 beschrieben die Wissenschaftler Andrew Fire und Craig Mello erstmalig den Effekt der RNAi im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (15). RNAi stellt einen hochkonservierten Mechanismus in den meisten eukaryotischen Lebenswesen dar, welcher der zielgerichteten Abschaltung von Genen auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene dient. Die Funktion der RNAi variiert jedoch von der Regulation der endogenen Genexpression bis hin zur Abwehr viraler Infektionen sowie von Transposons und Transgenen. Dabei wird entweder die *messenger* RNA (mRNA) bzw. virale, genomische RNA abgebaut, die Translation inhibiert oder aber die Chromatinstruktur verändert (16,17). Der Ausgangspunkt der RNAi sind längere, doppelsträngige RNAs (dsRNA) bzw. einzelsträngige RNAs (ssRNAs) mit doppelsträngigen Bereichen, welche nachfolgend in kleine, doppelsträngige RNAs prozessiert werden. Die wohl bedeutendsten dieser RNAs sind sogenannte microRNAs (miRNAs) und *small interfering* RNAs (siRNAs) (18). Nachfolgend wird RNAi anhand des antiviralen RNA-silencings in Insekten erläutert.

1.2.1 Antivirales RNA-silencing in Insekten

Die Infektion eines Insekts mit einem Virus löst das antivirale RNA-silencing aus. Dabei wird virale RNA in Form von dsRNA, entweder als Replikationsintermediat oder aber als doppelsträngige Bereiche der genomischen RNA, erkannt und durch Klasse III-Ribonukleasen in kleine dsRNAs prozessiert. Die in diesem Mechanismus aktive Ribonuklease ist das sogenannte *Dicer-2*-Protein (DCR2), welche als Produkt hauptsächlich siRNAs mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden (nt) generiert (19). Die Größe hängt von dem jeweiligen Organismus ab. Das Produkt der DCRs zeichnet sich durch ein charakteristisches 5'-Monophosphat und einen 2-nt 3'-Überhang aus und besteht aus einem *guide*- und einem *passenger*-Strang (20). Nach der Prozessierung der dsRNA wird der siRNA-Duplex durch DCR-2 und seinem Cofaktorprotein R2D2 gebunden. Der Komplex unterstützt das *Argonaute-2*-Protein (AGO2) bei der Bindung der siRNAs (21). Anschließend entwindet AGO2 den Duplex, wobei der *guide*-Strang gebunden bleibt und der *passenger*-Strang nukleolytisch mit Unterstützung der Endoribonuklease C3PO abgebaut wird (22). Als *guide*-Strang wird in der Regel der Strang ausgewählt, welcher im siRNA-Duplex das weniger stabil gepaarte 5'-Ende aufweist. Zudem bindet R2D2 den Strang des siRNA-Duplex mit dem thermodynamisch stabileren 5'-Ende, sodass DCR-2 automatisch an den Strang mit dem instabileren 5'-Ende bindet und somit AGO2 präsentiert (23,24). Nachfolgend wird der *guide*-Strang an der 2'-Hydroxyl-Gruppe der Ribose des 3'-Nukleotids durch HEN1 methyliert und es lagern sich weitere Proteine an, sodass sich der *RNA-induced silencing complex* (RISC) bildet (25,26). Der RISC erkennt die Target-RNA über komplementäre Basenpaarung und spaltet diese durch Hydrolyse an einer definierten Position (27,28). Dadurch wird die Translation viraler Proteine und zusätzlich die Replikation inhibiert (**Abbildung 1**). Des Weiteren kann die lokale Antwort auf die Virusinfektion in bisher noch nicht infizierte Zellen erweitert und somit auch dort RNAi ausgelöst werden. Ob diese sogenannte systemische RNAi allerdings in allen Insekten auftritt, ist zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt (29). Bspw. wird virale dsRNA aus infizierten Zellen durch *Drosophila melanogaster*-Hämozyten aufgenommen und durch endogene Transposon-Reverse-Transkriptasen in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese dient als Template für die *de-novo*-Synthese von sekundären siRNAs, welche in Exosom-ähnlichen Vesikeln sekretiert werden und so eine systemische Immunantwort vermitteln (30). Außerdem wird die antivirale Immunantwort durch Interaktionen von Molekülen von RNAi- und nicht-RNAi-Stoffwechselwegen verstärkt (31).

Dem Mechanismus des antiviralen RNA-silencings können Viren allerdings durch Generierung sogenannter viraler Suppressorproteinen (VSRs) entgegenwirken (32,33). Grundsätzlich bestehen drei Möglichkeiten ihrer Wirkweise: 1.) direkte Interaktion mit den Kernkomponenten der RNAi (34,35). 2.) Bindung langer dsRNA, um die Prozessierung zu

unterbinden (36). 3.) Bindung von siRNA, um die Beladung des AGO2 zu verhindern (37). Letztlich handelt es sich um ein evolutionäres Wettrüsten zwischen dem Wirtsorganismus und dem Virus, bei dem beide Seiten kontinuierlich neue Anpassungsstrategien entwickeln.

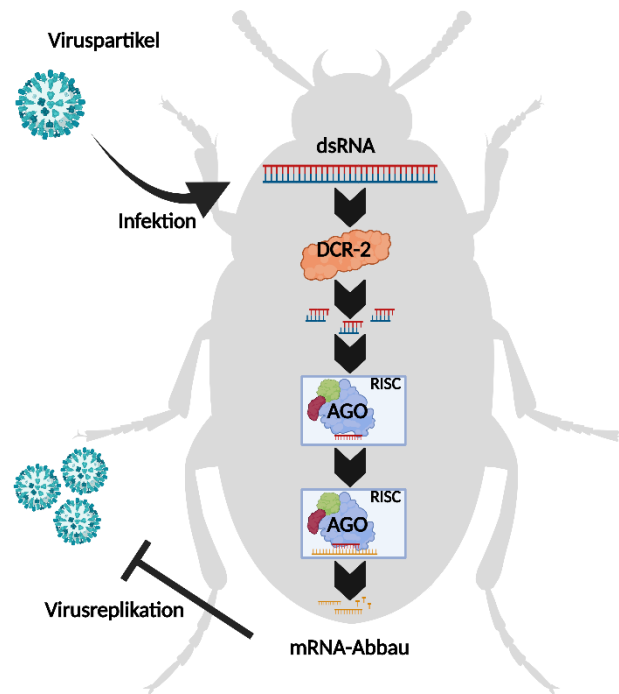


Abbildung 1: RNAi-Mechanismus in Insekten

Virale dsRNA wird durch *Dicer-2* (DCR2) erkannt und in kleine *small interfering RNAs* (siRNAs) prozessiert. Der *guide*-Strang wird vom *Argonaute*-Protein (AGO) gebunden und die virale Target-RNA nach Bildung des *RNA-induced silencing complex* (RISC) endonukleolytisch gespalten. Dies verhindert die Virusreplikation und unterbindet die Virusinfektion. Modifiziert nach (38) und mit BioRender erstellt.

1.2.2 *Dicer* und *Dicer-like*-Proteine - der Initiator der RNAi

DCR-Proteine und ihre orthologen *Dicer-like*-Proteine (DCL) gehören zur Familie der Typ-III-Ribonukleasen. Diese Enzyme sind, wie bereits beschrieben, essenziell für die Biogenese kleiner, nicht-kodierender RNAs, wie miRNAs und siRNAs (39,40). Die Anzahl der DCR/DCL-Proteine variiert erheblich zwischen Eukaryoten. Während Säugetiere lediglich ein *DCR*-Gen besitzen, weisen Insekten zwei und Pflanzen mindestens vier Gene auf (41). Die erhöhte Anzahl in Pflanzen ist das Ergebnis umfangreicher Genduplikationen, die vermutlich eine funktionelle Anpassung an die spezifischen Bedürfnisse pflanzlicher Organismen ermöglichten (42). Im Gegensatz zu Säugetieren, die auf Interferonantworten zurückgreifen können (43), und Insekten, die bspw. den JAK-STAT-Signalweg nutzen (44), besitzen Pflanzen kein vergleichbares Immunabwehrsystem. Bei Säugetieren löst die Erkennung viraler Nukleinsäuren durch zelluläre Sensoren die Produktion von Typ-I-Interferonen aus, die über spezifische Rezeptoren Signalwege aktivieren und so die Expression antiviraler Gene

zur Hemmung der Virusreplikation fördern. In Insekten aktiviert die Bindung von Liganden an den *Domeless*-Rezeptor den JAK-STAT-Signalweg, der zur Transkription antiviraler Effektorgene führt (45). Die Diversifizierung der DCL-Proteine könnte daher eine kompensatorische Rolle in der pflanzlichen Immunabwehr spielen.

DCR/DCL-Proteine lassen sich in zwei Klassen unterteilen, basierend auf der Anzahl ihrer RNase III-Domänen. Zur Klasse I gehören Enzyme mit einer einzelnen RNase III-Domäne, die als Homodimere agieren. Enzyme der Klasse II besitzen hingegen zwei RNase III-Domänen und arbeiten als Monomere (46). Proteine der Klasse II zeichnen sich zudem durch eine hochkonservierte Domänenstruktur aus, die sechs funktionale Bereiche umfasst: die ATPase- und DExD/H-Box-Domänen, welche im N-terminalen Bereich lokalisiert sind, die *domain of unknown function 283* (DUF283) und die PAZ-Domäne, welche sich im mittleren Sequenzabschnitt befinden und die beiden RNase III-Domänen a und b sowie die Doppelstrang-RNA-Bindedomänen (dsRBD), welche C-terminal gelegen sind (47). Zusätzlich weisen einige Gene noch Kernlokalisationssignale (NLS) auf (48) (**Abbildung 2**).

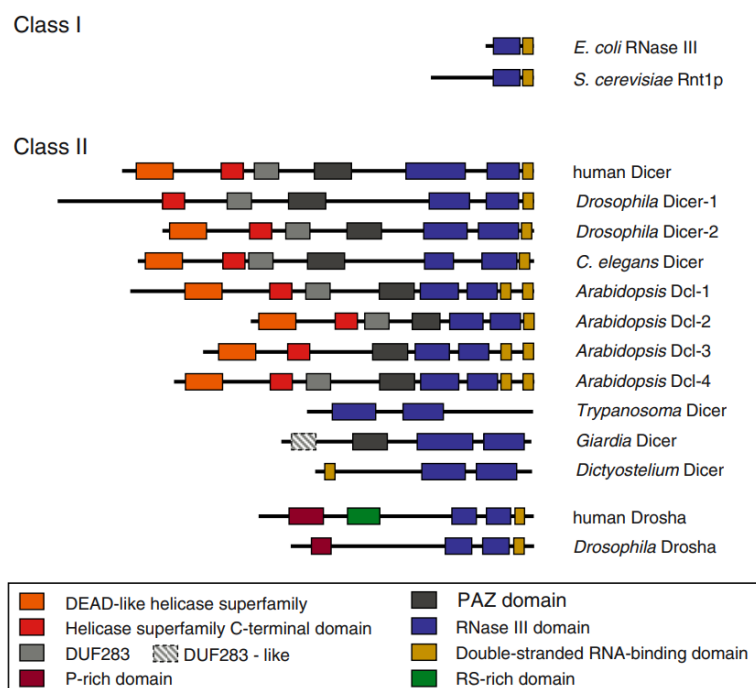


Abbildung 2: Domänenorganisation der DCR und DCL

DCR und DCL können, abhängig von der Anzahl an RNase III-Domänen, in zwei Klassen unterteilt werden. Die einzelnen Domänen sind farblich dargestellt. Abbildung aus (46)

Das erste strukturell analysierte DCR (Kristallstruktur) stammt vom Protozoen *Giardia intestinalis* (49). Basierend auf diesem Modell wurden detaillierte Hypothesen zur Funktion der einzelnen Domänen aufgestellt. Die Helikase- und dsRBD-Domänen spielen eine wichtige Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen und sind zudem an der Bindung der dsRNA beteiligt

(47,50,51). Weiterhin wird die Bindung des 3'-Endes der dsRNA durch die PAZ-Domäne über eine hochkonservierte Tasche realisiert (52). Einige DCR, wie bspw. das humane DCR und DCR-2 aus *D. melanogaster*, besitzen zudem eine 5'-Bindetasche zur zusätzlichen Stabilisierung der dsRNA-Bindung (53). Die RNase III-Domänen bilden das katalytische Zentrum und schneiden jeweils einen Strang der dsRNA. Dabei wird die spezifische Länge der generierten RNA-Produkte durch den Abstand zwischen der PAZ-Domäne und dem katalytischen Zentrum definiert. Diese Bereiche sind über eine sogenannte *connector helix* miteinander verbunden, die eine präzise räumliche Anordnung sicherstellt (49). Die exakte Wirkweise ist allerdings noch nicht für alle DCR/DCL-Proteine beschrieben und einige Veröffentlichungen zeigen auch, dass es Unterschiede in den jeweiligen Präferenzen und Mechanismen gibt. Ein wesentliches Merkmal der DCR/DCL-Funktion ist jedoch die Zusammenarbeit mit Cofaktoren, die die Aktivität des Enzyms unterstützen oder modulieren (54–56). Cofaktoren zeichnen sich häufig durch das Vorhandensein von einem oder mehreren dsRNA-Bindemotiven (dsRBM) aus, die spezifische Interaktionen mit der RNA und dem DCR/DCL-Protein ermöglichen. Für das pflanzliche DCL4, das eine Schlüsselrolle im antiviralen *silencing* spielt, wurde bspw. das Cofaktorprotein DRB4 identifiziert (57).

1.2.3 Steigerung der Effektivität der RNAi-Technologie durch effiziente siRNAs (esiRNAs)

Die RNAi-Technologie wird bereits bspw. in den USA und in Kanada kommerziell zur Bekämpfung von Schadinsekten und in weiteren Ländern zur Bekämpfung von Viren, welche Nutzpflanzen infizieren, eingesetzt (58,59). Ein wesentlicher Nachteil dieses Ansatzes besteht jedoch darin, dass die hierfür eingesetzte dsRNA, wie in den meisten Fällen, durch *in-silico*-Methoden entworfen wird (60). Dies führt zu zwei wesentlichen Limitationen: Erstens lässt sich bislang nur eingeschränkt eine verlässliche Aussage über die Zugänglichkeit der Target-mRNA in dem Bereich treffen, aus dem die siRNAs generiert werden. Zweitens entsteht während der Prozessierung der dsRNA durch DCL4 (primär) ein heterogener Pool aus 21 nt langen siRNAs, der überwiegend ineffiziente und nur wenige hochwirksame siRNA-Moleküle umfasst. Infolgedessen besteht die Möglichkeit, dass AGO1 und AGO2, die maßgeblich an der pflanzlichen RNAi-vermittelten Immunantwort beteiligt sind, bevorzugt mit weniger wirksamen siRNAs beladen werden. Dies kann zu einer insgesamt abgeschwächten oder ineffizienten regulatorischen Wirkung führen. (61–64).

In der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Biotechnologie“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wird bereits seit einigen Jahren an der Steigerung der Effektivität der RNAi-Technologie geforscht. Dabei wurde ein *screening*-Verfahren entwickelt, das die gezielte Identifikation der besonders wirksamen siRNAs *in vitro* ermöglicht. Im Folgenden werden sie

als sogenannte effiziente siRNAs (esiRNAs) bezeichnet (63). Die Eigenschaften, welche eine esiRNA charakterisieren, sind eine hohe Affinität zum AGO, die Zugänglichkeit der Target-RNA und eine hohe Umsatzrate des RISC (65,66). In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte bereits am Modellvirus *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) ein ausgeprägter Schutz durch Verwendung von esiRNAs gegenüber einer viralen Infektion nachgewiesen werden (63). Im weiteren Verlauf der Forschung wurde in einem multivalenten Ansatz eine sogenannte effiziente, doppelsträngige RNA (edsRNA) entworfen, welche aus mehreren zuvor identifizierten esiRNAs besteht. Die einzelnen esiRNAs haben jeweils die charakteristische Länge von 21 nt. Die edsRNA wird durch das endogene DCL4 in der Pflanze in einem definierten Muster in die zuvor indentifizierten 21 nt lange esiRNAs prozessiert. Diese esiRNAs werden anschließend in AGO1 bzw. AGO2 eingebaut, wodurch ein funktioneller RISC entsteht, der eine gezielte, endonukleolytische Spaltung der komplementären Target-mRNA vermittelt (näheres im Ergebnisteil). Die edsRNA zeigte nach Applikation auf der Pflanze *Nicotiana benthaminana* einen 80-100%igen Schutz gegenüber einer Infektion mit *Cucumber mosaic virus* (CMV). Ein Vorteil der edsRNA liegt darin, dass diese bspw. auch aus diversen esiRNAs gegen verschiedene Target-RNAs des Ziel-Organismus bestehen und somit der Schutz erhöht werden kann (67).

1.3 Einsatz von RNAi zur Schädlingsbekämpfung - Fortschritte, Herausforderungen und Perspektiven

Wie bereits ausgeführt, wird RNAi mittlerweile in der Entwicklung innovativer Strategien zur Schädlingsbekämpfung verwendet. Dabei wird spezifische dsRNA generiert, die auf einen Abschnitt eines essenziellen Gens des Schadinsekts abgestimmt ist. Diese dsRNA wird von dem Insekt aufgenommen und im Rahmen des natürlichen RNAi-Prozesses zu siRNAs prozessiert, welche die RISC-vermittelte Spaltung der komplementären Target-mRNA auslösen. Dies führt zur Unterbindung der Translation essenzieller Proteine. Da die Proteine für das Überleben und die Reproduktion des Schadinsekts unverzichtbar sind, hat die gezielte Degradierung der mRNA letztlich den Tod des Organismus zur Folge. Dies trägt nicht nur zur Bekämpfung einzelner Schädlinge bei, sondern kann auch eine signifikante Reduktion der gesamten Population bewirken (**Abbildung 3**) (68).

Die Applikation von dsRNA lässt sich in zwei Hauptkategorien unterteilen, die transformative und die nicht-transformative Anwendung (**Abbildung 3**) (69). Der transformative Ansatz basiert auf der Nutzung transgener Pflanzen, bei denen eine Expressionskassette zur Synthese von dsRNA in die Pflanzenzellen integriert wird. Häufig erfolgt die Lokalisierung dieser Kassette in den Chloroplasten, da dort keine DCLs vorliegen. Dadurch kann sich die dsRNA in den chloroplastidären Kompartimenten ansammeln, wodurch ausreichend Material

für eine effektive Anwendung bereitgestellt wird (70,71). Im Gegensatz dazu umfasst der nicht-transformative Ansatz die Aufnahme exogen hergestellter dsRNA durch Pflanzen. Dies kann entweder über die Wurzeln oder über die Blätter durch Bewässerung oder Sprühapplikation geschehen. Da die dsRNA in diesem Fall nicht endogen synthetisiert wird, muss ihre Stabilität sowie die Effizienz ihrer Aufnahme in die Zellen gewährleistet werden, um eine ausreichend biologische Wirkung zu erzielen (72,73).

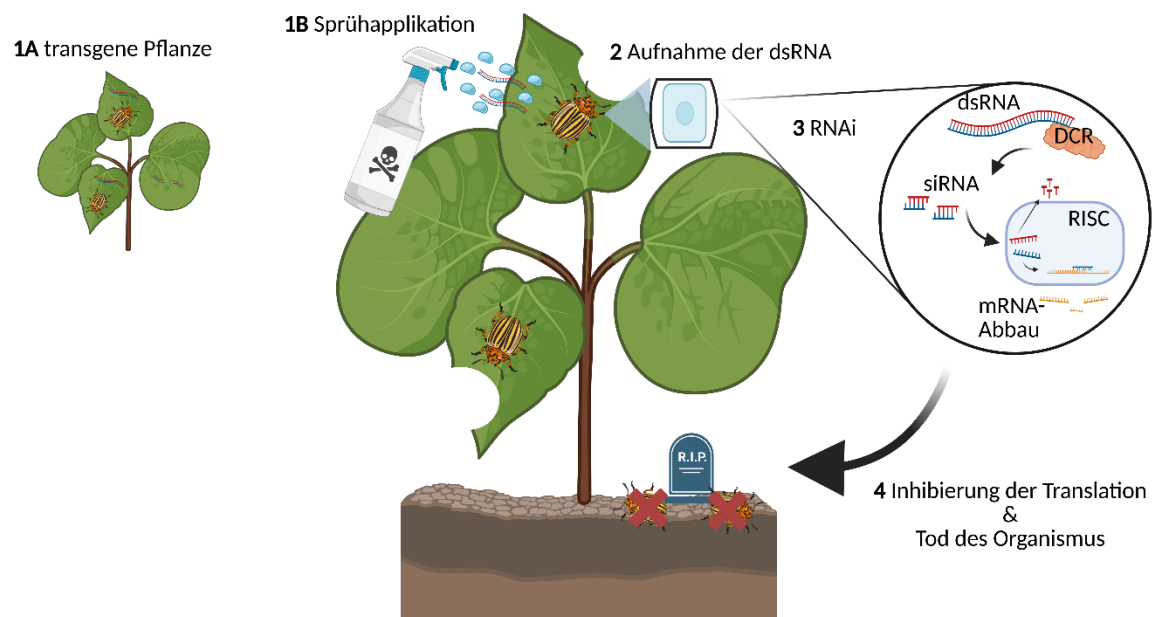


Abbildung 3: Anwendung der RNAi-Technologie

Der grundlegende Mechanismus der RNAi kann zur Schädlingsbekämpfung verwendet werden. Dazu wird eine hochspezifische dsRNA, die auf einen Abschnitt eines essenziellen Gens des Schadinsekts abgestimmt ist, entweder in transgenen Pflanzen (**1A**) oder exogen (**1B**) generiert. Durch das Fressen der Pflanze nimmt das Insekt die dsRNA auf (**2**) und die eigene RNAi wird ausgelöst (**3**). Dies führt zum Abbau der essenziellen Target-mRNAs und resultiert im Tod des Schadinsekts und einer Verringerung der Population (**4**). Abbildung modifiziert nach (74) und mit BioRender erstellt.

Die kommerzielle Verwendung der RNAi gegen Schadinsekten begann mit der Zulassung der gentechnisch veränderten Maispflanze *Smartstax Pro Corn*, die dsRNA gegen den Westlichen Maiswurzelbohrer (*Western Corn Rootworm*) generiert, welche für einen Abschnitt des *snf7*-Gens codiert (59,75,76). Die Vorteile transgener Pflanzen liegen in der kontinuierlichen Produktion von dsRNA und der damit verbundenen Wirksamkeit gegenüber spezifischen Schädlingen sowie dem Verzicht auf nachfolgende Aufarbeitung (77,78). Ungeachtet ihrer Fortschritte sind transgene Pflanzen weiterhin mit zahlreichen Herausforderungen verbunden. Die Akzeptanz in der Gesellschaft, insbesondere in Europa, ist gering, was vor allem auf ethische und sicherheitsbezogene Bedenken zurückzuführen ist. Zudem erfordert die

Entwicklung von GMOs hohe Investitionen und hohen Zeitaufwand (79). Ein weiteres Problem können die von der Pflanze produzierten siRNAs aus der dsRNA darstellen. Diese können durch Ineffizienz zu einer abgeschwächten RNAi führen (80). Zudem führt der anhaltende Selektionsdruck auf die zielgerichtet bekämpften Schadinsekten zur Entwicklung von Resistenzen, wodurch die Wirksamkeit der Maßnahmen im Laufe der Zeit abnimmt und transgene Pflanzen bei kontinuierlicher Aussaat langfristig an Effektivität verlieren können (81).

Um die Nachteile transgener Pflanzen zu umgehen, wurden alternative Methoden entwickelt. Ein Ansatz nutzt modifizierte Pflanzen- oder Insektenviren, die dsRNA in der Pflanze generieren und dann spezifisch an Schädlinge abgeben. Dies reduziert potenzielle Nebenwirkungen bei nützlichen Insekten und der Umwelt (82). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dsRNA direkt auf Pflanzen, bspw. in Form von Sprays oder Pulvern, aufzutragen, ähnlich wie herkömmliche Insektizide, was auch als *spray-induced gene silencing* (SIGS) bezeichnet wird (73). Dazu muss die dsRNA allerdings entweder synthetisch oder in Mikroorganismen hergestellt werden (83). Insgesamt wird die Herstellung von dsRNA durch Fortschritte in der biotechnologischen Produktion auch zunehmend kostengünstiger. Während die Herstellungskosten 2008 noch bei 12.000 US-Dollar pro Gramm lagen, sind sie mittlerweile für einige Herstellungsweisen auf etwa 1 US-Dollar gesunken (84).

Dennoch gibt es auch einige Nachteile in der Verwendung der RNAi-Technologie. Bspw. bleibt vor allem die Instabilität der dsRNA eine große Herausforderung. Zum einen besteht die Gefahr von enzymatischem Abbau durch RNasen, die ubiquitär vorkommen und deren Expressionsmuster zwischen den Insektenspezies variieren (85). Zum anderen verringern die äußeren Umwelteinflüsse wie Regen oder UV-Strahlung die Lebensdauer der dsRNA bei der Verwendung mittels SIGS (86,87). Weiterhin kann die dsRNA auch in den Boden übergehen, dort zersetzt und von anderen Mikroorganismen aufgenommen werden (88). Im Allgemeinen wird dsRNA hauptsächlich über Endozytose aufgenommen, wobei die Effizienz für „nackte“ dsRNA oft sehr gering ist (89). Verpackungstechnologien, etwa mit Liposomen oder natürlichen Polymeren wie Chitosan, können die Stabilität und Aufnahme zwar verbessern, sind jedoch derzeit teuer und in ihrer Effizienz noch begrenzt (90). Zudem variiert auch die Wirksamkeit von RNAi erheblich zwischen verschiedenen Insektenordnungen. Während Orthoptera, Blattodea und Coleoptera gut auf RNAi reagieren, zeigen Lepidoptera und Diptera eine geringere Empfindlichkeit. Diese Unterschiede sind auf biologische Barrieren, wie Verdauungsenzyme oder Zellaufnahmemechanismen, zurückzuführen (91,92). Ebenfalls muss beim Design einer dsRNA bedacht werden, dass die siRNAs zwar bei den meisten Insekten durch DCR-2 generiert werden, sich deren Länge jedoch zwischen den verschiedenen Spezies unterscheiden kann (21 bis 23 nt) (93,94). Ähnlich wie bei chemischen Pestiziden besteht auch bei RNAi die Gefahr der Resistenzbildung (95). Eine mögliche Lösung

sind Kombinationstherapien, bei denen mehrere Target-RNAs gleichzeitig adressiert werden, um die Evolution resistenter Schädlingspopulationen zu verzögern.

Trotz der bestehenden Herausforderungen, insbesondere der Effizienzsteigerung, der Kostenreduktion und der Regulierungsvorgaben, bleibt RNAi eine vielversprechende Zukunftstechnologie. Mit weiteren Fortschritten in Forschung und Entwicklung könnte sie den globalen Markt nachhaltig beeinflussen und einen entscheidenden Beitrag zur Bekämpfung des globalen Schädlingsdrucks leisten. In diesem Zuge können zunächst auch kombinierte Maßnahmen der RNAi-Technologie und bereits angewandeter Biozide zur Bekämpfung von Schadinsekten eingesetzt werden, um eine Reduktion der Population innerhalb eines akzeptablen Bereichs zu gewährleisten (96).

1.4 Herstellung doppelsträngiger RNA

Wie bereits erläutert, stellt die RNAi-Technologie eine vielversprechende Alternative zu chemischen Pestiziden dar, da sie aufgrund ihrer hohen Sequenzspezifität potenzielle *non-target*-Effekte im Vergleich zu konventionellen Wirkstoffen deutlich reduziert. Eine differenzierte Betrachtung von *off-target*- und *non-target*-Effekten ist hierbei jedoch unerlässlich: *Off-target*-Effekte bezeichnen unerwünschte Wirkungen im Zielorganismus, die durch die unbeabsichtigte Regulation von Genen mit partieller Sequenzhomologie zur vorgesehenen Zielsequenz hervorgerufen werden. *Non-target*-Effekte hingegen betreffen Organismen außerhalb des Zielspektrums, bei denen es durch Sequenzähnlichkeiten oder Aufnahme der dsRNA zu unbeabsichtigten molekularen Interaktionen kommen kann. Ein mögliches Szenario wäre hier die Beeinflussung homologer Sequenzen in nicht-zielgerichteten, ökologisch bedeutsamen Insektenarten wie der Honigbiene, was potenziell negative Auswirkungen auf deren Vitalität haben könnte. Zum momentanen Zeitpunkt liegt eine wesentliche Limitation der Technologie in der kostengünstigen und somit wirtschaftlichen Herstellung der dsRNA. Im folgenden Abschnitt werden diverse Herstellungsmethoden aufgezählt und miteinander verglichen.

1.4.1 Vergleich verschiedener Herstellungsmöglichkeiten von dsRNA

Die Herstellung von dsRNA für den nicht-transformativen Ansatz kann über *in-vitro*- und *in-vivo*-Systeme erfolgen. Während *in-vitro*-Systeme die enzymatische Synthese in einer zellfreien Umgebung ermöglichen, nutzen *in-vivo*-Systeme Mikroorganismen, wie Bakterien oder Hefen, zur Produktion. Beide Methoden bieten spezifische Vorteile und Herausforderungen, die je nach Anwendung berücksichtigt werden müssen.

Die *in-vitro*-Transkription (ivT) stellt die vermutlich einfachste Methode zur Herstellung von dsRNA dar und wird häufig in Laborstudien eingesetzt. Diese Technik basiert auf der

enzymatischen Synthese durch eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, wie bspw. der T7-RNA-Polymerase. Dabei dient eine spezifische DNA mit zwei entgegengesetzten Promotoren als Template. Dies ermöglicht die gleichzeitige Transkription beider RNA-Stränge durch *run-off*-Transkription oder Terminator-gesteuerte Prozesse (97,98).

Trotz ihrer Effizienz weist die ivT einige Einschränkungen auf. Es können Unterschiede in der Transkriptionsrate der beiden Stränge auftreten, was zu einer ungleichmäßigen Ausbeute und einer verminderten Gesamtmenge an dsRNA führt. Des Weiteren besitzt das Transkript aufgrund der Eigenschaften der T7-Polymerase strukturelle Besonderheiten. Am 5'-Ende befinden sich in der Regel drei Guanosinreste, während das 3'-Ende längere einzelsträngige Überhänge aufweisen kann (99). Zusätzlich entstehen häufig unvollständige Produkte, sogenannte *shortmers*, die möglicherweise die Aktivität der dsRNA beeinträchtigen (100). Zur Überwindung dieser Limitationen können verschiedene Optimierungsstrategien angewendet werden. So lassen sich die einzelsträngigen Überhänge bspw. durch enzymatische Behandlung mit RNase A oder RNase T1 gezielt entfernen, um *blunt ends* zu erzeugen, die mit einer erhöhten Stabilität und Funktionalität der dsRNA assoziiert sind (101,102). Dies ist möglich, da RNase A und RNase T1 bei Salzkonzentrationen über 300 mM NaCl selektiv ssRNA spalten, während dsRNA unter diesen Bedingungen weitgehend unbeeinträchtigt bleibt. Alternativ können die beiden RNA-Stränge zunächst auch separat transkribiert und anschließend hybridisiert werden (103). Eine weitere Option besteht darin, ein einzelsträngiges Transkript mit einer Haarnadelstruktur zu synthetisieren, die direkt eine dsRNA bildet (104). Die ivT-Methode ist hinsichtlich der Produktionsmenge begrenzt. Pro Reaktion können im klassischen Labormaßstab ohne *large scale* Kits 50-100 µg dsRNA erzeugt werden (105). Zudem ist sie kostenintensiv, mit geschätzten Produktionskosten von mindestens 60 US-Dollar pro Gramm dsRNA (106).

Die Nutzung zellfreier Expressionssysteme stellt eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von dsRNA in *in-vitro*-Systemen dar. Diese Systeme enthalten die wesentlichen cytoplasmatischen Komponenten von Zellen, die für Transkription und Translation benötigt werden, ohne jedoch vollständige lebende Zellen zu umfassen. Somit enthalten die Extrakte essenzielle Enzyme, Ribosomen und Energieträger, die die Synthese von RNA ausgehend von einem bereitgestellten DNA-Template ermöglichen (107). Zu den häufig verwendeten zellfreien Systemen gehören Extrakte aus *Escherichia coli*, Insektenembryonen oder Weizenkeimen (108). Der Prozess kann sowohl mit linearen DNA-Fragmenten als auch mit Plasmid-DNA durchgeführt werden. Durch den einfachen Austausch des Templates kann die Herstellung von dsRNA für unterschiedliche Zielsequenzen unkompliziert angepasst werden. GreenLight Biosciences ist ein Unternehmen, das auf die Nutzung zellfreier Systeme spezialisiert ist. Dieses Unternehmen hat das Verfahren dahingehend optimiert, dass lediglich das spezifische DNA-Template als Ausgangsmaterial hinzugegeben werden muss, um die

gewünschte dsRNA zu synthetisieren. Aufgrund weiterer Optimierung konnte GreenLight Biosciences die Produktionskosten signifikant auf lediglich 0,5 US-Dollar pro Gramm dsRNA senken (109).

Zur Produktion von dsRNA in *in-vivo*-Systemen wird vor allem *E. coli* verwendet. Diese Methode kombiniert klassische Verfahren der Translation mit Aspekten der ivT, um dsRNA innerhalb der Bakterienzellen zu synthetisieren und anzureichern. Für die Herstellung von dsRNA in *E. coli* wird üblicherweise der Stamm HT115 (DE3) verwendet (110–112). Dieser wurde genetisch so modifiziert, dass ihm das RNase III-Gen fehlt, welches spezifisch dsRNA abbaut (113,114). Dadurch kann dsRNA in den Zellen akkumulieren. Neuere Stämme, wie bspw. BL21 (DE3), zeigen in einigen Fällen sogar eine höhere Ausbeute und werden daher als Alternative in Betracht gezogen (112). Da *E. coli* Endotoxine produziert, die für Menschen potenziell gesundheitsschädlich sind, ist eine gründliche Aufreinigung der dsRNA zwingend erforderlich (115). Die Herstellung von dsRNA in *E. coli* beginnt mit der Transformation der Bakterienzellen mit einem Plasmid, das die gewünschte dsRNA-Sequenz unter der Kontrolle eines T7-Promotors codiert. Nach der Transformation wird zunächst die Genexpression der T7-Polymerase durch Induktion, bspw. mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), ausgelöst, welche dann die Expression der dsRNA induziert. Anschließend erfolgt die Ernte der Zellen, die Zellyse und die Aufreinigung der dsRNA (116). Die dsRNA kann entweder über zwei gegenüberliegenden T7-Promotoren generiert werden, die beide Stränge simultan transkribieren, oder durch die Konstruktion einer Haarnadelstruktur, die sich nach der Transkription selbst zu einer dsRNA faltet (117). Studien haben gezeigt, dass die Verwendung von Haarnadel-dsRNA teilweise zu höheren Ausbeuten führt (118). Die Menge der erzeugten dsRNA variiert je nach Plasmidkonstruktion, Wachstumsbedingungen und Fermentationsparametern. In optimierten Systemen kann die Ausbeute bis zu 182 mg/l erreichen (119). Die Herstellung von dsRNA in *E. coli* ist kostengünstiger als die klassische ivT, da gut etablierte Protokolle für Fermentationen mit hohen Biomassen existieren. Diese Effizienz ermöglicht Produktionskosten von weniger als 1 US-Dollar pro Gramm dsRNA.

In den letzten Jahren haben Forscher zunehmend nach Alternativen zur klassischen *in-vivo*-Produktion von dsRNA in *E. coli* gesucht. Dabei wurde das nicht-pathogene, grampositive Bakterium *Corynebacterium glutamicum* als geeigneter Organismus zur Herstellung der dsRNA identifiziert. Dieses Bakterium zeichnet sich durch seine Fähigkeit zur großmaßstäblichen Fermentation bei niedrigen Kosten aus und bietet somit eine attraktive Alternative zu *E. coli*. Besonders die Einstufung als nicht-pathogenes Bakterium erleichtert die Anwendung, da die Anforderungen an Sicherheitsmaßnahmen geringer als bei *E. coli* ausfallen (120–122). Analog zu *E. coli* wurden auch bei *C. glutamicum* Stämme entwickelt, die durch gezielte genetische Modifikationen keine RNase III-Aktivität aufweisen, um den Abbau von dsRNA zu verhindern. Ein Beispiel für einen solchen Stamm ist *C. glutamicum*

2256L Δ rnc (123). Der Prozess zur Herstellung von dsRNA in *C. glutamicum* folgt dem gleichen Prinzip wie bei *E. coli* (124). Optimierte Fermentationsbedingungen haben bei *C. glutamicum* Ausbeuten bis zu 1 g dsRNA pro Liter Fermentationskultur erzielt (125).

Des Weiteren stellt auch die Generierung von dsRNA in Hefen eine Möglichkeit der *in-vivo*-Herstellung dar. Dabei profitieren Hefen von ihrer Einstufung als ungefährlicher Organismus für den Menschen (126,127). Unter bestimmten Voraussetzungen kann die Hefe direkt als hitzeinaktiviertes Pulver appliziert werden, ohne dass eine kostenintensive und zeitaufwendige Reinigung der dsRNA erforderlich ist (128,129). Dies könnte zukünftig den Prozess der dsRNA-Anwendung vereinfachen. In bisherigen Studien konnte zwar nur eine geringe Menge an dsRNA mit Ausbeuten von etwa 182 ng/l erzielt werden, dennoch zeigten Experimente signifikante biologische Wirkungen der auf diese Weise generierten dsRNA (130). Dies deutet darauf hin, dass auch geringe Mengen an dsRNA bei zielgerichteter Applikation eine hohe Effizienz erzielen können. Weitere Details der Vorteile der Herstellung von dsRNA in Hefe sind in Abschnitt 1.4.2 beschrieben.

Im Allgemeinen müssen die hier beschriebenen GMOs vor der Freisetzung in die Umwelt inaktiviert werden, um mögliche Risiken zu minimieren. Dies kann bspw. durch Hitzeinaktivierung erfolgen (131,132). Die Wahl des optimalen Systems zur Herstellung von dsRNA hängt maßgeblich von den spezifischen Anforderungen der geplanten Anwendung ab. Dabei spielen insbesondere die benötigte Menge, die gewünschte Reinheit sowie die biologische Aktivität der dsRNA eine entscheidende Rolle. Für Anwendungen im landwirtschaftlichen Bereich, insbesondere zur Schädlingsbekämpfung mittels RNAi, werden große Mengen an dsRNA benötigt. Es wird geschätzt, dass pro Hektar bis zu 10 g dsRNA erforderlich sein könnten, abhängig von der Effizienz der RNAi im Zielorganismus sowie der Stabilität und Effektivität der eingesetzten dsRNA (106). Die Produktion von Mengen in diesem Ausmaß stellt eine besondere Herausforderung dar, da sie eine kosteneffiziente Herstellung in industriellem Maßstab erfordert. Für großflächige Anwendungen sind daher Produktionssysteme, die eine hohe Ausbeute bei niedrigen Kosten bieten, besonders attraktiv.

1.4.2 *Saccharomyces cerevisiae* – Ein Werkzeug zur Generierung von dsRNA

Die Herstellung von dsRNA in Hefe bietet eine vielversprechende Alternative zu traditionellen Produktionssystemen. In bisherigen Studien wurden vor allem die Spezies *Yarrowia lipolytica* und *S. cerevisiae* verwendet (128,130,133). Die vorliegende Arbeit fokussierte sich jedoch auf *S. cerevisiae*, einen der am besten erforschten eukaryotischen Modellorganismen. Diese Wahl basierte auf mehreren entscheidenden Vorteilen, die im Folgenden erläutert werden. Zunächst zeichnet sich *S. cerevisiae* durch eine jahrzehntelange Nutzung in der Biotechnologie aus. Der Organismus wird bspw. erfolgreich zur Produktion von Arzneimitteln,

wie rekombinantem Insulin, eingesetzt (134). Ein zentraler Vorteil liegt zudem in der kosteneffizienten Kultivierung, die durch Fermentationsverfahren ermöglicht wird. Des Weiteren ist *S. cerevisiae* durch umfassende Erforschung ihrer Genetik und Physiologie ein vergleichsweise leicht manipulierbarer Organismus, der eine schnelle und effiziente heterologe Expression ermöglichen kann (135). Ein zusätzlicher Aspekt ist der Verlust der Kernkomponenten der RNAi im Laufe der Evolution. Dies bedeutet, dass essenzielle Proteine wie DCR, AGO und die RISC-Komponenten nicht vorhanden sind (136). Dadurch sinkt das Risiko des Abbaus der transkribierten dsRNA innerhalb der Zelle, sodass sie akkumulieren kann. Allerdings besitzt *S. cerevisiae* das RNase III-ähnliche Enzym Rnt1, welches dsRNA erkennen und prozessieren kann (137). Ein weiterer entscheidender Vorteil von *S. cerevisiae* ist ihr GRAS-Status (*Generally Recognized As Safe*), der von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) vergeben wird. Trotz genetischer Modifikationen gilt dieser Organismus als sicher für den Menschen (135). Im Vergleich zu Produktionssystemen wie *E. coli* erlaubt dies eine direkte Applikation der Hefe nach Inaktivierung, ohne dass die dsRNA aufwendig extrahiert oder gereinigt werden muss. Diese Eigenschaft bietet wirtschaftliche Vorteile und verringert den technologischen Aufwand in der späteren Anwendung. Neben der heterologen Produktion von dsRNA besitzt *S. cerevisiae* weitere natürliche Eigenschaften für den Einsatz in der Schädlingsbekämpfung: Die Hefe kann flüchtige Verbindungen wie Acetate und Ester produzieren, die eine anlockende Wirkung auf Insekten haben (138). Diese chemischen Signale bewirken, dass Insekten die Hefepopulationen aktiv konsumieren. Gleichzeitig führt die Adhäsion von Hefezellen an der Insektenoberfläche zu deren effektiven Verteilung in neue und abgelegene Lebensräume. Diese Form der biotischen Verbreitung stellt für die Hefe einen erheblichen ökologischen Vorteil dar. Im Verlauf der Evolution hat sich infolgedessen eine wechselseitig vorteilhafte symbiotische Beziehung zwischen Hefen und Insekten ausgebildet. Die bestehende symbiotische Beziehung zwischen Insekten und Hefen legt nahe, dass der Einsatz von *S. cerevisiae* als Produktionsorganismus für dsRNA eine vielversprechende Strategie darstellt, da die Hefezellen von bestimmten Insektenarten aktiv konsumiert werden und somit vermutlich eine effiziente Aufnahme der dsRNA ermöglicht wird. Zusammenfassend erlaubt die hohe genetische Manipulierbarkeit von *S. cerevisiae* die Optimierung der dsRNA-Produktion durch gezielte genetische Eingriffe. Dies wird durch eine einfache Kultivierung und etablierte Fermentationstechnologie ergänzt. Die Kombination dieser Faktoren bietet ein skalierbares System, das wirtschaftlich attraktiv ist und gleichzeitig die Anforderungen als nachhaltiges Biopestizid zur Schädlingsbekämpfung erfüllt. Somit prädestinieren die Eigenschaften von *S. cerevisiae*, darunter der GRAS-Status, die Abwesenheit zentraler RNAi-Komponenten und die symbiotische Beziehung zu einigen Insekten, diesen Organismus zu einer exzellenten Wahl für die Herstellung von dsRNA. Außerdem bietet der Transport der Hefe als Trockenpulver signifikante Vorteile gegenüber

anderen Herstellungsformen, da dadurch auch einem möglichen Abbau der dsRNA entgegengewirkt werden kann. Die hier genannten Vorteile könnten die Basis für neue biotechnologische Anwendungen in der Landwirtschaft schaffen, insbesondere im Bereich der RNAi-basierten Schädlingsbekämpfung (139). Die kosteneffiziente Produktion und die ökologische Verträglichkeit bieten dabei einen innovativen Ansatz, um klassische Pestizide langfristig zu ersetzen.

1.5 Motivation und Zielstellung der Arbeit

Aufgrund der besorgniserregenden Umstände in der weltweiten Ernährungssicherung, der stark schwindenden Biodiversität und der politischen Beschlüsse, den Einsatz an chemischen Pestiziden bis zum Jahr 2030 deutlich zu reduzieren, müssen dringend alternative und nachhaltige Pflanzenschutzmaßnahmen entwickelt und angewandt werden. Wie bereits hervorgehoben, stellt RNAi eine Alternative dar. Mittlerweile wurden bereits einige Produkte, welche die RNAi-Technologie verwenden, zur Bekämpfung von Schadinsekten zugelassen. Da es sich dabei allerdings um transgene Pflanzen handelt, ist die Zulassung für den europäischen Markt zum jetzigen Zeitpunkt ausgeschlossen. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit eine alternative Methode zur Generierung von edsRNA etabliert und dadurch gleichzeitig die Anwendung erleichtert werden. Das zu erarbeitende Prinzip beruht darauf, die edsRNA in dem Modellorganismus *S. cerevisiae* zu exprimieren, den Organismus anschließend mittels Hitze zu inaktivieren und daraufhin die Hefe direkt an den Zielorganismus zu verfüttern. Da allerdings zu Beginn der Arbeit nur eine Modell-edsRNA gegen CMV vorlag, wurden die Experimente zur Etablierung des Systems mit dieser durchgeführt. Zu einem späteren Zeitpunkt konnten *in-vivo*-Anwendungsexperimente gegen den Kartoffelkäfer durchgeführt werden. Weiterhin wurde im Rahmen der Arbeit die Möglichkeit analysiert, eine Coexpression des pflanzlichen *DCL4* mit der edsRNA durchzuführen, damit bereits in der Hefezelle definierte esiRNAs vorliegen und so direkt vom Zielorganismus aufgenommen werden können. Dadurch könnte eine schnelle Wirkung und damit einhergehenden Bekämpfung gewährleistet werden.

2 Methoden

2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid / Bisacrylamid Rotiphorese (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Acrylamid / Bisacrylamid Rotiphorese (40:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich
Agarose	AppliChem GmbH
<i>p</i> -Aminobenzoessäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck KGaA
Ammoniumthiocyanat	AppliChem GmbH
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bacto-Agar	Becton, Dickinson & Co.
Bacto-Hefeextrakt	Becton, Dickinson & Co.
Bacto-Pepton	Becton, Dickinson & Co.
Bato-Trypton	Becton, Dickinson & Co.
Biotin	Sigma-Aldrich
Borsäure	AppliChem GmbH
Bromphenolblau	Merck KGaA
<i>Cap</i> -Analogon	Jena Bioscience GmbH
Chloroform	VWR Chemicals
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Jena Bioscience GmbH
Dithiothreitol (DTT)	Applichem GmbH
Eisensulfat-Heptahydrat	Merck KGaA
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol	VWR Chemicals
Ethidiumbromid	Merck KGaA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA
Formaldehyd	Merck KGaA
Formamid (deionisiert)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Galaktose	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glukose	Thermo Fisher Scientific Inc.
Glycerin	AppliChem GmbH
Glycin	AppliChem GmbH
Glycerin-3-Phosphat	Sigma-Aldrich
Glykogen	Roche Diagnostics

Guanidiniumthiocyanat	AppliChem GmbH
Guanosintriphosphat	Jena Bioscience GmbH
Harnstoff	AppliChem GmbH
Hepes	AppliChem GmbH
Histidin	Formedium LTD
μ -Inositol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Isoamylalkohol	VWR Chemicals
Isopropanol	VWR Chemicals
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumhydroxid	Thermo Fisher Scientific Inc.
Kaliumsulfat	Merck KGaA
Kalzium-D (+)-Panthothenat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kalziumsulfat	Thermo Fisher Scientific Inc.
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Kobaltchlorid	Bernd Kraft GmbH
Kreatinphosphat	AppliChem GmbH
Kupfersulfat-Pentahydrat	Merck KGaA
Leucin	Formedium LTD
Lithiumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Magnesiumacetat	Merck KGaA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Calbiochem-Novabiochem GmbH
Mangansulfat-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
MOPS	AppliChem GmbH
Natriumacetat	AppliChem GmbH
Natriumazid	Merck KGaA
Natriumcarbonat	Merck KGaA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis GmbH
Natriumhydroxid	Merck KGaA
Natriummolybdat	Sigma-Aldrich
Natriumthiosulfat	Merck KGaA
Niacin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Nukleotidtriphosphate (rNTPs)	Jena Bioscience GmbH
Phenol (equilibriert, stabilisiert)	AppliChem GmbH
Phenol (wassergesättigt, stabilisiert)	AppliChem GmbH

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure	Honeywell Research Chemicals
Proteaseinhibitor (<i>cOmplete</i> , EDTA-free)	Roche Diagnostics
Pyridoxin-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
RNase-freies Wasser	Sigma-Aldrich
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Schwefelsäure	VWR Chemicals
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Spermin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Sucofin	TSI GmbH & Co. KG
<i>Synthetic complete mixture (Kaiser) Drop-out Ura⁻</i>	Formedium LTD
<i>Synthetic complete mixture (Kaiser) Drop-out Ura⁻ His⁻</i>	Formedium LTD
<i>Synthetic complete mixture (Kaiser) Drop-out Ura⁻ Leu⁻</i>	Formedium LTD
<i>Synthetic complete mixture (Kaiser) Drop-out Ura⁻ Leu⁻ His⁻ Tryp⁻</i>	Formedium LTD
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Thiamin-HCl	SERVA Electrophoresis GmbH
Tris	AppliChem GmbH
Triton X-100	Merck KGaA
tRNA (Hefe)	Roche Diagnostics
Tryptophan	Formedium LTD
Tween-20	Merck KGaA
Xylencyanol	AppliChem GmbH
<i>Yeast Nitrogen Base (YNB)</i>	Formedium LTD
Zinkchlorid	Merck KGaA

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

AC 7L *BioBundle*

Avanti™ J-25

Benchtop β Shield

BioPhotometer plus

Digital Orbital Shaker

Einmalküvetten PLASTIBRAND, Polystyrol

Elektrophorese Netzteil EV3610

Enzytec™ *Liquid* D-Glucose/D-Fructose

ezZ-Control

GENESYS 10S UV/VIS-Spektralphotometer

Heizblock HB-202 *Thermocell*

Heizblock QBD2

Kompressor Clinic Dry 3.40HS

Kühlinkubator

LI-COR Odyssey CLx

LightCycler® 480 II

Luminometer

Magnetrührer RH *basic 2*

NanoDrop One Spektralphotometer

Nitrocellulose-Membran

PCR Cycler Biometra TOne

pH Meter inoLab pH 7110

Präzisionswaage ABJ

semi-dry-Transferapparat

Sonoplus Ultraschall Homogenisator 2070

Standard Analog Schüttler

Storage Phosphor Screen S 230

ThermoStat Plus

Thermostat Ultracool UC4

Typhoon Trio+ *Phosphoimager*

Unichromat 1500

Unigeldryer 3545 D

UVP UVsolo *touch*

UV Transilluminator USDT-20ML-8E

Vakuumpumpe CVC 3000

Getinge Applikon

Beckman Coulter GmbH

Thermo Fisher Scientific Inc.

Eppendorf AG

Cleaver Scientific Ltd.

Carl Roth GmbH & Co. KG

Consort bvba

R-Biopharm AG

Getinge Applikon

Thermo Fisher Scientific Inc.

BIOER

Grant Instruments

Gentilin

BINDER GmbH

LI-COR Biosciences GmbH

Roche

Sirius, Berthold Technologies GmbH & Co. KG

IKA-Werke

Thermo Fisher Scientific Inc.

LI-COR Biosciences GmbH

Analytik Jena GmbH

Xylem Inc

Kern & Sohn GmbH

Biostep GmbH

Bandeln electronic GmbH & Co. KG

VWR Chemicals

GE Healthcare

Eppendorf AG

Lauda

GE Healthcare

Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH

Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH

Analytik Jena GmbH

Carl Roth GmbH & Co. KG

Vacuubrand GmbH & Co. KG

Vakuumpumpe N840 LABOPORT
Vortex Genius 3
Waage accu-622
Whatman-Papier GP 005
Zentrifuge MIKRO200
Zentrifuge Rotina 38 R
Zentrifuge Rotina 380 R
Zentrifuge 5415 R
Zentrifuge 5424
Zentrifuge 5424 R
Zentrifuge 5430 R

KNF DAC GmbH
IKA-Werke
Thermo Fisher Scientific Inc.
GE Healthcare
Hettich GmbH
Hettich GmbH
Hettich GmbH
Eppendorf AG
Eppendorf AG
Eppendorf AG
Eppendorf AG

2.2 Puffer und Medien

Tabelle 1: verwendete Medien

Medienbezeichnung	Komponenten
Basalsalzmedium	6,83 mM CaSO ₄ ; 73,61 mM KOH; 60,45 mM MgSO ₄ * 7 H ₂ O; 104,44 mM K ₂ SO ₄ ; 26,7 ml H ₃ PO ₄
Kultivierungsmedium	69 g/l YNB; 18,5 g/l Kaiser SC <i>Dropout Ura⁻ His⁻</i> ; 200 mg/l Histidin
LB	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 1 ml 1 M NaOH; (2 % (w/v) Agar)
ScD Ura ⁻	6,9 g/l YNB; 1,926 g/l Kaiser SC <i>Single Drop-out Ura⁻</i> ; 2 % (w/v) Glukose; (2 % (w/v) Agar)
ScD Ura ⁻ His ⁻	6,9 g/l YNB; 1,850 g/l Kaiser SC <i>Double Drop-out Ura⁻ His⁻</i> ; 2 % (w/v) Glukose; (2 % (w/v) Agar)
SM Ura ⁻	6,9 g/l YNB; 1,926 g/l Kaiser SC <i>Single Drop-out Ura⁻</i> ; 2 % (w/v) Galaktose; 3 % (w/v) Glycerin
SM Ura ⁻ His ⁻	6,9 g/l YNB; 1,850 g/l Kaiser SC <i>Double Drop-out Ura⁻</i> ; 2 % (w/v) Galaktose; 3 % (w/v) Glycerin
Spurenelementlösung	24,03 mM CuSO ₄ * 5 H ₂ O; 0,53 mM NaI; 17,75 mM MnSO ₄ * H ₂ O; 0,83 mM Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O; 0,32 mM Borsäure; 3,85 mM CoCl ₂ ; 146,72 mM ZnCl ₂ ; 233,80 mM FeSO ₄ * 7 H ₂ O; 0,82 mM Biotin; 5 ml H ₂ SO ₄
Vitaminlösung	12 g Niacin; 1 g Pyridoxin-HCl; 1 g Thiamin-HCl; 0,5 g <i>p</i> -Aminobenzoesäure; 0,05 g Biotin; 25 g μ -Inositol; 3 g Ca-Pantothenat
YPD	10 g/l Hefeextrakt; 20 g/l Pepton; 2 % (w/v) Glukose; (2 % (w/v) Agar)

Tabelle 2: verwendete Puffer und Lösungen

Pufferbezeichnung	Komponenten
<i>annealing</i> -Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA
Blocklösung	7,5 % (w/v) Sucofin in PBS-T
B60-Puffer	50 mM HEPES-KOH pH 8,2; 50 mM NaCl; 2 mM MgOAc; 0,1 % (v/v) Triton X-100;

	10 % (w/v) Glycerin; 20 mM Glycerophosphat
Entwicklungslösung	3 % (w/v) Na ₂ CO ₃ ; 0,2 % (v/v) Formaldehyd; 0,24 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃
Färbelösung	0,2 % (w/v) AgNO ₃ ; 0,25 % (v/v) Formaldehyd
Inkubationslösung	40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 3 % (w/v) Glycerin
LAEMMLI-Puffer	25 mM Tris; 200 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
MOPS-Puffer	20 mM MOPS pH 7,0; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA
PBS	20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0; 130 mM NaCl
PBS-T	20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0; 130 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween-20
Sammelgelpuffer	1,25 M Tris-HCl pH 6,8
STE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA
50x TAE-Puffer (1 l)	242 g Tris; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8; 57,1 ml Essigsäure
TBE-Puffer	89 mM Tris pH 8,3; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA
Transferpuffer	39 mM Glycin; 48 mM Tris; 1,3 mM SDS; 20 % (v/v) Methanol
Trenngelpuffer	1,8 M Tris-HCl pH 8,8
Trizol (100 ml)	0,8 M Guanidiniumthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 0,1 M 3 M Natriumacetat pH 5; 5 % (w/v) Glycerin; 48 ml Phenol (sauer)
2x RNA-Ladepuffer HS	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
2x RNA-Ladepuffer	95 % (v/v) deionisiertes Formamid; 0,5 mM EDTA; 0,025 % (w/v) SDS; 0,025 % (v/v) Ethidiumbromid; Bromphenolblau; Xylencyanol
4x TR	120 mM HEPES-KOH pH 7,4; 400 mM KOAc; 7,2 mM MgOAc; 8 mM DTT; 4x Proteaseinhibitor (Roche, <i>cOmplete</i> , EDTA-free)
5x SDS-Probenpuffer	6,125 % (w/v) Sammelgelpuffer; 20 % (w/v) Glycerin;

	12,5 % (w/v) SDS; 10 % (w/v) β -Mercaptoethanol; Bromphenolblau
6x DNA-Ladepuffer	10 mM Tris-HCl pH 7,4; 60 mM EDTA; 60 % (w/v) Glycerin; 0,03 % (w/v) Bromphenolblau; 0,03 % (w/v) Xylencyanol
10x TM	7,5 mM rATP; 1 mM rGTP; 250 mM Kreatinphosphat; 0,8 mM Spermin

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNA-Arbeiten

2.3.1.1 Plasmidpräparationen

Prinzipiell unterscheiden sich eine Mini- und Midipräparation nur in der Ausbeute des gereinigten Plasmids. Für die Minipräparation wurden 2 ml LB-Medium (s. Tabelle 1) mit dem jeweiligen Antibiotikum (s. **Tabelle 3**) und einer *Escherichia coli*-Kolonie von Interesse versetzt und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Extraktion des gewünschten Plasmids erfolgte mittels *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Protokoll A, Thermo Scientific). Für eine Midipräparation wurden stattdessen 100 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum und einer *E. coli*-Kolonie von Interesse versetzt und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Plasmidisolation erfolgte in diesem Fall mittels *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega, Standard-Reinigungsprotokoll). Nach der jeweiligen Präparation wurde die Konzentration des Plasmids mithilfe des *NanoDrop One* (Thermo Scientific, s. 2.3.2.5) bestimmt.

Tabelle 3: verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicilin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml

2.3.1.2 DNA-Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche eine spezifische Erkennungssequenz besitzen und die DNA, abhängig von ihrem Typ, an einer definierten Stelle schneiden. In der Molekularbiologie finden nahezu ausschließlich Typ II-Restriktionsendonukleasen Anwendung, da sie die DNA innerhalb oder in unmittelbarer Nähe ihrer spezifischen Erkennungssequenz schneiden. Dabei spielen außerdem der verwendete Puffer und etwaige Cofaktoren eine Rolle, weil diese Bedingungen die Spezifität der Restriktionsendonuklease beeinflussen können.

Im Zuge dieser Arbeit wurde der Restriktionsverdau hauptsächlich für die Klonierung und der damit einhergehenden Generierung charakteristischer Enden (*blunt* oder *sticky*) und für die Überprüfung einer potenziell erfolgreichen Klonierung (Testverdau) verwendet.

Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben mit den ausgewählten Enzymen durchgeführt und die DNA anschließend ihrer Größe nach in einem 1-2%igen Agarosegel aufgetrennt.

2.3.1.3 Reinigung von DNA

Um DNA aus enzymatischen Reaktionen, wie bspw. einem Restriktionsverdau, zu reinigen, wurde eine silikabasierte Säulenteknologie verwendet. Dazu wurde das *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Scientific, Protokoll A) nach Herstellerangaben genutzt. Des Weiteren wurde die Extraktion von DNA aus Agarosegelen durch Verwendung des *GeneJET Gel Extraction Kits* (Thermo Scientific, Protokoll A) durchgeführt.

2.3.1.4 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA

Damit eine Ligation erfolgreich ablaufen kann, benötigt die DNA-Ligase an mindestens einem DNA-Fragment ein 5'-Monophosphat. Aus diesem Grund wurden bei Bedarf unphosphorylierte DNA-Fragmente unter Zuhilfenahme der T4-Polynukleotidkinase (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben phosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 µmol EDTA und 10-minütiger Inkubation bei 75 °C gestoppt.

Weiterhin kann es sinnvoll sein, einen Vektor nach Restriktionsverdau zu dephosphorylieren, um eine Rezirkularisierung zu verhindern. Dafür wurden 2 U Alkalische Phosphatase (Thermo Scientific) zum Ansatz zugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Hitzeinaktivierung bei 75 °C.

2.3.1.5 Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden

Für einige Klonierungsarbeiten wurden synthetisch generierte DNA-Einzelstränge *in vitro* zu doppelsträngigen DNA-Molekülen hybridisiert. Dafür wurde jeweils 1 nmol des *forward*- bzw. des *reverse*-Oligonukleotids in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit *annealing*-Puffer (s. Tabelle 2) für 1 min bei 95 °C inkubiert und daraufhin im Heizblock aktiv auf 25 °C abgekühlt.

2.3.1.6 Ligation von DNA

Die Ligation stellt einen essenziellen Schritt in der Molekularbiologie dar. Diese wird durch das Enzym DNA-Ligase ausgeführt, welches die Verknüpfung eines 5'-Phosphat-Endes mit einem

3'-Hydroxyl-Ende einer dsDNA und somit die Bildung einer neuen Phosphodiesterbindung katalysiert.

In dieser Arbeit wurde die T4 DNA-Ligase (Thermo Scientific) verwendet und die Reaktion 1 h bei Raumtemperatur (22 °C) inkubiert. Die Reaktionsbedingungen sind in **Tabelle 4** dargestellt.

Tabelle 4: Reaktionsansatz der T4 DNA-Ligase-Reaktion

Komponenten	Endkonzentration
Reaktionspuffer	1x
Plasmid	100 fmol
Vektor	20 fmol
ddH ₂ O	ad 20 µl

2.3.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine Polymerase-Kettenreaktion eignet sich für die Vervielfältigung sequenz-spezifischer Genabschnitte. Dabei müssen Primer, welche komplementär zum DNA-Template sind, verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde zwischen einer Polymerase mit hoher Genauigkeit (*Phusion*-Polymerase) und einer Polymerase für analytische Zwecke (*DreamTaq*-Polymerase) ausgewählt. Eine PCR wurde für Klonierungen, Überprüfungen von erfolgreichen Transformationen und Generierung von Templates durchgeführt. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen sind in **Tabelle 5** und **Tabelle 6** zu finden. Die Durchführung der PCR erfolgte im *PCR Cycler Biometra TOne* (Analytik Jena).

Tabelle 5: Reaktionsansatz der *DreamTaq*- und *Phusion*-Polymerase

Komponenten	<i>DreamTaq</i>	<i>Phusion</i>
Reaktionspuffer	1x	1x
10 mM dNTPs (jeweils)	250 µM	200 µM
<i>forward</i> -Primer	250 nM	500 nM
<i>reverse</i> -Primer	250 nM	500 nM
Template	30 pg - 1 µg	1 - 10 ng
DNA-Polymerase	0,75 U	1 U
ddH ₂ O	ad 20 µl	ad 50 µl

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen der *DreamTaq*- und *Phusion*-Polymerase Reaktionen
Die Schritte 2-4 wurden 30-mal wiederholt.

	<i>DreamTaq</i>		<i>Phusion</i>	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95 °C	3 min	98 °C	2 min
Denaturierung	94 °C	20 s	98 °C	20 s
<i>annealing</i>	T _M - 5 °C	20 s	55 °C	20 s
Elongation	72 °C	1 min/kb	72 °C	30 s/kb
finale Elongation	72 °C	5 min	72 °C	10 min

2.3.1.8 Agarose-Gelelektrophorese für DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Trennung von Nukleinsäuren hinsichtlich ihrer Größe verwendet. Dabei bewegen sich Nukleinsäuren aufgrund ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Agarosegel. Die Größe der zu untersuchenden Nukleinsäuren lässt sich durch Vergleich mit Nukleinsäuren bekannter Größe bestimmen. In Abhängigkeit von der erwarteten Größe der zu analysierenden Nukleinsäuren wurden 1-2%ige (w/v) Agarosegele verwendet.

1-2 % (w/v) Agarose wurden in 0,5 x TAE-Puffer (s. Tabelle 2) gelöst und mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die zu analysierenden Reaktionsansätze wurden mit 6 x DNA-Ladepuffer (s. Tabelle 2) gemischt (Endkonzentration 1 x) und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 120-130 V in 0,5 x TAE-Puffer für ca.

45 min durchgeführt. Anschließend erfolge die Detektion der DNA mittels UV-Licht (UVP UVsolo *touch*, Analytik Jena).

2.3.1.9 Sequenzierung

Um eine DNA-Sequenz auf Richtigkeit zu überprüfen, wird eine Sequenzierung durchgeführt. Dies geschieht bspw. nach einer erfolgten Klonierung, damit der Klonierungsvorgang abgeschlossen werden kann. Für die Sequenzierung wurden zunächst 2 µM eines ausgewählten Primers (3 µl) mit 500-1200 ng DNA in einem Endvolumen von 15 µl versetzt. Die Sequenzierungen wurden anschließend durch die Microsynth Seqlab GmbH (Göttingen) ausgeführt und mittels *Clustal Omega* analysiert.

2.3.2 RNA-Arbeiten

2.3.2.1 *In-vitro*-Transkription

Die *in-vitro*-Transkription ist ein molekularbiologisches Verfahren, bei welchem RNA gezielt enzymatisch im Reagenzglas synthetisiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *in-vitro*-Transkription entweder ausgehend von einem linearisierten Plasmid oder einem PCR-Produkt durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine *run-off*-Transkription, unabhängig von dem Template. Die Zusammensetzung der Reaktion ist in **Tabelle 7** aufgezeigt. Es wurde entweder die T7-RNA-Polymerase (20 U/µl, Agilent Technologies) oder die SP6-RNA-Polymerase (20 U/µl, Thermo Scientific) verwendet. Falls RNA mit 5'-*cap*-Analogon generiert werden sollte, wurde der 20 mM rNTP-Mix abgeändert (20 mM A, C, U; 5 mM G) und zusätzlich 0,8 mM m7GpppG-*cap*-Analogon (Jena Bioscience) zur Reaktion zugegeben.

Tabelle 7: Reaktionsansatz *in-vitro*-Transkription

Komponenten	Volumen
5x Transkriptionspuffer (Agilent Technologies)	20 µl
rNTP-Mix (je 20 mM A,C,G,U, Jena Bioscience)	10 µl
Template-DNA	2 µg
<i>RiboLock</i> RNase-Inhibitor (40 U/µl, Thermo Scientific)	0,5 µl
RNA-Polymerase (20 U/µl)	60 U
RNase-freies H ₂ O	ad 100 µl

Der Reaktionsansatz wurde mindestens 3 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Hydrolyse des Templates durch Zugabe von 20 U DNase I *recombinant RNase-free* (Roche)

und anschließender Inkubation für 15 min bei 37 °C. Die generierte RNA wurde abschließend mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation gereinigt (s. 2.3.2.4).

2.3.2.2 Generierung radioaktiv markierter RNA

Zur Visualisierung der Aktivität von DCL und AGO wurde radioaktiv markierte RNA eingesetzt. Die radioaktiv markierten *in-vitro*-Transkripte wurden ausgehend von einem PCR-Template generiert (s. **Tabelle 8**). Falls RNA mit 5'-*cap*-Analogon hergestellt werden sollte, wurde der rNTP-Mix abgeändert (10 mM A, U; 2,5 mM C, G) und zusätzlich 0,8 mM m7GpppG-*cap*-Analogon (Jena Bioscience) zur Reaktion zugegeben. Der Ansatz wurde für mindestens 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend erfolgte durch Zugabe von 10 U DNase I *recombinant RNase-free* (Roche) und 15-minütiger Inkubation die Hydrolyse des Templates. Die transkribierte RNA wurde durch Verwendung des *NucleoSpin® RNA II Kit* (Macherey-Nagel GmbH) gereinigt.

Tabelle 8: Reaktionsansatz zur Generierung radioaktiv markierter RNA

Komponenten	Volumen
5x Transkriptionspuffer (Agilent Technologies)	10 µl
rNTP-Mix (10 mM A,G,U; 2,5 mM C, Jena Bioscience)	6,25 µl
Template-DNA	1 µg
<i>RiboLock</i> RNase-Inhibitor (40 U/µl, Thermo Scientific)	20 U
α- ³² P-CTP (3000 Ci/mmol, Hartmann Analytic)	10 µCi
T7-RNA-Polymerase (50 U/µl, Agilent Technologies)	75 U
RNase-freies H ₂ O	ad 50 µl

2.3.2.3 Herstellung langer dsRNA

Lange dsRNA diente entweder als Substrat in den DCL- bzw. DCL-*Slicer*-Assays, als Kontroll-RNA in den silbergefärbten Polyacrylamid-Gelen sowie als Standard zur Quantifizierung der dsRNA in Hefezellen.

Zunächst wurden die jeweiligen Einzelstränge über *in-vitro*-Transkription generiert. Anschließend erfolgte die Anlagerung der Einzelstränge im Verhältnis 1:1. Bei einer isotoopenmarkierten, dsRNA lag der Anteil an radioaktiv markierter RNA nur bei 50 % des einen Einzelstrangs, die andere Hälfte des Einzelstrangs wurde durch unmarkierte RNA komplementiert.

Die Anlagerung wurde durch zweiminütige Inkubation bei 94 °C und anschließendes Abkühlen auf 25 °C im Heizblock in STE-Puffer (s. Tabelle 2) durchgeführt. Daraufhin erfolgte eine Fällung der dsRNA durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,2), 20 µg Glykogen und 2,5 Volumen Ethanol zunächst für 10 min bei Raumtemperatur und daraufhin für 10 min auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz 30 min bei 16060 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 200 µl 70%igen Ethanol gewaschen und die Zentrifugation für 5 min wiederholt. Nach Trocknung des Pellets erfolgte schließlich die Resuspension in 60 µl RNase-freiem H₂O.

2.3.2.4 Reinigung und Präzipitation von RNA mittels Phenol-Chloroform und Ethanol

Im Allgemeinen wurde RNA mithilfe einer Zweiphasentrennung, der Phenol-Chloroform-Extraktion, gereinigt. Der Reaktionsansatz mit den darin enthaltenden Nukleinsäuren wurde mit RNase-freiem H₂O auf 350 µl aufgefüllt, mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, 1 min gevortext und anschließend 3 min bei 16060 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 350 µl Chloroform (1 Volumen) zugegeben und die Extraktion wiederholt. Die obere, wässrige Phase wurde erneut überführt, mit RNase-freiem H₂O auf 350 µl aufgefüllt und die RNA durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2, 20 µg Glykogen und 2,5 Volumen absolutem Ethanol für 10 min auf Eis präzipitiert. Daraufhin wurde der Ansatz für 30 min bei 4 °C und 16060 g zentrifugiert und das Pellet mit 500 µl 70%igen Ethanol gewaschen. Der Zentrifugationsschritt wurde für 5 min wiederholt, das Pellet getrocknet und in RNase-freiem H₂O resuspendiert.

RNA, welche aus *in-vitro*-Transkriptionen stammt, wurde leicht abweichend aufgearbeitet. Zunächst wurde der Ansatz auf 400 µl aufgefüllt und später die RNA durch Zugabe von 72 µl 6 M Ammoniumacetat und 944 µl absolutem Ethanol für 10 min bei Raumtemperatur präzipitiert. Anschließend erfolgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 22 °C, sowie zweimaliges Waschen mit 500 µl 70%igen Ethanol für 10 min bei 22 °C. Alle weiteren Schritte wurden analog zur bereits beschriebenen Extraktion durchgeführt.

2.3.2.5 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA-Proben wurde mithilfe des *NanoDrop One* Spektralphotometers (Thermo Scientific) bestimmt. Dafür wurde je Messung 1 µl Probe verwendet. Für doppelsträngige RNA wurde der gemessene Wert mit einem Faktor von 1,25 multipliziert.

2.3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Bei Agarosegelen, welche für die Auftrennung von RNA genutzt wurden, wurden 1,5 g Agarose in 88 ml ddH₂O durch Aufkochen gelöst und 10 ml 10 x MOPS-Puffer (s. Tabelle 2) nach

kurzem Abkühlen zugegeben. Je nachdem, ob ein natives oder denaturierendes Agarosegel verwendet wurde, wurden 2 ml ddH₂O oder 2,7 ml Formaldehyd (37 %) zum Ansatz zugegeben. Die zu analysierenden Reaktionsansätze wurden mit dem entsprechenden 2 x RNA-Ladepuffer (s. Tabelle 2) versetzt (Endkonzentration 1 x). Falls die RNA-Proben mittels denaturierenden Gels analysiert werden sollten, wurde der Ansatz 5 min bei 75°C inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit den Proben beladen. Als Marker dienten entweder *RiboRuler Low Range* oder *RiboRuler High Range* Größenstandards (Thermo Scientific). Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 V in 1x MOPS-Puffer für ca. 45 min durchgeführt und die RNA mittels UV-Licht detektiert (UVP UVsolo *touch*, Analytik Jena).

2.3.2.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um kleine RNAs (sRNAs) oder aber Spaltfragmente aus *Slicer*-Assays aufzutrennen, wurden denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gele (s. **Tabelle 9**) verwendet. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 2x RNA-Ladepuffer HS (s. Tabelle 2) versetzt und für 5 min bei 75 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proben in 0,5 x TBE-Puffer (s. Tabelle 2) für ca. 75 min bei 350 V. Danach wurde das Gel für 15 min in einer 5%igen Essigsäurelösung (für 6 % Gele) oder 1 h in einer Inkubationslösung (für 12,5%ige Gele; s. Tabelle 2) inkubiert und daraufhin für mindestens 60 min bei 60 °C auf einem Vakuum-Geltrockner getrocknet.

Tabelle 9: Zusammensetzung von Harnstoff-Polyacrylamid-Gelen

Komponenten	6 %	12,5 %
Harnstoff (8 M)	7,21 g	4,81 g
5x TBE-Puffer	3 ml	2 ml
H ₂ O	4,5 ml	1,25 ml
40 % Acrylamid / Bisacrylamid	2,25 ml	2,25 ml
TEMED	35 µl	35 µl
10 % APS	70 µl	70 µl

2.3.2.8 Autoradiographie

Im Rahmen der Arbeit wurde die Autoradiographie zur Detektion von radioaktiv markierter RNA genutzt. Dazu wurden die Proben zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und das Gel getrocknet. Anschließend wurde das Gel auf einen *Storage Phosphor Screen* (GE Healthcare) gelegt und über Nacht exponiert. Das Scannen erfolgte am nächsten Tag mithilfe des *Typhoon Trio+ Phosphoimagers* (GE Healthcare).

2.3.2.9 Isolation von RNA aus Kartoffelkäfern mittels Trizol

RNasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme, welche vor allem durch hohe Thermostabilität ausgezeichnet sind. Aufgrund der hohen Anfälligkeit von RNA gegenüber Abbau durch RNasen, muss im Umgang mit RNA besonders sorgsam gearbeitet werden. Daher sollte die RNA so früh wie möglich von RNasen getrennt werden. Eine Möglichkeit stellt die RNA-Extraktion mit Trizol (s. Tabelle 2) dar. Dabei wird das Zellmaterial durch Guanidiniumthiocyanat denaturiert und anschließend die RNA durch Phasentrennung von der DNA und Proteinen separiert.

Zunächst wurden die Kartoffelkäferlarven in flüssigem Stickstoff inkubiert, um anschließend einen besseren Transfer in Eppendorfgefäße mit Keramik-beads (*Precellys Lysing Kit „tissue homogenizing CKMix“*, #P000918-LYSK0-A.0, Bertin Technologies) zu gewährleisten. Pro Reaktionsgefäß wurden maximal fünf Larven überführt. Daraufhin wurden 800 µl Trizol zugegeben und die Proben auf Eis gelagert. Danach erfolgte das Homogenisieren der Larven in einem Homogenisator (*Bead Mill Max* Homogenisator, VWR) für 20 s bei einer Geschwindigkeit von 6 m/s, gefolgt von einer 5-minütigen Kühlpause auf Eis. Anschließend wurden die Proben kurz bei - 80 °C eingefroren und sofort wieder aufgetaut, um zusätzliches Gewebe zu zerstören. Daraufhin wurden 160 µl Chloroform zugegeben, gevortext und die Proben für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt (ca. 475 µl) und 1 Volumen Isopropanol zugefügt. Der Ansatz wurde gevortext und über Nacht bei - 20 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C für 30 min. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml 75 % (v/v) Ethanol gewaschen und die Proben erneut für 15 min zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschvorgangs wurde das Pellet für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und in RNase-freiem H₂O resuspendiert (eine Larve in 30 µl, 5 Larven in 50 µl).

2.3.2.10 Isolation von RNA aus Hefezellen mittels Trizol

Zu Beginn wurde das Trizol auf 65 °C vorgewärmt und ein Eppendorf-rack im flüssigen Stickstoff vorgekühlt. Die aufzuschließende Probe wurde mit einem Minipistill für circa 45 s im rack gemörsert, mit 800 µl Trizol versetzt, das Minipistill gründlich ausgewaschen und die Proben zunächst für 3 min bei 65 °C und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde nach Zugabe von 200 µl Chloroform mehrmals invertiert und für weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol (1 Volumen) versetzt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, um die RNA zu fällen. Daraufhin erfolgte erneut eine 10-minütige

Zentrifugation. Nach Waschen des Pellets mit 1 ml 70%igen Ethanol wurde der Ansatz für 5 min bei 7000 g und 4 °C zentrifugiert, das Pellet getrocknet und in RNase-freiem H₂O resuspendiert.

2.3.2.11 RNase A/T1-Behandlung

Die in dieser Arbeit angewandte RNase A/T1-Behandlung wurde zur Detektion von dsRNA durchgeführt. Dabei sollte aus einer Gesamt-RNA-Isolation die ssRNA spezifisch durch Zugabe von RNasen verdaut und anschließend die unverdaute dsRNA mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silberfärbung nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wurde eine Kombination der RNasen A/T1 verwendet. Dies ist möglich, da RNase A und RNase T1 bei Salzkonzentrationen über 300 mM NaCl selektiv ssRNA spalten, während dsRNA unter diesen Bedingungen weitgehend unbeeinträchtigt bleibt. RNase A erkennt spezifisch die beiden Pyrimidine U und C und spaltet die Phosphodiesterbindung des darauffolgenden Nukleotids. RNase T1 hingegen erkennt das Purin G und spaltet ebenfalls die Phosphodiesterbindung des darauffolgenden Nukleotids (101,102).

Nachdem die Gesamt-RNA aus Hefezellen isoliert wurde (s. 2.3.2.10), erfolgte zunächst die enzymatische Umsetzung von eventuell zurückgebliebener DNA. Dazu wurde der Ansatz mit RNase-freiem H₂O auf 85 µl aufgefüllt und 10 µl 10x DNase I-Puffer (Roche) und 3 µl DNase I zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 2 µl DpnI hinzugefügt und der Inkubationsschritt wiederholt. Daraufhin wurden die Reaktionsbedingungen für den kombinierten RNase A/T1-Verdau angepasst. Dem Ansatz wurden zunächst 131 µl RNase-freies H₂O, 82,5 µl 4 M NaCl sowie 16,5 µl 100 mM EDTA zugefügt. Danach erfolgte die Zugabe von 1,75 µl RNase A/T1-Mix (3,5 µg RNase-A, 8,75 U RNase-T1) und eine 90-minütige Inkubation bei 37 °C. Abschließend wurde die Reaktion mit Proteinase K behandelt (50 µg Proteinase K, 20 µl 10 % (w/v) SDS, 45 min bei 37 °C), eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Reinigung zur Isolation der dsRNA durchgeführt und diese mittels Ethanol-Fällung präzipitiert (s. 2.3.2.4).

2.3.2.12 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine Methode, Proteine oder Nukleinsäuren in einem Gel anzufärben. Der Vorteil der Silberfärbung ist eine hohe Sensitivität, da bereits 0,1-1 ng Probe detektiert werden können. Im Allgemeinen lagern sich Silberionen an negativ geladene Bereiche an und werden durch die spätere Zugabe von alkalischem Formaldehyd zu Silber reduziert.

Das zu färbende Gel wurde zunächst für 30 min in 10 % (v/v) Essigsäure inkubiert, um die Proben zu fixieren. Daraufhin erfolgte drei Mal ein 2-minütiger Waschschrift mit ddH₂O. Nach dem letzten Waschschrift wurden 50 ml Färbelösung zugegeben (s. Tabelle 2) und das Gel

erneut für 30 min inkubiert. Die überschüssigen Silberionen wurden durch 1-minütiges Waschen mit ddH₂O entfernt. Die Entwicklung des Gels startete durch Zugabe von 50 ml Entwicklungslösung (s. Tabelle 2), die Färbung wurde durch Zugabe von 10 % (v/v) Essigsäure gestoppt. Alle Arbeitsschritte wurden unter kontinuierlichem Schütteln durchgeführt.

2.3.2.13 DNase-Behandlung

Eine DNase-Behandlung dient dem Abbau von Template-DNA nach einer *in-vitro*-Transkription oder aber von DNA aus RNA-Isolationen, um daraufhin bspw. eine cDNA-Synthese durchführen zu können. Bei der Durchführung wurde stets die DNase I (Roche) verwendet und es wurde den Herstellerangaben gefolgt. Einzig die Gesamt-RNA der Kartoffelkäferlarven wurde zum Abbau der genomischen DNA mit dsDNase (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben behandelt.

2.3.2.14 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wird eingesetzt, um RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Diese Methode wurde zum Nachweis der transkribierten dsRNA aus der Hefe, für die Generierung von Standardgeraden zur Bestimmung der dsRNA-Quantität sowie für die genotypische Analyse der Target-RNA der Kartoffelkäferlarven verwendet. In dieser Arbeit wurde die RevertAid Reverse Transkriptase (200 U/μl, Thermo Scientific) genutzt und es wurde den Herstellerangaben gefolgt. Bei der Generierung von cDNA aus dsRNA wurde der Ansatz nach Primerzugabe zunächst für 10 min bei 95 °C und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert, bevor die weiteren Komponenten zugegeben wurden. Zur Generierung der cDNA wurde entweder 2 μg DNase I-behandelte totale RNA oder aber eine definierte Menge *in vitro* transkribierter RNA (20,48 fg - 1600 pg) verwendet. Die cDNA-Synthese der dsRNA erfolgte mit 20 pmol Primer. Als Negativkontrolle diente eine Probe, bei der die Reverse Transkriptase durch RNase-freies H₂O ersetzt wurde (-RT).

2.3.2.15 Bestimmung der Wiedergewinnungsrate von RNA mittels fluoreszenzmarkierter RNA

Für die Quantifizierung der in *S. cerevisiae* generierten edsRNA ist die Kenntnis der Wiedergewinnungsrate nach RNA-Extraktion mit Trizol von entscheidender Bedeutung, da während des Extraktionsprozesses Verluste auftreten können. Ohne Berücksichtigung dieser Verluste würden die berechneten RNA-Mengen systematisch unterschätzt (zur genauen Berechnung s. 2.3.2.16). Um diese zu bestimmen, wurde dem Ansatz direkt nach Zugabe des Trizols fluoreszenzmarkierte RNA (200-300 fmol) zugefügt. Anschließend erfolgte die totale

RNA-Extraktion (s. 2.3.2.10). Daraufhin wurde ein Viertel der totalen RNA mit 2x RNA-Ladepuffer HS (s. Tabelle 2) versetzt, für 5 min bei 75 °C inkubiert und auf ein denaturierendes 6%iges Polyacrylamid-Gel (s. Tabelle 9) aufgetragen. Als Marker wurde eine selbsthergestellte Mischung fluoreszenzmarkierter RNAs mit unterschiedlichen Längen und als Laufpuffer 0,5 x TBE (s. Tabelle 2) verwendet. Das Gel wurde für ca. 75 min bei 350 V laufen gelassen, danach zwei Mal in Laufpuffer gewaschen und an einem LI-COR Odyssey CLx (LI-COR Biosciences GmbH) gescannt. Für die Erstellung einer Standardgraden und der damit einhergehenden Quantifizierung mithilfe der Software *Image Studio* Version 5.2 wurden zusätzlich verschiedene Mengen der fluoreszenzmarkierten RNA aufs Gel aufgetragen.

2.3.2.16 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) beruht auf dem Prinzip der PCR, aber durch Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Farbstoffs ist die Quantifizierung des PCR-Produkts in Echtzeit möglich. Dabei verhält sich das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des PCR-Produkts. Ein Nachteil der Verwendung fluoreszenzmarkierter Farbstoffe ist die unspezifische Interkalation in die DNA und somit die fehlende Unterscheidung zu unspezifischen PCR-Produkten oder Primerdimeren. Dieses Problem kann allerdings teilweise durch Schmelzkurvenanalyse behoben werden.

Die qPCR wurde zur Bestimmung der dsRNA-Quantität im heterologen Genexpressionssystem *S. cerevisiae* verwendet. Dazu wurde zunächst die Gesamt-RNA aus 15 OD-Einheiten Hefezellen mittels Trizol-Extraktion (s. 2.3.2.10) isoliert und die Konzentration sowie Qualität mit dem *NanoDrop One* (Thermo Scientific) bestimmt. Daraufhin wurden 10 µg Gesamt-RNA mit DNase I behandelt (s. 2.3.2.13) und eine reverse Transkription durchgeführt (s. 2.3.2.14). Die Quantifizierung der DNA erfolgte mithilfe der Standardkurvenmethode mit 2x SG qPCR Master Mix (EUR_x®) nach Herstellerangaben. Für die qPCR wurde 1 µl cDNA als Template eingesetzt und die Analyse wurde mit einem LightCycler® 480 II (Roche) durchgeführt (Reaktionsbedingungen s. **Tabelle 10**). Zur Erstellung der Standardkurve wurde eine definierten Ausgangskonzentration der dsRNA verwendet, aus der schrittweise fünf Verdünnungen mit einem Verdünnungsfaktor von 1:5 hergestellt wurden. Zur Berechnung der dsRNA-Quantität wurde folgende Formel genutzt:

$$\text{Quantität (dsRNA)} = x = 10^{\frac{y-b}{m}}$$

y: gemessener C_t

b: Y-Achsenabschnitt

m: Anstieg

Die ausgehend von der Formel berechnete Quantität entspricht allerdings nur der dsRNA-Quantität in dem cDNA-Ansatz, sodass noch die Quantität in der Gesamt-RNA (Masse Gesamt-RNA / 2 µg) berechnet werden muss. Aufgrund der Tatsache, dass die mittels fluoreszenzmarkierter RNA bestimmte Wiedergewinnungsrate (s. 2.3.2.15) bei circa 70-90 % lag, wurde die zuletzt berechnete dsRNA-Quantität durch 0,8 dividiert, um schlussendlich die tatsächliche Menge an dsRNA in 15 OD-Einheiten Hefe zu bestimmen.

Für die Beurteilung eines molekularen Effekts bei der Behandlung der Kartoffelkäferlarven mit Hefe, welche (e)dsRNA transkribierte, wurde ebenfalls eine qPCR-Analyse durchgeführt. Dazu wurde zunächst die totale RNA (s. 2.3.2.9) isoliert, die genomische DNA mit dsDNase enzymatisch umgesetzt (s. 2.3.2.13) und die cDNA synthetisiert (s. 2.3.2.14). Anschließend erfolgte die qPCR mit 2x SG qPCR Master Mix (EURx[®]) nach Herstellerangaben. Für die qPCR wurden 2 µl einer 1:5 verdünnten cDNA als Template eingesetzt und die Analyse wurde mit einem LightCycler[®] 480 II (Roche) durchgeführt (Reaktionsbedingungen s. **Tabelle 10**). Die Auswertung basierte auf der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

Tabelle 10: Reaktionsbedingungen der qPCR

Die Schritte 2-4 wurden 35-mal wiederholt.

	Temperatur	Zeit	Rampenrate (°C / s)
initiale Denaturierung	95 °C	10 min	4,4
Denaturierung	95 °C	5 s	4,4
<i>annealing</i>	60 °C	10 s	2,2
Elongation	72 °C	15 s	4,4
Schmelzkurve Teil 1	95 °C	30 s	4,4
Schmelzkurve Teil 2	67 °C	1 min	2,2
Schmelzkurve Teil 3	95 °C		0,11

2.3.2.17 Next generation sequencing von sRNAs

Beim *Next generation sequencing* (NGS) handelt es sich um ein Hochdurchsatzverfahren zur Sequenzierung von DNA oder RNA. In dieser Arbeit wurden RNAs aus DCL-Assays zur Analyse der Prozessivität und des *phased processings* verwendet. Die Sequenzierung der RNAs erfolgte durch die *Core-Unit* DNA-Technologie des IZKF Leipzig von PD Dr. Knut Krohn (Fakultät für Medizin, Universität Leipzig). Zur Generierung der RNA-Bibliothek wurde das Kit „NEBNext[®] Multiplex Small RNA Library Prep“ (New England Biolabs) verwendet. Die

bioinformatische Auswertung der Daten wurde durch PD Dr. Jan Grau (Institut für Informatik, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

Das NGS wurde sowohl mit *in vitro* transkribierter RNA als auch mit *in vivo* transkribierter RNA durchgeführt. Die Zusammensetzung der Reaktion zur *in-vitro-Transkription* von RNA kann Tabelle 7 entnommen werden. Dabei wurde unmarkierte Substrat-RNA und je Probe ein Triplikat verwendet. Anschließend wurde ein DCL-Assay, wie in Abschnitt 2.5.10 beschrieben, bis zur Behandlung mit Proteinase K durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mindestens über Nacht bei - 20 °C gelagert. Daraufhin wurden die Triplikate vereinigt und der Reaktionsansatz mit RNase-freiem H₂O auf 300 µl aufgefüllt. Danach erfolgte die Zugabe von 300 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), 1-minütiges Vortexen und eine Zentrifugation für 3 min bei 16060 g. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Reinigungsschritt wiederholt. Anschließend wurde der Überstand erneut überführt und mit 300 µl Chloroform versetzt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abermals abgenommen, auf 300 µl mit RNase-freiem H₂O aufgefüllt und die RNA durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natrimacetat (pH 5,2), 20 µg Glykogen und 2,5 Volumen Ethanol zunächst für 10 min bei Raumtemperatur, dann 10 min auf Eis und abschließend über Nacht bei - 20 °C gefällt. Das Reaktionsgefäß wurde für 30 min bei 16060 g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet mit 500 µl Ethanol gewaschen. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl RNase-freiem H₂O resuspendiert. Zur Erhöhung der Reinheit der isolierten RNA wurde der Fällungsschritt erneut durchgeführt, wobei die Fällung bei - 20 °C über einen Zeitraum von einer Stunde erfolgte. Schlussendlich wurde das Pellet in 25 µl RNase-freiem H₂O gelöst.

Die Probenvorbereitung der *in vivo* transkribierten RNA begann mit der heterologen Genexpression von *DCL4* und der *edsRNA* (s. 2.5.4). Nach der Ernte von jeweils drei Replikaten (15 OD-Einheiten) wurde die RNA mittels Trizol extrahiert (s. 2.3.2.10) und die Pellets in 350 µl RNase-freiem H₂O resuspendiert. Zur weiteren Reinigung wurde die RNA erneut mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol gereinigt und gefällt (s. oben zweiter Reinigungsschritt).

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode, bei der Proteine denaturiert und nach ihrem Molekulargewicht separiert werden. Dabei lagert sich das SDS gemäß dem Molekulargewicht der Proteine an. Als Laufpuffer für die diskontinuierlichen Gele (s. **Tabelle 11**) diente LAEMMLI-Puffer (s. Tabelle 2). Die Proben wurden vor dem Beladen mit 5x SDS-Probenpuffer (s. Tabelle

2) versetzt und anschließend 10 min bei 95 °C inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 40 mA und maximaler Spannung für 1 h.

Tabelle 11: Zusammensetzung von vier SDS-Gelen

Komponenten	Trenngel (10 %)	Sammelgel (4 %)
H ₂ O	13 ml	9 ml
30 % Acrylamid / Bisacrylamid	10 ml	2 ml
Trenngelpuffer / Sammelgelpuffer	6 ml	1,25 ml
10%ige SDS-Lösung	300 µl	125 µl
TEMED	70 µl	25 µl
10 % APS	210 µl	70 µl

2.4.2 Westernblot

Ein Westernblot dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen und wird nach der SDS-PAGE durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden damit DCL4 und DRB4 nach Generierung in *S. cerevisiae* qualitativ nachgewiesen. Zu Beginn wurden *Whatman*-Papier und eine Nitrocellulose-Membran (Odyssey®, LI-COR Biosciences GmbH) in Transferpuffer (s. Tabelle 2) inkubiert. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die Membran nach dem *semi-dry*-Verfahren. Dafür wurden zwei *Whatman*-Papiere auf die Anode gelegt, gefolgt von der Membran, dem SDS-Gel und erneut zwei *Whatman*-Papieren. Das Blotting erfolgte für 2 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA / cm². Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Blocklösung (s. Tabelle 2) und anschließend mit dem primären Antikörper (Anti-FLAG aus Kaninchen, Sigma-Aldrich, 1:1000 bzw. Anti-HA aus Maus, Santa Cruz Biotechnology, 1:500 in Blocklösung) wahlweise entweder für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Daraufhin folgte dreimaliges Waschen mit PBS-T (s. Tabelle 2) für jeweils 5 min und eine 1-stündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (IRDye® 800CW Anti-Maus bzw. Anti-Kaninchen, LI-COR, 1:10000 in Blocklösung) bei Raumtemperatur. Abschließend wurde die Membran erneut drei Mal für jeweils 15 min mit PBS-T gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte an einem LI-COR Odyssey CLx (LI-COR Biosciences GmbH) und die Auswertung mittels der Software *Image Studio* Version 5.2.

2.5 Arbeiten mit Zellen

2.5.1 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Transformation ist eine Möglichkeit, freie DNA in kompetente Zellen zu schleusen. Dabei kann entweder ein Ligationsansatz (Transformation) oder aber ein Plasmid (Retransformation) in die Bakterien eingebracht werden.

50 µl chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen (s. **Tabelle 12**) wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 5 µl Ligationsansatz oder 1 µl Plasmid-DNA versetzt. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert und daraufhin einem Hitzeschock für 60 s bei 42 °C unterzogen. Es wurden 500 µl LB-Medium (s. Tabelle 1) zum Transformationsansatz zugegeben und dieser für 30 min bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden entweder 25 µl (Plasmid-DNA) oder 100 µl (Ligation) Zellen auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 12: verwendete prokaryotische Stämme

Bakterienstamm	Genotyp
Top10	<i>F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 ga/U ga/K rpsL (StrR) endA1 nupG λ-</i>
Stellar	<i>F-, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ(lacZYA-argF) U169, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ΔmcrA, λ</i>

2.5.2 Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Für die Generierung kompetenter Hefezellen wurden 3 ml YPD-Medium (s. Tabelle 1) mit einer Wildtyp-Hefekolonie (INVSc1 oder CEN.PK2-1C, Thermo Scientific, #C81000 oder Euroscarf, #30000A) inokuliert und 14-16 h bei 30 °C und 200 rpm (*Digital Orbital Shaker*, VWR) inkubiert. Daraufhin erfolgte die Messung der optischen Dichte der Übernachtskultur bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) mithilfe eines Photospektrometers (GEN10S UV-Vis, Thermo Scientific) und das Animpfen von 50 ml YPD-Medium auf eine OD₆₀₀ = 0,1. Diese Hauptkultur wurde für 5 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde erneut die OD₆₀₀ bestimmt, wobei ein Wert von OD₆₀₀ = 0,4 erreicht werden sollte. Die tatsächlich gemessene OD₆₀₀ entsprach Z. Die Hauptkultur wurde nach der Bestimmung der OD₆₀₀ für 5 min bei 280 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 20 ml sterilem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in Z ml sterilem Wasser resuspendiert, das Volumen bestimmt und dasselbe Volumen an 0,2 M Lithiumacetat hinzugegeben. Der Ansatz wurde daraufhin 1 h bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation konnten die Zellen entweder sofort verwendet oder aber für eine spätere Nutzung als

Gefrierstock bei - 70 °C als 110 µl Aliquots gelagert werden. Für die Lagerung musste zuvor 1 Volumen 30 % (w/v) autoklaviertes Glycerin zu den Zellen hinzugefügt werden.

2.5.3 Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen

Zu Beginn der Transformation wurden 10 µg *carrier*-DNA (Hefe-tRNA, Thermo Scientific) und 2 µg Plasmid-DNA gemischt. Daraufhin wurden 50 µl kompetente Zellen und 55 µl 70 % (w/v) PEG3350 zum Ansatz hinzugegeben und dieser für 1 h bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 12 µl DMSO zugegeben und der Ansatz durch Pipettieren gemischt. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 6 min bei 42 °C. Es wurde 1 ml Wasser zugegeben, das Eppendorfgefäß invertiert und für 2 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Wasser resuspendiert. Der gesamte Ansatz wurde anschließend auf ScD-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker (s. Tabelle 1) ausplattiert und für 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.5.4 Heterologe Genexpression in *S. cerevisiae*-Zellen

Für die heterologe Genexpression wurden die Hefezellen zunächst in einer Vorkultur inkubiert. Dafür wurden 10 ml ScD-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker (s. Tabelle 1) mit einer ausgewählten Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm (Digital Orbital Shaker, VWR) geschüttelt. Die OD₆₀₀ wurde mithilfe des Spektrophotometers (GEN10S UV-Vis, Thermo Scientific) bestimmt und anschließend die 50 ml Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ = 0,25 angeimpft. Das Medium der Hauptkultur richtete sich nach dem jeweiligen Promotor des heterologen DNA-Abschnitts: Für den induzierbaren GAL-Promotor wurde SM-Medium (s. Tabelle 1) und für die konstitutiven Promotoren TEF1 und TDH3 wurde ScD-Medium (s. Tabelle 1) verwendet. Die Hauptkultur wurde zwischen 6 und 24 h bei 30 °C und 200 rpm (*Digital Orbital Shaker*, VWR) inkubiert. Nach Beendigung der heterologen Genexpression wurde erneut die OD₆₀₀ bestimmt und dann entweder 15 OD-Einheiten (RNA-Extraktion) oder 50 OD-Einheiten (Proteinanalyse) geerntet. Dafür wurde das entsprechende Volumen an Hefesuspension in ein Falconröhrchen gefüllt und für 5 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml sterilen ddH₂O resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das Pellet bis zum Gebrauch bei - 20 °C gelagert.

2.5.5 LiOAc-DNA-Extraktion aus *S. cerevisiae*-Zellen

Die LiOAc-DNA-Extraktion wird für die Extraktion von DNA aus Hefekolonien verwendet. Als erstes wurde die Hefekolonie in 100 µl 0,2 M Lithiumacetat, 1 % (w/v) SDS resuspendiert, gevortext und 5 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von

300 µl eiskaltem 96 % (v/v) Ethanol präzipitiert. Der Ansatz wurde für 3 min bei 4 °C und 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 µl eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Nach erneuter Abnahme des Überstands wurde das Pellet für 5 min bei 60 °C im Heizblock getrocknet. Schlussendlich wurde das Pellet in 100 µl sterilem ddH₂O resuspendiert und bis zum Gebrauch auf Eis gelagert (maximal 2-3 Tage).

2.5.6 Zellaufschluss von Hefezellen mittels Ultraschall

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hefezellen mechanisch durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Dabei wirken große Kavitationskräfte, welche lokal hohe Energien freisetzen, auf den Organismus ein. Das Hefepellet wurde zunächst in 400 µl B60-Puffer (s. Tabelle 2) resuspendiert und daraufhin DTT und PMSF hinzugegeben (Endkonzentration je 1 mM). Der Zellaufschluss erfolgte durch zweimalige Ultraschallbehandlung (Bandelin Sonoplus) mit stoßweisen Impulsen über jeweils 5 Minuten, unterbrochen durch eine 2-minütige Pause nach dem letzten Puls, wobei die Proben währenddessen auf Eis gekühlt wurden. Danach wurde der Ansatz 5 min bei 9391 g zentrifugiert und sowohl der Überstand als auch das Pellet bei - 80 °C zur weiteren Analyse gelagert.

2.5.7 Herstellung von Gefrierstocks von *S. cerevisiae*-Zellen

Gefrierstocks ermöglichen die dauerhafte und stabile Aufbewahrung von Zellen über längere Zeiträume ohne Qualitätsverlust und reduzieren zugleich das Risiko von Kontaminationen sowie unerwünschten Mutationen während fortlaufender Kultivierung.

Zunächst wurden 10 ml ScD-Medium mit dem entsprechenden *Dropout* als Vorkultur mit einer Hefekolonie inokuliert und 14-16 h bei 30 °C und 200 rpm (*Digital Orbital Shaker*, VWR) inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der OD₆₀₀ als 1:10-Verdünnung. Die Hauptkultur (50 ml ScD-Medium mit dem entsprechenden *Dropout*) wurde auf eine OD₆₀₀ = 0,2 angeimpft und 5 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zellviabilität der Hauptkultur wurde mittels Mikroskopie überprüft. Zur Generierung der Kryostocks wurden 300 µl Hefesuspension mit 1 Volumen 30 % (w/v) autoklaviertem Glycerin versetzt. Die Kryostocks wurden anschließend bei - 80 °C gelagert.

2.5.8 Fermentation

Die Fermentation wird in der Biotechnologie eingesetzt, um mithilfe von Mikroorganismen definierte Biomoleküle durch heterologe Genexpression im größeren Maßstab generieren zu können. Diese verbleiben dann entweder in der Zelle oder werden in das Medium sezerniert. Nachdem bereits im Rahmen der Arbeit dsRNA im Schüttelkolben generiert werden konnte,

sollte die Ausbeute mithilfe der Fermentation erhöht werden. Das dabei verwendete Modell war der Bioreaktor *AC 7L BioBundle mit ezZ-Control* der Firma Getinge Applikon.



Abbildung 4: Bioreaktor

Exemplarische Darstellung eines vergleichbaren Bioreaktors (140).

Das Fermentationssystem besteht aus dem Bioreaktor, welcher an einem *Controller* angeschlossen ist. Dieser dient der Steuerung des Systems. Weiterhin gibt es eine Verbindung zu einer externen Pumpe und einer Waage. Diese Komponenten werden hauptsächlich für die kontinuierliche Zugabe an Nährmedium verwendet. Mithilfe eines Kompressors kann dem Reaktor aktiv Luft zugeführt werden und durch den Anschluss eines Umlaufkühlers erfolgt die aktive Kühlung des Systems.

Bevor eine Fermentation durchgeführt werden kann, muss der Bioreaktor vorbereitet werden. Dafür werden alle Schläuche abgeklemmt und alle freien Enden mit Aluminiumfolie bedeckt. Außerdem werden das pH-Meter und die Pumpe samt *feeding*-Schlauch vor jeder neuen Fermentation kalibriert. Daraufhin wird der Bioreaktor mit einer 1,5x Basalsalzlösung (s. Tabelle 1) gefüllt und abschließend für 30 min bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Autoklaviervorgang wird der Bioreaktor an den *Controller* angeschlossen, alle

Messinstrumente verbunden und die Luftzufuhr sowie der Umlaufkühler angekoppelt. Danach erfolgt die Zugabe von 4,6 ml Spurenelementlösung, 8 ml Vitaminlösung, 200 ml Kultivierungsmedium und 200 ml 5%ige Glukoselösung (s. Tabelle 1). Der pH-Wert wird auf pH 5 titriert und das gesamte System durch Zufuhr von Luft (10 l/min) sowie Einstellen des Rührers auf 1000 rpm maximal mit Sauerstoff gesättigt. Nach 1 h wird die dO_2 -Sonde kalibriert. Zuletzt werden vor Inokulation circa 30 ml Reaktionsmedium als Referenz entnommen.

Da der Bioreaktor ein Startvolumen von circa zwei Liter aufweist, mussten mehrere Vorkulturen angesetzt werden, um eine Start- $\text{OD}_{600} = 0,25$ erreichen zu können. Zu Beginn wurde die Vorkultur (20 ml ScD-Medium, s. Tabelle 1) mit einer ausgewählten Kolonie mit Selektionsmarker (in diesem Fall immer Ura-Selektionsmarker) inokuliert und für circa 16 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert (*Digital Orbital Shaker*, VWR). Daraufhin wurde die erste Vorkultur in einen neuen Schüttelkolben überführt und auf 100 ml mit ScD-Medium aufgefüllt. Die zweite Vorkultur wurde bei denselben Bedingungen für circa 5 h inkubiert. Anschließend wurde die OD_{600} gemessen und eine dritte Vorkultur (300 ml auf $\text{OD}_{600} = 0,2$) angeimpft. Die Inkubation erfolgte für circa 6 h bei 30 °C und 200 rpm (TR-250, Infors HT). Die OD_{600} wurde abermals bestimmt und das Volumen zur Inokulation des Bioreaktors auf $\text{OD}_{600} = 0,2$ berechnet. Die entsprechende Hefesuspension wurde für 5 min bei 1000 g und Raumtemperatur zentrifugiert und das Hefepellet in 25 ml ScD-Medium resuspendiert. Der Bioreaktor wurde mit dem gesamten Volumen inokuliert und abschließend wurde nochmals mit 10 ml ScD-Medium nachgespült. Die Aufzeichnung des Fermentationslaufs erfolgte durch die Software *Lucillus PIMS Lite*.

Die Fermentation wurde stets bei den folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 400 rpm Grundrührgeschwindigkeit, 4,5 l/min Grundluftzufuhr, pH 5, 35 % dO_2 , 30 °C.

Während der Fermentation wurden Proben durch das Probeentnahmerohr entnommen und die OD_{600} sowie die Glukosekonzentration bestimmt. Die Proben wurden bei - 20 °C gelagert. In der Regel wurde die Hefesuspension des Bioreaktors nach Beendigung des Fermentationslaufs geerntet. Dazu wurde die Hefesuspension für 10 min bei 7500 g und 4 °C (Beckman Coulter GmbH, Avanti™ J-25) zentrifugiert und die sechs Hefepellets anschließend in insgesamt 120 ml ScD-Medium resuspendiert. Daraufhin erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 3000 g und 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen, die Biofeuchtmasse bestimmt und die Zellpellets bei - 20 °C gelagert. Zusätzlich wurden mehrere Proben mit einer definierten OD_{600} von 15 (bezogen auf die ursprünglich gemessene Hefesuspension) geerntet und bis zur Analyse bei - 20 °C gelagert.

2.5.9 Bestimmung der Glukosekonzentration in Fermentationsproben

Da es sich bei *S. cerevisiae* um einen CRABTREE-positiven Organismus handelt, stellt die aktuelle Glukosekonzentration im Medium während der Fermentation einen wesentlichen Parameter dar. Der CRABTREE-Effekt beschreibt ein Phänomen, bei dem bestimmte fakultativ anaerobe Mikroorganismen, insbesondere *S. cerevisiae*, trotz ausreichender Sauerstoffkonzentration bevorzugt Gärung betreiben, wenn hohe Glukosekonzentrationen vorliegen (141,142). Aus diesem Grund wurde die Glukosekonzentration während oder nach Beendigung des Fermentationslaufs bestimmt. Dafür wurde das Kit Enzytec™ Liquid D-Glucose/D-Fructose (R-Biopharm AG) genutzt. Prinzipiell wurde den Herstellerangaben gefolgt, allerdings wurde jeweils nur die Hälfte der angegebenen Volumina der Lösungen verwendet. Aufgrund des leicht sauren pH-Werts des Mediums, welches zur Kultivierung der Hefen verwendet wurde, mussten die Proben vor der Bestimmung der Glukosekonzentration nochmal aufgearbeitet werden. Dafür wurde 1 ml der zu bestimmende Lösung durch Zugabe von 175 µl 1 M NaOH neutralisiert. Der Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 min bei 18620 g und 4 °C zentrifugiert. Daraufhin wurden 800 µl des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei Bedarf 1:10 bzw. 1:100 mit ddH₂O vor der Durchführung der Bestimmung der Glukosekonzentration verdünnt.

2.5.10 DCL-Assay

Der DCL-Assay im BY2-Lysat (BYL) stellt den initialen Schritt der RNAi nach, nämlich die Spaltung von dsRNA in einen Pool von kleinen RNAs (sRNAs) mit einer Länge von 21 bis 24 nt. BYL ist ein entvakuolisierter, cytoplasmatischer Pflanzenextrakt aus *Nicotiana tabacum* BY-2-Protoplasten, der sowohl DCL- als auch RISC-Aktivität besitzt und zudem die Durchführung von *in-vitro*-Translationen ermöglicht (63). Dieser Pflanzenextrakt weist somit vergleichbare translationale Eigenschaften wie der etablierte Weizenkeim- oder Retikulozytenextrakt auf, zeichnet sich jedoch durch eine gesteigerte RNAi-Aktivität aus (143–145). Im Rahmen des Assays wird radioaktiv markierte dsRNA als Substrat eingesetzt und mit dem BYL-Reaktionsansatz inkubiert. Die DCL-Enzyme prozessieren die dsRNA zu charakteristischen kleinen RNA-Fragmente mit einer Länge von 21-24 nt. Die resultierenden Produkte werden anschließend gereinigt und durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt und analysiert, wodurch sowohl Größe als auch Menge der entstandenen sRNAs bestimmt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser DCL-Assay genutzt, um die Rekonstitution der DCL4-Aktivität im Modellorganismus *S. cerevisiae* zu analysieren. Die Visualisierung der Substrat-RNA und der durch DCL generierten sRNAs erfolgte durch Einsatz ³²P-markierter RNA (s. 2.3.2.2) und anschließender Autoradiographie (s. 2.3.2.8). Die Zusammensetzung der

jeweiligen Reaktionsansätze ist **Tabelle 13** zu entnehmen. Als Positiv- und Negativkontrolle wurde der DCL-Assay mit BYL und für die Analyse der Rekonstitution der DCL4-Aktivität in *S. cerevisiae* mit Hefe-Rohextrakt durchgeführt. Bei der Negativkontrolle wurde das Substrat erst nach Proteinase K-Verdau zugegeben.

Tabelle 13: Zusammensetzung des DCL-Assays

Komponenten Kontrollen	Volumen	Komponenten Hefe-Rohextrakt	Volumen
BYL	10 µl	Hefe-Rohextrakt	10 µl
Kreatinkinase (10 mg/ml)	0,4 µl	Kreatinkinase (10 mg/ml)	0,4 µl
10x TM-Puffer	2 µl	10x TM-Puffer	2 µl
4x TR-Puffer	2 µl	4x TR-Puffer	4,5 µl
³² P-markiertes dsRNA-Substrat	200 ng	³² P-markiertes dsRNA-Substrat	200 ng
RNase-freies H ₂ O	ad 20 µl	RNase-freies H ₂ O	ad 20 µl

Nach Mischung des Ansatzes wurde dieser für 2,5 h bei 21 °C inkubiert. Anschließend wurden 1,2 µl SDS (10 % w/v) und 1,2 µl Proteinase K (20 U/µl) zugegeben und erneut für 30 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 100 µl RNase-freiem H₂O und 125 µl Chloroform. Die Probe wurde für mindestens 1 min gevortext und danach 10 min bei 16060 g und Raumtemperatur zentrifugiert. 90 µl des Überstandes wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 2,5 µl Hefe-tRNA (20 mg/ml) und 2,5 Volumen Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde invertiert und zur Fällung der RNA über Nacht bei - 20 °C gelagert. Nachfolgend wurde das Reaktionsgefäß für 30 min bei 16060 g und 4 °C zentrifugiert, das Pellet mit 500 µl 70%igen Ethanol gewaschen und erneut für 10 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und in 30 µl RNase-freiem H₂O resuspendiert. Die Detektion der sRNAs erfolgte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem 12,5%igen Gel (s. 2.3.2.7) und anschließender Autoradiographie (s. 2.3.2.8).

2.5.11 *In-vitro*-Translation

Die *in-vitro*-Translation im BYL-System basiert auf den funktionellen Bestandteilen des zellfreien, cytoplasmatischen Extrakts aus *Nicotiana tabacum* BY-2-Protoplasten, welcher aktive Ribosomen, tRNAs sowie die notwendigen eukaryotischen Translationfaktoren enthält (146). Nach Zugabe eines *in vitro* transkribierten mRNA-Templates erfolgt die Proteinsynthese

durch pflanzliche Ribosomen im Lysat. Die *in-vitro*-Translation wurde in *Micrococcus*-Nuklease behandeltem BYL für 2,5 h bei 25 °C durchgeführt (s. **Tabelle 14**). *Micrococcus*-Nuklease ist eine Calcium-abhängige Endonuklease, die sowohl DNA als auch RNA abbauen kann und unter anderem zur Reinigung von Zelllysaten eingesetzt wird. In zellfreien Systemen wie BYL kommt sie bspw. gezielt zum Einsatz, um endogene Nukleinsäuren (RNA und DNA) zu entfernen, die andernfalls mit experimentell zugesetzten Nukleinsäuren interferieren könnten. Die enzymatische Aktivität der *Micrococcus*-Nuklease wird anschließend durch Zugabe von EGTA, einem Calcium-Chelator, inhibiert (147).

Tabelle 14: Zusammensetzung einer *in-vitro*-Translation

Komponenten	Volumen
BYL	10 µl
Kreatinkinase (10 mg/ml)	0,4 µl
10x TM-Puffer	2 µl
4x TR-Puffer	2 µl
mRNA	0,5 pmol
RNase-freies H ₂ O	ad 20 µl

2.5.12 Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay dient der Überprüfung der Qualität eines BY2-Lysats oder eines frisch hergestellten TM-/TR-Puffers (s. Tabelle 2). Dafür wurde eine *in-vitro*-Translation (s. 2.5.11) mit Luciferase-RNA als RNA-Template in *Micrococcus*-Nuklease behandeltem BYL durchgeführt (je ein Ansatz mit altem und neuem Material, s. Tabelle 14).

Nach 1-stündiger Inkubationszeit bei 25 °C wurde die Luciferaseaktivität jeweils als Doppelbestimmung für die alte und neue Reaktionskomponente mittels Biolumineszenz bestimmt. Dafür wurden 20 µl Luciferin-Substrat mit 5 µl Translationsansatz versetzt und die Aktivität mittels Luminometer (Sirius, Berthold Technologies GmbH & Co. KG) gemessen. Das Luciferin-Substrat wird durch die translatierte Luciferase in Oxyluciferin umgesetzt und das bei der Reaktion emittierte Licht im Luminometer als relative Lichteinheiten pro Stunde (RLUs) gemessen.

2.5.13 Slicer-Assay

Beim sogenannten *Slicer*-Assay in BYL handelt es sich um eine Methode zur Untersuchung der endonukleolytischen Aktivität von AGOs im Kontext der RNAi. Dabei wird der zweite

Schritt des RNAi-Mechanismus nachgebildet, der die Inkorporation einer siRNA in ein AGO-Protein, die Bildung des RISC sowie die anschließende spezifische Spaltung einer komplementären Target-RNA umfasst. Die endonukleolytische Aktivität, häufig als „Slicer-Aktivität“ bezeichnet, beschreibt die Fähigkeit von AGO-Proteinen, eine Target-RNA an einer definierten Position zu schneiden. Für den Assay wird zunächst *in vitro* ein Komplex aus AGO und einer synthetischen siRNA assembliert. Dieser Komplex wird anschließend mit einer komplementären, radioaktiv markierten Target-RNA inkubiert. Im Falle einer erfolgreichen Spaltung erfolgt der Schnitt typischerweise zwischen den Nukleotiden 10 und 11 der Target-RNA, ausgehend vom 5'-Ende des *guide*-Strangs der siRNA (148). Die Reaktionsprodukte werden durch Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Visualisierung der RNA-Fragmente erfolgt mittels Autoradiographie. Der Nachweis klarer Schnittprodukte in Form eines charakteristischen Fragmentmusters gilt als Nachweis für die *Slicer*-Aktivität (146).

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die *in-vitro*-Translation ist Tabelle 14 zu entnehmen. Dem Reaktionsgemisch wurde zusätzlich eine synthetische siRNA in einer Endkonzentration von 0,1 μ M zugesetzt, welche vollständig komplementär zur verwendeten Target-RNA war. Zur ausreichenden Translation der Ago-mRNA wurde der Ansatz 2,5 h bei 21 °C inkubiert. Daraufhin wurden 2 μ g einer Kompetitor-RNA (Luciferase-mRNA) und 50 fmol einer radioaktiv markierten Target-RNA (s. 2.3.2.2) zugegeben und der Ansatz zur Spaltung der Target-RNA für 15 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung der RNA wie in Abschnitt 2.5.10 beschrieben. Aufgrund der Größe der Target-RNA (CMV-RNA 2, 3 kb) erfolgte die Auftrennung der RNA-Proben mithilfe eines 1,5%igen, denaturierenden Agarosegels (s. 2.3.2.6). Die RNA-Probe wurden mittels Autoradiographie (s. 2.3.2.8) detektiert. Aufgrund der Dicke des Agarosegels musste dieses allerdings vorgetrocknet werden. Dafür wurde das Gel auf eine Frischhaltefolie gelegt und mit einem DE81-Chromatographie- und einem *Whatman*-Papier bedeckt. Darauf wurden mehrere Schichten Zellstoff positioniert und das Gel unter Einwirkung von Gewicht für mindestens 3 h bei Raumtemperatur getrocknet.

2.5.14 DCL-*Slicer*-Assay

Der DCL-*Slicer*-Assay stellt die beiden Hauptschritte der RNAi nach. Dabei wird der Effekt der Prozessierung von dsRNA durch DCL und die Spaltung von Target-RNA durch AGO kombiniert. Im Gegensatz zum *Slicer*-Assay wird dem Reaktionsansatz keine spezifische siRNA zugegeben, sondern eine dsRNA, welche durch DCL in einen Pool aus 21-24 nt langen sRNAs gespalten wird (63).

Im Kontext der Arbeit wurde die edsRNA, entweder *in vitro* oder im Modellorganismus *S. cerevisiae* transkribiert, als Substrat und die genomische RNA 2 des *Cucumber mosaic virus* (CMV) als Target-RNA verwendet. Für *in vitro* transkribierte RNA wurden 25-350 ng und für *in vivo* transkribierte RNA das maximal mögliche Volumen eingesetzt. Die Zusammensetzung der Reaktion und der Reaktionsablauf sind Tabelle 14 und Abschnitt 2.5.13 zu entnehmen.

2.5.15 Hitzeinaktivierung

Damit GMOs in die Umwelt eingebracht werden dürfen, muss zunächst sichergestellt werden, dass sie nicht mehr lebensfähig sind. Dazu können unterschiedliche Methoden, wie bspw. der Zellaufschluss mit anschließender Isolation des Materials von Interesse, UV-Bestrahlung oder Hitzebehandlung verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hitzebehandlung zur Inaktivierung der Hefezellen gewählt. Die zu inaktivierende Hefesuspension wurde für 5 min bei 4000 g pelletiert und das Pellet anschließend in einem Heizblock für 10 min bei 70 °C inkubiert. Daraufhin wurde erneut für 1 min bei 16060 g zentrifugiert und das Pellet für weitere Experimente bei - 20 °C gelagert.

2.5.16 Probenvorbereitung des *in-vivo*-Experiments

Die Auswirkung der Fütterung von (e)dsRNA-produzierenden *S. cerevisiae* auf die Vitalität des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata*, CPB) wurde im Rahmen von *in-vivo*-Experimenten untersucht. Die Hefe diente als Expressionsorganismus für spezifische dsRNA-Konstrukte: edsRNA gegen *PSMB5*, Luciferase-dsRNA (Negativkontrolle), dsRNA abgeleitet vom kommerziellen Produkt *Calantha*[™] (Positivkontrolle), pYES-Leervektor als weitere Kontrolle.

Zur Vorbereitung wurden 5 ml ScD-Ura-Medium und entsprechendem Selektionsmarker (s. Tabelle 1) mit jeweils einer ausgewählten Kolonie inokuliert und für 24 h bei 30 °C und 200 rpm (Digital Orbital Shaker, VWR) inkubiert. Daraufhin wurde die OD₆₀₀ mittels eines UV-Vis-Photometers (GEN10S, Thermo Scientific) gemessen. Die Hauptkultur wurde anschließend durch die Zugabe von 2 ml der Vorkultur in 250 ml SM-Medium (s. Tabelle 1) hergestellt und weitere 28 h unter denselben Temperatur- und Schüttelbedingungen (TR-250, Infors HT) inkubiert. Nach der Kultivierung wurden für jedes dsRNA-Konstrukt jeweils drei Aliquots zu je 125 OD-Einheiten durch Zentrifugation bei 4000 g und 22 °C für 5 min geerntet. Die resultierenden Pellets wurden in 1 ml Medium gewaschen, in Eppendorfgefäße überführt und erneut denselben Zentrifugationsbedingungen unterzogen. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet durch Hitze inaktiviert (s. 2.5.15). Schließlich wurden die Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und je 125 OD-Einheiten in 300 µl RNase-freiem

Wasser resuspendiert. Die Hefesuspensionen wurden zunächst bei - 20 °C gelagert. Zusätzlich wurde die Menge der (e)dsRNA für jedes Konstrukt mittels qPCR bestimmt (s. 2.3.2.16).

Drei Tage vor Abreise von M.Sc. Juliane Schulz wurden die Hefesuspensionen auf Eis aufgetaut. Für das Vergleichsexperiment zwischen den (e)dsRNAs wurde die dsRNA-enthaltende Hefe bei Bedarf mit Hefe des Leervektor-Konstrukts gemischt. Zudem erfolgte für alle Proben eine 1:10-Verdünnung der Suspensionen in RNase-freiem-Wasser. Für das Experiment mit maximal möglicher dsRNA-Menge wurden die Hefesuspensionen ausschließlich 1:10 verdünnt. Alle Hefesuspensionen wurden anschließend erneut schockgefroren und bis zur Abreise bei - 80 °C gelagert.

2.5.17 Applikation dsRNA-transkribierender Hefe

Zur Überprüfung der Wirksamkeit der transkribierten (e)dsRNA wurde ein Experiment mit dem Kartoffelkäfer durchgeführt, das in zwei Teile gegliedert war. Der erste Teil des Experiments diente dem Vergleich zwischen einer zielgerichtet multivalenten edsRNA und einer bereits zugelassenen dsRNA (Ledprona, Produktname Calantha™, GreenLight Biosciences), während im zweiten Teil die maximal mögliche Menge an dsRNA getestet wurde.

Für die Durchführung der Versuche wurde die Kartoffelpflanze der Sorte „Maxi“ verwendet. Vor der Applikation der Hefesuspension auf eine ausgestanzte Blattscheibe eines Kartoffelpflanzenblatts wurde dieses in eine 1%ige Triton X-100-Lösung getaucht, um die Oberflächenspannung herabzusetzen. Anschließend wurden die Blätter für 15-30 min an der Luft getrocknet. Danach erfolgte die Applikation der Hefesuspension auf die vorbehandelten Blattstücke. Nach einer weiteren Trocknungsphase von 15-20 min wurden Larven des CPB im zweiten Larvenstadium, die etwa seit 4 h vor Versuchsbeginn hungerten, mit diesen gefüttert. Diese Maßnahme diente dazu, den Fressanreiz zu erhöhen und eine rasche Aufnahme des behandelten Blattmaterials zu gewährleisten. Insgesamt wurde jede Kartoffelkäferlarve an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit einem ausgestanzten Teilstück eines Kartoffelpflanzenblatts gefüttert, das zuvor mit der entsprechenden Hefesuspension behandelt worden war. Das Applikationsvolumen betrug am ersten Tag 15 µl (Blattdurchmesser 1 cm) und an den folgenden beiden Tagen 40 µl (Blattdurchmesser 1,5 cm). Pro Konstrukt wurden 20 Tiere für genotypische Analysen und 20 Tiere für phänotypische Untersuchungen eingesetzt. Eine Ausnahme stellte der Versuch mit dem Einsatz der maximal möglichen dsRNA Massenkonzentration dar, bei dem 25 Tiere für die phänotypische Analyse verwendet wurden. Die für die genotypische Analyse bestimmten Käfer wurden nach dem dritten Tag eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt untersucht. Dieses Experimente wurden durch M.Sc. Juliane Schulz durchgeführt.

3 Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung erwähnt (s. 1.2.3), wurde in der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Biotechnologie“ ein *screening*-Verfahren zur *in-vitro*-Identifizierung hochwirksamer siRNAs entwickelt. Diese besonders wirksamen Moleküle werden als effiziente siRNAs (*esiRNAs*) bezeichnet. Bereits vor Beginn der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Experimente zur Identifizierung von *esiRNAs* gegen unterschiedliche Viren und Organismen durchgeführt. Darauf aufbauend wurde ein weiterer Ansatz entwickelt, bei dem in einem multivalenten Design eine effiziente doppelsträngige RNA (*edsRNA*) konstruiert wurde, die mehrere dieser *esiRNAs* in 5'-3'-Anordnung kombiniert. Infolgedessen konnte ein ausgeprägter Schutz von 80-100 % bei *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen (*N.b.*) erzielt werden, die mit dem *Cucumber mosaic virus* (*CMV*) infiziert und simultan mit einer *edsRNA* behandelt worden waren (67). Da *esiRNAs* und *edsRNAs* bislang ausschließlich durch aufwendige und kostenintensive Syntheseverfahren hergestellt wurden, verfolgte die vorliegende Arbeit das Ziel, ein effizientes und skalierbares Produktionssystem für *edsRNAs* im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* zu etablieren. Dieses System soll die Grundlage für die Bereitstellung größerer Mengen *edsRNA* bilden, um deren potenzielle Anwendung in Form von inaktivierter Hefe in der biologischen Schädlingsbekämpfung zu ermöglichen. Außerdem sollte die Möglichkeit einer Coexpression der *edsRNA* und des Pflanzengens *DCL4* (und gegebenenfalls des Gens seines potenziellen Cofaktor-Proteins *DRB4*) zur sofortigen Prozessierung der *edsRNA* in *esiRNAs* in der Hefe untersucht werden.

3.1 Generierung von RNAi-Komponenten in *S. cerevisiae*

3.1.1 Klonierung der codierenden Sequenz der Pflanzengene *DCL4* und *DRB4* in Hefektoren

Da das Ziel der vorliegenden Arbeit die Verwendung des Modellorganismus *S. cerevisiae* einschloss, wurden zunächst Klonierungen in einen geeigneten Hefektor (pYES) vorgenommen. Aufgrund der Tatsache, dass die beiden oben genannten Proteine pflanzlichen Ursprungs sind und eine maximale Translationsrate in *S. cerevisiae* angestrebt wurde, wurden Codon-optimierte Varianten für die Expression der Gene in *S. cerevisiae* durch GenScript Biotech synthetisiert. Die Codon-optimierten Gene wurden durch GenScript Biotech in den Standardvektor pUC57 mit geeigneten Restriktionsschnittstellen kloniert und enthalten zur späteren Detektion des Proteins *upstream* vom Startcodon entweder die codierende Sequenz für einen FLAG-*tag* (*DCL4*) oder einen HA-*tag* (*DRB4*). Die beiden Restriktionsenzyme KpnI und NotI wurden für die Klonierung in das Hefeplasmid verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte für *DCL4* und das Hefeplasmid pYES sequenziell, für *DRB4* hingegen simultan von einem PCR-Produkt, bei welchem die verwendeten Primer die Erkennungssequenzen der

Restriktionsenzyme beinhalten. Das Plasmid mit dem Codon-optimierten *DCL4* wurde zunächst mit KpnI linearisiert, anschließend aufgereinigt und daraufhin mit NotI umgesetzt. Danach erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung des Restriktionsverdaus in einem 1%igen Agarosegel. Das Produkt mit der erwarteten Größe wurde ausgeschnitten und die DNA gereinigt. Die Vorbereitung des Hefeplasמידs pYES erfolgte in gleicher Weise, allerdings wurde die Reihenfolge der Restriktionsenzyme umgekehrt. Zusätzlich wurde das Hefeplasמיד nach dem zweiten Restriktionsverdaus mit alkalischer Phosphatase inkubiert, um eine mögliche Religation zu verhindern. Nachdem alle Restriktionsverdaus und Reinigungen abgeschlossen waren, wurden die Codon-optimierten Gene mit dem Hefeplasמיד ligiert und anschließend in *E. coli* (Stellar-Zellen) transformiert. Nach Überprüfung ausgewählter Kolonien mittels Kolonie-PCR und Testverdaus wurde der Erfolg der Klonierung durch eine anschließende Sequenzierung bestätigt.

3.1.2 Heterologe Genexpression von *DCL4* und *DRB4* sowie Aktivitätsnachweis *in vitro*

Nach der erfolgreichen Generierung der Plasmide wurden die Codon-optimierten Gene in *S. cerevisiae* exprimiert. Dafür wurde der auxotrophe Hefestamm CEN.PK2-1C zunächst jeweils mit einem der beiden Plasmide transformiert. Nach der Selektion erfolgreich transformierter Kolonien wurden die Gene unter dem induzierbaren Galaktosepromotor GAL1 für acht Stunden exprimiert. Anschließend wurden 50 OD-Einheiten geerntet, mittels Ultraschall aufgeschlossen (s. 2.5.6) und das Expressionsprodukt mit Westernblot analysiert (**Abbildung 5A**). Da es sich bei der Probe nur um einen Rohextrakt handelt, sind neben dem jeweiligen Expressionsprodukt (*DCL4* 181 kDa, *DRB4* 58 kDa) noch weitere Banden zu erkennen. Diese können endogene Hefeproteine, welche durch unspezifische Antikörperbindung markiert werden, oder aber Abbauprodukte des Zielproteins darstellen.

Nachdem die heterologe Expression der pflanzlichen Gene in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden konnte, wurde die Aktivität des *DCL4* analysiert. In der Arbeitsgruppe wurde bereits ein Assay zum Nachweis der DCL-Aktivität unter Zuhilfenahme des Pflanzenextraktes BYL etabliert. BYL ist ein entvakuolisierter, cytoplasmatischer Pflanzenextrakt aus *Nicotiana tabacum* BY-2-Protoplasten, der sowohl DCL- als auch RISC-Aktivität besitzt und zudem die Durchführung von *in-vitro*-Translationen ermöglicht (63). Im Assay wird dsRNA durch endogene DCL-Aktivität im Pflanzenextrakt in sRNAs prozessiert (**Abbildung 5B**). Zur Analyse der *DCL4*-Aktivität im Hefe-Rohextrakt wurde dasselbe Prinzip angewendet, allerdings wurde anstelle des BYLs der Hefe-Rohextrakt in den Assay eingesetzt. Zur Detektion der prozessierten sRNAs wurde eine radioaktiv markierte, perfekt basengepaarte dsRNA (CMV-RNA 2) als Substrat für das *DCL4* eingesetzt. Während das BYL alle DCL-Enzyme enthält und somit auch sRNAs mit einer Länge von 21-24 nt generiert werden können

(146), liegt im Hefeextrakt lediglich DCL4 vor, welches hauptsächlich sRNAs mit einer Länge von 21 nt generiert (149). Anhand **Abbildung 5C** ist zu erkennen, dass das DCL4 eine eindeutige Spaltung des Substrats in 21 nt lange sRNAs zeigte und somit im Hefe-Rohextrakt aktiv war. Um eine möglicherweise effizientere Prozessierung des Substrats zu erhalten, wurde das in der Literatur beschriebene Cofaktor-Protein DRB4 ebenfalls heterolog in *S. cerevisiae* generiert und der Einfluss auf die DCL4-Aktivität durch Mischung der beiden Hefe-Rohextrakte in einem Volumenverhältnis von 1:1 analysiert. Hierbei wurden Indikationen erhalten, dass eine leichte Verbesserung der Spaltaktivität (annähernd gleiche Intensität der 21 nt-Bande bei halbiertem Enzymmenge) in Präsenz von DRB4 vorlag (**Abbildung 29**, im Anhang gezeigt). Schlussendlich konnte somit der erste Schritt des RNAi-Prozesses erfolgreich in dem Modellorganismus *S. cerevisiae* rekonstruiert werden.

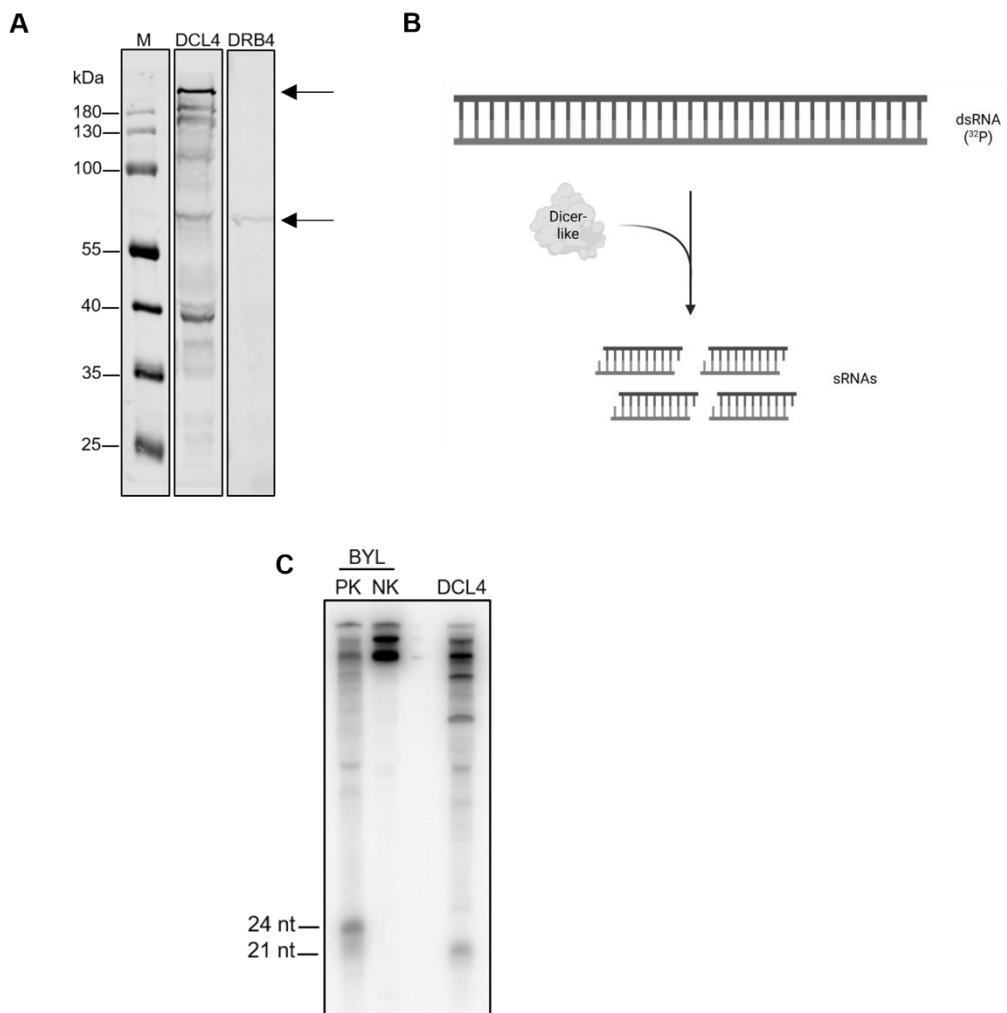


Abbildung 5: Nachweis der DCL4-Aktivität im *S. cerevisiae*-Rohextrakt

(A) Nachweis der generierten Proteine FLAG-DCL4 (181 kDa) und HA-DRB4 (58 kDa) in *S. cerevisiae* mittels Western Blot unter Verwendung eines *tag*-spezifischen primären Antikörpers und sekundären Antikörpers, der mit einem nahinfraroten Fluorophor IRDye® 800CW konjugiert ist. Als Marker (M) wurden 3 µl *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) verwendet. Die Auftrennung der

Proben erfolgte in einem 10%igen SDS-Gel mittels PAGE. **(B)** Darstellung der Prozessierung von dsRNA in sRNAs durch *Dicer-like*-Enzyme. **(C)** Radioaktiv markierte CMV dsRNA 2 wurde durch endogene DCL-Enzyme in BYL (PK) oder durch heterolog exprimiertes *DCL4* im *S. cerevisiae*-Rohextrakt in 21-24 nt lange sRNAs prozessiert. BYL, welchem erst nach Inaktivierung der Proteine durch Proteinase K die radioaktiv markierte dsRNA zugegeben wurde, diente als Negativkontrolle (NK). Die Auftrennung erfolgte in einem 12,5%igen Harnstoff-Polyacrylamid-Gel.

3.2 Herstellung effizienter doppelsträngiger RNA (edsRNA)

3.2.1 Design der Modell-edsRNA-Konstrukte

Wie bereits erwähnt, beruht das Prinzip dieser Arbeit auf der *in vivo*-Generierung von edsRNA. Da zu Beginn der Untersuchungen lediglich eine Modell-edsRNA gegen das *Cucumber mosaic virus* (CMV) vorlag, die bereits einen ausgeprägten Schutz vor viraler Infektion gezeigt hatte, wurden die initialen Experimente zur Systemetablierung mit dieser edsRNA durchgeführt (67). Die edsRNA bestand aus sechs zuvor mittels des *in-vitro*-screening-Verfahrens identifizierten esiRNAs (siR1172, siR1489, siR359, siR1020, siR2041 und siR380) sowie zwei sogenannten pseudo-siRNAs (pseudo-siRNA 1 und 2) mit einer jeweiligen Länge von 21 nt. Jeweils drei der ausgewählten esiRNAs waren gezielt für eine bevorzugte Bindung an *NbAGO1* (siR1172, siR1489, siR359) bzw. *NbAGO2* (siR1020, siR2041, siR380) identifiziert worden. Die pseudo-siRNAs stellen künstliche Sequenzen dar, die keine regulatorische Funktion im Sinne einer klassischen siRNA besitzen. Sie enthielten jedoch einen modifizierten T7-RNA-Polymerase-Promotor zur effizienten Transkription und fungierten gleichzeitig als strukturelles Element zur Aufrechterhaltung des für die DCL-vermittelte Prozessierung erforderlichen Rasters. Basierend auf den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften wurde nämlich erwartet, dass die edsRNA in einem festen 21-Nukleotid-Raster prozessiert wird, was als *phased processing* bezeichnet wird (136,150).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Transkription der edsRNA durch unterschiedliche Polymerasen, abhängig vom jeweiligen Promotor, erfolgen. Zur Verifizierung des Prinzips *in vitro* beinhaltet eines der Konstrukte einen T7-Promotor und für die Transkription der edsRNA *in vivo* wurde zunächst ein RNA-Polymerase II-spezifischer Promotor (GAL1) gewählt. Aus diesem Grund hat Dr. Selma Gago-Zachert das ursprüngliche CMV2-edsRNA-Konstrukt von Dr. Marie Knoblich für eine optimale Expression in *S. cerevisiae* angepasst (**Abbildung 6**) (67). Für das korrekte *phased processing* der edsRNA in die einzelnen esiRNAs musste gewährleistet werden, dass die Enden der edsRNA genau definiert sind. Dies bedeutet, dass der Transkriptionsstart und die -termination immer mit demselben Nukleotid beginnen bzw. enden sollten, um eine Verschiebung des Rasters der Prozessierung durch DCL4 möglichst zu vermeiden. Zwar beginnt das Transkript der T7-Polymerase immer mit zwei aufeinanderfolgenden Guanosin-Nukleotiden, sodass der Transkriptionsstart definiert ist,

allerdings variiert die Transkriptionstermination. Im Fall der endogenen RNA-Polymerase II (RNA-Pol II) sind sowohl der Transkriptionsstart als auch die -termination nicht exakt definiert. Daher wurden für die RNA-Pol II-vermittelte Transkription sogenannte Ribozyme *upstream* (*Hammerhead*-Ribozym) und *downstream* (Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym) von der edsRNA-Sequenz positioniert, um die authentischen Termini erzeugen zu können. Die pseudo-siRNAs des RNA-Polymerase II-Konstrukts wiesen keine Nukleotidsequenz des Promotors auf und erfüllten ausschließlich eine strukturelle Funktion zur Sicherstellung eines korrekten Prozessierasters. Hier beinhaltet die pseudo-siRNA dazu einen Abschnitt des *Hammerhead*-Ribozymes. Die Transkription mithilfe der T7-Polymerase erforderte lediglich die Positionierung einer Ribozymsequenz *downstream* (Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym) der edsRNA-Sequenz.

Ein Ribozym ist ein katalytisch aktives RNA-Molekül, welches sich cotranskriptionell faltet und bei Erreichen seiner Struktur an einer definierten Stelle abspaltet (151). Im Rahmen dieser Arbeit wurden eines der am besten charakterisierten Ribozyme, das *Hammerhead*-Ribozym (HH_{rz}), und ein Ribozym viralen Ursprungs, das Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym (HDV_{rz}), verwendet. Zwar ermöglichen Ribozyme durch Selbstabspaltung die Bildung authentischer Termini im Hinblick auf die Nukleotidsequenz, jedoch weisen diese Enden nicht die charakteristischen chemischen Eigenschaften, ein 5'-Phosphat und eine 3'-Hydroxylgruppe, auf. Da die durch DCL-Enzyme generierten Produkte (siRNAs und miRNAs) ein 5'-Phosphat sowie eine 3'-Hydroxylgruppe besitzen, liegt nämlich die Annahme nahe, dass diese chemischen Eigenschaften auch für das jeweilige Substrat (dsRNA) eine entscheidende Rolle für die effiziente Prozessierung spielen. (20). Stattdessen blieben nach Abspaltung ein 5'-OH und ein 2',3'-cyclisches Phosphat zurück (152). Ob diese Strukturen vom DCL-Protein als Substrat während der Prozessierung erkannt werden und eine effiziente Spaltung der edsRNA in einzelne esiRNAs erfolgt, war zu Beginn der Arbeit noch unklar. (s. 3.2.2).

Die in dieser Arbeit verwendeten edsRNA-Plasmide wurden durch BioCAT GmbH synthetisiert und anschließend im Rahmen einer Bachelorarbeit von Lea Meschke in die Hefevektoren pYES, pGREG503 und pGREG504 kloniert (153). Insgesamt wurden zwei Varianten des Konstrukts für die T7-Polymerase-vermittelte edsRNA-Generierung analysiert. Das eine Konstrukt (**Abbildung 6A**) enthält in 5'-3'-Orientierung folgende Elemente: einen T7-Promotor, die edsRNA-Sequenz, eine *Spacer*-Sequenz (Actin-Intron) sowie eine zweite edsRNA-Sequenz, die zur ersten Sequenz revers komplementär ist. Diese Anordnung ermöglicht die Ausbildung eines Haarnadeltranskripts mit einer Gesamtlänge von 147 nt. Die zweite Variante des T7-Konstrukts umfasst zwei T7-Promotoren, an die jeweils in 3'-Richtung die edsRNA-Sequenz anschließt. Die edsRNA-Sequenz hinter dem zweiten T7-Promotor ist dabei allerdings revers komplementär zur ersten edsRNA-Sequenz. Durch die getrennte

Transkription entstehen zwei komplementäre Einzelstränge, die sich anschließend spontan zu einer edsRNA mit einer Länge von 147 nt hybridisieren (**Abbildung 6B**).

Für die Generierung der edsRNA *in vivo* (in *S. cerevisiae*) wurde nur eine Variante des Konstrukts erstellt (**Abbildung 6C**). Dabei liegt ein RNA-Polymerase II-spezifischer Promotor (GAL1) vor und die edsRNA-Sequenz wird durch ein Actin-Intron getrennt. Nach erfolgreicher Transkription sollte die Intronsequenz in der Hefe erkannt und gespleißt werden, sodass schlussendlich eine Haarnadel-edsRNA mit einem *Tetra*loop und einer Größe von 147 nt zurückbleibt. Im Zuge der Arbeit wurde das RNA-Pol II-Konstrukt noch hinsichtlich seiner verwendeten Promotoren modifiziert. Dabei entstanden die Varianten mit einem TEF1-Promotor (Translations-Elongationsfaktor) und einem TDH3-Promotor (Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase). Dies wurde durch Amplifikation der jeweiligen Promotorregion mit geeigneten Restriktionsschnittstellen (SpeI und HindIII) aus Wildtyp-Hefezellen (CEN.PK2-1C) und anschließendem Austausch des GAL1-Promotors erreicht.

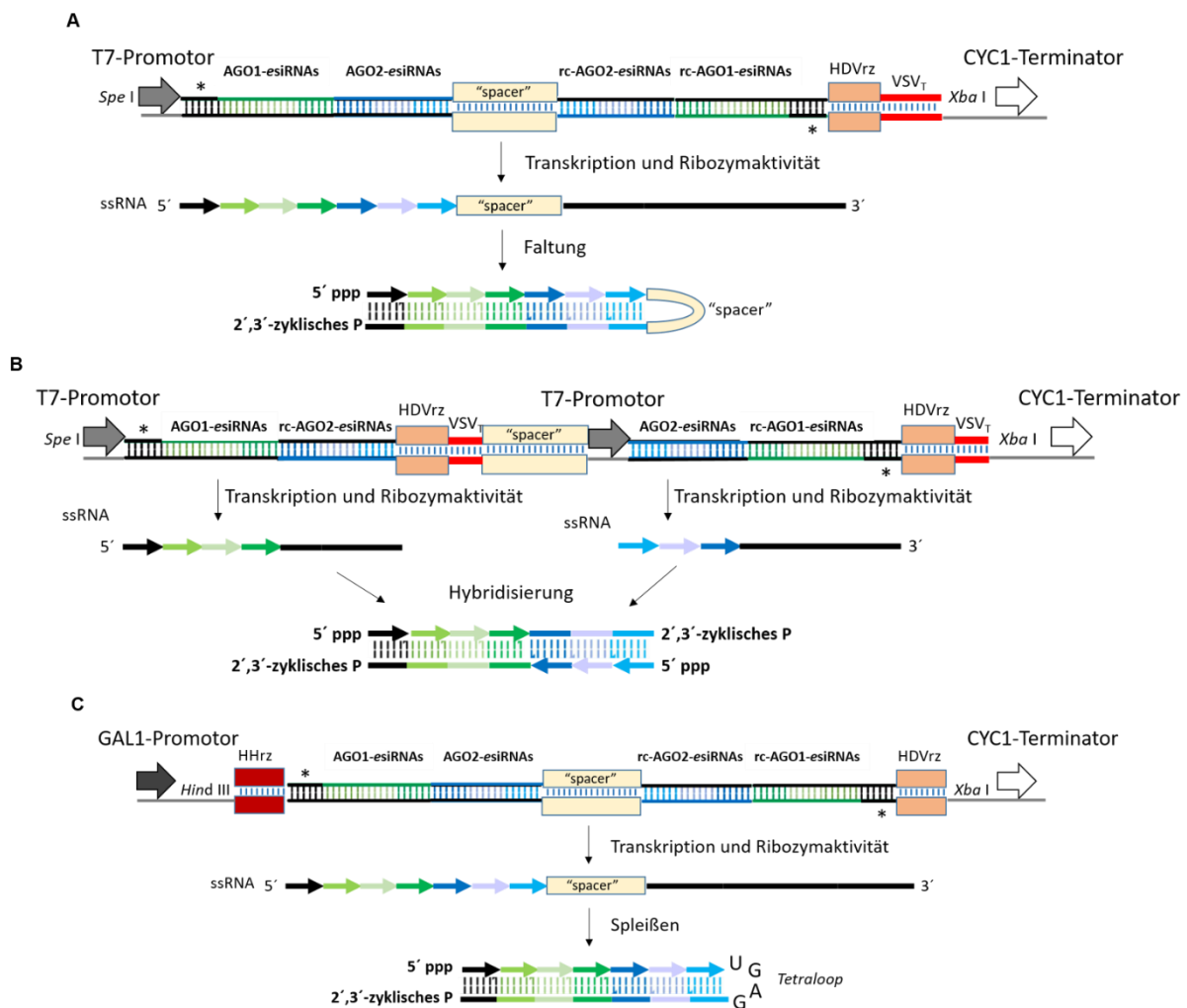


Abbildung 6: Design der CMV2-edsRNA-Konstrukte

Aufbau verschiedener Varianten der Konstrukte zur Generierung der edsRNA. **(A)** edsRNA-Konstrukt 7.1 besitzt folgende Elemente in 5'-3'-Orientierung: T7-Promotor - Strang mit der edsRNA-Sequenz,

welche die pseudo-siRNA und die sechs esiRNAs enthält - *spacer* (Actin-Intron) - komplementärer Strang mit der edsRNA-Sequenz, sodass sich nach erfolgreicher Transkription eine Haarnadel ausbildet. Zudem liegen am 3'-Ende noch eine Sequenz für das Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym (HDV_{rz}) und zwei Terminatoren (*Vesicular Stomatitis Virus*, VSV und *Iso-1-cytochrome c*, CYC1) vor. **(B)** Das Konstrukt 7.2 setzt sich aus zwei Abfolgen der nachfolgend aufgeführten Elemente in 5'-3'-Orientierung zusammen: T7-Promotor - edsRNA-Sequenz - Sequenz für das Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym (HDV_{rz}) - Sequenz für einen Terminator (*Vesicular Stomatitis Virus*, VSV). Die zweite edsRNA-Sequenz ist revers komplementär zur ersten edsRNA-Sequenz angeordnet. Nach der Transkription dieser beiden Einzelstränge sollte sich eine edsRNA durch spontane Hybridisierung der Einzelstränge ausbilden. **(C)** Das Konstrukt 2.1 wird durch die RNA-Polymerase II generiert und ist prinzipiell wie das Konstrukt 7.1 **(A)** aufgebaut. Allerdings befindet sich *upstream* der 5'-pseudo-siRNA-Sequenz zusätzlich noch ein *Hammerhead*-Ribozym (HH_{rz}). Die edsRNA-Sequenzen sind durch ein Actin-Intron getrennt. Der Stern (*) kennzeichnet die pseudo-siRNA (Abbildung modifiziert nach Dr. Selma Gago-Zachert).

3.2.2 *Proof-of-concept* des Designs der edsRNA-Konstrukte durch T7-Transkription und Nachweis einer Prozessierung und Aktivität *in vitro*

Nach erfolgreicher Klonierung der Konstrukte in episomale Hefevektoren durch Lea Meschke sollte die Funktionsweise der Transkription der edsRNA mit den modifizierten Konstrukten nachgewiesen werden. Dafür wurden sowohl das T7-Haarnadel-Transkript (Abbildung 6A, im weiteren Verlauf als 7.1 bezeichnet) als auch das edsRNA-Konstrukt, welches durch spontane Hybridisierung der jeweiligen Einzelstränge ausgebildet wird (Abbildung 6B, im weiteren Verlauf als 7.2 bezeichnet) durch eine *in-vitro*-Transkription generiert (s. 2.3.2.1). Das von Konstrukt 7.1 generierte und Ribozym-gespaltene Transkript weist eine theoretische Länge von ca. 600 nt auf, wohingegen die *in-vitro*-Transkription des Konstrukts 7.2 in einem Transkript mit einer theoretischen Länge von 147 nt resultiert. Anhand der Analyse der *in-vitro*-Transkripte ist eindeutig zu erkennen, dass nicht nur ein einziges Transkript mit der erwarteten Länge generiert wurde (**Abbildung 7**). Dies bedeutet, dass die Ribozyme keine einhundertprozentige Aktivität aufweisen und infolgedessen auch keine homogene Transkriptspezies vorliegt, sondern viele verschiedene Varianten der edsRNA in unterschiedlichen Mengen. Bei genauer Betrachtung der Abbildung fällt allerdings auf, dass schätzungsweise mindestens die Hälfte der generierten Transkripte dem Transkript von Interesse, also der korrekt Ribozym-prozessierten edsRNA, entsprechen (**Abbildung 7**, Stern). Die Funktionalität der Ribozyme lässt sich vor allem an der Bande für das Ribozym (unterste Bande) erkennen, da diese nur vorliegen kann, wenn zugleich auch das erwartete Transkript generiert wird.

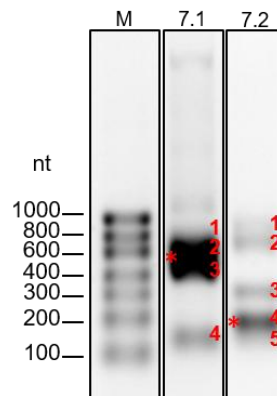


Abbildung 7: *In-vitro*-Transkription der edsRNA-Konstrukte 7.1 und 7.2

Darstellung der Transkripte der edsRNA-Modell-Konstrukte 7.1 und 7.2 nach *in-vitro*-Transkription mit T7-RNA-Polymerase. Das Haarnadel-Konstrukt (7.1) weist vier verschiedene Banden auf, die als relevant eingestuft wurden. Das Konstrukt, welches zwei einzelsträngige RNAs generiert, die die edsRNA durch spontane Hybridisierung ausbilden (7.2), zeigt fünf unterschiedliche Banden. Die einzelnen Transkripte wurden folgendermaßen interpretiert: 7.1) 1. Transkript bis zum Terminator oder *run-off*-Transkript (740 nt oder länger), 2. denaturierte Haarnadel-RNA bis zum Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym (600 nt), 3. native Haarnadel-RNA bis zum Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym (600 nt), 4. Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym bis zum Terminator (120 nt); 7.2) 1. Vom ersten T7-Promotor ausgehendes Transkript bis zum zweiten Terminator oder *run-off*-Transkript (940 nt oder länger), 2. Vom ersten T7-Promotor ausgehendes Transkript bis zum zweiten Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym (780 nt), 3. Transkript bis zum jeweils ersten Terminator (290 nt), 4. Transkript bis zum jeweils ersten Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym (147 nt), 5. Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym bis zum Terminator (120 nt). Die Proben wurden in einem 1,5%igen denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und es wurden 2 µl *RiboRuler Low Range* als Marker (M) für die Zuordnung der Banden verwendet.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass *in vitro* zumindest teilweise korrekt durch Ribozym-Prozessierung gebildete edsRNA vorlag, wurde ein anschließender DCL-*Slicer*-Assay durchgeführt, um deren Funktionalität zu überprüfen (**Abbildung 8**). Der Assay sollte Aufschluss darüber geben, ob die durch das Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym generierte Struktur des 3'-Endes der edsRNA, ein zyklisches Phosphat, einen Einfluss auf die Aktivität der DCLs hat.

Der DCL-*Slicer*-Assay stellt ein kombiniertes *in-vitro*-Verfahren in BYL dar, das die beiden zentralen Schritte der RNAi, die Prozessierung von dsRNA durch DCLs sowie die anschließende Spaltung komplementärer Target-RNA durch AGOs, experimentell nachbildet. Im Unterschied zum klassischen *Slicer*-Assay, bei dem dem Reaktionsansatz eine definierte synthetische siRNA zugegeben wird, basiert der DCL-*Slicer*-Assay auf der *de-novo*-Erzeugung des siRNA-Pools durch DCLs aus einem dsRNA-Substrat. Während der Prozessierung der dsRNA durch DCLs findet im BYL-System gleichzeitig die *in-vitro*-Translation des AGOs statt, wodurch eine direkte Kopplung beider RNAi-Schritte ermöglicht wird (63). Im Rahmen dieser

Arbeit wurden sowohl *N. benthamiana* AGO1 als auch AGO2 verwendet, da jeweils drei der funktionellen esiRNAs, die durch die DCL-vermittelte Prozessierung der edsRNA generiert werden sollten, charakteristische biochemische Eigenschaften aufwiesen, die eine spezifische Assoziation mit einem der beiden AGO-Proteine nahelegten. Dabei ist bekannt, dass AGO1 in Pflanzen bevorzugt sRNAs mit einem 5'-Uridin bindet, während AGO2 eine Präferenz für sRNAs mit einem 5'-Adenin zeigt. Diese unterschiedliche 5'-Nukleotid-Präferenz spielt eine entscheidende Rolle für die selektive Beladung der Argonaute-Proteine (65). Nach ausreichender Inkubationszeit und erfolgreicher Programmierung des RISCs wurde dem Reaktionsansatz ^{32}P -markierte Target-RNA (CMV RNA 2) zugesetzt. Die entstehenden Spaltprodukte wurden anschließend durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert (**Abbildung 8A**). Anhand **Abbildung 8B** ist zu erkennen, dass sowohl das Gemisch der Transkripte ausgehend von Konstrukt 7.1 als auch das von Konstrukt 7.2 zu einer vollständigen Spaltung der Target-RNA führten. Bei der Verwendung von *N. benthamiana* AGO2 (*NbAGO2*) ähnelte das Spaltmuster der Target-RNA mit den Transkripten des Konstruktes 7.2 eher der Positivkontrolle (*in vitro* transkribierte, perfekte edsRNA), als es bei Konstrukt 7.1 der Fall ist. Zur Herstellung der Positivkontrolle wurden zwei PCR-Templates mit je einem T7-Primer vom Plasmid p-dsbbCMV21nt generiert, sodass eine Transkription der jeweiligen Einzelstränge *in vitro* möglich war. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der Einzelstränge.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass unterschiedliche esiRNAs aus den Transkripten generiert wurden. Die zentrale Aussage des Experiments besteht jedoch darin, dass das 2',3'-zyklische Phosphat am 3'-Ende des Transkripts offenbar keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der DCL-Proteine hat.

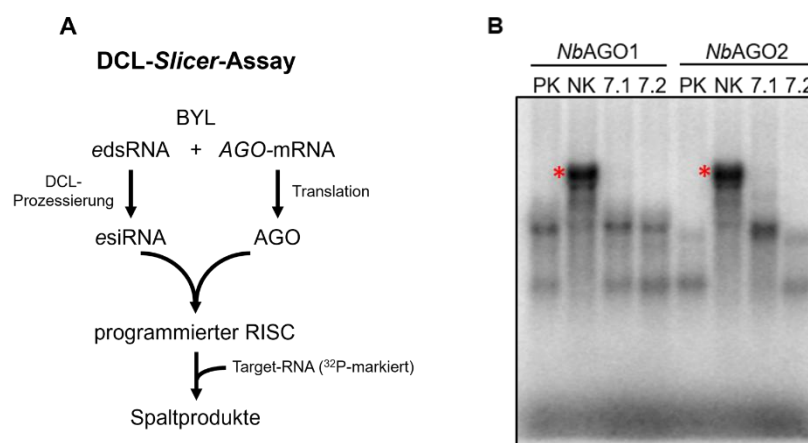


Abbildung 8: DCL-Slicer-Assay mit *in vitro* transkribierten Konstrukten 7.1 und 7.2

(A) Schematische Darstellung des DCL-Slicer-Assays (detaillierte Beschreibung im Text). **(B)** Die Funktionalität der edsRNA-Konstrukte wurde sowohl mit *N. benthamiana* AGO1 als auch mit AGO2 überprüft. Dafür wurden 50 ng der Transkripte aus Abbildung 7 im DCL-Slicer-Assay verwendet. Als

Positivkontrolle (PK) dienten 50 ng einer perfekt doppelsträngigen, *in vitro* transkribierten edsRNA, welche die gleichen esiRNA-Sequenzen wie die Konstrukte 7.1 und 7.2 besitzt. Für die Negativkontrolle (NK) wurde keine edsRNA zugegeben. Die ungespaltene Target-RNA (CMV-RNA 2, ³²P-markiert) ist mit einem roten Stern markiert. Die Proben wurden in einem 1,75%igen denaturierenden Agarosegel aufgetrennt.

3.2.3 Verwendung unterschiedlicher RNA-Pol II-abhängiger Promotoren zur Transkription der edsRNA *in vivo*

Im zuvor beschriebenen Abschnitt konnte sowohl die Funktionalität der Transkription als auch die Prozessierung der Transkripte durch DCL-Proteine sowie die anschließende Rekonstitution des RISC nachgewiesen werden, die in der endonukleolytischen Spaltung einer radioaktiv markierten Target-RNA resultierte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das grundlegende Design der Konstrukte vermutlich keinen negativen Einfluss auf die Effizienz des RNAi-Mechanismus zu haben scheint. Inwieweit dies jedoch auch für die edsRNA gilt, die *in vivo* generiert wurde, soll in den folgenden Untersuchungen näher analysiert werden.

Wie bereits in Abschnitt 3.2.1 erwähnt, wurde für die Transkription der edsRNA in *S. cerevisiae* das Konstrukt mit einem RNA-Polymerase II-spezifischen Promotor (GAL1) verwendet. Dieser hat die Eigenschaft, dass er induzierbar ist. Das heißt, er ist nur dann aktiv, wenn ein entsprechender Induktor vorliegt. Der Gegensatz zu einem induzierbaren Promotor ist ein konstitutiver Promotor. Dieser ist permanent aktiv, sodass eine kontinuierliche Genexpression erfolgt. Da zu Beginn der Arbeit unklar war, wie sich das Produkt (dsRNA) auf die Physiologie der Hefezelle auswirkt, wurden zusätzliche edsRNA-Konstrukte unter einem konstitutiven Promotor generiert. Dazu wurde der GAL1-Promotor im edsRNA-Konstrukt durch einen TEF1-Promotor oder einen TDH3-Promotor ersetzt (s. 3.2.1). Diese drei in der vorliegenden Arbeit ausgewählten Promotoren gehören alle zu den stärksten RNA-Polymerase II-abhängigen Promotoren (154). Des Weiteren wurden sie bereits in diversen Publikationen zur Transkription von dsRNA in *S. cerevisiae* verwendet (128,129,131).

Ein wesentlicher Vorteil der konstitutiven Promotoren gegenüber dem induzierbaren GAL1-Promotor besteht darin, dass die Kohlenstoffquelle während des Wachstumsprozesses der Hefe und der Transkription der edsRNA gleichbleibend verwendet werden kann. Dadurch wird das Zellwachstum weniger stark beeinträchtigt als unter Einsatz des GAL1-Promotors, was eine effizientere Biomassebildung innerhalb kürzerer Zeiträume ermöglicht (s. **Abbildung 30**). Der GAL1-Promotor bietet jedoch den Vorteil, dass der Zeitpunkt der Transkriptionsinitiation präzise gesteuert werden kann.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die verwendeten Promotoren hinsichtlich der Menge der transkribierten edsRNA unterscheiden.

3.2.4 Transkription der edsRNA in *S. cerevisiae*

Um die verschiedenen Promotoren hinsichtlich der *in vivo* generierten Mengen an edsRNA vergleichen zu können, war zunächst die Auswahl einer geeigneten Nachweismethode erforderlich. Da aufgrund unzureichender Literaturangaben keine verlässlichen Aussagen über die zu erwartenden edsRNA-Konzentrationen getroffen werden konnten, wurde der Nachweis zunächst mittels silbergefärbter, denaturierender Polyacrylamid-Gele gewählt.

Zur Anreicherung und Analyse der edsRNA wurde zunächst die Gesamt-RNA aus 15 OD-Einheiten Hefezellen mittels Trizol-Extraktion in Kombination mit Chloroform isoliert. Verbliebene genomische DNA wurde anschließend enzymatisch durch Zugabe von DNase I entfernt. Da der Anteil der edsRNA im Vergleich zu endogenen ssRNAs sehr gering ist und letztere die edsRNA im Gel überdecken würden, erfolgte ein selektiver Verdau der ssRNAs durch Behandlung mit RNase A/T1 unter Hochsalzbedingungen ($> 0,3 \text{ M NaCl}$), unter denen dsRNA nicht gespalten wird. Anschließend wurde der Reaktionsansatz durch eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion gereinigt, und die verbleibende dsRNA durch Ethanol-Fällung isoliert. Die qualitative Analyse der angereicherten dsRNA erfolgte schließlich durch Auftragung auf ein denaturierendes Harnstoff-Polyacrylamid-Gel und anschließende Visualisierung mittels Silberfärbung.

Bevor jedoch die *in-vivo*-Transkripte analysiert werden konnten, musste zunächst das Detektionslimit und der Verlust an dsRNA während der Aufarbeitung der Proben analysiert werden. Um den Verlust durch die Reinigungsprozedur (s. 2.3.2.11) abschätzen zu können, wurde *in vitro* transkribierte, perfekt doppelsträngige RNA in unterschiedlichen Konzentrationen während der RNA-Extraktion zu Wildtyp-Hefe-Rohextrakten zugegeben und die oben beschriebene Prozedur durchgeführt. Zur gleichzeitigen Abschätzung des Detektionslimits wurde unbehandelte dsRNA parallel zu den Proben der Verlustbestimmung auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen und anschließend ebenfalls mittels Silberfärbung visualisiert (**Abbildung 9A**). Anhand des Vergleichs zwischen der unbehandelten dsRNA und der Probe, zu welcher zu Beginn der Reinigungsprozedur eine definierte Menge an dsRNA zugegeben wurde, lässt sich ein Verlust von 50-90 % an dsRNA ableiten. Des Weiteren liegt das Detektionslimit bei circa 1 ng dsRNA.

Nach Auswahl einer geeigneten Nachweismethode zur Detektion potenziell *in vivo* transkribierter edsRNA wurde die Transkription dieser untersucht. Hierzu wurde der Hefestamm CEN.PK2-1C jeweils mit einem der drei episomalen edsRNA-Konstrukte transformiert, die unter der Kontrolle eines Pol II-spezifischen Promotors stehen (GAL1/TEF1/TDH3; s. 3.2.1). Der Erfolg der Transformation wurde mittels Kolonie-PCR überprüft, woraufhin jeweils ein positiv getesteter Hefeklon für die weitere Analyse ausgewählt wurde. Die Kultivierung der Hauptkultur erfolgte in einem Schüttelkolben mit 50 ml Medium. Für die transformierten Hefen mit den konstitutiven Promotoren TEF1 und TDH3 wurde

glukosehaltiges Medium und für die transformierten Hefen mit dem induzierbaren Promotor GAL1 galaktosehaltiges Medium verwendet. Die Hauptkultur wurde nach acht Stunden Inkubation geerntet und jeweils 15 OD-Einheiten, wie bereits für die Abschätzung des Verlusts beschrieben, aufgearbeitet. Anschließend erfolgte die Visualisierung der edsRNA-Transkripte mittels silbergefärbter, denaturierender Polyacrylamid-Gele (**Abbildung 9B**). Die erwartete Größe der perfekt doppelsträngigen RNA betrug für alle Konstrukte 147 nt (ohne *Tetra*loop, s. Abbildung 6) bzw. 298 nt (mit *Tetra*loop, falls die ssRNA des *Tetra*loops nicht durch RNase A/T1 umgesetzt wurde). Während die Transkriptgröße der Konstrukte mit dem GAL1- und TDH3-Promotor der Erwartung entsprach (**Abbildung 9B**, blauer Stern), ähnelte das Transkript des Konstruktes mit dem TEF1-Promotor (**Abbildung 9B**, roter Stern) eher der Positivkontrolle, welche eine Größe von 168 nt aufwies. Dies könnte ggf. auf das Laufverhalten der betreffenden dsRNA innerhalb des Gels zurückzuführen sein. Eine alternative Erklärung stellt eine unvollständige Denaturierung der edsRNA dar, sodass die apparente Größe abweichend von der erwarteten Größe ist. Des Weiteren unterschied sich die Intensität der Bande des jeweiligen Transkripts zwischen den unterschiedlichen Promotoren stark (TEF1>GAL1>TDH3). Es kann also geschlussfolgert werden, dass die Ribozyme auch unter den vorliegenden *in-vivo*-Bedingungen aktiv sind und somit zumindest anteilig die erwünschte Haarnadel-RNA generiert wird.

Um die Ausbeute an edsRNA weiter erhöhen zu können, wurde überprüft, ob die gewählte Wachstumszeit der Hauptkultur von acht Stunden angepasst werden muss, da die Inkubationszeit im ersten Versuch auf Erfahrungen für die rekombinante Herstellung von Proteinen sowie aufgrund von Publikationen basierte. Daher wurde eine Zeitreihe (4h bis 24 h) für das edsRNA-Konstrukt mit dem GAL1-Promotor aufgenommen (**Abbildung 9C**). Der Abbildung ist klar zu entnehmen, dass die höchste Konzentration an edsRNA nach acht bis zwölf Stunden Inkubation vorliegt. Hingegen ist die edsRNA nach 24 Stunden kaum noch zu detektieren. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Hefe nach etwa 24 Stunden Wachstum in die stationäre Phase übergeht, wodurch nur noch geringe Mengen neuer edsRNA synthetisiert werden, während gleichzeitig die bereits vorhandene edsRNA verstärkt durch endogene RNasen abgebaut wird.

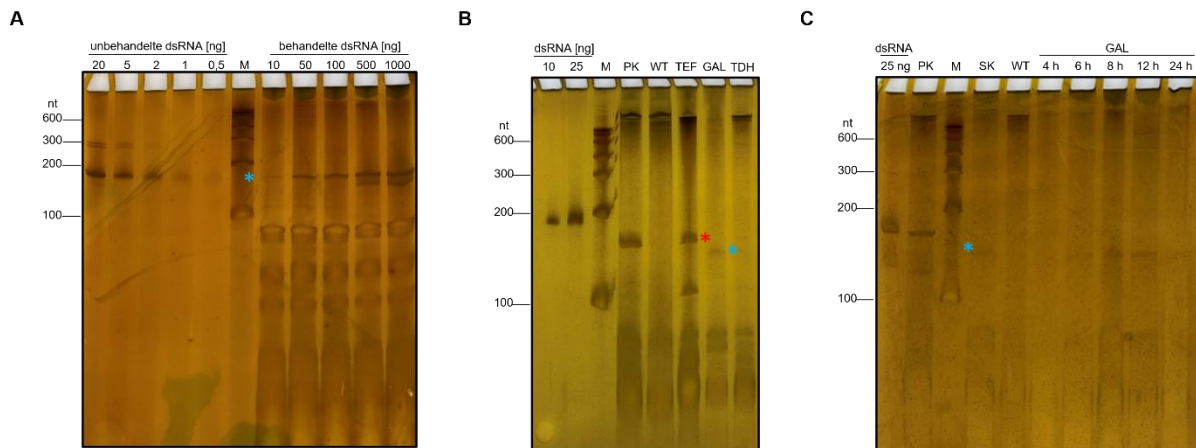


Abbildung 9: Nachweis der Transkription von edsRNA in *S. cerevisiae*

(A) Zur Abschätzung des Detektionslimits sowie des RNA-Verlustes während der Probenaufarbeitung wurde *in vitro* transkribierte dsRNA mit einer Länge von 168 nt (blauer Stern) in Konzentrationen von 10-1000 ng zu je 15 OD-Einheiten Wildtyp-Hefe (CEN.PK2-1C) hinzugegeben. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, ssRNA mittels RNase A/T1 enzymatisch umgesetzt und die dsRNA-haltige Probe mit Phenol-Chloroform gereinigt. Zur Bestimmung des Detektionslimits wurde parallellaufend unbehandelte dsRNA in Konzentrationen von 0,5-20 ng direkt auf das Gel aufgetragen. Es konnte ein dsRNA-Verlust von ca. 50-90 % sowie ein Detektionslimit von etwa 1 ng ermittelt werden. **(B)** Nachweis *in vivo* transkribierter edsRNA aus Hefestämmen, die jeweils mit einem der drei Pol II-spezifischen edsRNA-Konstrukte (GAL1-, TEF1- oder TDH3-Promotor) transformiert wurden. Nach Kultivierung der transformierten Stämme in promotorabhängigem Medium erfolgten Zellernte, Isolierung der Gesamt-RNA, Umsetzung der ssRNA mit RNase A/T1 sowie eine anschließende Reinigung der Nukleinsäuren. Als Negativkontrolle diente Wildtyp-Hefe (WT), als Positivkontrolle (PK) eine *in vitro* transkribierte dsRNA (168 bp), die während der RNA-Isolation zu Wildtyp-Hefe zugesetzt wurde. Für die GAL1- und TDH3-Konstrukte konnten Transkripte der erwarteten Größe (147 nt, blauer Stern) nachgewiesen werden. Das Transkript des TEF1-Konstrukts wies hingegen eine abweichende apparente Größe auf (roter Stern), möglicherweise bedingt durch unvollständige Denaturierung oder verändertes Laufverhalten. Die Transkriptintensitäten variierten promotorabhängig (TEF1 > GAL1 > TDH3), was auf unterschiedliche Transkriptionsniveaus schließen lässt. **(C)** Zeitabhängiger Nachweis der *in vivo* transkribierten edsRNA (147 nt, blauer Stern) im GAL1-Konstrukt zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion (4-24 h). Zusätzlich wurde eine Kontrollprobe aus einem früheren Schüttelkolben-Experiment (SK) aufgetragen. Als Negativ- und Positivkontrollen dienten jeweils Wildtyp-Hefe (WT) sowie *in vitro* transkribierte dsRNA (168 bp), die während der RNA-Isolation zugesetzt wurde (PK). Alle dargestellten Gele **(A-C)** zeigen denaturierende 6 %ige Harnstoff-Polyacrylamid-Gele. Als Marker (M) wurden jeweils 0,5 μ l *RiboRuler Low Range RNA Ladder* (Thermo Scientific) verwendet.

3.2.5 Bestimmung der Quantität an *in vivo* transkribierter edsRNA

Die Mehrzahl der in der Literatur beschriebenen Experimente zur Anwendung von RNA-Interferenz gegen Schadinsekten wurde unter Verwendung von *in vitro* transkribierter RNA oder dsRNA aus *E. coli* durchgeführt. Um eine fundierte Aussage über die Effizienz der

edsRNA-Transkription in *S. cerevisiae* treffen zu können, war es erforderlich, die Menge der produzierten dsRNA präzise zu quantifizieren. Obwohl eine grobe Abschätzung der edsRNA-Menge anhand der Ergebnisse silbergefärbter Gele möglich ist (**Abbildung 9**), erweist sich diese Methode als unzureichend präzise. Daher wurde zur exakten Quantifizierung eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) nach vorheriger reverser Transkription der dsRNA in komplementäre DNA (cDNA) durchgeführt.

Da auch die qPCR eine RNA-Extraktion voraussetzt, wurde zunächst die Wiedergewinnungsrate der RNA ermittelt, indem fluoreszenzmarkierte RNA verwendet wurde (**Abbildung 10**). Zu diesem Zweck wurde der Wildtyp-Hefe zu Beginn der RNA-Extraktion eine definierte Menge an fluoreszenzmarkierter RNA (200-300 fmol) zugesetzt. Im Anschluss daran wurde eine definierte Menge der extrahierten RNA zusammen mit einer Standardkurve, die aus verschiedenen Mengen derselben fluoreszenzmarkierten RNA bestand (20-70 fmol), auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Intensität der jeweiligen Banden im Gel wurde mithilfe der Software *Image Studio* bestimmt, und es wurde eine lineare Regression durchgeführt, um eine Gleichung für die Standardkurve zu erstellen.

Auf Grundlage der ermittelten Intensitäten konnte für jede Probe die Wiedergewinnungsrate berechnet werden. In dem gezeigten Gel lag diese bei 100 %, 92 % und 92 %. Wiederholte Experimente ergaben ähnliche Ergebnisse von 70 % bis 90 %. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine pauschale Wiedergewinnungsrate von 80 % für alle Proben angenommen, die in den nachfolgenden Berechnungen der Menge an dsRNA berücksichtigt wurde. Dieses Ergebnis steht in deutlichem Gegensatz zu dem Verlust, der anhand silbergefärbter Polyacrylamid-Gele detektiert wurde. Der signifikante Unterschied zwischen beiden Methoden lässt sich vermutlich auf mehrere Faktoren zurückführen. Erstens berücksichtigt das vorliegende Experiment ausschließlich den RNA-Verlust während der Extraktion mittels Trizol und Phenol-Chloroform, wohingegen der Nachweis der dsRNA im silbergefärbten Polyacrylamid-Gel zusätzliche Schritte umfasst - darunter den Verdau von ssRNA, einen weiteren Extraktionsschritt sowie die Färbung selbst - und somit zusätzliche Fehlerquellen einführt. Zweitens erfolgte die Quantifizierung der fluoreszenzmarkierten RNA mithilfe der Software *Image Studio*, welche eine objektive, digitale Auswertung erlaubt, während die Bestimmung der RNA-Menge im Silbergel lediglich durch visuelle Abschätzung vorgenommen wurde. Darüber hinaus ist die gesamte Methodenkette, die zur Analyse der dsRNA im Silbergel führt, anfälliger für Verluste und Variabilitäten als die direkte Bestimmung der fluoreszenzmarkierten RNA.

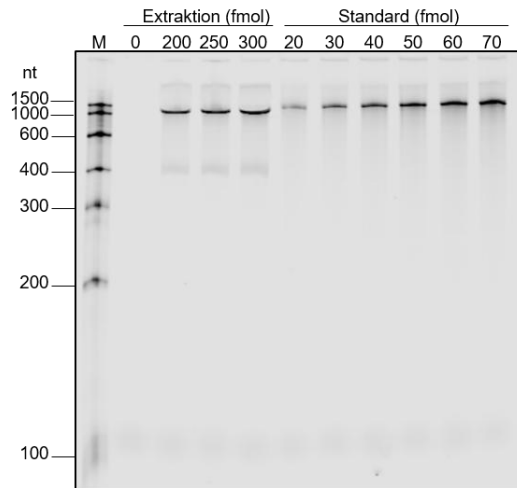


Abbildung 10: Bestimmung der Wiedergewinnungsrate an dsRNA nach Trizol-Extraktion

Es wurden insgesamt drei verschiedene Stoffmengen (200, 250, 300 fmol) fluoreszenzmarkierter RNA zu Wildtyp-Hefeproben bei der RNA-Extraktion mit Trizol zugefügt. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 20 µl RNase-freiem H₂O und auf das Gel wurden 5 µl aufgetragen, daher nur ein Viertel (25 %). Zur Berechnung der Wiedergewinnungsrate mithilfe einer Standardgeraden wurde dieselbe fluoreszenzmarkierte RNA mit unterschiedlichen Stoffmengen (20-70 fmol) auf das Gel aufgebracht. Die Proben wurden in einem 6%igen Harnstoff-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Bei dem Marker (2 µl) handelt es sich um eine Zusammenstellung von sieben *in vitro* transkribierten RNAs mit der angegebenen Größe.

Nachdem der Verlust an dsRNA während der RNA-Extraktion mit Trizol bekannt war, konnten die in *S. cerevisiae* generierten Mengen an edsRNA präzise quantifiziert werden. Hierfür wurden alle drei Konstrukte mit Pol II-spezifischen Promotoren analysiert. Für jeden Promotor wurden drei einzelne Klone desselben Transformationsereignisses untersucht. Von jedem Klon wurde eine Hauptkultur über einen Zeitraum von acht Stunden kultiviert und anschließend 15 OD-Einheiten geerntet. Pro Klon wurden drei technische Replikate durchgeführt, die jeweils 15 OD-Einheiten derselben Kultur entsprachen. Die Proben wurden nach dem in Abschnitt 2.3.2.16 beschriebenen Verfahren aufbereitet. Um Ungenauigkeiten in der Berechnung zu vermeiden, wurde für jede qPCR-Platte eine neue Standardkurve implementiert. Hierfür wurde bei jeder cDNA-Synthese zusätzlich cDNA aus 320 pg *in vitro* transkribierter edsRNA hergestellt und für die Erstellung der Standardkurve sequenziell verdünnt (1:5). Die Generierung der edsRNA erfolgte durch *in-vitro*-Transkription der jeweiligen Einzelstränge mittels T7-Polymerase und anschließender Hybridisierung. Die Standardkurve wurde durch die Auftragung der Schwellenwert-Zyklen (C_t-Werte) gegen den Logarithmus der jeweiligen Konzentration der edsRNA erstellt. Anschließend wurde eine lineare Regression mit Excel durchgeführt. Als Primer für die cDNA-Synthese des Standards und der edsRNA-Proben wurde edsCMVRNA2-qRT-1 verwendet. Die Primerkombination edsCMVRNA2-qRT-1 und edsCMVRNA2-qRT-2 wurde für die qPCR genutzt. Die Berechnung der edsRNA-Menge

erfolgte mit Excel auf Grundlage der in Abschnitt 2.3.2.16 beschriebenen Gleichung. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 11** dargestellt.

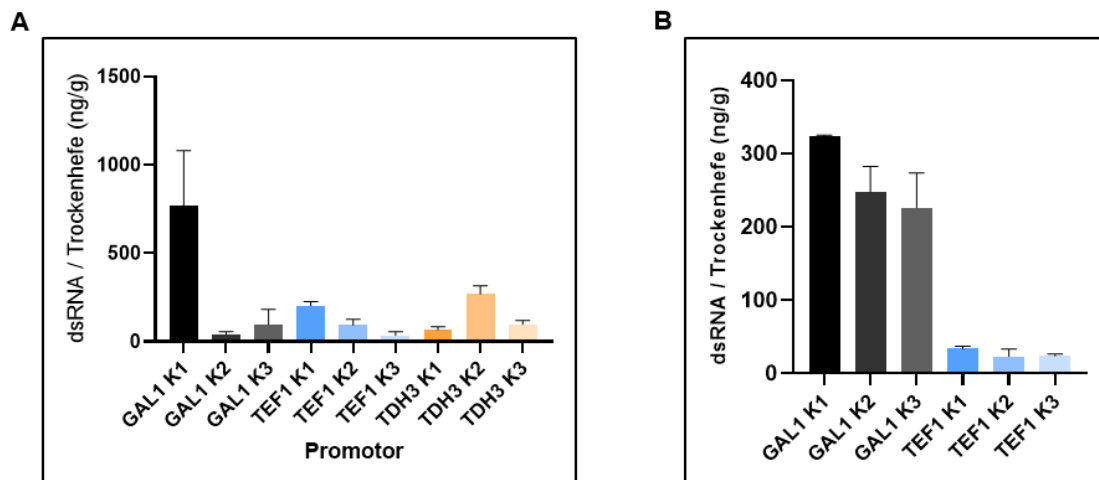


Abbildung 11: Vergleich der Menge an edsRNA von individuellen Klonen mit unterschiedlichen Promotoren

S. cerevisiae wurde mit episomalen Konstrukten zur Expression von edsRNA transformiert. Anschließend erfolgten die *in-vivo*-Transkription, die Isolation der Gesamt-RNA sowie die nachfolgende reverse Transkription der edsRNA. **(A)** Je Promotor (GAL1, TEF1 und TDH3) wurden drei individuelle Hefeklone (K1, K2, K3) hinsichtlich ihrer edsRNA-Quantität mittels qPCR analysiert. Dabei wurden jeweils drei technische Replikate durchgeführt und für die Quantifizierung ein edsRNA-Standard verwendet. Die einzelnen Balken zeigen den Mittelwert sowie die Standardabweichung der Replikate. **(B)** Wiederholung der Bestimmung der edsRNA-Expression derselben Klone nach einem Zeitraum von drei Wochen. Während dieses Zeitraums wurden die Hefeklone auf Petrischalen im Kühlschrank gelagert. Eine Darstellung der Klone unter dem TDH3-Promotor wurde nicht vorgenommen, da die edsRNA-Expression der Klone unter dem TEF-Promotor (beide konstitutive Promotoren) vergleichbare Werte aufwies. Es wurden abermals drei technische Replikate verwendet und der Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Die Darstellung der Abbildungen erfolgte mit GraphPad Prism.

Die Analyse zeigt erhebliche Unterschiede in der edsRNA-Menge für unterschiedliche Klone bei der Verwendung desselben Promotors. Beispielsweise wies Klon 1 mit dem GAL1-Promotor eine durchschnittliche edsRNA-Menge von 742 ng pro Gramm Trockenhefe auf, während Klon 3 nur eine durchschnittliche Menge von 100 ng erreichte. Währenddessen produzierte Klon 2 mit TDH3-Promotor die höchste Menge an edsRNA. Bei einem Vergleich aller Daten scheint kein Promotor signifikant hervorstechen. Die großen Unterschiede innerhalb der Klone mit demselben Promotor könnten auf die variable Plasmidkopienzahl in den einzelnen Klonen zurückzuführen sein, da das Plasmid ausschließlich episomal vorliegt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Menge an edsRNA drei Wochen später in einem unabhängigen Experiment erneut bestimmt. In der Zwischenzeit wurden die

Hefekolonien nicht auf frische Platten übertragen. Die Durchführung und Auswertung des Experiments erfolgten nach demselben Verfahren wie in **Abbildung 11A**. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die anfänglichen Unterschiede zwischen den Klonen mit demselben Promotor weitgehend ausgeglichen hatten (**Abbildung 11B**). Unter dem GAL1-Promotor betrug die edsRNA-Menge nun bei allen Klonen etwa 250 bis 320 ng pro Gramm Trockenhefe, während die Menge des Transkripts mit TEF1-Promotor deutlich auf etwa 30 ng pro Gramm Trockenhefe sank. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die Plasmidkopienzahl die Menge an produzierter edsRNA maßgeblich beeinflusst. Eine mögliche Lösung zur Umgehung dieser Variabilität wäre die Integration des Konstrukts in das Hefegenom, was jedoch nicht in dieser Arbeit verfolgt wurde.

3.2.6 Nachweis einer Prozessierung und Aktivität der *in vivo* transkribierten edsRNA im DCL-*Slicer*-Assay

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Transkription der edsRNA *in vivo* erfolgreich stattfindet. Allerdings blieb die Frage offen, ob diese *in vivo* transkribierte edsRNA, ähnlich wie die *in vitro* transkribierte edsRNA, in funktionale esiRNAs prozessiert werden kann. Um dies zu untersuchen, wurde ebenfalls ein DCL-*Slicer*-Assay durchgeführt.

Zur funktionellen Analyse der *in vivo* transkribierten edsRNA wurden zunächst *S. cerevisiae*-Zellen, die mit dem GAL1-Pol II-Konstrukt transformiert waren, kultiviert und durch Galaktose-Zugabe die Transkription der edsRNA induziert. Anschließend wurden zwei parallele Aufarbeitungsstrategien verfolgt: In einem Ansatz wurde nach Ernte von 15 OD-Einheiten die Gesamt-RNA isoliert und anschließend einer RNase A/T1-Behandlung unterzogen, um selektiv ssRNA zu entfernen und so potenziell dsRNA anzureichern. Im zweiten Ansatz wurde die Gesamt-RNA extrahiert, jedoch ohne RNase-Behandlung weiterverarbeitet, um auch unvollständig Ribozym-prozessierte Transkripte zu erfassen. Hintergrund dieser Strategie war die Annahme, dass die Ribozym-vermittelte Prozessierung *in vivo* vermutlich ebenfalls nicht vollständig effizient verläuft, sodass zusätzlich Intermediate der edsRNA mit einzelsträngigen Überhängen vorliegen und funktional sein könnten. Die jeweils aufbereiteten RNA-Proben wurden im anschließenden DCL-*Slicer*-Assay im BYL-System auf ihre Funktionalität getestet. Dazu wurden die RNA-Proben mit dem maximal möglichen Reaktionsvolumen (5,6 µl, s. Tabelle 14) als Substrat in den Assay eingebracht, um die Generierung funktioneller esiRNAs aus der *in vivo* synthetisierten edsRNA zu maximieren. Nach ausreichender Inkubation wurde dem Reaktionsansatz ³²P-markierte Target-RNA (CMV RNA 2) zugesetzt. Die resultierenden Spaltprodukte wurden durch agarosegelbasierte Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließender Autoradiographie detektiert. Die getesteten Reaktionsansätze zeigten jedoch keinerlei Spaltung der Target-RNA. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein,

dass die Menge der edsRNA bzw. der daraus im Assay prozessierten esiRNA zu gering war, um eine effektive Spaltung der Target-RNA zu bewirken.

Zur Untersuchung des Einflusses hoher Mengen an Hefe-RNA als potenzieller *competitor* auf die Spaltung einer ^{32}P -markierten Target-RNA (CMV-RNA 2) wurden in einem weiteren funktionellen DCL-*Slicer*-Assay verschiedene Konzentrationen *in vitro* transkribierter edsRNA getestet. Dem Reaktionsansatz wurden dabei jeweils 2 μg bzw. 10 μg Gesamt-RNA aus Wildtyp-Hefe zugesetzt (**Abbildung 12**). Innerhalb der einzelnen Versuche zeigte sich kein Unterschied in der Effizienz der Target-RNA-Spaltung in Abhängigkeit von der eingesetzten edsRNA-Konzentration. Es wurde jedoch deutlich, dass bei einer Hintergrund-RNA-Konzentration von 2 μg eine vollständige Spaltung der Target-RNA erreicht wurde (**Abbildung 12A**), während bei 10 μg Hintergrund-RNA nur eine teilweise Spaltung der Target-RNA beobachtet werden konnte (**Abbildung 12B**).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das System bei einer zu hohen Konzentration an Hintergrund-RNA unspezifisch inhibiert wird, was die Spaltung der Target-RNA beeinträchtigen kann. Folglich ist es schwierig zu bestimmen, ob die *in vivo* transkribierte edsRNA tatsächlich nicht in funktionelle esiRNAs prozessiert wurde oder aber ob die Menge an edsRNA im *in-vitro*-System und folglich die Menge funktioneller esiRNAs zu gering war und somit die Spaltung der Target-RNA aufgrund der unspezifischen Inhibierung durch die zusätzliche Wildtyp-Hefe-RNA verhindert wurde.

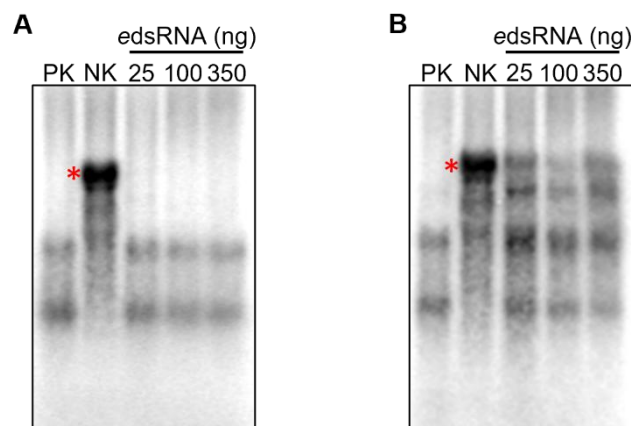


Abbildung 12: Einfluss von Gesamt-RNA aus Wildtyp-Hefe auf die DCL-vermittelte Prozessierung und AGO1-vermittelte Spaltung einer Target-RNA im DCL-*Slicer*-Assay

Funktioneller DCL-*Slicer*-Assay mit verschiedenen Konzentrationen *in vitro* transkribierter edsRNA (25-350 ng). Den Reaktionsansätzen wurden jeweils (**A**) 2 μg bzw. (**B**) 10 μg Gesamt-RNA aus Wildtyp-Hefe als potenzieller *competitor* zugesetzt. Die Target-RNA (CMV-RNA 2, ^{32}P -markiert) wurde durch endogene DCLs in funktionelle esiRNAs prozessiert, welche von *NbAGO1* gebunden und nach Rekonstitution des RISC zur spezifischen Spaltung der Target-RNA führten. Als Postivkontrolle (PK) dienten 50 ng einer *in vitro* transkribierten edsRNA ohne Gesamt-RNA aus Wildtyp-Hefe und bei der Negativkontrolle (NK) wurde keine edsRNA zugegeben. Die ungespaltene Target-RNA ist mit einem

roten Stern markiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 1,75%igen denaturierenden Agarosegel.

3.2.7 Etablierung eines Fermentationsverfahrens zur Produktion von dsRNA in

S. cerevisiae

In der Literatur wurde bereits mehrfach gezeigt, dass RNAi zur Bekämpfung von Schadinsekten eingesetzt werden kann. Es wurden auch Versuche mit Hefen durchgeführt, in denen dsRNA produziert wurde, die eine signifikante Reduktion ihrer Vitalität oder Fitness zur Folge hatte. In diesen Studien wurde jedoch keine detaillierte Angabe zur produzierten dsRNA-Menge gemacht. Wie in Abschnitt 3.2.5 dargestellt, wurden in den durchgeführten Schüttelkolbenexperimenten lediglich geringe Mengen an dsRNA von maximal 750 ng pro Gramm Trockenhefe erreicht. Darüber hinaus lieferte die *in vivo* generierte dsRNA im durchgeführten *in-vitro*-DCL-Slicer-Assay keine Hinweise auf die Bildung funktioneller esiRNAs in einer ausreichenden Menge, die zu einer Spaltung der Target-RNA geführt hätte (s. 3.2.6). Vor diesem Hintergrund wurde eine Steigerung der dsRNA-Produktion in *S. cerevisiae* angestrebt.

Im Rahmen eines BMBF-geförderten Forschungsprojektes konnten zwei Fermenter angeschafft werden, die für dieses Vorhaben eingesetzt werden sollten. Die dahinterstehende Idee ist, dass unter den kontrollierten Wachstumsbedingungen in einem Fermenter das Hefewachstum optimiert und dadurch möglicherweise eine höhere Menge an dsRNA pro Zelle produziert werden könnte. Ein weiterer Vorteil der Fermentation ist das größere Kulturvolumen sowie die Möglichkeit, eine höhere Zelldichte zu erreichen. Da in der Arbeitsgruppe keine Erfahrung mit der Fermentation von *S. cerevisiae* vorlag, musste zunächst ein entsprechendes Protokoll entwickelt und etabliert werden.

Nach anfänglichen Schwierigkeiten gelang es, ein Protokoll für die Fermentation im *fed-batch*-Verfahren zu etablieren (s. 2.5.8). Beim *fed-batch*-Verfahren werden die Nährstoffe kontinuierlich oder schrittweise zu einem Bioreaktor hinzugefügt, während das Kulturvolumen nur geringfügig ansteigt. Im Gegensatz zu klassischen *batch*-Prozessen, bei denen die Nährstoffe zu Beginn der Kultivierung vollständig zugegeben werden, ermöglicht der *fed-batch*-Prozess eine gezielte Kontrolle der Nährstoffkonzentration während der Kultivierung. Dies dient dazu, das Zellwachstum zu optimieren und die Bildung unerwünschter Nebenprodukte zu minimieren.

Während der Fermentation stellte sich heraus, dass die aktuelle Glukosekonzentration im Bioreaktor der kritischste Parameter war. Dies liegt daran, dass *S. cerevisiae* ein CRABTREE-positiver Organismus ist. Der CRABTREE-Effekt beschreibt ein Phänomen, dass Hefezellen, insbesondere *S. cerevisiae*, unter Bedingungen hoher Glukosekonzentrationen bevorzugt Gärung betreiben, obwohl ausreichend Sauerstoff für eine oxidative Phosphorylierung

vorhanden ist. Normalerweise wird Glukose unter aeroben Bedingungen vollständig zu CO_2 und H_2O verstoffwechselt, was erheblich mehr ATP liefert als die Gärung. Beim CRABTREE-Effekt schalten die Hefezellen jedoch trotz Sauerstoff auf die weniger effiziente Energiegewinnung durch Gärung um, was zur Produktion von Ethanol führt. Dieses Verhalten wird durch eine schnelle Glukoseaufnahme und eine Überlastung der Atmungskette verursacht, sodass Glykolyseprodukte akkumulieren, die dann in der Gärung weiterverarbeitet werden. Bei *S. cerevisiae* wird der CRABTREE-Effekt bereits bei einer Glukosekonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ ausgelöst (141,142). Daher musste die Glukosekonzentration im Reaktor konstant niedrig gehalten werden, um eine optimale Zellteilung der Hefe zu gewährleisten. Es wurde jedoch bewusst eine Glukosekonzentration knapp oberhalb des Schwellwerts angestrebt, um die Gefahr des vollständigen Verbrauchs der Glukose zu minimieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Glukosekonzentration diskontinuierlich mit einem Kit gemessen. Dies hatte zur Folge, dass zu keinem Zeitpunkt die aktuelle Glukosekonzentration im Reaktor genau bekannt war, weil die Bestimmung circa 90 Minuten in Anspruch nimmt. Da die Glukosekonzentration, wie beschrieben, künstlich sehr niedrig gehalten werden musste, gestaltete sich die Reproduzierbarkeit der Fermentationsläufe als schwierig. Bereits kleinste Veränderungen im Zellwachstum oder eine leicht abweichende Anzahl an lebenden und toten Zellen hatten einen erheblichen Einfluss auf die Fermentation. Zudem musste die *feeding*-Strategie vor Beginn der Fermentation festgelegt werden (**Abbildung 13**). Ein beispielhafter Fermentationslauf ist in **Abbildung 14** dargestellt, die während dieses Laufs gemessenen Glukosekonzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten sind in **Tabelle 15** aufgeführt.

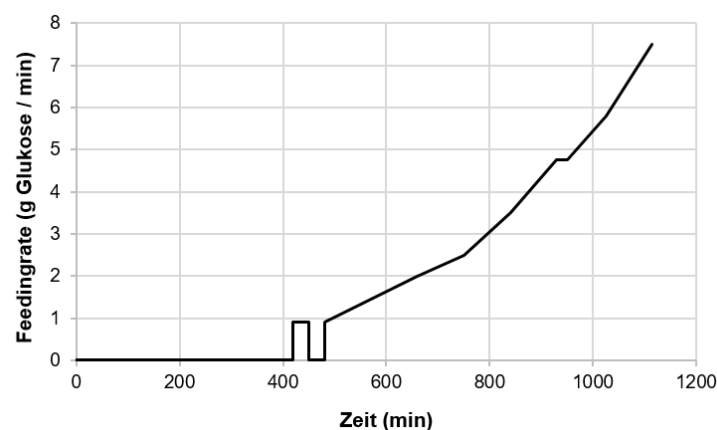


Abbildung 13: Feeding-Profil des in Abbildung 14 dargestellten Fermentationslaufs

Das *Feeding*-Profil lässt sich in zwei Phasen einteilen, eine *batch*-Phase (bis 420 min) und eine *fed-batch*-Phase (420 min bis 1125 min). Die *fed-batch*-Phase wurde in mehrere Abschnitte unterteilt, sodass der Anstieg der *feeding*-Rate einem gestreckten, exponentiellen Wachstum ähnelt. Die *feeding*-Lösung bestand aus 2x ScD Ura⁻ mit 5,75 % Glukose.

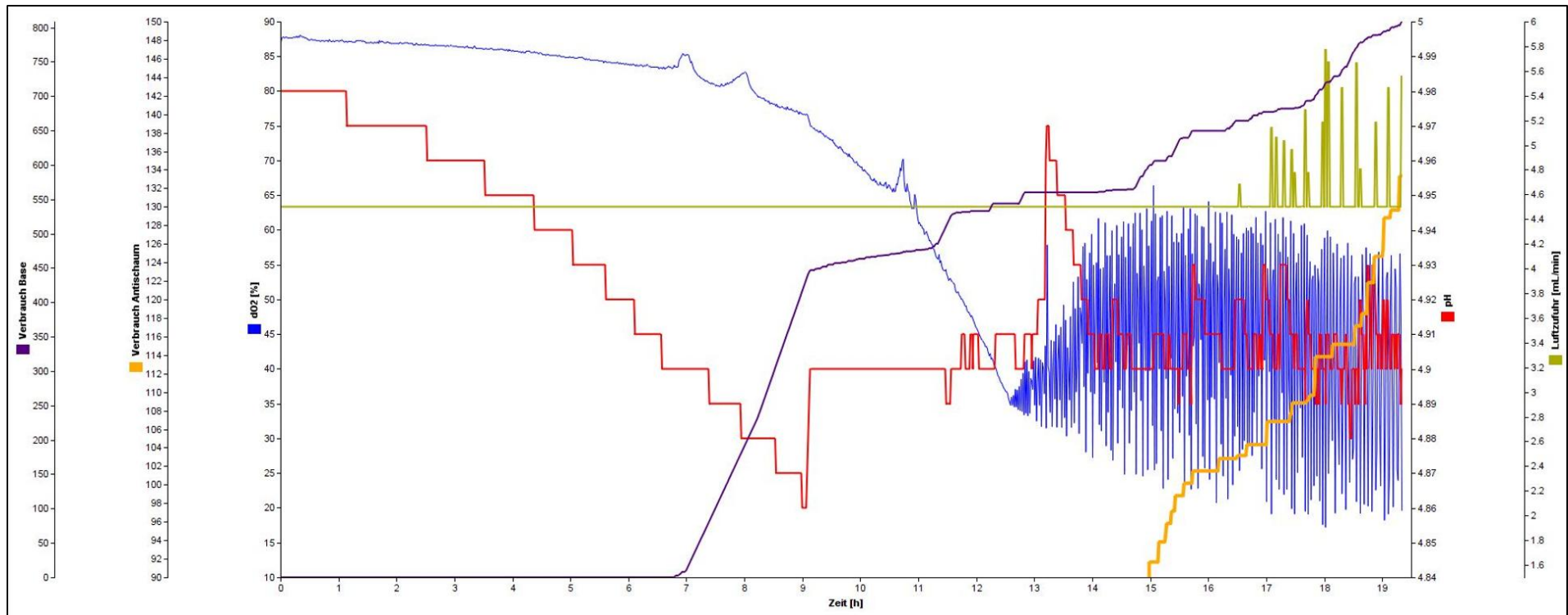


Abbildung 14: Parameterübersicht eines Fermentationslaufs der edsRNA-Produktion in *S. cerevisiae*

Beispielhafter Fermentationslauf transformierter *S. cerevisiae* mit dem TEF1-Promotor-edsRNA-Konstrukt im *fed-batch*-Verfahren. Die Parameter sind dargestellt: lila – Verbrauch Base; orange – Verbrauch Antischaum; blau – gelöste Sauerstoffmenge im Reaktor (% in Bezug auf maximale Sättigung); rot – pH-Wert im Reaktor; grün – Luftzufuhr (l/min). Aufgrund einer leicht verzögerten Erfassung des gelösten Sauerstoffs erfolgte die Regelung der Rührgeschwindigkeit zeitverzögert, was in der Folge zu oszillierendem Verhalten im Belüftungssystem führte.

Tabelle 15: Glukosekonzentration des in Abbildung 14 dargestellten Fermentationslaufs

Zeit nach Inokulation (h)	Glukosekonzentration ($\mu\text{g} / \text{ml}$)
0	5000
1,5	4682
2,5	4262
3,5	3570
4,5	2743
5,5	1766
6,5	492
7,5	380
8,5	162
9,5	300
10,5	138
11,5	173
12,5	160
13,5	236
14	181
14,5	145
15	161
15,5	262
16	172
16,5	242
17	167
17,5	238
18,25	239
18,75	311

Es ist deutlich zu erkennen, dass zu Beginn des Fermentationsprozesses sowohl der pH-Wert als auch die Konzentration des gelösten Sauerstoffs (dO_2) abfielen. Nach etwa 7 und 7,5 Stunden zeigte sich ein leichter Anstieg des dO_2 , welcher exakt mit den Zeitpunkten des *feeding*-Impulses sowie dem Start der *fed-batch*-Phase übereinstimmt. Nach dem ersten

Impuls wurde kontinuierlich Glukoselösung zugegeben, wie in Abbildung 14 dargestellt. Aus **Tabelle 15** lässt sich entnehmen, dass eine *batch*-Phase von 7 Stunden für die gewählte Anfangskonzentration an Glukose optimal ist, da die Glukosekonzentration von anfänglich 5 g/l auf etwa 0,4 g/l abfällt. Danach musste auf das *fed-batch*-Verfahren umgestellt werden, da sonst die Glukosekonzentration im Reaktor innerhalb kürzester Zeit auf Null gesunken wäre. Zu Beginn der *fed-batch*-Phase genügt die Zugabe kleiner Glukosemengen in kurzen Impulsen, um eine zu hohe Glukosekonzentration zu vermeiden und den CRABTREE-Effekt zu verhindern.

Nach 9 Stunden sank der pH-Wert unterhalb des *setpoints* von 4,9, weshalb Ammoniumhydroxid zugegeben werden musste, um diesen wieder zu erreichen. Ebenfalls war ein starker Abfall der dO_2 -Konzentration nach 9 Stunden festzustellen, was auf den Beginn des exponentiellen Wachstums der Hefen hindeutet. Der dO_2 -*setpoint* wurde nach etwa 12,5 Stunden erreicht, woraufhin die Rührgeschwindigkeit erhöht wurde, um diesen aufrechtzuerhalten. Aufgrund der minimal verzögerten Messung des gelösten Sauerstoffs reagierte der Rührer jedoch verzögert, was zu Oszillationen führte. Diese Oszillationen nahmen im Verlauf der Fermentation zu, da auch der Sauerstoffbedarf der Hefen stetig anstieg. Als die Rührgeschwindigkeit ihr Maximum erreichte, der Messwert des dO_2 aber weiterhin unterhalb des *setpoints* lag, wurde zusätzlich die Luftzufuhr erhöht (**Abbildung 14**, grüne Kurve).

Ab einem bestimmten Zeitpunkt der Fermentation (ca. 15 Stunden) musste zudem Antischaummittel zugegeben werden, da die Hefen im Stadium des exponentiellen Wachstums vermehrt Gase, insbesondere CO_2 , produzieren, was zu Schaumbildung führt. Die Zugabe des Antischaums verhinderte ein Übersäumen des Reaktors. In **Tabelle 15** ist ersichtlich, dass durch das gewählte *feeding*-Programm die Glukosekonzentration konstant zwischen 100 mg/l und 500 mg/l gehalten wurde. Diese Konzentration liegt nur knapp oberhalb der Grenze, bei der der CRABTREE-Effekt auftritt, wodurch nahezu optimale Fermentationsbedingungen aufrechterhalten werden konnten.

Nach Abschluss des Fermentationslaufs wurde die gesamte Biomasse geerntet, wobei eine Feuchtmasse von 110,5 g ermittelt wurde. Diese Masse entspricht einer Konzentration von 26,5 g/l, bezogen auf das Endvolumen der Fermentation. Im Anschluss daran wurde die Menge der transkribierten edsRNA durch RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und qPCR analysiert. Die Ergebnisse zeigten jedoch keinen höheren Ertrag im Vergleich zu den Schüttelkolbenexperimenten. Dies deutet darauf hin, dass mit dem angewandten System die Menge an edsRNA pro Zelle nicht erhöht werden kann. Aufgrund der deutlich gesteigerten Biomasseproduktion resultiert lediglich ein insgesamt höhere Ertrag an edsRNA. Es könnte erwogen werden, die Kopienzahl der verwendeten Plasmide anzupassen oder aber das

Konstrukt ins Hefegenom zu integrieren, um möglicherweise die edsRNA-Menge pro Zelle zu steigern.

3.2.8 Coexpression von *DCL4* und edsRNA in *S. cerevisiae* zur direkten Applikation inaktivierter Hefe mit esiRNAs

Da die *in vivo* generierte edsRNA keine Hinweise auf die Bildung funktioneller esiRNAs in ausreichender Menge zur Spaltung einer Target-RNA lieferte (s. 3.2.6) und auch unter kontrollierten Fermentationsbedingungen keine signifikante Erhöhung der edsRNA-Menge pro Hefezelle erzielt werden konnte (s. 3.2.7), wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich die Möglichkeit evaluiert, ob neben der Applikation von edsRNA-produzierender, inaktivierter Hefe auch eine direkte *in-vivo*-Prozessierung der transkribierten edsRNA zu esiRNAs durch Coexpression von *DCL4* in *S. cerevisiae* realisierbar ist. Diese Strategie hätte den Vorteil, dass im Zielorganismus lediglich die Beladung des AGOs sowie die Bildung des RISCs erforderlich wären, um die gewünschte Genregulation zu initiieren.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden zwei Ansätze untersucht. In einer Probe wurde Hefe mit einem Plasmid transformiert, welches die Expression von edsRNA ermöglicht. In einer anderen Probe wurde Hefe mit einem Plasmid für die Expression von edsRNA sowie zusätzlich mit einem Plasmid für die Expression von *DCL4* transformiert. Nach der Transformation erfolgte die Induktion der Genexpression durch die Zugabe von Galaktose. Acht Stunden nach der Induktion wurden jeweils 15 OD-Einheiten der Hefekulturen geerntet. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und mit RNase A/T1 behandelt, um die entstandenen RNA-Produkte zu analysieren.

Die Ergebnisse dieses Assays wurden mittels einer Visualisierung auf einem Harnstoff-Polyacrylamid-Gel dargestellt (**Abbildung 15**). Bei der gezeigten Abbildung handelt es sich um eine qualitative Analyse mit limitierter RNA-Menge. Der Proteinnachweis von *DCL4* wurde in diesem Fall nicht durchgeführt, da auf Grundlage vorheriger Experimente zur *DCL4*-Expression in *S. cerevisiae* (s. Abbildung 5) vergleichbare Hefezellmengen verwendet und somit ein ähnlicher Expressionsgrad angenommen wurde. In der Probe, die nur das edsRNA-Plasmid mit GAL-Promotor enthielt, konnte eine deutliche Bande auf der erwarteten Höhe nachgewiesen werden (blauer Pfeil, unterer Bereich), was auf die erfolgreiche Transkription der edsRNA hinweist. Im Gegensatz dazu war diese Bande bei der Coexpression von *DCL4* nicht mehr nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass die transkribierte edsRNA durch *DCL4* erkannt und prozessiert wurde. Ein weiteres Indiz für die Aktivität von *DCL4* war eine zusätzliche Bande im oberen Bereich des Gels (blauer Pfeil, oberer Bereich), deren Intensität bei der Coexpression von *DCL4* im Vergleich zur Kontrolle ohne *DCL4* abgeschwächt war.

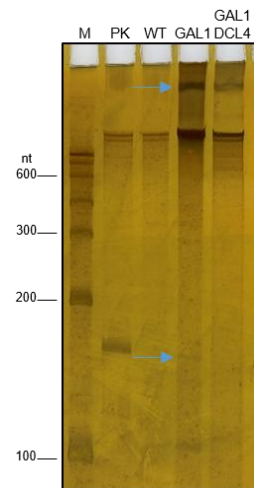


Abbildung 15: Prozessierung der edsRNA durch DCL4 *in vivo*

Qualitative Analyse der DCL4-vermittelten Prozessierung von edsRNA in *S. cerevisiae*. Es wurde jeweils Gesamt-RNA aus 15 OD-Einheiten Hefezellen isoliert, gezielt ssRNA durch RNase A/T1-Behandlung umgesetzt und die dsRNA-haltigen Proben in einem 6%igen denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Zur besseren Visualisierung der Banden erfolgte eine Silberfärbung. Als Negativkontrollte diente Wildtyp-Hefe (WT) und zur Überprüfung der RNase A/T1-Behandlung wurde *in vitro* transkribierte dsRNA (25 ng) zu einer Wildtyp-Hefeprobe vor der RNA-Isolation dazugegeben (PK). Die Coexpression von *DCL4* und der edsRNA unter Kontrolle des GAL1-Promotors (letzte Spur) wies keine Bande für die edsRNA auf, wohingegen die Probe der alleinigen Expression der edsRNA unter Kontrolle des GAL1-Promotors das Transkript zeigte (blauer Pfeil, unterer Bereich). Als Marker (M) wurde *RiboRuler Low Range* (Thermo Scientific) verwendet.

Um die Prozessierung der edsRNA durch DCL4 nicht nur auf Grundlage der Gelvisualisierung zu bestätigen, sondern auch die Produkte der Prozessierung genauer zu charakterisieren, wurde eine *next-generation-sequencing*-Analyse (NGS) der kleinen RNA-Fragmente durchgeführt. Diese Untersuchung sollte Aufschluss darüber geben, ob tatsächlich esiRNAs gebildet wurden und inwiefern diese für die Beladung der AGO-Proteine und die Bildung des RISC im Zielorganismus geeignet sind. Dazu wurde RNA sowohl aus Triplikaten der Coexpressionsprobe als auch aus der Probe der alleinigen edsRNA-Transkription isoliert. Anschließend wurden die extrahierten RNA-Proben zu einer Gesamtprobe vereint. Die darauffolgende Aufarbeitung der Gesamt-RNA erfolgte gemäß den beschriebenen Protokollen (s. 2.3.2.17). Die Erstellung einer RNA-Bibliothek von kleinen RNAs (sRNAs) wurde durch die *Core Unit* DNA-Technologien der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig durchgeführt. Die bioinformatische Analyse der Daten wurde von PD Dr. Jan Grau (Institut für Informatik, MLU Halle-Wittenberg) vorgenommen.

Im Rahmen der Längenanalyse der generierten sRNAs konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Präsenz von DCL4 in *S. cerevisiae* eine Verschiebung der Zielsequenz-sRNAs hin zu einer charakteristischen Länge von 21 nt bewirkte (**Abbildung 16A**). Dieses Ergebnis steht im

Einklang mit der Literatur, welche zeigt, dass DCL4 hauptsächlich siRNAs mit einer Länge von 21 nt produziert (149). Die detektierten sRNAs mit einer Länge von 20 nt könnten unter anderem durch den Abbau eines Nukleotids von 21 nt-sRNAs oder durch den Abbau von zwei Nukleotiden von 22 nt-sRNAs entstanden sein. Im Gegensatz dazu zeigte die Hefe ohne DCL4 (Wildtyp-Hefe) eine unspezifische Verteilung der sRNA-Größen, wobei die Mehrheit der sRNAs eine Länge von 24 nt aufwies (**Abbildung 16B**). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass aktives DCL4 erfolgreich gebildet und die *in vivo* generierte edsRNA von DCL4 erkannt sowie prozessiert wird.

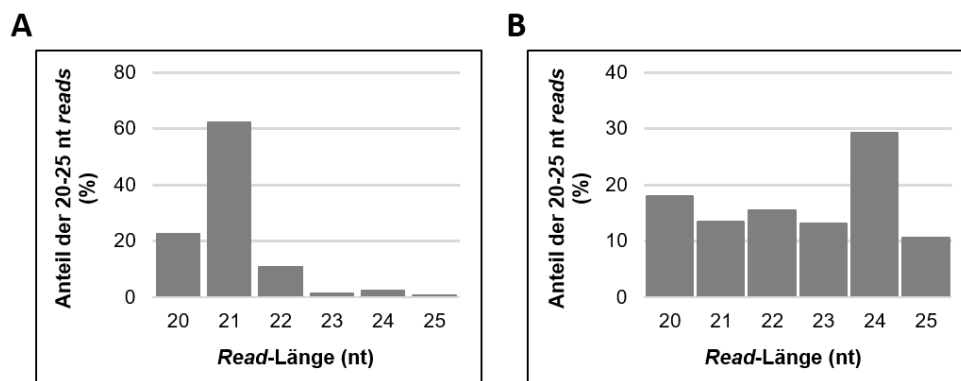


Abbildung 16: Größenverteilung von sRNAs (20-25 nt) nach Prozessierung *in vivo* transkribierter CMV-edsRNA in *S. cerevisiae*-Zell-extrakten

In vivo transkribierte CMV-edsRNA wurde in Hefe-Rohextrakten in sRNAs prozessiert. Verglichen wurden (**A**) *S. cerevisiae*-Rohextrakt, in dem *DCL4* heterolog exprimiert wurde, und (**B**) *S. cerevisiae* Wildtyp-Rohextrakt. Nach Prozessierung wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Fraktion der sRNAs mittels NGS analysiert. Es ist die jeweilige Verteilung der sRNAs im Größenbereich von 20-25 nt dargestellt.

Im Folgenden wurde eine detaillierte Analyse der verschiedenen Sequenzen der sRNAs durchgeführt. Hierbei wurde der Fokus auf 21 nt lange sRNAs gelegt. Basierend auf den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften des DCL4 wurde erwartet, dass die edsRNA in einem 21-Nukleotid-Raster prozessiert wird, was als *phased processing* bezeichnet wird (136,150). Zur Beurteilung der Daten wurde die Positionierung des 5'-Nukleotids der *reads* in Bezug auf die Gesamtlänge der edsRNA analysiert (**Abbildung 17**).

In der Coexpressionsprobe von *DCL4* und edsRNA (**Abbildung 17A**) konnten in den ersten 20 Nukleotiden der edsRNA-Sequenz kaum *reads* detektiert werden. Zwischen Nukleotidposition 20 und 40 zeigte sich hingegen eine ausgeprägte Hotspot-Region, in der einzelne Sequenzen bis zu 1700 *reads* aufwiesen. Im anschließenden Bereich traten nur vereinzelt *reads* auf, bevor zwischen Nukleotid 100 und 140 eine weitere Hotspot-Region identifiziert werden konnte. Die Anzahl an *reads* in diesem zweiten Hotspot lag jedoch deutlich unter denen der ersten Region. Insgesamt zeigte sich, dass die sRNA-Produktion nicht über

die gesamte Länge der edsRNA verteilt war, sondern sich primär auf zwei Hotspot-Regionen am 5'- und 3'-Ende der Sequenz konzentrierte. Zudem waren nahezu alle detektierten Peaks unspezifische sRNAs (orange). Dies deutet darauf hin, dass funktionelle esiRNAs (blau) nur in sehr geringem Maße generiert wurden und somit im DCL4-haltigen Extrakt kein eindeutiges *phased processing* beobachtet werden konnte (**Abbildung 17A**).

Zur Beurteilung des *phased processing* durch DCL4 im Hefeextrakt wurde ein Wildtyp-Hefeextrakt als Negativkontrolle herangezogen, der lediglich die edsRNA, nicht jedoch *DCL4*, exprimiert. Die Analyse erfolgte analog zur Coexpressionsprobe (**Abbildung 17B**). Interessanterweise zeigte sich auch in dieser Kontrollprobe ein vergleichbares Verteilungsmuster der 21 nt sRNA-*reads*. In den ersten 20 Nukleotiden wurden kaum *reads* detektiert, gefolgt von einer ausgeprägten Hotspot-Region zwischen den Nukleotidpositionen 20 und 40. Danach trat lediglich ein einzelner *read* bei Position 79 auf, bevor zwischen Nukleotid 100 und 140 eine zweite Hotspot-Region identifiziert wurde. Im Gegensatz zur Coexpressionsprobe war in der Negativkontrolle die Anzahl der jeweiligen *reads* im zweiten Hotspot höher als im ersten. Darüber hinaus war die maximale Anzahl der *reads* pro Sequenz mit 16 *reads* deutlich geringer als in der Coexpressionsprobe, was auf eine insgesamt niedrigere sRNA-Produktion im Wildtyp-Hefeextrakt ohne *DCL4*-Expression hinweist. Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch ohne *DCL4*-Expression ein analoges *processing* der edsRNA stattfindet, allerdings auf deutlich reduziertem Niveau. Dies könnte auf die Aktivität endogener ribonukleolytischer Enzyme in *S. cerevisiae* zurückzuführen sein, die in der Lage sind, dsRNA unspezifisch zu spalten.

Die Analyse der prozentualen Häufigkeit der esiRNAs bestätigte, dass kein *phased processing* der angebotenen edsRNA in die konstituierenden esiRNAs (pseudo-siR1, siR1172, siR1489, siR359, siR1020, siR2041 und siR380) durch DCL4 stattfand (**Abbildung 18A**). Einige esiRNAs, wie die siR1489, sowie die pseudo-siR1 wurden überhaupt nicht detektiert, während für die verbleibenden esiRNAs lediglich je ein Anteil von maximal 1,5 % an der Gesamtheit der 21 nt *reads* nachgewiesen werden konnte. Dies führte zum Ergebnis, dass der Anteil unspezifischer, 21 nt langer sRNAs mehr als 95 % betrug. Zudem konnte lediglich für siR2041 beide Stränge detektiert werden, während bei allen anderen esiRNAs höchstens einer der beiden Stränge detektiert wurde.

Des Weiteren wurde die Analyse der prozentualen Häufigkeit der esiRNAs auch für die Negativkontrolle durchgeführt, bei der lediglich die edsRNA, nicht jedoch *DCL4*, exprimiert wurde (**Abbildung 18B**). In dieser Probe konnten ebenfalls nicht alle funktionalen esiRNAs detektiert werden, sondern lediglich einzelne Stränge der esiRNAs siR1020, siR2041 und siR380. Auffällig war dabei allerdings ein deutlich höherer prozentualer Anteil dieser esiRNAs im Vergleich zur Coexpressionsprobe, trotz fehlender *DCL4*-Aktivität. Bei der Betrachtung der

absoluten Anzahl der *reads* fällt allerdings auf, dass die Gesamtmenge der detektierten esiRNAs im *DCL4*-haltigen Extrakt deutlich höher war (**Abbildung 17**).

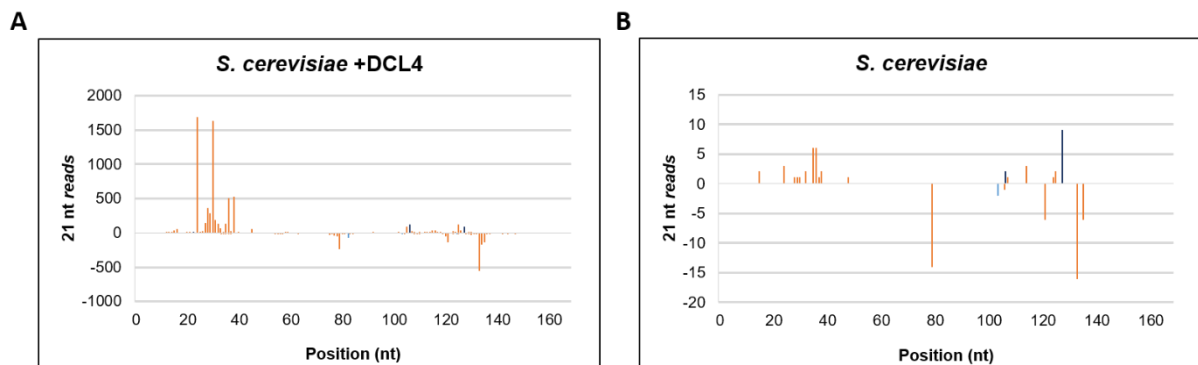


Abbildung 17: Verteilung der 21 nt langen *reads* über die Gesamtlänge der edsRNA

Darstellung der Häufigkeit der sRNA-*reads* des **(A)** DCL4-haltigen Hefe-Rohextraktes und **(B)** des Wildtyp-Hefe-Rohextraktes. Die Peaks repräsentieren die Position des 5'-Nukleotids der sRNA in Bezug auf die edsRNA. *Reads*, welche einer esiRNA entsprechen, sind blau hervorgehoben und unspezifische *reads* orange markiert. Die Werte oberhalb der X-Achse entsprechen *reads* des einen und die Werte unterhalb der X-Achse denen des anderen edsRNA-Stranges. Die negativen Zahlen sind als Beträge zu verstehen.

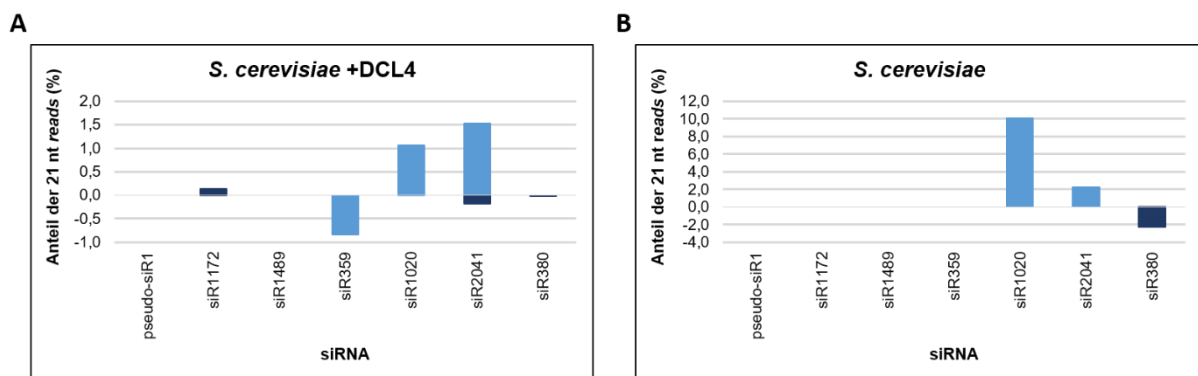


Abbildung 18: Anteil der 21 nt esiRNA *reads* an der Gesamtheit der 21 nt sRNA *reads*

Darstellung des Anteils der einzelnen *guide*- (dunkelblau) und *passenger*-Stränge (hellblau) der esiRNAs, welche ausgehend von der originär exprimierten dsRNA generiert wurden, an der jeweiligen Gesamtheit der 21 nt *reads* für den **(A)** DCL4-haltigen Hefe-Rohextrakt und **(B)** den Wildtyp-Hefe-Rohextrakt. Die esiRNAs sind nach ihrer Position auf der edsRNA angeordnet. Die Werte oberhalb der X-Achse entsprechen *reads* des einen und die Werte unterhalb der X-Achse denen des anderen edsRNA-Stranges. Die negativen Zahlen sind als Beträge zu verstehen.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass *DCL4* grundsätzlich funktional in *S. cerevisiae* exprimiert wird. Dennoch erscheint eine Coexpression von *DCL4* und edsRNA in der hier verwendeten Konstellation nicht für eine direkte Anwendung hitzeinaktivierter Hefe

zur Schädlingsbekämpfung geeignet, da die edsRNA, im Gegensatz zur Situation im Pflanzenextrakten, nicht bevorzugt in ihre konstituierenden esiRNAs prozessiert wird (67). Daher wurden *in-vivo*-Versuche mit einem *S. cerevisiae*-Stamm durchgeführt, der zwar edsRNA, jedoch kein *DCL4* exprimiert, um zu prüfen, ob unter diesen Bedingungen eine alternative Prozessierung der edsRNA und ein daraus resultierender Gen-*silencing*-Effekt im Zielorganismus erreicht werden können - selbst bei vergleichsweise geringer edsRNA-Menge. Zudem konnte Knoblich *et al.* zeigen, dass bereits geringe Mengen an esiRNAs aufgrund ihrer ausgeprägten Wirksamkeit ausreichen, um in Pflanzen einen effektiven Schutz gegenüber viralen Pathogenen zu vermitteln (67).

3.3 Anwendung von dsRNA-exprimierenden Hefen zur biotechnologischen Schädlingskontrolle im Labormaßstab

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass edsRNA in *S. cerevisiae* generiert werden kann. Es bleibt jedoch unklar, ob die Menge an RNA für praktische Anwendungen geeignet ist. In der wissenschaftlichen Literatur gibt es bereits Angaben zur erforderlichen Menge an dsRNA, die für eine erfolgreiche Bekämpfung ausgewählter Schadinsekten mittels RNAi notwendig sind (155,156). Aufbauend auf Ergebnissen von M.Sc. Juliane Schulz wurden daher Experimente zur Anwendung von edsRNA-produzierenden Hefen gegen den Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*, CPB) durchgeführt.

In ihrer Arbeit konzentrierte sich M.Sc. Juliane Schulz auf die Identifizierung von esiRNAs gegen die mRNA der 20S-Proteasomen-Untereinheit Beta 5 (*PSMB5*) des Kartoffelkäfers, ein essenzielles Gen für die Bildung des 20S-Proteasoms. Zudem entwarf sie eine spezifische edsRNA und testete deren Wirksamkeit im Vergleich zu einer bereits in den USA zugelassenen dsRNA (Calantha™, GreenLight Biosciences), die ebenfalls gegen diese Target-RNA des Kartoffelkäfers gerichtet ist. Die von ihr durchgeführten Experimente zeigten, dass bereits Mengen an dsRNA im Nanogrammbereich (ca. 35 fmol edsRNA) ausreichen um den Kartoffelkäfer zu töten. Diese Ergebnisse waren vielversprechend und legten nahe, dass möglicherweise auch Hefen, die nur geringe Mengen an edsRNA produzieren, angewendet werden können, um den Kartoffelkäfer erfolgreich zu bekämpfen.

3.3.1 Inaktivierung der Hefe zur sicheren Verbreitung in der Umwelt

Für die geplanten Anwendungsexperimente war es erforderlich, die Hefe als GMO vor der Freisetzung in die Umwelt zu inaktivieren. Basierend auf der einschlägigen Literatur wurde entschieden, die Hefe durch Hitzebehandlung zu inaktivieren. In diesem Zusammenhang wurden sowohl der Wildtyp-Hefestamm als auch Hefe, die mit dem Modell-edsRNA-GAL1-Konstrukt transformiert war, untersucht. Zwei unterschiedliche Inaktivierungstemperaturen (60 °C und 70 °C) sowie drei verschiedene Inkubationszeiten (5 min, 10 min, 30 min) wurden getestet. Für jede Kombination von Temperatur und Inkubationszeit wurden 4 OD-Einheiten der Hauptkultur verwendet.

Eine Probe diente zum Nachweis der erfolgreichen Inaktivierung, die anhand des fehlenden Wachstums auf Nährboden überprüft wurde, während die zweite Probe zur Bestätigung der Integrität der edsRNA nach der Inaktivierung herangezogen wurde. Die Proben, die zum Nachweis der Stabilität der edsRNA dienten, wurden nach der jeweiligen Inaktivierungszeit zentrifugiert und die Zellpellets bei - 20 °C gelagert. Parallel dazu wurden die Proben für den Nachweis der Zellviabilität in einer Verdünnungsreihe auf Nährboden ausgestrichen und

anschließend bei 30 °C inkubiert. Die Ergebnisse des Hitzeinaktivierungstests sind in **Abbildung 19** dargestellt.

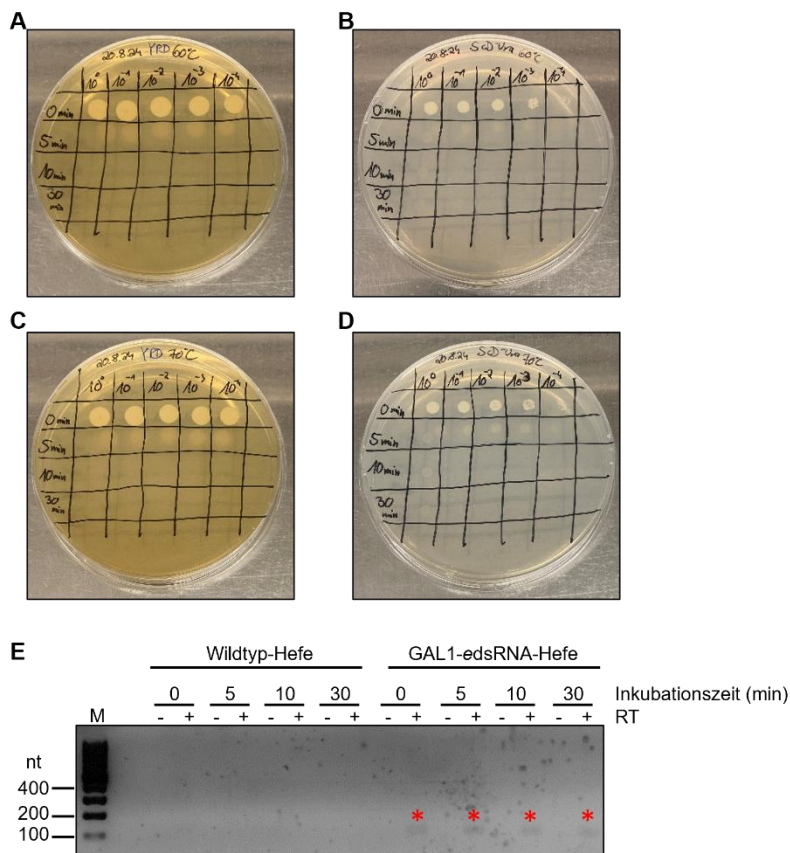


Abbildung 19: Inaktivierung von *S. cerevisiae* und Überprüfung der edsRNA-Integrität

Wildtyp-Hefe (**A, C**) und mit dem GAL1-edsRNA-Konstrukt transformierte Hefe (**B, D**) wurden durch Hitzebehandlung inaktiviert. Die Inaktivierung wurde bei zwei unterschiedlichen Temperaturen, 60 °C (**A, B**) und 70 °C (**C, D**) durchgeführt und es wurden jeweils drei Zeitpunkte (5 min, 10 min und 30 min) untersucht. Die Auftragung der Proben erfolgte in einer Verdünnungsreihe (10⁰–10⁴). (**E**) Überprüfung der edsRNA-Integrität mittels RT-PCR. Es wurde jeweils eine Probe mit (+) und ohne (-) Reverse Transkriptase (RT) analysiert. Die Proben wurden in einem 1%igen denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und es wurden 2 µl 100 bp Plus DNA Ladder als Marker (M) für die Zuordnung der Banden verwendet.

Die Ergebnisse der Hitzebehandlung zeigen eindeutig, dass bereits eine 5-minütige Inkubation bei 60 °C ausreicht, um die Hefe vollständig zu inaktivieren (**Abbildung 19A und 19B**). Diese Methode erweist sich als einfach, schnell, kostengünstig und praktisch für die Anwendung. Um jedoch sicherzustellen, dass sämtliche Hefezellen inaktiviert werden, erscheint es sinnvoll, die Behandlung bei 70 °C durchzuführen. Da es jedoch ebenso wichtig ist, dass die transkribierte edsRNA während der Hitzebehandlung nicht degradiert oder zerstört wird, ist der Nachweis ihrer Integrität nach der Behandlung von entscheidender Bedeutung. Zu diesem Zweck wurde

aus den bei 70 °C behandelten und bei -20 °C gelagerten Proben RNA extrahiert und anschließend eine RT-PCR durchgeführt (**Abbildung 19E**). Die verwendeten Primer sind dem Anhang zu entnehmen (s. 7.4). Während in den Proben der Wildtyp-Hefe keine Bande für die edsRNA detektiert werden konnte, zeigten die Proben des mit dem GAL1-Konstrukt transformierten Hefestamms, unabhängig von der Behandlungsdauer, eine eindeutige Bande für die edsRNA. Da die PCR keine quantitative Aussage über die Menge des Templates angibt, wurde zusätzlich eine qPCR mit den synthetisierten cDNAs der Proben durchgeführt. Diese zeigte vergleichbare C_T -Werte für alle Proben, was auf eine gleiche Menge an Template und somit an edsRNA hindeutet (s. **Tabelle 18**, im Anhang gezeigt).

Diese Ergebnisse belegen, dass eine 5-minütige Hitzebehandlung bei 70 °C ausreichend ist, um die genetisch modifizierten Hefen zu inaktivieren, ohne die Integrität der edsRNA zu beeinträchtigen.

3.3.2 Klonierung und Herstellung der (e)dsRNA-Konstrukte für *in-vivo*-Experimente gegen CPB

Im bisherigen Verlauf der Arbeit wurde mit einem Modell der edsRNA gegen das Pflanzenvirus CMV gearbeitet. Die in dieser dsRNA vorliegenden esiRNAs weisen jedoch erwartungsgemäß keine Sequenzhomologie zum CPB auf. Aus diesem Grund wurden die von M.Sc. Juliane Schulz identifizierten esiRNAs gegen *PSMB5* in ähnlicher Weise wie beim Modellkonstrukt 2.1 (s. Abbildung 6C), das unter der Kontrolle des GAL1-Promotors steht, zu einem edsRNA-Konstrukt zusammengefügt. Die Synthese der Plasmide wurde bei dem Unternehmen Eurofins in Auftrag zu geben. Aufgrund der Komplexität des Konstrukts wurde dieses in zwei Teile segmentiert. Die Teilung erfolgte an einer Poly-A-Sequenz innerhalb des Actin-Introns. Die Fragmente wurden von dem Unternehmen direkt mit gewünschten Restriktionsschnittstellen in einen pUC57-Vektor kloniert.

Die Klonierung des Haarnadel-Konstrukts sollte analog zum CMV-Konstrukt in den hefespezifischen Vektor pYES erfolgen. Hierfür wurde *upstream* eine HindIII-Erkennungssequenz und *downstream* eine SphI-Erkennungssequenz benötigt. Um die beiden Teile des Konstrukts ohne die Einführung zusätzlicher Nukleotide zusammenzufügen, wurden Restriktionsenzyme verwendet, die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden. Dies führte zur folgenden Anordnung: Der erste Teil des Haarnadel-Konstrukts besaß *upstream* eine HindIII-Restriktionsschnittstelle und *downstream* eine Bpil-Restriktionsschnittstelle. Der zweite Teil des Haarnadel-Konstrukts wies *upstream* eine Bpil- und *downstream* eine SphI-Restriktionsschnittstelle auf.

Zusätzlich zum edsRNA-Haarnadel-Konstrukt gegen CPB wurden zwei weitere Konstrukte generiert: ein Haarnadel-Konstrukt, das die dsRNA-Sequenz des kommerziell erhältlichen Bioinsektizids Calantha™ enthielt, sowie ein weiteres Konstrukt mit einem Abschnitt einer

dsRNA-Sequenz gegen *Firefly*-Luciferase. Diese Konstrukte dienten der Herstellung der Positivkontrolle (dsRNA mit Sequenz des kommerziell erhältlichen Bioinsektizids Calantha™) bzw. Negativkontrolle (dsRNA mit Sequenzabschnitt gegen *Firefly*-Luciferase), wobei im weiteren Verlauf die Begriffe Positivkontrolle und Negativkontrolle synonym für die entsprechenden dsRNA-Moleküle verwendet werden. Die Positivkontrolle diente als Vergleich zur Bewertung der Wirksamkeit der Behandlung gegen CPB, während die Negativkontrolle als unspezifische Kontrolle verwendet wurde. Diese beiden Konstrukte waren identisch zum dsRNA-Haarnadel-Konstrukt aufgebaut und wurden für die Klonierung ebenfalls zunächst in zwei Teile aufgeteilt. Beim Konstrukt zur Generierung der Negativkontrolle mussten jedoch anstelle von Bpil-Restriktionsschnittstellen Bsal-Schnittstellen verwendet werden, da die ausgewählte dsRNA-Sequenz der Luciferase bereits mehrere Bpil-Schnittstellen enthielt.

Für die Klonierung in den Hefvektor pYES wurde dieser zunächst mit den Restriktionsenzymen HindIII und SphI verdaut. Um eine unerwünschte Religation des Vektor-*backbones* zu verhindern, erfolgte anschließend eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase, die die Dephosphorylierung der Enden sicherstellte. Die beiden Teile der Konstrukte wurden separat mit den passenden Restriktionsenzymen (HindIII, Bpil, Bsal, SphI) geschnitten und anschließend elektrophoretisch vom pUC57-*backbone* getrennt.

Im nächsten Schritt wurde nach einer Gelextraktion der gewünschten Fragmente eine Ligation der beiden geschnittenen Fragmente des Haarnadel-Konstrukts mit dem ebenfalls geschnittenen pYES-*backbone* durchgeführt. Nach der erfolgreichen Ligation der Fragmente erfolgte die Transformation in *E. coli* TOP10-Zellen. Um die Anwesenheit der gewünschten Konstrukte in den transformierten Bakterien zu überprüfen, wurden ausgewählte Kolonien mittels Kolonie-PCR analysiert. Von jedem Konstrukt wurde anschließend DNA aus den positiven Klonen extrahiert und einem Testverdau unterzogen, um die korrekte Integration der Fragmente zu bestätigen. Nach erfolgreicher Überprüfung der Konstrukte durch den Testverdau wurde eine Sequenzierung durchgeführt, um die Integrität der Konstrukte sicherzustellen und eventuelle Mutationen auszuschließen.

Daraufhin erfolgte zur Überprüfung der *in-vivo*-Transkription der (e)dsRNA eine Transformation von auxotrophen Hefezellen (CEN.PK2-1C) mit den jeweiligen Konstrukten. Um die Zellteilung zu fördern und eine einheitliche Kopienanzahl der Plasmide in verschiedenen Klonen sicherzustellen (s. Abbildung 11), wurden die Kolonien mehrfach umgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Dadurch bestand kein Bedarf, mehrere Klone für jedes Konstrukt analysieren zu müssen, sodass ein Klon-unabhängiges Experiment durchgeführt werden konnte. Aufgrund der erwarteten erhöhten Variabilität zwischen den Individuen bei den *in-vivo*-Experimenten war es notwendig, größere Mengen an Hefekulturen bereitzustellen. Daher wurden für die Produktion der (e)dsRNAs 250 ml Hauptkulturen von *S. cerevisiae* verwendet (s. 2.5.16). Nach der Induktion der Transkription für circa 28 Stunden wurden die

Hefezellen durch Hitzebehandlung inaktiviert. Daraufhin erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA und die Synthese der cDNA durch reverse Transkription. Anschließend wurde die Menge der (e)dsRNA, basierend auf dem zugrunde liegenden DNA-Template, mittels qPCR bestimmt. Diese Quantifizierung ist von zentraler Bedeutung, da die Mengen der (e)dsRNA je nach Konstrukt variieren können, aber für eine Vergleichbarkeit im *in-vivo*-Experiment annähernd gleich sein müssen. Für eine exakte Quantifizierung wurde ein Standard benötigt, weshalb die jeweiligen (e)dsRNAs durch *in-vitro*-Transkription der Einzelstränge und anschließender Hybridisierung hergestellt und verwendet wurden (siehe 3.2.5). Die Primer für die cDNA-Synthese und die qPCR sind dem Anhang zu entnehmen (s. 7.4). Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in **Abbildung 20** dargestellt.

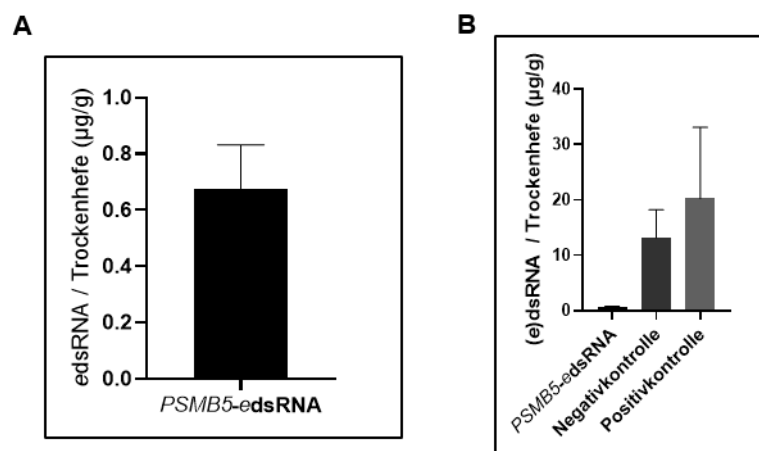


Abbildung 20: Quantifizierung der (e)dsRNA der Hefeproben für das *in-vivo*-Experiment

Analyse der (e)dsRNA-Quantität von je 15 OD-Einheiten Hefeproben nach cDNA-Synthese mittels qPCR. Es wurden jeweils drei technische Replikate durchgeführt und für die Quantifizierung der jeweilige edsRNA-Standard verwendet. Gezeigt sind der Mittelwert sowie die Standardabweichung der Replikate. (A) Quantität der edsRNA, welche gegen *PSMB5* des CPB gerichtet ist. (B) Vergleich der edsRNA-Quantität mit der Quantität der Negativ- und Positivkontrolle. Die Darstellung der Abbildungen erfolgte mit GraphPad Prism.

Die Analyse zeigt zunächst, dass alle (e)dsRNAs erfolgreich generiert wurden, was die Funktionalität des zugrunde liegenden Prinzips zur Produktion von dsRNA in Hefe bestätigt. Bei näherer Betrachtung der Daten wird jedoch deutlich, dass die Mengen der transkribierten (e)dsRNAs stark variieren. Während die Menge der gegen *PSMB5* gerichteten edsRNA der Menge der CMV-Modell-edsRNA entsprach, wurden bei den beiden anderen dsRNAs deutlich höhere Mengen detektiert. Die Negativkontrolle (dsRNA mit Sequenzabschnitt gegen *Firefly*-Luciferase) wies eine Konzentration auf, die etwa das 20-fache der *PSMB5*-edsRNA betrug (13 µg/g Trockenhefe vs. 0,675 µg/g Trockenhefe bzw. 48 pmol/g Trockenhefe vs. 3,82 pmol/g Trockenhefe). Noch stärker war der Unterschied bei der Positivkontrolle (dsRNA mit Sequenz

des kommerziell erhältlichen Bioinsektizids Calantha™), die mit einer Menge von 20 µg/g Trockenhefe (64 pmol/g Trockenhefe) sogar das 30-fache der *PSMB5*-edsRNA-Konzentration erreichte.

Diese erheblichen Unterschiede in den Mengen könnten auf die unterschiedlichen Längen der (e)dsRNAs zurückzuführen sein. Längere dsRNA-Moleküle, wie bei der Positiv- und der Negativkontrolle, sind potenziell stabiler, was eine höhere Anreicherung in der Hefe erklären könnte. Um die Mengen der unterschiedlichen (e)dsRNAs für die *nachfolgenden in-vivo*-Experimente vergleichbar zu gestalten, war eine Reduktion der dsRNA-Konzentrationen erforderlich. Hierzu wurden die Hefeproben, die die Negativ- bzw. Positivkontrolle enthielten, mit Hefeproben gemischt, welche lediglich den Hefe-Leervektor beinhalten. Dadurch konnten die Konzentrationen der Positiv- bzw. Negativkontrolle auf das Niveau der *PSMB5*-edsRNA angepasst werden.

Weiterhin sahen die experimentellen Rahmenbedingungen des *in-vivo*-Versuchs vor, dass ein Teilstück eines Kartoffelpflanzenblatts von definierter Größe (1 cm und 1,5 cm Durchmesser) mit einer Hefesuspension benetzt wurde. Im Anschluss wurde auf jedes behandelte Blatt ein Kartoffelkäfer im zweiten Larvenstadium platziert. In Vorversuchen hatte sich jedoch gezeigt, dass die Larven der Kartoffelkäfer Blätter, die mit einer dickflüssigen Hefesuspension behandelt worden waren, weitgehend mieden und keinen nennenswerten Fraß aufwiesen. Daher wurde die Hefesuspension final im Verhältnis 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt, um einen ausreichenden Fraß zu gewährleisten (s. **Abbildung 21**).



Abbildung 21: Ausgestanzte Blattscheibe eines Kartoffelpflanzenblatts mit Hefesuspension

Beispielhafte Darstellung einer ausgestanzten Blattscheibe eines Kartoffelpflanzenblatts nach Applikation der Hefesuspension.

3.3.3 Versuchsaufbau des CPB-Experiments

Die *in-vivo*-Experimente wurden von M.Sc. Juliane Schulz im Biotestlabor der BTL Bio-Test Labor GmbH in Sagerheide durchgeführt, welches über die notwendige Ausstattung und Expertise für derartige Biotests verfügt. Der detaillierte Versuchsaufbau ist in **Abbildung 22** dargestellt.

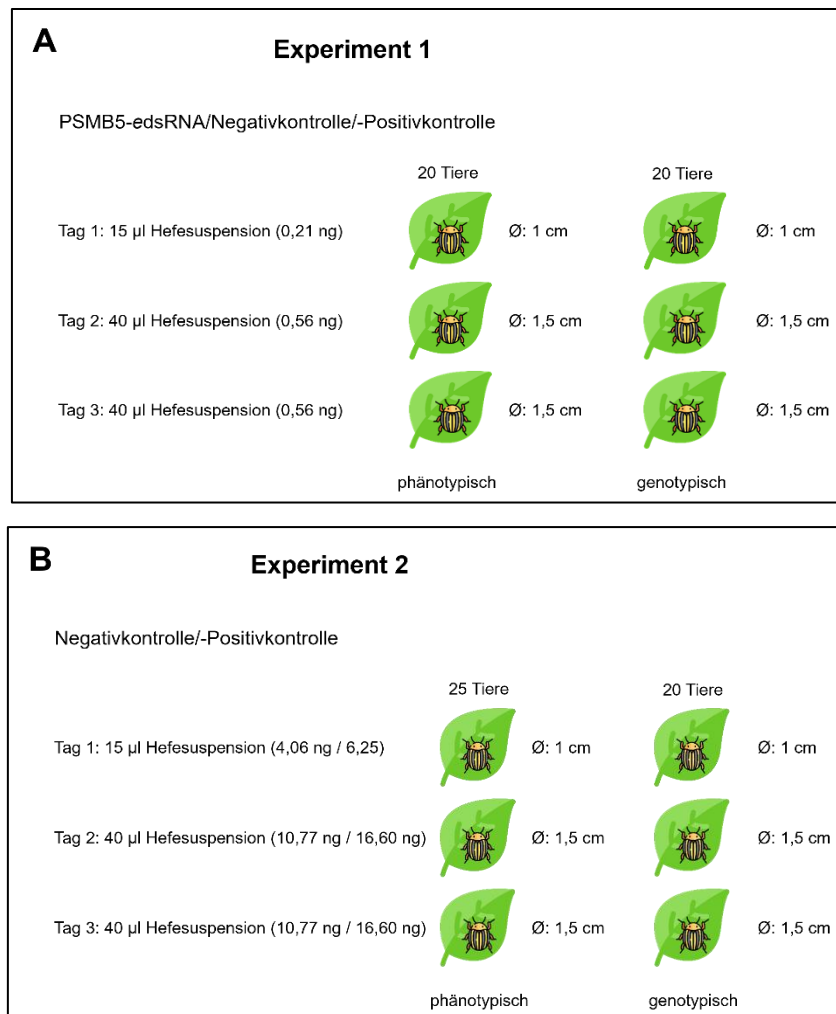


Abbildung 22: Versuchsaufbau der (e)dsRNA-Applikation gegen CPB

(A) Versuchsaufbau zur Vergleichsanalyse der Effektivität von edsRNA und Negativ/Positivkontrolle. (B) Versuchsaufbau zur Untersuchung der maximal möglichen Mengen an Positivkontrolle. In beiden Experimenten wurde die Hefefutterlösung an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils auf frische Blätter von Kartoffelpflanzen appliziert. Der Effekt der Behandlung mit (e)dsRNA wurde sowohl auf phänotypischer als auch auf genotypischer Ebene untersucht. Zur Bewertung physiologischer und morphologischer Veränderungen dienten die phänotypischen Parameter Blattfraß, Larvengröße und Mortalität. Die genotypische Analyse erfolgte durch die Quantifizierung der Expression der Target-mRNA *PSMB5* nach reverser Transkription mittels qPCR. Die hierfür eingesetzten Kartoffelkäfer wurden am vierten Versuchstag eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt für die qPCR-Analyse herangezogen.

Das *in-vivo*-Experiment war in zwei Teile gegliedert, um die Effekte unterschiedlicher Mengen dsRNA auf die Zielorganismen zu analysieren. Im ersten Experiment wurde ein Vergleich zwischen der edsRNA-Variante und den Konstrukten zur Generierung der Kontrollen durchgeführt, wobei die Mengen der eingesetzten Kontrollen auf das Niveau der edsRNA angeglichen wurden (s. 3.3.2). Ziel dieses Experiments war es, mögliche Unterschiede in der Wirkung der edsRNA im Vergleich zur Positivkontrolle zu identifizieren. Im zweiten Experiment

hingegen wurden die maximalen Menge der Positiv- bzw. Negativkontrolle verabreicht, ohne eine Verdünnung mit einer Hefeprobe, die einen Leervektor enthielt. Dies ermöglichte eine Untersuchung der Effektivität der dsRNA bei höherer Konzentration.

Für die Experimente wurden 40 bzw. 45 Versuchstiere verwendet, die in zwei Gruppen aufgeteilt wurden: eine Gruppe zur phänotypischen und eine zur genotypischen Analyse. Für die phänotypische Analyse wurden die Parameter Blattfraß, Larvengröße und Sterberate herangezogen, um potenzielle Veränderungen in der physiologischen und morphologischen Reaktion zu bewerten. Die genotypische Analyse basierte auf der Bestimmung des Expressionslevels der Target-mRNA *PSMB5* nach reverser Transkription mittels qPCR. Diese Methodenkombination ermöglichte eine präzise Korrelation zwischen den beobachteten phänotypischen Effekten und den zugrunde liegenden genotypischen Veränderungen.

Die für die genotypische Analyse der *PSMB5*-Target-RNA eingesetzten Tiere wurden am vierten Tag eingefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt mittels qPCR untersucht zu werden. Im Rahmen der phänotypischen Analyse wurden die Tiere über einen Zeitraum von elf Tagen beobachtet, wobei die Sterberate an den jeweiligen Tagen systematisch erfasst wurde. Der Verabreichungsplan für die dsRNA erstreckte sich über einen Zeitraum von drei Tagen. Am ersten Tag wurden 15 µl der Hefesuspension auf eine ausgestanzte Blattscheibe eines Kartoffelpflanzenblatts (1 cm Durchmesser) appliziert und an den folgenden zwei Tagen je 40 µl Suspension auf eine frisch ausgestanzte Blattscheibe eines Kartoffelpflanzenblatts (1,5 cm Durchmesser). Die Mengen an dsRNA, die im ersten Experiment verabreicht wurden, betrugen etwa 0,21 ng an Tag 1 und 0,56 ng an den Tagen 2 und 3. Diese Dosierung erlaubte es, die Effekte bei einer moderaten Konzentration zu untersuchen und Unterschiede zwischen der edsRNA und der Positivkontrolle zu evaluieren. Im zweiten Experiment wurde die Dosierung erhöht, sodass an Tag 1 etwa 4,06 ng (Negativkontrolle) bzw. 6,25 ng (Positivkontrolle) und an den Tagen 2 und 3 circa 10,77 ng (Negativkontrolle) bzw. 16,6 ng (Positivkontrolle) dsRNA verabreicht wurden. Dieser signifikante Anstieg der Menge zielte darauf ab, eine maximal mögliche Wirkung mit der verfügbaren dsRNA-Konzentration zu erzielen.

3.3.4 Phänotypische Analyse

Im Rahmen des Vergleichsexperiments wurden Käferlarven über einen Zeitraum von elf Tagen untersucht, wobei die Fütterung mit Hefe, die dsRNA in Konzentrationen im unteren Nanogrammbereich enthielt (Tag 1: 0,21 ng bzw. Tag 2/3: 0,56 ng), ausschließlich an den ersten drei Tagen erfolgte. Zur Beurteilung der Effekte wurden die phänotypischen Auswirkungen in Form der Überlebensrate dokumentiert (**Tabelle 16**) und mithilfe von Kaplan-Meier-Diagrammen visualisiert (**Abbildung 23**). Es konnten zwei zentrale Ergebnisse beobachtet werden: Erstens zeigte die Negativkontrollgruppe, die mit unspezifischer dsRNA

gegen *Firefly*-Luciferase behandelt wurde, im Vergleich zur Wasserkontrollgruppe eine erhöhte Mortalität. Diese ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Larven die Hefesuspension als Futter weniger bereitwillig konsumierten, was zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme und in der Folge zu einer erhöhten Sterblichkeit führte. Es ist zudem denkbar, dass der beobachtete Effekt zumindest teilweise auf eine intrinsische toxische Wirkung der Hefe gegenüber CPB zurückzuführen ist. Zweitens wiesen die Larven, die mit der *PSMB5*-edsRNA behandelt wurden, insbesondere in den ersten vier Tagen eine erhöhte Mortalität im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (dsRNA mit Sequenz des kommerziell erhältlichen Bioinsektizids Calantha™ und dsRNA mit Sequenzabschnitt gegen *Firefly*-Luciferase) auf. Bemerkenswert war zudem, dass die Positivkontrolle, die einen bereits zugelassenen Wirkstoff repräsentiert, mit einer Überlebensrate von 85 % bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nur eine geringe Mortalität verursachte, während in der mit edsRNA behandelten Versuchsgruppe lediglich eine Überlebensrate von 55 % erreicht wurde (**Abbildung 23**).

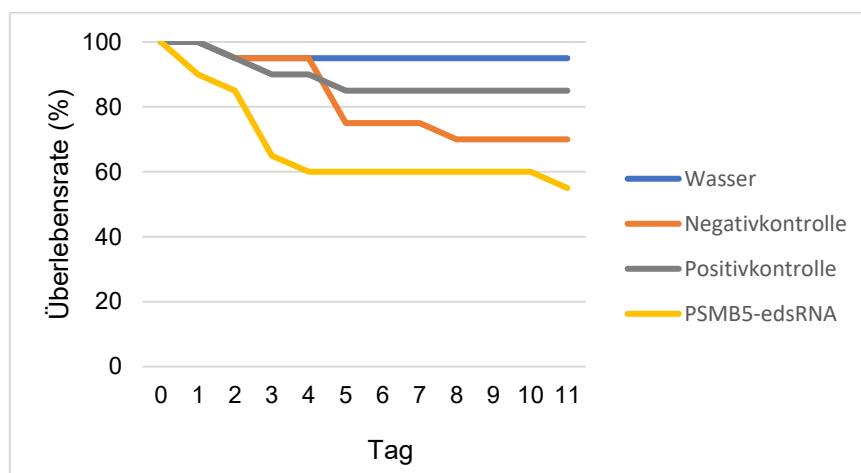


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Diagramm der Behandlung von Kartoffelkäferlarven mit (e)dsRNAs

Darstellung der prozentualen Überlebensrate der Kartoffelkäferlarven (n=20) über einen Zeitraum von elf Tagen nach dreitägiger Fütterung mit Hefe, die dsRNA enthielt. An Tag 1 wurden 0,21 ng (e)dsRNA und an Tag 2 und 3 0,56 ng (e)dsRNA verabreicht. Abgebildet sind Kaplan-Meier-Kurven für vier Behandlungsgruppen: Wasserkontrolle, edsRNA gegen *PSMB5*, Negativkontrolle (dsRNA mit Sequenzabschnitt gegen *Firefly*-Luciferase) und Positivkontrolle (dsRNA mit Sequenz des kommerziell erhältlichen Bioinsektizids Calantha™).

Tabelle 16: Überlebensrate des Kaplan-Meier-Diagramms aus Abbildung 23

Tag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Wasser	100%	100%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%
Negativkontrolle	100%	100%	95%	95%	95%	75%	75%	75%	70%	70%	70%	70%
Positivkontrolle	100%	100%	95%	90%	90%	85%	85%	85%	85%	85%	85%	85%
<i>PSMB5</i> -edsRNA	100%	90%	85%	65%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	55%

Zusätzlich zur erhöhten Mortalität bei der edsRNA-Behandlung wurden bereits an Tag vier Größenunterschiede zwischen den Gruppen beobachtet. Larven, die mit Hefe behandelt wurden, die aktive Wirkstoffe enthielt (Positivkontrolle und *PSMB5*-edsRNA), waren kleiner als die Tiere der Wasserkontroll- und Negativkontrollgruppe (**Abbildung 24**). Alle mit Hefe behandelten Individuen zeigten zudem initial eine reduzierte Fraßaktivität. Im weiteren Verlauf des Experiments nahm diese jedoch sukzessive zu, sodass das Fressverhalten der behandelten Larven ab dem siebten Versuchstag dem der Wasserkontrollgruppe weitgehend entsprach. Darüber hinaus erholten sich die meisten Tiere nach der Hefeapplikation, sodass in späteren Entwicklungsstadien kaum noch Unterschiede in der Körpergröße im Vergleich zur Wasserkontrollgruppe festzustellen waren. Eine Ausnahme bildeten jedoch sechs der insgesamt zwölf überlebenden Larven der edsRNA-Behandlung, die ein deutlich verringertes Wachstum und eine geringe Fraßaktivität aufwiesen. Am elften und letzten Tag des Experiments war die Größe der meisten Larven vergleichbar, unabhängig von der Behandlung. Allerdings fielen vier Larven der edsRNA-Applikationsgruppe weiterhin durch ihre deutlich geringere Größe auf (**Abbildung 25D**). Die übrigen acht Larven dieser Gruppe hatten hingegen eine Größe erreicht, die jener der Wasserkontrollgruppe entsprach (**Abbildung 25E**). Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass nahezu alle überlebenden Individuen in der Lage waren, sich von den Auswirkungen der Hefeapplikation zu erholen und dass das stark verringerte Wachstum der vier Individuen vermutlich direkt auf die edsRNA-Behandlung zurückgeführt werden kann.

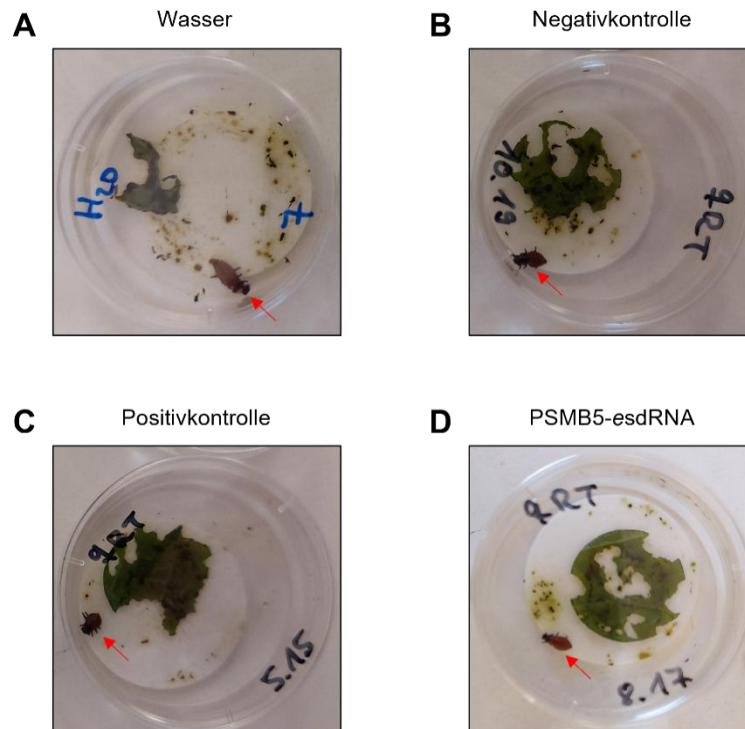


Abbildung 24: Phänotyp von Kartoffelkäferlarven im Vergleichsexperiment am vierten Versuchstag

Repräsentative Bilder einzelner Kartoffelkäferlarven des Vergleichsexperiments am vierten Versuchstag. (A) Wasserkontrolle. (B) Negativkontroll-Behandlung. (C) Positivkontroll-Behandlung. (D) *PSMB5*-edsRNA-Behandlung

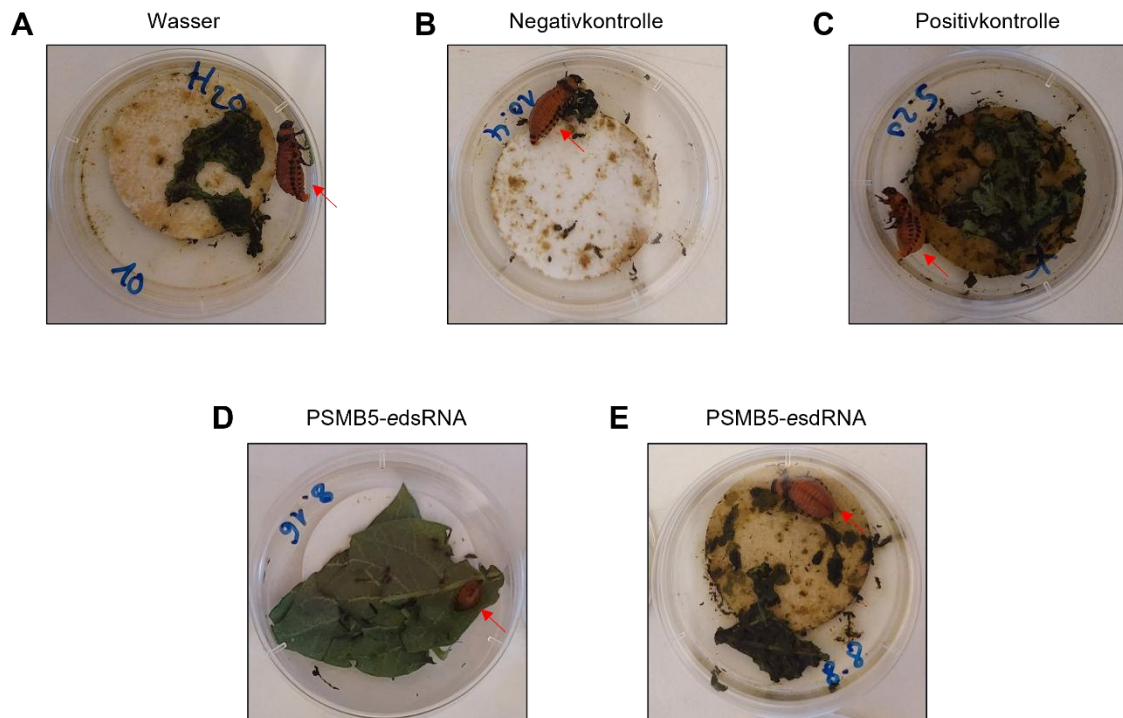


Abbildung 25: Phänotyp von Kartoffelkäferlarven im Vergleichsexperiment am elften Versuchstag

Repräsentative Bilder einzelner Kartoffelkäferlarven des Vergleichsexperiments am elften Versuchstag. (A) Wasserkontrolle. (B) Negativkontroll-Behandlung. (C) Positivkontrolle-Behandlung. (D, E) *PSMB5*-edsRNA-Behandlung.

Ein deutlicherer Effekt wurde im Experiment mit höherer Wirkstoffkonzentration in der Hefe beobachtet (**Abbildung 22B**). In diesem Versuch wurden sowohl die Negativkontrolle (dsRNA mit Sequenzabschnitt gegen *Firefly*-Luciferase) als auch die Positivkontrolle (dsRNA mit Sequenz des kommerziell erhältlichen Bioinsektizids Calantha™) in jeweils maximaler Konzentration eingesetzt. Die edsRNA, welche gegen *PSMB5* gerichtet ist, konnte in diesen Ansatz nicht einbezogen werden, da bereits im vorausgegangenen Vergleichsexperiment die höchstmögliche Konzentration dieser dsRNA verwendet wurde und diese deutlich geringer als die höchstmögliche Konzentration der Positiv- bzw. Negativkontrolle war. Das Kaplan-Meier-Diagramm verdeutlicht erneut, dass die Hefesuspension selbst einen Einfluss auf die Larven hat, da die Negativkontrolle am Ende des Experiments eine Sterberate von 36 % aufwies. Dies ist wiederum wahrscheinlich auf den reduzierten Fraß zurückzuführen. Ein markanter Unterschied zeigte sich jedoch bei den Käferlarven, die mit Hefe gefüttert wurden, welche die Positivkontrolle enthielt (**Abbildung 26**). Während die Unterschiede zwischen der Positivkontrolle und der Negativkontrolle zu Beginn des Experiments relativ gering waren, zeigte sich ab dem sechsten Tag ein deutlicher Anstieg der Mortalität in der Positivkontrollgruppe. Dieser Trend setzte sich fort und erreichte am siebten Versuchstag eine Mortalitätsrate von 100 %. Bemerkenswert ist, dass diese vollständige Mortalität durch die

Applikation der Positivkontrolle in einer sehr geringen Wirkstoffmenge im Nanogrammbereich ausgelöst wurde.

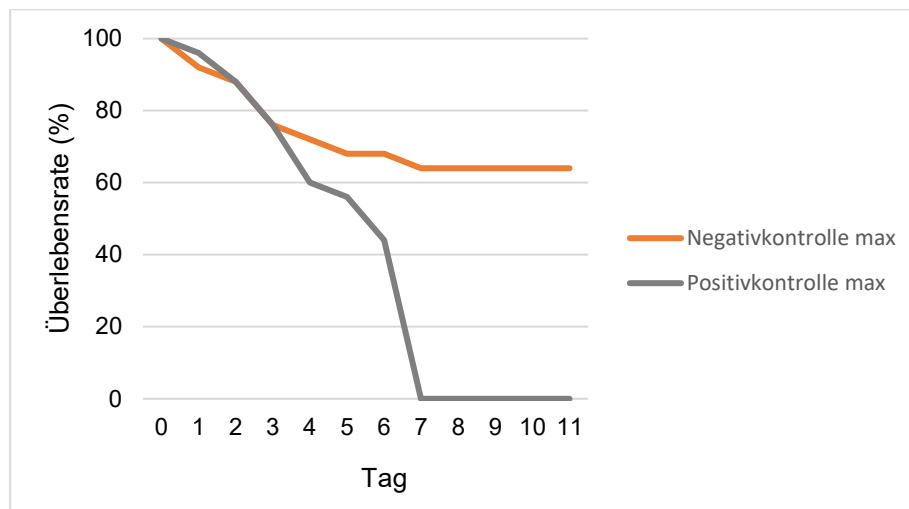


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Diagramm der Behandlung von Kartoffelkäferlarven mit maximaler dsRNA-Konzentration

Darstellung der prozentualen Überlebensrate der Kartoffelkäferlarven (n=25) über einen Zeitraum von elf Tagen nach dreitägiger Fütterung mit Hefe, die dsRNA enthält. An Tag 1 wurden 4,06 ng dsRNA (Negativkontrolle) bzw. 6,25 ng (Positivkontrolle) und an Tag 2 und 3 10,77 ng (Negativkontrolle) bzw. 16,6 ng (Positivkontrolle) verabreicht. Abgebildet sind Kaplan-Meier-Kurven für zwei Behandlungsgruppen: Negativkontrolle (dsRNA mit Sequenzabschnitt gegen *Firefly*-Luciferase) und Positivkontrolle (dsRNA mit Sequenz des kommerziell erhältlichen Bioinsektizids Calantha™).

Tabelle 17: Überlebensrate des Kaplan-Meier-Diagramms aus Abbildung 26

Tag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Negativkontrolle	100%	92%	88%	76%	72%	68%	68%	64%	64%	64%	64%	64%
Positivkontrolle	100%	96%	88%	76%	60%	56%	44%	0%	0%	0%	0%	0%

Bereits am vierten Tag des Experiments war ein messbarer Größenunterschied zwischen den Larven der Wasserkontrolle (dieselbe wie bei Experiment 1) und denen der Hefebehandlung festzustellen (**Abbildung 27A-C**). Nach dem Wechsel zu einer normalen Futterquelle erholten sich die Individuen der Negativkontrollgruppe (dsRNA mit Sequenzabschnitt gegen *Firefly*-Luciferase) sukzessive, die Individuen der Positivkontrollgruppe (dsRNA mit Sequenz des kommerziell erhältlichen Bioinsektizids Calantha™) jedoch nicht. Die Individuen der Negativkontrollgruppe zeigten für die gemessenen Parameter Wachstum und Fraßaktivität im zeitlichen Verlauf eine Annäherung an die Werte der Wasserkontrollgruppe (**Abbildung 27D,E**). Am Ende des Experiments wiesen alle überlebenden Larven der Negativkontrolle eine

vergleichbare Größe zu den Larven der Wasserkontrolle auf, sodass keine Unterscheidung mehr möglich war (**Abbildung 27G,H**).

Die Ergebnisse beider Experimente verdeutlichen den spezifischen Einfluss der Behandlung mit Hefe, die aktive Wirkstoffe wie *PSMB5*-dsRNA bzw. die Positivkontrolle enthält, auf das Wachstum der Larven sowie auf die damit verbundene Mortalität. Um aber auszuschließen, dass das verringerte Wachstum und die erhöhte Mortalität durch unspezifische Effekte verursacht wurden, wurde zusätzlich das Expressionsniveau der Target-mRNA (*PSMB5*) untersucht (3.3.5).

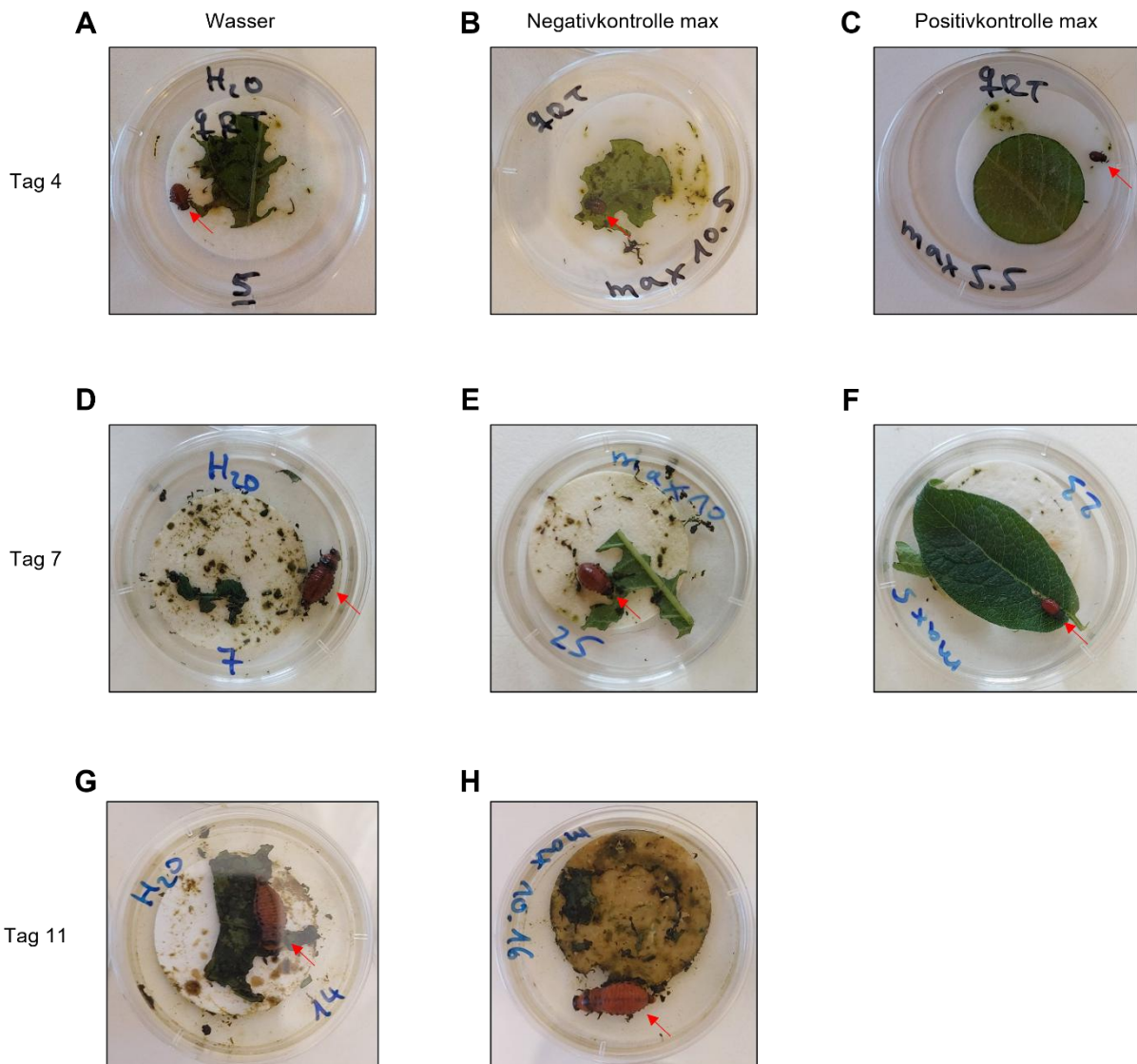


Abbildung 27: Repräsentative Bilder von Kartoffelkäferlarven nach Hefeapplikation mit maximaler dsRNA-Menge

Repräsentative Bilder einzelner Kartoffelkäferlarven am vierten (**A-C**), sechsten (**D-F**) und elften Versuchstag (**G, H**). (**A, D, G**) Wasserkontrolle. (**B, E, H**) Negativkontroll-Behandlung. (**C, F**) Positivkontroll-Behandlung.

3.3.5 Genotypische Analyse

Um die erhöhte Mortalität und das verringerte Wachstum der Käferlarven mit der durchgeführten Behandlung zu korrelieren, wurde das Niveau der Expression der Target-mRNA (*PSMB5*) nach reverser Transkription mittels qPCR analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Individuen am vierten Versuchstag durch M.Sc. Juliane Schulz eingefroren. Die Probenaufarbeitung erfolgte in zwei Gruppen mit jeweils fünf Individuen. Die Einteilung basierte darauf, dass für die Analyse nur Tiere ausgewählt wurden, die ein vergleichbares Fressverhalten zeigten. Im ersten Arbeitsschritt erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA (2.3.2.9). Anschließend wurde die verbliebene genomische DNA durch Behandlung mit dsDNase enzymatisch verdaut (2.3.2.13) und cDNA synthetisiert (2.3.2.14). Für die qPCR-Analyse wurden drei technische Triplikate pro Probe durchgeführt. Als Referenzgen diente das Gen des *ribosomal protein 18* (RP18), das in zuvor veröffentlichten Studien erfolgreich verwendet wurde. Zur Bestimmung der Veränderung des Niveaus der Expression wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode herangezogen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in **Abbildung 28** dargestellt.

Anhand der Abbildung wird deutlich, dass die generelle Behandlung mit Hefe, welche die Negativkontrolle enthielt (dsRNA mit Sequenzabschnitt gegen *Firefly*-Luciferase), keine Reduktion des Niveaus der *PSMB5*-Expression bewirkte. Es zeigte sich hier sogar im Gegenteil eine leichte Erhöhung. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Mortalität in der Kontrolle durch eine unspezifische Ursache, wie bspw. verminderte Nahrungsaufnahme bzw. Toxizität oder *off-target*-Effekte, ausgelöst wurde. Dies steht im Einklang mit der beobachteten Erholung der Individuen nach der Umstellung auf normales Futter. Im Gegensatz dazu wurde bei den Proben des Experiments mit der maximal möglichen Menge der Positivkontrolle (dsRNA mit Sequenz des kommerziell erhältlichen Bioinsektizids Calantha™) eine signifikante Reduktion des Niveaus der *PSMB5*-Expression festgestellt. Im Vergleich zur Wasserkontrolle sank das Niveau des *PSMB5*-Transkripts um etwa 67 %. Diese starke Reduktion korrelierte mit den phänotypischen Effekten und einer Mortalitätsrate von 100 %. Interessanterweise zeigte jedoch die genotypische Analyse des Vergleichsexperiments (Experiment 1) eine höhere *downregulation* des Niveaus des *PSMB5*-Transkripts nach Applikation der Positivkontrolle (um 50 %) gegenüber der *PSMB5*-edsRNA (um 20 %), obwohl letztere ausgeprägtere phänotypische Merkmale aufwies. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte sein, dass nur lebende Individuen für die RNA-Extraktion herangezogen wurden. Da sich tote Tiere zersetzen, ist in diesen Fällen keine RNA-Extraktion möglich, was zu einer Verzerrung der Daten führen könnte. Überlebende Individuen könnten weniger stark betroffen gewesen sein, etwa durch geringeren Futterkonsum, was eine geringere Reduktion des Niveaus der Expression zur Folge hätte. Eine weitere Hypothese stellt eine mögliche Gegenregulation der *PSMB5*-Transkriptmenge in den behandelten Individuen dar. Es ist

denkbar, dass die edsRNA-Behandlung verglichen mit der Positivkontroll-Behandlung zu einem früheren Zeitpunkt eine Reduktion des Niveau der Expression bewirkte, sodass die Tiere schneller kompensatorische Mechanismen aktivierten, um das *PSMB5*-Transkriptionsniveau wieder anzuheben. Da alle Proben zum gleichen Zeitpunkt entnommen wurden, könnte diese zeitliche Dynamik die Ergebnisse beeinflusst haben. Zukünftige Experimente sollten diese Hypothesen genauer untersuchen, um die Mechanismen hinter den beobachteten Effekten besser zu verstehen. Trotz dieser offenen Fragen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Applikation von Hefe mit spezifischen edsRNA-Transkripten, die gegen ausgewählte mRNAs des Kartoffelkäfers gerichtet sind, eine vielversprechende Methode zur Bekämpfung darstellen könnte. Besonders bemerkenswert ist, dass bereits geringe Mengen im niedrigen Nanogrammbereich für eine effektive Bekämpfung ausreichen könnten. Dies unterstreicht das Potenzial dieser Technologie für eine nachhaltige Schädlingsbekämpfung in der Zukunft.

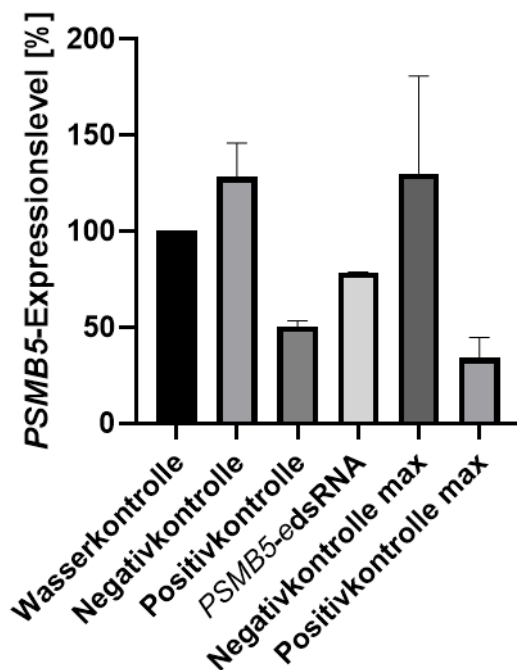


Abbildung 28: Änderung des *PSMB5*-Expressionslevels nach Hefeapplikation

Am vierten Versuchstag wurden Larven des Kartoffelkäfers im zweiten Entwicklungsstadium zur genotypischen Analyse eingefroren. In der Folge wurde die Gesamt-RNA isoliert, eine cDNA-Synthese durchgeführt und die Menge an edsRNA mittels qPCR bestimmt. Für jeden Wirkstoff wurden zwei Versuchsgruppen mit jeweils fünf Individuen analysiert, wobei die qPCR in drei technischen Triplikaten erfolgte. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Gruppen wurden mit GraphPad Prism berechnet und dargestellt.

4 Diskussion

Die Ernährung bildet die essenzielle Grundlage des Lebens, wobei der Bedarf an Nahrungsmitteln aufgrund des globalen Bevölkerungswachstums in den kommenden Jahrzehnten weiter ansteigen wird. Gleichzeitig führen Pflanzenviren und Schadinsekten zu erheblichen Ertragsverlusten, die durch die Auswirkungen des Klimawandels zusätzlich verschärft werden (157). Derzeit dominieren konventionelle Bekämpfungsmaßnahmen wie der Einsatz von Pestiziden. In den letzten Jahren wurde jedoch intensiv an alternativen Ansätzen geforscht, insbesondere an der Nutzung des natürlichen antiviralen Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi). Im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchungen stand die Herstellung der dsRNA, welche als pathogenassoziiertes molekulares Muster (PAMP) fungiert und somit RNAi induziert. Für den praktischen Einsatz auf landwirtschaftlichen Flächen erfordert die Anwendung von RNAi-Technologien die kosteneffiziente Produktion großer Mengen an dsRNA. In der vorliegenden Arbeit wurden die Möglichkeiten der Generierung von dsRNA im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* und deren potenziellen Einsatz zur Bekämpfung des Kartoffelkäfers untersucht.

4.1 Aufbau potenzieller edsRNA-Kandidaten für die Transkription in *S. cerevisiae* und Aktivitätstests im Pflanzenextrakt

Vorangegangene Studien haben bereits gezeigt, dass sich dsRNA als Biopestizid eignet. Mithilfe der RNAi-Technologie konnten verschiedene Insektenarten erfolgreich in ihrer Vitalität und Fitness beeinträchtigt werden, darunter *Drosophila suzukii*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Aedes aegypti* und *Diabrotica virgifera* (128,155,158,159). In diesen Experimenten wurde die dsRNA entweder synthetisch hergestellt oder in Mikroorganismen produziert. Die Wirksamkeit der dsRNA hängt maßgeblich von ihrer Sequenz ab, die spezifisch auf das jeweilige Gen des Zielorganismus abgestimmt sein muss. Zusätzlich spielen aber auch die physikochemischen Eigenschaften der dsRNA eine wichtige Rolle, da verschiedene Dicer-Enzyme, die die dsRNA in aktive siRNAs zerschneiden, unterschiedliche Präferenzen aufweisen. So bevorzugt das pflanzliche Dicer-Enzym DCL3 kürzere dsRNA-Moleküle (<50 nt), während DCL4 längere Stränge (>100 nt) präferiert (160). Neben der Länge der dsRNA beeinflussen auch unterschiedliche optimale Salzkonzentrationen sowie die Konzentration organischer Phosphate die Effizienz der RNAi (161). Für Dicer-Enzyme zahlreicher verschiedener Insekten sind bislang weniger spezifische Daten verfügbar, da sich die Forschung bislang überwiegend auf Untersuchungen an ausgewählten Modellorganismen wie *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* oder *Arabidopsis thaliana* konzentriert hat. Es ist jedoch bekannt, dass die Prozessierung der dsRNA in entscheidendem Maße von der Struktur und Beschaffenheit ihrer Enden abhängt. Während *blunt ends* zu einer schrittweisen, ATP-

abhängigen Prozessierung führen, resultieren 3'-Überhänge in einer nicht prozessiven und ATP-unabhängigen Spaltung (150,162). Die Nutzung der in dieser Arbeit angestrebten RNAi-Technologie als Biopestizid basiert darauf, dass die eingesetzte edsRNA in die zuvor identifizierten esiRNAs prozessiert wird, die gezielt die Gene der Schadinsekten stilllegen. Eine zentrale Voraussetzung für die Effizienz dieser Technologie ist die sukzessive Prozessierung der dsRNA von den Enden in das Innere des Moleküls durch die Dicer-Enzyme des Zielorganismus. Dabei spielen insbesondere die Enden der edsRNA eine entscheidende Rolle. Für manche Dicer-Enzyme, wie DCL4 aus *Arabidopsis thaliana*, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Effizienz der Spaltung zwischen dsRNA mit *blunt ends* und solchen mit 3'-Überhängen von 1 oder 2 Nukleotiden nachgewiesen werden (160). Es ist jedoch unklar, ob dies eine universelle Eigenschaft von Dicer-Enzymen darstellt. Ein weiteres wichtiges Merkmal ist die sogenannte *5'-counting-rule*, die für humanes Dicer beschrieben wurde. Dabei hängt die Position der Substratspaltung von der Distanz zum 5'-Ende der dsRNA ab. Es wird angenommen, dass auch DCL3 aus *A. thaliana* dieser Regel folgt, jedoch ist unklar, ob dies bspw. auch für DCL4 gilt (163,160). Diese Unterschiede in den Prozessierungsmechanismen der Dicer-Enzyme betonen die Notwendigkeit, die dsRNA-Designkriterien für verschiedene Zielorganismen genau zu untersuchen und anzupassen, um eine maximale Effektivität der RNAi-Technologie zu gewährleisten.

Bei der Herstellung der edsRNA in *S. cerevisiae* wurde ein RNA-Pol II-abhängiger Promotor verwendet, der jedoch keine präzise Definition des Transkriptionsstarts und -endes gewährleistet. Dies führt zur Bildung einer heterogenen Population von edsRNA-Spezies mit variierenden Enden. Angesichts der beschriebenen Unterschiede in der Substratspezifität und Prozessierungseffizienz der Dicer-Enzyme verschiedener Organismen war unklar, ob diese Variabilität die RNAi-Aktivität beeinflussen könnte. Um konsistente edsRNA-Moleküle mit *blunt ends* und einheitlichen Startnukleotiden zu erzeugen, wurden an das 5'- und 3'-Ende der edsRNA Ribozym-Sequenzen integriert. Ribozyme sind katalytisch aktive RNA-Moleküle, die sich während der Transkription falten und eine Selbstspaltung an einer spezifischen Position durchführen können (151). Dieser Mechanismus ermöglicht die Herstellung von edsRNA mit definierten Enden. Der Einsatz von Ribozymen stellt somit eine elegante Lösung dar, um die Homogenität der edsRNA-Spezies zu erhöhen und deren Effektivität in RNAi-basierten Anwendungen zu optimieren. Um die Eignung von Ribozymen zur Herstellung definierter edsRNA-Spezies zu prüfen, wurde zunächst eine *in-vitro*-Transkription unter Verwendung der T7-RNA-Polymerase durchgeführt. Aufgrund der spezifischen Eigenschaften dieser Polymerase war lediglich eine Ribozym-Sequenz am 3'-Ende der edsRNA erforderlich. Zum einen wurde ein Haarnadel-Konstrukt verwendet, bei dem eine einzelsträngige RNA durch eine palindromische Sequenzstruktur innerhalb des Transkripts eine intramolekulare Basenpaarung eingeht und so eine dsRNA mit Haarnadelstruktur bildet. Zum anderen wurde

ein System mit zwei separaten T7-Promotoren genutzt. Diese generieren jeweils einen RNA-Strang, die durch Selbstannäherung zu einer dsRNA hybridisieren.

Die Ergebnisse der *in-vitro*-Transkription zeigten, dass sich das Ribozym erwartungsgemäß von der edsRNA abspalten konnte. Allerdings erreichte die Effizienz dieser Abspaltung nicht 100 %, da auch längere, ungespaltene Transkripte detektiert wurden. Dennoch konnte bestätigt werden, dass der Einsatz von Ribozymen eine Anreicherung definierter edsRNA-Spezies bis zu einem gewissen Anteil ermöglicht, wenngleich eine vollständige Homogenisierung der RNA-Population nicht erreicht wurde. Ein weiterer entscheidender Punkt bei der Verwendung von Ribozymen zur Generierung von edsRNA ist die chemische Beschaffenheit der Enden. Für die effiziente Prozessierung durch Dicer-Enzyme sind normalerweise ein phosphoryliertes 5'-Ende und eine Hydroxylgruppe am 3'-Ende erforderlich (164). Die Aktivität des *Hammerhead*-Ribozyms (am 5'-Ende) erzeugt jedoch ein 3'-Hydroxylende, während das HDV-Ribozym (am 3'-Ende) ein 2,3-zyklisches Phosphat hinterlässt (152). Diese chemischen Eigenschaften weichen von den natürlichen Enden der dsRNA ab. Obwohl bekannt ist, dass DCL4 in Pflanzen auch dsRNA mit unphosphorylierten Enden prozessieren kann, ist unklar, ob dies auch für Dicer-Enzyme von Insekten gilt (160). Ebenso ist der Einfluss des zyklischen Phosphats am 3'-Ende auf die Prozessierungseffizienz und die RNAi-Aktivität bislang nicht erforscht.

Um den Einfluss der unnatürlichen Enden auf die Aktivität der edsRNA zu bewerten, wurden die *in-vitro*-Transkripte in einem zellfreien, zytoplasmatischen Pflanzenextrakt (BYL) getestet. Dieses System zeichnet sich durch die Funktionalität der Dicer-ähnlichen Enzyme (DCLs) sowie die Möglichkeit der RISC-Rekonstitution aus und ermöglichte die Untersuchung der Toleranz von DCL4 gegenüber dem 2,3-zyklischen Phosphat (146). Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl das Haarnadel-Konstrukt als auch die spontan hybridisierte dsRNA in der Lage waren, die Target-RNA erfolgreich zu spalten. Dies legt nahe, dass das 2,3-zyklische Phosphat die Aktivität von DCL4 nicht beeinträchtigt. Dieses Erkenntnis könnte auch auf andere Dicer-Enzyme übertragbar sein. Allerdings wies das Haarnadel-Konstrukt spezifische Einschränkungen auf. Die Spaltung der Target-RNA durch AGO2 war bei diesem Konstrukt weniger effizient, was auf die Struktur der Haarnadel zurückzuführen ist. DCL4 prozessiert die dsRNA ausgehend vom 5'-Ende, wobei die Effizienz mit zunehmender Distanz zu diesem Ende abnimmt (149). Da der *loop* der Haarnadelstruktur die Prozessierung vom 3'-Ende blockiert und sich die siRNAs mit hoher Affinität zu AGO2 in der Nähe des *loops* und nicht am 5'-Ende befinden, führt dies zur reduzierten Bildung dieser siRNAs und folglich zu einer geringeren Target-RNA-Spaltung. Dieses Problem tritt bei dem Konstrukt ohne *loop* nicht auf, da beide Enden für DCL4 zugänglich sind, was eine gleichmäßigere Prozessierung ermöglicht. Für zukünftige Designs von edsRNAs, die auf Haarnadel-Konstrukten basieren, sollte daher berücksichtigt werden, dass weniger effiziente siRNAs in der Nähe des *loops*

positioniert werden, während hochwirksame siRNAs am 5'-Ende lokalisiert sein sollten. Dieses gezielte Design könnte dazu beitragen, den RNAi-Effekt zu maximieren und die Effizienz der Target-RNA-Spaltung zu verbessern.

4.2 Transkription der Modell-edsRNA in *S. cerevisiae* sowie Detektion und Quantifizierung unter *in-vitro*-Bedingungen

Seit 2018 finden RNAi-basierte Therapeutika zunehmend Anwendung in der Humanmedizin und aktuell sind sechs solcher Wirkstoffe für medizinische Zwecke zugelassen (165). Diese sind jedoch ausschließlich siRNAs und miRNAs, nicht jedoch dsRNAs. Ein bedeutender Fortschritt im Bereich der RNAi-basierten Insektenbekämpfung wurde im Dezember 2023 erzielt. In den USA wurde erstmals ein RNAi-basierter Pflanzenschutzwirkstoff zugelassen. Dabei handelt es sich um das von GreenLight Biosciences entwickelte Produkt Calantha™, welches den Wirkstoff Ledprona enthält, und speziell gegen den Kartoffelkäfer gerichtet ist (155,166). Studien zeigen, dass Ledprona eine vergleichbare Wirksamkeit wie herkömmliche Insektizide wie Spinosad oder Chlorantraniliprol aufweist, jedoch eine deutlich geringere Wirkstoffmenge benötigt. Während für Spinosad etwa 88 g/ha erforderlich sind, sind bei Calantha™ lediglich 9,9 g/ha ausreichend (167). Das Bioinsektizid wird über Sprühapplikation auf die Blätter der Kartoffelpflanze aufgetragen. Ein zentrales Problem bei der Anwendung von dsRNA über die Sprühapplikation stellt die geringe Stabilität der dsRNA in der Umwelt dar, weshalb häufig eine Formulierung der dsRNA in Kombination mit Nanopartikeln erfolgt. Die Formulierung von dsRNA mit Nanopartikeln dient primär dem Schutz vor Umweltfaktoren, die die Stabilität und Wirksamkeit der RNA beeinträchtigen. Nanopartikel umhüllen die dsRNA und schützen sie so vor enzymatischem Abbau durch exogene Ribonukleasen sowie vor physikalischen Einflüssen wie UV-Strahlung und Temperaturschwankungen. Zudem ermöglichen bestimmte Nanopartikel eine kontrollierte Freisetzung der dsRNA und verbessern die Haftung an Blattoberflächen, wodurch die Bioverfügbarkeit erhöht und ein rascher Abbau durch Regen oder Sonnenlicht reduziert wird. Des Weiteren sind sie in der Regel biologisch abbaubar (168). Dennoch gibt es auch Nachteile, wie eine potenzielle Erhöhung von *non-target*-Effekten durch die unspezifische Aufnahme, hohe Herstellungskosten oder bspw. die Bioakkumulation der Nanopartikel durch Weitergabe innerhalb der Nahrungskette. Ein weiterer hemmender Faktor für den breiten Einsatz künstlich synthetisierter Nanopartikel in der Landwirtschaft ist die unzureichende regulatorische Grundlage. Derzeit existieren in vielen Ländern keine spezifischen rechtlichen Rahmenbedingungen für die Anwendung von Nanomaterialien auf landwirtschaftlichen Flächen, was zu erheblicher Unsicherheit hinsichtlich Zulassung, Haftung und Risikobewertung führt. Diese regulatorische Lücke wird durch den Mangel an Langzeitstudien zusätzlich verschärft, sodass potenzielle Umwelt- und

Gesundheitsrisiken bislang nicht abschließend beurteilt werden können. Darüber hinaus beeinflusst die Skepsis in der Öffentlichkeit die Akzeptanz solcher Technologien maßgeblich. Insbesondere die Wahrnehmung von Nanopartikeln als künstliche und potenziell unkontrollierbare Substanzen verstärkt Vorbehalte gegenüber deren Einsatz im Freiland (169,170). Aus diesen Gründen wird weiterhin an Alternativen geforscht, die ohne zusätzliche Moleküle auskommen. Ein vielversprechender Ansatz ist die Herstellung von dsRNA in *S. cerevisiae*, da diese durch ihre Zellstruktur einen natürlichen Schutz vor Umwelteinflüssen bietet. Dieser Schutz könnte die Stabilität der dsRNA verbessern und die Notwendigkeit zusätzlicher Schutzmaßnahmen reduzieren.

Die Herstellung und Anwendung von dsRNA in *S. cerevisiae* oder Hefe im Allgemeinen ist bislang nur begrenzt erforscht und veröffentlicht. In dieser Arbeit wurde daher die edsRNA basierend auf Erfahrungen in der Transkription von dsRNA in *E. coli* als Haarnadel-Molekül in *S. cerevisiae* hergestellt, da diese Struktur voraussichtlich eine höhere Stabilität aufweist als zwei einzelsträngige RNAs, die erst nach der Transkription im Zellkern hybridisieren müssen. Die separate Transkription birgt ein erhöhtes Risiko für den Abbau der Einzelstränge sowie eine geringere Ausbeute. In den meisten Veröffentlichungen wurde die dsRNA mittels episomaler Plasmide in die Hefe eingebracht, wobei die Transkription durch RNA-Pol II-abhängige Polymerasen erfolgte (128,129,131,171). Verlässliche Angaben zur erzielbaren RNA-Menge sind jedoch selten. Eine der wenigen verfügbaren Studien berichtet von einer Transkriptmenge von 182 ng/l (130). Zur Analyse der hergestellten edsRNA wurde in dieser Arbeit zunächst eine visuelle Detektion mittels silbergefärbtem Harnstoff-Polyacrylamid-Gel durchgeführt. Diese Methode ermöglicht nicht nur den Nachweis der RNA, sondern auch eine Aussage über die Identität der edsRNA. Mit allen getesteten Promotoren (GAL1, TEF1 und TDH3) konnte edsRNA detektiert werden, wobei sich jedoch deutliche Unterschiede in der Expressionsintensität zeigten. Die Intensität der detektierten Banden variierte zusätzlich von Experiment zu Experiment. Dies ist vermutlich auf die Nutzung episomaler Plasmide zurückzuführen, deren Kopienzahl in *S. cerevisiae* schwanken kann und so zu einer von Experiment zu Experiment abweichenden RNA-Produktion führt (172–174).

Zur quantitativen Bestimmung der edsRNA wurde die qPCR eingesetzt. Diese Methode zeichnet sich durch eine hohe Sequenzspezifität und Sensitivität aus, was sie besonders geeignet für die Detektion geringer Nukleinsäuremengen macht. Die hohe Sensitivität stellt jedoch zugleich eine methodische Herausforderung dar, da bereits geringfügige Abweichungen im gemessenen C_t -Wert zu erheblichen Schwankungen in der berechneten dsRNA-Menge führen können. Nichtsdestotrotz erlaubt die qPCR eine zuverlässige Quantifizierung im Pikogrammbereich, vorausgesetzt, es wird ein sorgfältig kalibrierter Standard zur exakten Berechnung herangezogen. Die Berechnungsmethode basiert auf der simultanen Analyse von Standard und zu analysierender Probe. Im Rahmen dieser Arbeit

durchgeführte empirische Experimente verdeutlichten, dass die Verwendung eines Standards, der mit der zu bestimmenden dsRNA identisch ist, vorteilhaft ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der Verwendung einer nicht identischen dsRNA als Standard Unterschiede in den Primereffizienzen auftreten können, welche zu einer Über- oder Unterschätzung der dsRNA-Menge führen. Aus diesem Grund wurde für jede edsRNA ein spezifischer Standard entwickelt und verwendet.

Die Analyse individueller Klone offenbarte eine hohe Variabilität in der Menge der produzierten edsRNA. Während einige Klone hohe Mengen von bis zu 1 µg/g Trockengewicht aufwiesen, zeigten die meisten Klone lediglich moderate bis niedrige Mengen im Bereich von 50 bis 300 ng/g Trockengewicht. Im Durchschnitt konnten höhere Mengen mit dem GAL1-Promotor erzielt werden. Das Phänomen der Schwankungen wurde bereits im Rahmen des visuellen Nachweises mittels Harnstoff-Polyacrylamid-Gelen beobachtet und ist, wie zuvor erläutert, auf die Nutzung episomaler Plasmide zurückzuführen. Eine mögliche Lösung zur Reduzierung dieser Variabilität könnte die Integration des edsRNA-Konstrukts in das Hefegenom darstellen. Durch eine stabile Kopienanzahl ließe sich eine gleichmäßigere Produktion der edsRNA erreichen. Zudem würde der Integrationsprozess eine Selektion von Klonen mit besonders hohem Transkriptionsniveau ermöglichen, welche für zukünftige Experimente aufbewahrt werden könnten (174).

Interessanterweise zeigte sich auch eine signifikante Reduktion der Variabilität in der Plasmidkopienzahl mit zunehmender Anzahl von Zellteilungen. Während der initialen Transformation wird eine unterschiedliche Anzahl an Plasmiden in die Hefezellen eingebracht und die Replikation der episomalen Plasmide erfolgt stets unabhängig vom chromosomalen Genom der Hefe. Während der Zellteilung werden die Plasmide zudem nicht immer gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Es wurde jedoch beobachtet, dass sich die Kopienzahl der Plasmide nach mehreren Zellteilungen vermutlich in einem bestimmten Bereich stabilisierte, wobei die Schwankungen im Vergleich zum Zeitpunkt der Transformation deutlich verringert waren. Somit fiel die Variabilität der edsRNA-Mengen bei einer späteren Analyse der Hefeklone deutlich geringer aus. Trotz dieser Stabilisierung der Plasmidkopienzahl variierte die gemessene Menge an edsRNA zwischen den verschiedenen Promotortypen. Insbesondere war die Transkriptmenge unter dem induzierbaren GAL1-Promotor etwa zehnmals höher als unter den konstitutiven Promotoren TEF1 und TDH3. Diese Beobachtung legt nahe, dass das episomale Plasmid mit induzierbarem GAL1-Promotor von den Hefezellen besser toleriert wird als diejenigen mit konstitutivem Promotor. Eine plausible Erklärung hierfür könnte in der kontinuierlichen Expression der edsRNA unter konstitutiven Promotoren liegen, die von den Zellen nur bis zu einem gewissen Maß kompensiert werden kann. Die dauerhafte Akkumulation von dsRNA könnte zu einer verstärkten Expression oder Aktivierung von *RNT1* führen, welches ein endoribonukleolytisches Enzym der RNase III-

Familie darstellt und für den Abbau von dsRNA-Strukturen verantwortlich ist. Eine Überlastung dieses RNA-Abbauwegs kann potenziell zellulären Stress verursachen und somit die Fitness der Zellen beeinträchtigen. In der Folge könnten die Hefezellen von Beginn an eine geringere Kopienzahl plasmidischer Vektoren mit konstitutiven Promotoren aufrechterhalten, was sich auch in einem insgesamt reduzierten Transkriptionsniveau widerspiegeln würde (130).

Obwohl die Menge an edsRNA quantifiziert und ihre Identität teilweise bestimmt werden konnte, ist eine präzise Aussage über die Menge korrekt Ribozym-prozessierter edsRNA bislang nicht möglich. Untersuchungen der *in-vitro*-Transkription in Abhängigkeit von der T7-Polymerase zeigten, dass die eingesetzten Ribozyme keine vollständige Aktivität aufweisen. Dies könnte in Hefezellen durch unterschiedliche Aktivität der Ribozyme zur Entstehung von verschiedenen Varianten von edsRNA-Molekülen mit variabler Länge und Struktur führen. Zur Überprüfung, ob die *in vivo* transkribierten edsRNA-Moleküle unter *in-vitro*-Bedingungen zur Spaltung einer komplementären Target-RNA geeignet sind, wurde ein kombinierter DCL-*Slicer*-Assay im BYL-System durchgeführt. Da dieser Assay die DCL-vermittelte Prozessierung von dsRNA mit der anschließenden AGO-vermittelten endonukleolytischen Spaltung einer Target-RNA durch die resultierenden sRNAs kombiniert, ermöglicht er Rückschlüsse sowohl auf die Eignung des eingesetzten dsRNA-Substrats zur Prozessierung als auch auf die Funktionalität der daraus generierten siRNAs im Rahmen der RNAi. Hefezellen, die *in vivo* transkribierte edsRNA exprimierten, wurden im DCL-*Slicer*-Assay in zwei unterschiedlichen Reaktionsansätzen untersucht. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde ein Ansatz mit RNase A/T1 behandelt, um gezielt dsRNA anzureichern, während der zweite Ansatz unbehandelt blieb, um auch unvollständig Ribozym-prozessierte edsRNA-Moleküle mit möglichen einzelsträngigen Überhängen zu erfassen. Dieser Assay zeigte jedoch für keinen der beiden Reaktionsansätze eine Spaltung der Target-RNA. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine unzureichende Konzentration der in den Hefezellen produzierten edsRNA sein. Alternativ könnte eine Interaktion unspezifischer RNA mit den RNAi-Kernkomponenten im BYL die Funktionalität beeinflusst haben.

Zur Untersuchung dieser Hypothesen wurde durch *in-vitro*-Transkription perfekte dsRNA *mit blunt ends* hergestellt und in einem DCL-*Slicer*-Assay getestet. Dabei wurde die Funktionalität mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (2 µg und 10 µg) an Hefe-RNA als unspezifischer *competitor* analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass bei einer Konzentration von 2 µg unspezifischer RNA eine Spaltung der Target-RNA erfolgte. Hingegen führte eine Konzentration von 10 µg *competitor*-RNA zu einer Beeinträchtigung der Funktionalität, was sich in einer nur teilweisen Spaltung der Target-RNA äußerte. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine Sättigung der DCLs und AGOs im BYL-System sein. Diese Sättigung könnte ebenfalls unter *in-vivo*-Bedingungen im Zielorganismus auftreten und zu einer abgeschwächten RNAi führen.

4.3 Fehlerhaftes *phased processing* von edsRNA durch DCL4 in *S. cerevisiae*

In bisherigen Studien zur RNAi-basierten Schädlingsbekämpfung wurden überwiegend dsRNAs als Wirkstoffe eingesetzt, während siRNAs kaum Verwendung fanden. Dies gilt unabhängig davon, ob die RNA in transgenen Pflanzen hergestellt oder exogen appliziert wurde. Ein wesentlicher Grund dafür ist die verringerte Stabilität von siRNAs im Vergleich zu dsRNAs. Zudem zeigen Untersuchungen, dass längere dsRNAs bei Schadinsekten eine effektivere RNAi-Aktivierung auslösen als kürzere Moleküle (175–177). Um die Stabilität von dsRNAs zusätzlich zu erhöhen und ihren Abbau durch ubiquitär vorkommende RNasen zu minimieren, wurde der Mikroorganismus *S. cerevisiae* als Produktionssystem eingesetzt. Diese Methode bietet zwei zentrale Vorteile. Zum einen könnte sie das Problem der Aufnahme von dsRNAs durch blattfressende Insekten verbessern, da die Produktion in einem Mikroorganismus eine natürliche Schutzumgebung bietet und *S. cerevisiae* anlockende Eigenschaften für Insekten zeigt und teilweise sogar als Nahrungsquelle dient. Zum anderen besitzt *S. cerevisiae* nicht die RNAi-Kernkomponenten *AGO*, *DCR* und *RDRP*, da diese im Laufe der Evolution verloren gingen. Dies führt dazu, dass dsRNA in der Hefe akkumuliert und nicht in kurze siRNAs prozessiert wird (136,178). Trotz der Vorteile könnte es von Nutzen sein, wenn die korrekt prozessierten esiRNAs bereits in *S. cerevisiae* vorliegen würden. Derzeit ist unklar, wie effizient und genau dsRNA in Schadinsekten zu siRNAs verarbeitet wird.

Zur Untersuchung dieser Möglichkeit wurde das Enzym *DCL4* in *S. cerevisiae* exprimiert und seine Fähigkeit zur Prozessierung sowohl unter *in-vitro*-Bedingungen als auch in Coexpressionsstudien getestet. Die Wahl von *DCL4* basiert auf Erkenntnissen aus vorangegangenen Experimenten im Modellpflanzenextrakt BYL, in denen gezeigt wurde, dass eine edsRNA bevorzugt zu funktionalen esiRNAs prozessiert wurde. Etwa 60 % der detektierten 21 nt sRNAs entsprachen dabei den erwarteten, aus der edsRNA abgeleiteten esiRNA-Sequenzen (67). Daher könnte eine vergleichbare Strategie in Hefe sowohl die Genauigkeit als auch die Effizienz der RNAi-Anwendung gegen Schadinsekten verbessern.

Die Experimente zur Untersuchung der *in vitro* transkribierten edsRNAs und der Coexpression von edsRNA und *DCL4* zeigten weitgehend übereinstimmende Ergebnisse. In beiden Ansätzen dominieren 21 nt lange sRNAs, gefolgt von 20 nt und 22 nt langen Fragmenten. Im Fall der Coexpression von *DCL4* machten 21 nt sRNAs etwa 62 % der gesamten sRNAs im Bereich von 20-25 nt aus. Ohne *DCL4* war jedoch keine klar dominierende Nukleotidgröße erkennbar, was auf das Fehlen einer spezifischen Prozessierung der edsRNA und stattdessen auf unspezifischen Abbau hindeutet. Diese Beobachtung entspricht der Literatur, die beschreibt, dass *DCL4* bevorzugt 21 nt lange siRNAs aus dsRNA generiert. Der unspezifische Abbau in den Hefezellen lässt sich vermutlich auf das RNase III-ähnliche Protein Rnt1 zurückführen (130,179).

Eine detaillierte Analyse der Verteilung der 21 nt langen sRNAs über die gesamte Länge der edsRNA zeigte keine definierten Peaks, sondern eher Hotspot-Regionen zwischen den Nukleotiden 20 bis 40 sowie 100 bis 140, unabhängig von der Anwesenheit von DCL4. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die unterschiedliche Zugänglichkeit der edsRNA in diesen Bereichen sein, möglicherweise aufgrund der Bindung durch RNA-Bindeproteine, die die Zugänglichkeit in den anderen Regionen einschränken (180). Bei der Analyse der Häufigkeit einzelner esiRNAs zeigte sich, dass nur etwa 3,5 % der gesamten 21 nt langen sRNAs den erwarteten esiRNAs zugeordnet werden konnten, während bei der Probe ohne DCL4 dieser Anteil bei etwa 11 % lag. Dabei ist zu beachten, dass die absolute Anzahl der *reads* in der Coexpression-Probe deutlich höher war, was schlicht auf die insgesamt höhere Prozessierungsrate durch das präsente DCL4 zurückzuführen ist. Dies ist für die Effektivität der RNAi von Bedeutung, da bereits geringe Mengen an esiRNAs eine entscheidende Rolle spielen können. Zudem konnte in der Coexpression-Probe für einige esiRNAs kein Nachweis erfolgen, während bei anderen nur der *guide*- oder der *passenger*-Strang detektierbar waren. Lediglich für siR2041 konnten beide Stränge nachgewiesen werden, jedoch mit unterschiedlichen Häufigkeiten. Diese Unterschiede könnten durch die Stabilität der jeweiligen Stränge in der Hefe sowie durch die spezifische Sequenzierungsmethode bedingt sein. Weiterhin könnte auch eine mögliche Sequenzspezifität des DCL4 dazu beitragen, dass einige sRNAs nicht detektiert wurden, da eine Präferenz für GC-reiche Regionen bekannt ist (181). Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente belegen, dass das Enzym DCL4 in *S. cerevisiae* grundsätzlich funktional exprimiert wird, jedoch lediglich ein unzureichendes *phased processing* der edsRNA erfolgt. Konkret bedeutet dies, dass DCL4 in *S. cerevisiae* die coexprimierte edsRNA nicht in einem regelmäßigen 21-Nukleotid-Raster in 5'-3'-Richtung prozessiert. Infolgedessen werden, im Gegensatz zum pflanzlichen Modellextrakt BYL, die konstituierenden esiRNAs nicht prioritär generiert. Dieses Ergebnis legt nahe, dass für eine präzise und effiziente Prozessierung zusätzliche zelluläre Faktoren erforderlich sein könnten, die in *S. cerevisiae* nicht oder nur unzureichend vorhanden sind.. Eine Studie von Hiragui et al. hat gezeigt, dass DCL-Proteine mit Mitgliedern der DRB-Familie (Doppelstrang RNA-Bindeprotein) interagieren können. Solche Interaktionen wurden für DCL1 und DRB1 sowie für DCL4 und DRB4 in *A. thaliana* nachgewiesen (57). Ähnliche Protein-Protein-Interaktionen zwischen Dicer-Proteinen und Cofaktoren wurden auch in anderen Organismen beobachtet (47). Untersuchungen in *A. thaliana* verdeutlichten zudem, dass die Anwesenheit dieser Cofaktoren die Genauigkeit und Ausbeute der RNA-Prozessierung signifikant erhöhen kann (182–184). Um zu prüfen, ob DRB4 die Prozessierung durch DCL4 auch in *S. cerevisiae* in ein definiertes Raster verschiebt, wurde *DRB4* in *S. cerevisiae* exprimiert. Anschließend wurden Rohextrakte, die sowohl DRB4 als auch DCL4 enthielten, mit edsRNA unter *in-vitro*-Bedingungen inkubiert.

Die Experimente zur Expression von *DRB4* und *DCL4* in *S. cerevisiae* zeigen, dass auch die zusätzliche Präsenz von *DRB4* die Prozessierung der *edsRNA* nicht entscheidend verbessert. Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Kombination von *edsRNA* mit *DCL4* in diesem heterologen System nicht geeignet ist, um bereits in der Hefe ausreichende Mengen funktionaler esiRNAs zu generieren. Ein möglicher Erklärungsansatz für die unzureichende Prozessierung liegt im nicht-nativen zellulären Kontext von *S. cerevisiae*, der möglicherweise nicht alle erforderlichen molekularen Komponenten oder zellulären Bedingungen für eine effiziente Verarbeitung der *edsRNA* bereitstellt. Es ist denkbar, dass *DCL4* neben *DRB4* weitere, bisher unbekannte Cofaktoren benötigt, um ein präzises *phased processing* der *edsRNA* zu gewährleisten. Solche zusätzlichen Faktoren könnten in *A. thaliana* vorhanden sein, aber in der Hefe fehlen. Dies zeigt, dass die Mechanismen der RNA-Prozessierung komplexer sind als zunächst angenommen und dass weitere Studien erforderlich sind, um die spezifischen Anforderungen von *DCL4* zu verstehen. Eine gezielte Untersuchung potenziell zusätzlicher Cofaktoren könnten künftige Ansätze zur Optimierung der esiRNA-Produktion in *S. cerevisiae* darstellen.

Eine Möglichkeit der Identifizierung potenzieller Cofaktoren für das *phased processing* von dsRNA ist die Verwendung des Modellpflanzenextrakts BYL. Dazu könnte eine Expressionsbibliothek aus BYL erstellt und diese in *S. cerevisiae* exprimiert werden. Anschließend könnte analysiert werden, ob ein *phased processing* der dsRNA stattfindet. Bei einem positiven Ergebnis können schrittweise einzelne Proteine aus der Bibliothek entfernt werden, um die für die Prozessierung verantwortlichen Faktoren zu identifizieren. Ein ergänzender methodischer Ansatz zur Identifizierung weiterer pflanzlicher Interaktionspartner von *DCL4* ist das *Yeast-to-Hybrid*-System (Y2H). Mithilfe dieses Systems können systematisch Proteine detektiert werden, die mit *DCL4* interagieren (185). Diese Kandidaten können daraufhin auf ihre Rolle beim korrekten *phased processing* von dsRNA getestet werden. Durch die Kombination beider Ansätze könnte eine umfassende Identifikation und Charakterisierung der für die *DCL4*-abhängige Prozessierung essenziellen Proteine ermöglicht werden.

4.4 Funktionalität des Konzepts der Herstellung von *edsRNA* in *S. cerevisiae* am Beispiel des Kartoffelkäfers

Die übermäßige Verwendung chemischer Pestizide hat weltweit zur Bildung von Resistenzen bei zahlreichen Insekten geführt (186). Diese Problematik nahm besonders seit den 1950er Jahren zu. Bis zum Jahr 2020 waren allein für die Gruppe der Arthropoden 17.000 Resistenzen gegen 349 Pestizidpräparate bekannt (187). Ein weiteres Problem ergibt sich aus dem Verbot bestimmter hochwirksamer Pestizide. So ließ die Europäische Union im Jahr

2019 die Zulassung der Neonicotinoide Imidacloprid, Clothianidin und Thiamethoxam auslaufen. Diese systemisch wirkenden Nervengifte, die durch ihre Selektivität und Wirksamkeit gekennzeichnet sind, wurden aufgrund ihrer schädlichen Auswirkungen auf Honigbienen und die damit verbundene Reduktion der Biodiversität verboten (188). Das Verbot führte jedoch zu neuen Herausforderungen im Umgang mit Schadinsekten, die zuvor mit diesen Wirkstoffen bekämpft worden waren. Ein Beispiel ist die Grüne Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae*), welche seit Jahrzehnten mit Neonicotinoiden kontrolliert wurde (189).

Ein besonders für die Landwirtschaft relevantes Beispiel für Resistenzen ist der Kartoffelkäfer, der inzwischen gegen mehr als 50 verschiedene Pestizide Resistenzen entwickelt hat. Derzeit erfolgt die Bekämpfung hauptsächlich mit Spinosad, ein Wirkstoff, der aus dem Bakterium *Saccharopolyspora spinosa* gewonnen wird, auch weil es eines der wenigen Insektizide darstellt, welches für die organische Landwirtschaft zugelassen ist. Allerdings gibt es auch hier bereits erste Berichte über Resistenzen (190–192) und auch diese Substanz birgt Risiken für Bienen und andere bestäubende Insekten (193).

Der Kartoffelkäfer war ursprünglich in Mexiko beheimatet und ernährte sich dort von dem zur Familie der Nachtschattengewächse gehörenden Stachel-Nachtschatten (*Solanum rostratum*). Im 19. Jahrhundert breitete er sich zunächst in den USA aus und wurde aufgrund seiner großen Populationen im Bundesstaat Colorado als „*Colorado potato beetle*“ bekannt. Durch den globalen Handel wurde der Kartoffelkäfer schließlich nach Europa eingeschleppt und 1877 erstmals in Deutschland nachgewiesen (194). In Europa fand er mit der Kartoffelpflanze (*Solanum tuberosum*), einem ebenfalls zu den Nachtschattengewächsen gehörenden Gewächs, eine neue Hauptnahrungsquelle. Zudem frisst der Kartoffelkäfer auch andere Pflanzen dieser Familie, wie Paprika, Auberginen und Tomaten. Da er in Europa keine natürlichen Fressfeinde hat, konnte er sich ungehindert ausbreiten (195). Heutige Bekämpfungsmaßnahmen beschränken sich weitgehend auf den Einsatz von Spinosad sowie auf mechanische Methoden, wie den Einsatz von Sammelmaschinen (*Beetle Collector*) in kleinem Maßstab (196,197). Darüber hinaus wird die RNAi als vielversprechende alternative Methode erforscht und in den USA wurde bereits ein RNAi-basiertes Produkt zur Bekämpfung des Kartoffelkäfers zugelassen (166). In der vorliegenden Arbeit wurde der Kartoffelkäfer aufgrund seiner besonderen Sensitivität als Modellorganismus zur Überprüfung des neuen Bekämpfungskonzepts, der Herstellung von edsRNA in *S. cerevisiae*, herangezogen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das grundlegende Konzept der Verwendung von *S. cerevisiae* als Produktions- und Verpackungswerkzeug zunächst anhand der Modell-edsRNA gegen das *Cucumber mosaic virus* (CMV) etabliert. Für die Durchführung von *in-vivo*-Experimenten war es jedoch notwendig, spezifisch neue edsRNAs zu designen. Dabei orientierte sich der strukturelle Aufbau an der Haarnadelstruktur der Modell-edsRNA. Zur Funktionsprüfung wurden mehrere (e)dsRNAs eingesetzt, darunter eine edsRNA, die spezifisch gegen die

PSMB5-mRNA des Kartoffelkäfers gerichtet war. Diese wurde von M.Sc. Juliane Schulz entwickelt. Ergänzend wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle verwendet. Die Negativkontrolle wurde ausgehend von einem Konstrukt generiert, welches einen Abschnitt der codierenden Sequenz des *Firefly*-Luciferase-Gens enthielt, und diente als unspezifische Vergleichsprobe. Die Positivkontrolle wurde ausgehend von einem Konstrukt generiert, welches die dsRNA-Sequenz des aktiven Wirkstoffs im kommerziell erhältlichen Bioinsektizids Calantha™ enthielt, und ebenfalls gegen die *PSMB5*-mRNA gerichtet ist. Nach der erfolgreichen Klonierung wurden alle drei (e)dsRNAs unter *in-vivo*-Bedingungen in *S. cerevisiae* exprimiert. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass sich die Kopienzahl episomaler Plasmide in verschiedenen Hefeklonen nach mehreren Zellteilungen aneinander annähert. Zudem wurde festgestellt, dass der induzierbare GAL1-Promotor die höchste durchschnittliche Transkriptmenge ermöglicht. Aufgrund dieser empirischen Erkenntnisse wurde auf eine separate Analyse verschiedener Klone und Promotoren verzichtet. Die Quantifizierung der Transkriptmenge erfolgte in Anlehnung an das Verfahren, das bereits für die Modell-edsRNA entwickelt wurde. Die Ergebnisse dieser Überprüfung lieferten jedoch ein unerwartetes Ergebnis.

Generell lässt sich festhalten, dass die heterologe Transkription von dsRNA in *S. cerevisiae* möglich ist und somit vielversprechende Möglichkeiten für biotechnologische Anwendungen eröffnet. Die Analyse der Transkriptmenge zwischen den getesteten Modellen für das Anwendungsexperiment zeigte jedoch signifikante Unterschiede. Während die gegen *PSMB5* gerichtete edsRNA maximal 1 µg/g Trockengewicht erreichte, erzielte die unspezifische Negativkontrolle 11 µg/g und die Positivkontrolle sogar 20 µg/g Trockengewicht. Die Gründe für diese drastischen Unterschiede sind nicht eindeutig, jedoch gibt es plausible Erklärungsansätze. Einer der möglichen Faktoren ist die Transkriptlänge. Die edsRNA, welche eine Länge von 277 bp aufweist, ist kürzer als die Negativkontrolle mit 423 bp und die Positivkontrolle mit 485 bp. Diese Längendifferenzen könnten die Stabilität der Transkripte beeinflussen, da längere RNA-Moleküle möglicherweise eine höhere strukturelle Stabilität besitzen und weniger schnell abgebaut werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die spezifische Zusammensetzung der edsRNA, die aus einer Vielzahl kleiner esiRNAs besteht. Diese esiRNAs müssen spezifische strukturelle und sequenzielle Anforderungen erfüllen, um effektiv mit AGO2-Proteinen interagieren zu können. In Insekten zeigt AGO2 eine ausgeprägte Präferenz für siRNAs mit einem 5'-terminalen Adenin oder Uracil, während siRNAs mit hohem GC-Gehalt tendenziell eine geringere Effizienz in der RNA-Interferenz aufweisen (198–200). Diese Eigenschaften könnten dazu beitragen, dass die edsRNA weniger stabil ist und schneller abgebaut wird als andere dsRNAs.

Zur Steigerung der Transkriptmenge der edsRNA gibt es verschiedene Optimierungsansätze. Eine Möglichkeit besteht darin, mehrere Kopien des edsRNA-Konstrukts in das Genom von

S. cerevisiae zu integrieren, um die Transkription zu erhöhen. Auch der Einsatz stärkerer Promotoren könnte die Expression der edsRNA verbessern. Trotz der niedrigeren Transkriptmenge bietet die edsRNA einen wesentlichen Vorteil gegenüber anderen dsRNAs. Sie basiert auf validierten esiRNAs, die eine hohe Effektivität gezeigt haben, und verhindert dadurch die Sättigung der AGO-Proteine mit weniger wirksamen siRNAs (63,67). Dies ermöglicht bereits bei geringeren Transkriptkonzentrationen eine effiziente RNAi. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Transkription und Stabilität von dsRNAs in *S. cerevisiae* stark von der Struktur und Zusammensetzung der Moleküle abhängen könnte. Dennoch hat die edsRNA durch weitere Optimierungen das Potenzial, sich als zentrale Komponente in RNAi-Strategien zu etablieren.

Die Funktionalität des Konzepts wurde in zwei Versuchen untersucht. Der erste Versuch zielte darauf ab, die Transkriptmengen der Negativkontrolle (dsRNA mit Sequenzabschnitt gegen *Firefly*-Luciferase) und Positivkontrolle auf das Niveau der edsRNA anzugleichen, um eine identische Konzentration aller drei (e)dsRNAs innerhalb der Hefezellen sicherzustellen. Dies ermöglichte einen direkten Vergleich der Effektivität der edsRNA mit der etablierten Positivkontrolle (dsRNA mit Sequenz des kommerziell erhältlichen Bioinsektizids Calantha™). Da jedoch für die Negativkontrolle und die Positivkontrolle eine 20- bzw. 30-fach höhere Transkriptmenge festgestellt wurde, wurde in einem zweiten Experiment die maximale Konzentration der beiden dsRNAs eingesetzt, um Erkenntnisse über unterschiedliche Konzentrationsbereiche gewinnen zu können. Zu Beginn des Experiments zeigte der Vergleich der jeweiligen (e)dsRNAs eine erhöhte Mortalität in der mit edsRNA behandelten Gruppe. Nachdem jedoch die Verabreichung von mit Hefe behandelten Blättern gestoppt und durch unbehandelte Blätter ersetzt wurde, blieb die Mortalität unverändert, was höchstwahrscheinlich auf die geringe eingesetzte Transkriptmenge der edsRNA (0,21-0,56 ng) zurückzuführen ist. Es wird angenommen, dass diese Menge an einem Schwellenwert lag, sodass nicht alle Individuen nachhaltig beeinträchtigt wurden. Bisherige Studien zu letalen Dosen in Experimenten mit Kartoffelkäfern sind rar. Erste Ergebnisse wurden 2021 von Rodrigues et al. publiziert. Dabei gaben die Verfasser an, dass eine Konzentration von 1 µg/L Ledprona-dsRNA benötigt wurde, um 90 % der Kartoffelkäfer im zweiten Larvenstadium innerhalb von 10 Tagen zu töten (155). Darüber hinaus zeigte sich bei einem Drittel der überlebenden Individuen nach der edsRNA-Behandlung ein nachhaltiger Effekt auf die physische Entwicklung, da diese signifikant kleiner als die Vergleichstiere waren und vermutlich weder Puppenstadium noch Fortpflanzung erreicht hätten. Interessanterweise wies die Positivkontroll-Vergleichsgruppe keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Mortalität zu den anderen Vergleichsgruppen auf (Wasser- und Negativkontrolle). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die edsRNA im getesteten Bereich der Wirkstoffkonzentration eine stärkere Beeinträchtigung auf die Vitalität der Kartoffelkäfer

bewirkte als die Positivkontrolle und dass im Vergleich zu dem Produkt Calantha™, das Ledprona enthält, möglicherweise weniger als 9,9 g/ha edsRNA zur effektiven Bekämpfung der Kartoffelkäfer ausgebracht werden könnten.

Die von M.Sc. Juliane Schulz im Vorfeld erzielten Ergebnisse demonstrierten, dass bereits 10 ng *in vitro* transkribierte und in Wasser resuspendierte, nackte dsRNA ausreichend waren, um eine vollständige Mortalität bei den gleichen Versuchsbedingungen zu erreichen. Aufgrund der deutlich höheren Transkriptmenge der Positivkontrolle im Vergleich zur edsRNA konnten in dem zweiten Experiment Konzentrationen von bis zu 16,6 ng verwendet werden. Da die dsRNA in diesem Experiment jedoch in Hefe eingeschlossen war und unklar blieb, welcher Anteil an dsRNA tatsächlich die Zielzellen erreichte, war der Ausgang des Experiments zunächst ungewiss. Bisher veröffentlichte Studien, die Hefe als Produktionsorganismus und Träger für dsRNA verwendeten, konzentrierten sich in der Regel auf die Behandlung von Fliegen oder Mosquitos (128,131). Bei diesen Studien wurden ganze Gruppen von Individuen untersucht, anstatt einzelner Individuen. Dabei wurde weder vorab die Transkriptmenge bestimmt noch eine Abschätzung darüber vorgenommen, wie viel dsRNA den Zielort erreichte. Im Allgemeinen muss die Hefe zunächst nach der Aufnahme der dsRNA-haltigen Nahrung lysiert werden, bevor die dsRNA an ihren Wirkort transportiert werden kann. In Kartoffelkäfern erfolgt die Aufnahme der dsRNA in die Zielzellen bspw. über eine Clathrin-abhängige Endozytose (201). Aufgrund dieser komplexen Schritte ist eine genaue Bestimmung der tatsächlich in der Zielzelle ankommenden Transkriptmenge schwierig. Dennoch trug das Experiment, bei dem die maximal mögliche Transkriptmenge eingesetzt wurde, dazu bei, die für eine effektive Bekämpfung eines einzelnen Individuums notwendige Menge an dsRNA weiter einzugrenzen.

Zu Beginn des Experiments zeigten die Individuen der Gruppen, die mit der unspezifischen Negativkontrolle (dsRNA mit Sequenzabschnitt gegen *Firefly*-Luciferase) und spezifischer Positivkontrolle (dsRNA mit Sequenz des kommerziell erhältlichen Bioinsektizids Calantha™) behandelt wurden, keine Unterschiede in Mortalität oder Größe. Nach dem Wechsel von Hefebearbeiteten auf unbehandelte Blätter erholten sich die Individuen der Gruppe, die mit der Negativkontrolle behandelt wurden, obwohl auch hier die Mortalität bis zum Ende des Versuchs anstieg und letztlich 36 % erreichte. Diese Mortalitätsrate war jedoch erheblich geringer als die 100%ige Mortalität, die in der Gruppe mit der Positivkontrolle beobachtet wurde. Wie bereits beschrieben, deutet die hohe Mortalität in der Negativkontroll-Vergleichsgruppe darauf hin, dass die Hefe selbst für die Kartoffelkäfer problematisch ist. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Tiere der Wasserkontrollgruppe etwa 50 % der angebotenen Nahrung in den ersten drei Tagen fraßen, während die Tiere der anderen Gruppen lediglich 40 bis 45 % zu sich nahmen. Keines der mit der Positivkontrolle behandelten Tiere zeigte im Verlauf des Experiments Anzeichen einer Erholung, was einen

signifikanten Unterschied zum Vergleichsexperiment darstellt. Zusätzlich wiesen alle mit der Positivkontrolle behandelten Individuen deutliche morphologische Beeinträchtigungen auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bereits eine geringe Menge spezifischer dsRNA unterhalb von 16 ng ausreichen könnte, um eine Kartoffelkäferlarve innerhalb von maximal sieben Tagen zu töten.

Schlussendlich lässt sich festhalten, dass *S. cerevisiae* unter bestimmten Bedingungen als Produktionsorganismus genutzt werden kann, insbesondere jedoch als Werkzeug zur effizienten Verpackung von dsRNA. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass zwar für bestimmte Insektenarten eine Symbiose mit Hefen besteht, jedoch nicht alle Insekten grundsätzlich Hefen konsumieren. Dies deutet darauf hin, dass der Einsatz dieser Technologie vorrangig auf phytophage Schadinsekten beschränkt sein könnte, die sich sowohl durch pflanzenbasierten Fraß als auch durch den Konsum von Hefen auszeichnen (202). Weiterhin ist es notwendig, die Stabilität der dsRNA in *S. cerevisiae* unter verschiedenen Bedingungen, wie bspw. unterschiedlichen Temperaturen, eingehend zu testen, um die Anwendbarkeit dieser Methode weiter zu validieren. Trotz dieser Einschränkungen bietet Hefe eine potenzielle Alternative zu Nanopartikeln, um die Aufnahme und Stabilität der dsRNA zu verbessern und somit eine neuartige Herangehensweise für den gezielten Einsatz von heterolog produzierter dsRNA gegen Pflanzenschädlinge bereitzustellen.

4.5 Potenzial und Biosicherheit von RNAi-basierten Biopestiziden

Der Einsatz von RNAi als Grundlage für Biopestizide birgt vielversprechendes Potenzial im Kampf gegen Ernteverluste, die weltweit zu einem erheblichen Teil (20-40 %) durch Schädlinge und Krankheiten verursacht werden. Zusätzlich hat der übermäßige Einsatz chemischer Pestizide bereits bis zum Jahr 2000 zur Entwicklung von Resistenzen bei über 500 Insektenspezies geführt (203). RNAi-basierte Ansätze bieten eine alternative, umweltfreundlichere Lösung, die jedoch sowohl Vorteile als auch Nachteile und Risiken mit sich bringt.

4.5.1 Vorteile von RNAi-basierten Biopestiziden

Im Vergleich zu herkömmlichen Pestiziden, die oft toxisch für Mensch, Tier und nützliche Insekten sind und eine Umweltpersistenz von Jahrzehnten aufweisen können, zeichnet sich RNAi durch höhere Spezifität und Umweltverträglichkeit aus (204). RNAi zielt sequenzspezifisch auf die ausgewählten Schädlinge ab und reduziert somit erheblich das Risiko von *non-target*-Effekten. Weiterhin unterstreicht der natürliche Ursprung dieses Mechanismus seine potenzielle Sicherheit und Kompatibilität mit biologischen Systemen. Ein weiterer Vorteil von RNAi-basierten Biopestiziden ist ihr schneller Abbau in der Umwelt.

Studien zeigen, dass dsRNA innerhalb von 35 Stunden im Boden und innerhalb von 72 Stunden im Wasser durch natürliche Prozesse abgebaut wird (205,206). Zudem konnte die Wirksamkeit der dsRNA gegenüber viralen Infektionen durch die Entwicklung eines biologisch abbaubaren Stabilisators, BioClay, verlängert werden (87). Des Weiteren birgt die Anwendung von dsRNA als Insektizid ein geringes Risiko für Säugetiere, einschließlich des Menschen, da die orale Aufnahme von dsRNA in der Regel keine nachweisbaren schädlichen Effekte verursacht. Im Jahr 2023 kam die *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), eine internationale Organisation mit derzeit 38 Mitgliedstaaten, in einem umfassenden Bericht zu dem Ergebnis, dass exogen applizierte dsRNA grundsätzlich keinen signifikanten Einfluss auf die menschliche Gesundheit hat. Die OECD verfügt über international anerkannte Standardverfahren zur Bewertung toxikologischer und umweltrelevanter Eigenschaften chemischer und biologischer Stoffe, darunter Toxizitätsprüfungen, Abschätzungen der Umweltexposition, Genotoxizitäts- und Bioakkumulationsstudien. Diese Standards bilden die Grundlage zahlreicher regulatorischer Zulassungsverfahren weltweit. Dennoch betont die OECD, dass dsRNA-basierte Biomoleküle individuell und produktspezifisch bewertet werden müssen, insbesondere im Hinblick auf ihre Formulierung und Anwendung (207). Auch die *United States Environmental Protection Agency* (EPA), als zuständige Zulassungsbehörde für Pestizide und bioaktive Wirkstoffe in den USA, hat im Rahmen der Zulassung des Produkts Calantha™ eine umfassende Bewertung möglicher gesundheitlicher Risiken durchgeführt. Die EPA kam dabei zu dem Schluss, dass die Anwendung von Calantha™ keine relevanten gesundheitlichen Risiken für den Menschen darstellt und potenzielle Effekte als vernachlässigbar einzustufen sind (208). Dies lässt sich folgendermaßen erklären: Exogene dsRNA wird im Verdauungstrakt durch RNasen und die saure Magen Umgebung rasch abgebaut. Darüber hinaus erfolgt die Aufnahme der nicht abgebauten dsRNA nur in sehr geringem Maße durch die Zellmembran, da diese als effektive Barriere wirkt. Im Gegensatz zu Insekten oder Pflanzen wird das RNAi-System im Menschen nicht aktiv als primäre Immunantwort gegenüber Pathogenen, einschließlich Viren, verwendet. Stattdessen wird lange, exogene dsRNA von Immunrezeptoren wie TLR3, RIG-I und MDA5 erkannt, was eine Interferon-vermittelte Immunantwort auslöst. Die RNAi-Wirkung bei Säugetieren wird hingegen hauptsächlich durch kleine RNAs, wie siRNAs oder miRNAs, im Embryonalstadium vermittelt. Dennoch kann RNAi auch durch exogen applizierte siRNAs oder miRNAs gezielt ausgelöst werden (209,210).

4.5.2 Nachteile und Herausforderungen

Die Wirksamkeit von RNAi zeigt eine hohe Variabilität zwischen verschiedenen Insektenarten, wobei einige Arten erheblich sensibler reagieren als andere (211,212). Dies bedeutet, dass

RNAi-basierte Methoden möglicherweise nicht bei allen Zielschädlingen effektiv sind. Zudem ist die Bevölkerung, insbesondere in Europa, der genetischen Veränderung von Organismen (HIGS-Methode) skeptisch gegenüber eingestellt, was den Einsatz von RNAi-Biopestiziden in Form von GMOs wie bspw. transgenen Pflanzen erschwert (213). Alternative Methoden wie Sprühapplikationen, Köder, Nanopartikel, Wurzelbehandlungen oder Stamminjektionen stellen praktikable Optionen dar, jedoch bestehen auch hier Herausforderungen hinsichtlich der Stabilität und Aufnahme von dsRNA. Umweltfaktoren wie UV-Strahlung, der Abbau durch RNasen sowie der pH-Wert im Darm von Insekten können die Stabilität der dsRNA negativ beeinflussen (72). Ein weiterer Aspekt betrifft die Wahl geeigneter Zielgene für die RNAi-Technologie. Es sollte stets auf essenzielle Gene der Schadinsekten abgezielt werden, damit auch ein partielles *silencing* für eine ausreichende Wirkung genügt. Unterschiedliche Expressionslevel in den diversen Entwicklungsstadien der Insekten könnten jedoch dem Mechanismus entgegenwirken.

4.5.3 Aspekte der Biosicherheit

Ein zentraler Aspekt der Biosicherheit bei RNAi-basierten Biopestiziden ist das Risiko von *non-target*-Effekten. Es muss sichergestellt werden, dass weder andere Insekten noch Menschen unbeabsichtigt beeinträchtigt werden (214). Die Bioinformatik ist ein unverzichtbares Werkzeug zur Vorhersage potenziell komplementärer Sequenzen innerhalb von Nicht-Zielorganismen, die durch funktionale esiRNAs unbeabsichtigt beeinflusst werden könnten. Dadurch leistet sie einen wichtigen Beitrag zur Risikobewertung und Biosicherheit von RNAi-basierten Anwendungen. Dabei stellt die unvollständige Sequenzierung vieler Insektengenome eine Herausforderung dar. Im Allgemeinen können übervorsichtige Vorhersagen jedoch zu vermeidbaren Einschränkungen führen, da auch Faktoren wie Konzentration, Stabilität und tatsächliche Exposition berücksichtigt werden müssen. Zwar deuten bisherige Untersuchungen darauf hin, dass dsRNA unter normalen Umständen keine Gefahr für den Menschen darstellt. Allerdings könnten Modifikationen zur Erhöhung der Stabilität unbekannte Risiken mit sich bringen. Eine potenzielle Herausforderung stellt außerdem die Entwicklung von Resistenzen dar. Beispielsweise wurden bereits Resistenzen gegen RNAi in Schädlingen wie dem Kartoffelkäfer und dem Westlichen Maiswurzelbohrer beobachtet. Diese Resistenzen können durch Punktmutationen (SNPs) entstehen, die die Bindung der siRNA an das Zielgen verhindert, während die Proteinfunktion erhalten bleibt. Auch Mutationen in RNAi-Schlüsselkomponenten oder Genen, die für den Transport und die Aufnahme von dsRNA entscheidend sind, könnten Resistenzen fördern (95,215). Ein weiteres Hindernis für den Einsatz von RNAi-basierten Biopestiziden liegt in der Abwesenheit klarer regulatorischer Leitlinien (214,216). Die Entwicklung solcher Rahmenbedingungen ist

essenziell, um den sicheren und effektiven Einsatz dieser Technologie in der Landwirtschaft zu gewährleisten.

4.6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Herstellung von edsRNA sowohl für das Modell CMV als auch für den Kartoffelkäfer erfolgreich in *S. cerevisiae* umgesetzt werden konnte. In Vergleichsexperimenten mit einer *in-silico* entwickelten Positivkontrolle erzielte die edsRNA eine höhere Mortalitätsrate von Kartoffelkäferlarven. Dies verdeutlicht, dass bereits geringe Mengen einer gezielt designten und hochspezifischen dsRNA ausreichen, um eine effektive Wirkung zu erzielen. Die erfolgreiche Anwendung der RNAi-Technologie in diesem Kontext unterstreicht das Potenzial der edsRNA als nachhaltiges Biopestizid. Die Ergebnisse legen eine solide Grundlage für die Weiterentwicklung und den Einsatz von RNAi-basierten Lösungen in der modernen Landwirtschaft.

Zukünftige Forschungen könnten sich darauf konzentrieren, die RNAi-Technologie gegen andere Schadinsekten oder auch gegen Viren, die Nutzinsekten wie Bienen oder Hummeln befallen, Pilzerkrankungen und Unkräuter einzusetzen. Der Kartoffelkäfer diene zwar als erfolgreicher Modellorganismus für RNAi-basierte Anwendungen, da er besonders empfänglich für diese Behandlungsform ist, jedoch bleibt zu klären, ob ähnliche Ergebnisse auch bei weniger sensiblen Spezies erzielt werden können.

Weiterhin könnte die edsRNA auch durch die Kombination von esiRNAs, die auf verschiedene Target-RNAs abzielen, aufgebaut werden. Dies würde möglicherweise eine effektivere Behandlung bei niedriger edsRNA-Konzentration ermöglichen und zugleich das Auftreten von Resistenzen verhindern oder verzögern. Zudem könnte die Länge der edsRNA angepasst werden, da die Ergebnisse der Transkription darauf hinweisen, dass längere Transkripte mit höherer Ausbeute produziert werden können. Darüber hinaus bieten sich Möglichkeiten, die Promotoren für die Transkription der edsRNA zu optimieren, um die Effizienz der Transkription weiter zu steigern.

In den bisherigen Experimenten kamen überwiegend episomale Plasmide zum Einsatz, da diese die Möglichkeit bieten, mehrere Kopien des Plasmids in *S. cerevisiae* zu etablieren. Allerdings ist dieser Ansatz mit Nachteilen verbunden. Die Kopienanzahl der Plasmide kann variieren, und es ist ein konstanter Selektionsdruck erforderlich, um die Plasmidstabilität aufrechtzuerhalten. Dies erhöht nicht nur die Komplexität, sondern auch die Kosten der Kultivierung. Eine mögliche Alternative wäre die Integration mehrerer Kopien des Konstrukts in das Hefegenom. Dadurch könnten stabile Klone erzeugt werden, die unabhängig vom Selektionsdruck persistieren und eine konsistente Expression gewährleisten. Im Rahmen dieser Überlegungen wäre es sinnvoll, *S. cerevisiae* genetisch zu modifizieren, indem bspw.

das RNase III-ähnliche Gen *Rnt1* ausgeschaltet wird. Dadurch könnte die Akkumulation der edsRNA erhöht werden, da der enzymatische Abbau der RNA vermindert wäre.

Für den flächendeckenden Einsatz der RNAi-Technologie mit *S. cerevisiae* als Produktions- und Lieferorganismus ist eine einfache, kostengünstige und stabile Form der Lagerung und des Transports von entscheidender Bedeutung. Eine vielversprechende Lösung könnte die Verarbeitung der Hefe zu Trockenpulver sein. Dieses Pulver könnte dann am Zielort unmittelbar vor der Applikation in Wasser oder Puffer resuspendiert werden. Ein solcher Ansatz würde nicht nur eine einfache Handhabung und Lagerung ermöglichen, sondern auch den Transport über weite Entfernungen, einschließlich abgelegener Gebiete, erleichtern. Gleichzeitig würde die edsRNA vor möglichen Abbauprozessen während des Transports geschützt und sich somit als zukunftsfähiges und nachhaltiges Biopestizid erweisen.

5 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund einer prognostizierten Weltbevölkerung von über 10 Milliarden Menschen bis zum Ende dieses Jahrhunderts stellt die Sicherstellung einer nachhaltigen und ökologisch verträglichen Nahrungsmittelproduktion eine der zentralen Herausforderungen unserer Zeit dar. Der angestrebte Rückgang des Einsatzes chemischer Pestizide im Rahmen des *European Green Deals* (Reduktion um 50 % bis 2030) erfordert zudem zeitnah die Entwicklung alternativer Pflanzenschutzstrategien. Eine vielversprechende Alternative stellt die RNA-Interferenz (RNAi) dar, ein natürlicher Mechanismus der Genregulation, der durch das Vorhandensein doppelsträngiger RNA (dsRNA) als pathogenassoziiertes molekulares Muster (PAMP) ausgelöst wird und zur sequenzspezifischen Degradation komplementärer mRNA führt. Ziel dieser Arbeit war es, das Potenzial des Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* zur kostengünstigen und skalierbaren Produktion funktioneller dsRNA zu untersuchen.

Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit entwickelte die Arbeitsgruppe „Mikrobielle Biotechnologie“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg ein *in-vitro-Screening*-Verfahren zur Identifizierung besonders wirksamer siRNAs, sogenannter esiRNAs. Aufbauend darauf wurde ein multivalentes edsRNA-Design konzipiert, das mehrere dieser esiRNAs in 5'-3'-Anordnung kombiniert. Dieses ursprüngliche Konstrukt wurde von Dr. Selma Gago-Zachert modifiziert, um die effiziente Generierung der edsRNA *in vivo* zu ermöglichen. Hierzu wurden Ribozyme *upstream* und *downstream* vom edsRNA-Konstrukt verwendet, welche sich cotranskriptionell präzise an einer definierten Position abspalten und dadurch ein exakt definiertes 3'-Ende erzeugen. Dies ist entscheidend für die Stabilität und besonders die Funktionalität der edsRNA. Für die Transkription der edsRNA wurden insgesamt zwei unterschiedliche RNA-Polymerasen verwendet: Die T7-Polymerase diente der Validierung des Konzepts *in vitro*, während die RNA-Polymerase II für die Expression *in vivo* eingesetzt wurde. Für das RNA-Polymerase II-basierte Expressionskonstrukt wurden drei verschiedene Promotoren eingesetzt (GAL1, TEF1, TDH3).

In vitro wurde die edsRNA nur teilweise korrekt durch die Ribozym-vermittelte Prozessierung generiert. Trotzdem war der Anteil der korrekt Ribozym-prozessierten edsRNA im Transkriptgemisch ausreichend, um eine spezifische endonukleolytische Spaltung der Target-RNA im kombinierten DCL-*Slicer*-Assay zu induzieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ribozym-vermittelte Verarbeitung zwar nicht vollständig effizient ist, jedoch funktionelle edsRNA-Moleküle in hinreichender Menge produziert werden, um die angestrebte *silencing*-Aktivität zu ermöglichen.

In vivo wurde die korrekt Ribozym-prozessierten edsRNA unter Verwendung des induzierbaren GAL1- und konstitutiven TDH3-Promotors generiert. Im Gegensatz dazu führte der konstitutive TEF1-Promotor zwar auch zur Transkription der edsRNA, jedoch ließ sich in diesem Fall keine

eindeutige Aussage über die korrekte Ribozym-vermittelte Prozessierung treffen. Mögliche Ursachen hierfür sind eine unzureichende Sensitivität der eingesetzten Nachweismethoden oder eine verminderte Effizienz der Ribozym-Spaltung unter konstitutiver Promotoraktivität. Unabhängig vom verwendeten Promotor konnte maximal eine Ausbeute von ca. 1 µg edsRNA pro Gramm Trockenhefe erzielt werden. Ebenso wie die Funktionalität der *in vitro* generierten edsRNA wurde auch die Funktionalität der *in vivo* generierten edsRNA im kombinierten DCL-*Slicer*-Assay überprüft. Allerdings ergab sich hierbei kein Hinweis auf die Bildung funktionaler esiRNAs, da die Target-RNA ungespalten blieb. Zur weiteren Untersuchung möglicher hemmender Effekte wurde der Einfluss von kompetitiver RNA analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von 2 µg Gesamt-Hefe-RNA keinen messbaren Einfluss auf die Spaltungseffizienz hatte, während die Zugabe von 10 µg zu einer deutlich reduzierten, nur noch partiellen Spaltung führte. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass eine hohe Konzentration unspezifischer zellulärer RNA mit den edsRNA-Substraten oder -Intermediaten um zentrale Komponenten der *silencing*-Maschinerie konkurriert. Dies könnte eine mögliche Erklärung sein, weshalb im *in-vivo*-Ansatz keine funktionale RNAi beobachtet wurde. Alternativ sind weitere experimentelle Ursachen wie eine unzureichende Prozessierung, Instabilität der edsRNA oder ineffiziente Aufnahme in den RISC nicht auszuschließen und sollten in zukünftigen Studien gezielt untersucht werden.

Um bereits in *S. cerevisiae* funktionelle esiRNAs vorliegen zu haben, wurden die edsRNA sowie *DCL4* aus *A. thaliana* in einem Coexpressionssystem gemeinsam exprimiert. Die Analyse der DCL4-Aktivität in *S. cerevisiae* ergab das charakteristische Prozessierungsprodukt von 21 nt. Zusätzlich wurden jedoch auch RNA-Fragmente mit einer Länge von 22 nt detektiert, was auf eine gewisse Variabilität in der Prozessierung durch das heterolog exprimierte *DCL4* hinweist. Ein *phased processing*, bei dem die entstehenden esiRNAs in einem definierten 21-Nukleotid-Raster aus der edsRNA gebildet werden, konnte hingegen der Erwartung aus Experimenten im Pflanzenextrakt BYL in *S. cerevisiae* nicht beobachtet werden. Diese Abweichungen deuten darauf hin, dass die Coexpression von edsRNA und *DCL4* in diesem zellulären Kontext nicht ausreicht, um die Bildung von esiRNAs zuverlässig zu gewährleisten.

Daher wurden *in-vivo*-Experimente mit einem *S. cerevisiae*-Stamm durchgeführt, der edsRNA, jedoch kein *DCL4* exprimiert, um zu prüfen, ob eine alternative Prozessierung der edsRNA und ein daraus resultierender Gen-*silencing*-Effekt auch bei geringer edsRNA-Menge möglich sind. Knoblich et al. zeigten zudem, dass bereits geringe Mengen an esiRNAs in Pflanzen einen effektiven Schutz gegenüber viralen Pathogenen vermitteln können.

Die (e)dsRNA-Ausbeuten lagen im Bereich von 1-20 µg/g Trockenhefe, was auf Limitierungen im Hinblick auf industrielle Anwendungen hinweist. Dennoch konnte im *in-vivo*-Experiment mit dem Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*) eine Mortalität und Entwicklungsschädigung

durch edsRNA-Konzentrationen unterhalb von 1 ng nachgewiesen werden. Des Weiteren führte die Positivkontrolle (dsRNA abgeleitet vom kommerziellen Produkt Calantha™) bereits innerhalb von sieben Tagen bei Konzentrationen unter 16 ng zu einer 100%igen Mortalität der Kartoffelkäferlarven. Damit konnte prinzipiell die biologische Wirksamkeit des Hefe-basierten Systems demonstriert werden.

Insgesamt belegen die Ergebnisse das grundsätzliche Potenzial von *S. cerevisiae* als Produktionsorganismus für funktionelle (e)dsRNA im Rahmen RNAi-basierter Pflanzenschutzstrategien. Dennoch verdeutlichen die experimentellen Befunde auch bestehende Herausforderungen, etwa hinsichtlich der Transkriptmengen, der Prozessierungseffizienz und der Stabilität der dsRNA *in vivo*. Diese Aspekte bedürfen weiterführender Optimierung, bevor eine industrielle Anwendung realisierbar erscheint. Die Arbeit liefert somit sowohl einen grundlegenden Beitrag zum Verständnis der RNAi-Technologie in einem heterologen System als auch eine mögliche Grundlage für nachhaltige, biotechnologische Lösungen im Pflanzenschutz der Zukunft.

6 Literaturverzeichnis

1. World Bank (2025) World Development Indicators. Data Bank, <https://databank.worldbank.org/reports.aspx?source=World-Development-Indicators>.
2. Taagepera, R. and Nemčok, M. (2024) World population growth over millennia: Ancient and present phases with a temporary halt in-between, *The Anthropocene Review*, **11**, 163–183.
3. Otekunrin, O.A. (2024) Assessing the Prevalence and Severity of Global Hunger and Food Insecurity: Recent Dynamics and Sub-Saharan Africa's Burden, *Sustainability*, **16**, 4877.
4. Abd-Elsalam, K.A. and Abdel-Momen, S.M. (2024) Plant Quarantine Challenges under Climate Change Anxiety. Springer Nature Switzerland, Cham.
5. Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S.J., Esker, P., McRoberts, N. and Nelson, A. (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops, *Nature ecology & evolution*, **3**, 430–439. First published on Feb 4, 2019.
6. Arora, R. and Sandhu, S. (2017) Breeding Insect Resistant Crops for Sustainable Agriculture. Springer Singapore, Singapore.
7. Pesticide Action Network Europe (2010) Pesticides and the loss of biodiversity. How intensive pesticide use affects wildlife populations and species diversity, https://www.pan-europe.info/old/Resources/Briefings/Pesticides_and_the_loss_of_biodiversity.pdf.
8. Bass, C., Denholm, I., Williamson, M.S. and Nauen, R. (2015) The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides, *Pesticide biochemistry and physiology*, **121**, 78–87. First published on Apr 28, 2015.
9. Hawkins, N.J., Bass, C., Dixon, A. and Neve, P. (2019) The evolutionary origins of pesticide resistance, *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **94**, 135–155. First published on Jul 3, 2018.
10. Sabarwal, A., Kumar, K. and Singh, R.P. (2018) Hazardous effects of chemical pesticides on human health-Cancer and other associated disorders, *Environmental toxicology and pharmacology*, **63**, 103–114. First published on Sep 1, 2018.
11. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz Agenda 2030. Nachhaltigkeitsziele, <https://www.bmu.de/themen/nachhaltigkeit/2030-agenda>.
12. Europäische Kommission Der europäische Grüne Deal, https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal_de.
13. Bremmer, J., Gonzalez-Martinez, A., Jongeneel, R., Huiting, H., Stokkers, R. and Ruijs, M. (2021) Impact assessment of EC 2030 Green Deal Targets for sustainable crop production. Wageningen Economic Research, Wageningen.
14. Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans, *Plant Cell*, **2**, 279–289.
15. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, **391**, 806–811.
16. Shabalina, S.A. and Koonin, E.V. (2008) Origins and evolution of eukaryotic RNA interference, *Trends in ecology & evolution*, **23**, 578–587. First published on Aug 18, 2008.
17. Szweykowska-Kulińska, Z., Jaromłowski, A., & Figlerowicz, M. (2003) RNA interference and its role in the regulation of eucaryotic gene expression., *Acta Biochimica Polonica*, **50**, 217–229.
18. Meister, G. and Tuschl, T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA, *Nature*, **431**, 343–349.
19. Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals, *Cell*, **101**, 25–33.
20. Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs, *Genes & development*, **15**, 188–200.

21. Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.-E., Smith, D.P. and Wang, X. (2003) R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway, *Science (New York, N.Y.)*, **301**, 1921–1925.
22. Liu, Y., Ye, X., Jiang, F., Liang, C., Chen, D., Peng, J., Kinch, L.N., Grishin, N.V. and Liu, Q. (2009) C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation, *Science (New York, N.Y.)*, **325**, 750–753.
23. Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex, *Cell*, **115**, 199–208.
24. Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. and Zamore, P.D. (2004) A protein sensor for siRNA asymmetry, *Science (New York, N.Y.)*, **306**, 1377–1380.
25. Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R. and Hannon, G.J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi, *Science (New York, N.Y.)*, **293**, 1146–1150.
26. Noland, C.L. and Doudna, J.A. (2013) Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways, *RNA (New York, N.Y.)*, **19**, 639–648. First published on Mar 26, 2013.
27. Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H. and Siomi, M.C. (2004) Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways, *Genes & development*, **18**, 1655–1666. First published on Jul 1, 2004.
28. Iwakawa, H.-O. and Tomari, Y. (2022) Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex, *Molecular cell*, **82**, 30–43. First published on Dec 22, 2021.
29. Karlikow, M., Goic, B. and Saleh, M.-C. (2014) RNAi and antiviral defense in *Drosophila*: setting up a systemic immune response, *Developmental and comparative immunology*, **42**, 85–92. First published on May 14, 2013.
30. Tassetto, M., Kunitomi, M. and Andino, R. (2017) Circulating Immune Cells Mediate a Systemic RNAi-Based Adaptive Antiviral Response in *Drosophila*, *Cell*, **169**, 314–325.e13.
31. Paradkar, P.N., Trinidad, L., Voysey, R., Duchemin, J.-B. and Walker, P.J. (2012) Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 18915–18920. First published on Oct 1, 2012.
32. Berry, B., Deddouche, S., Kirschner, D., Imler, J.-L. and Antoniewski, C. (2009) Viral suppressors of RNA silencing hinder exogenous and endogenous small RNA pathways in *Drosophila*, *PloS one*, **4**, e5866. First published on Jun 10, 2009.
33. Burgyán, J. and Havelda, Z. (2011) Viral suppressors of RNA silencing, *Trends in plant science*, **16**, 265–272. First published on Mar 24, 2011.
34. Nayak, A., Kim, D.Y., Trnka, M.J., Kerr, C.H., Lidsky, P.V., Stanley, D.J., Rivera, B.M., Li, K.H., Burlingame, A.L. and Jan, E. *et al.* (2018) A Viral Protein Restricts *Drosophila* RNAi Immunity by Regulating Argonaute Activity and Stability, *Cell host & microbe*, **24**, 542–557.e9.
35. Singh, G., Popli, S., Hari, Y., Malhotra, P., Mukherjee, S. and Bhatnagar, R.K. (2009) Suppression of RNA silencing by Flock house virus B2 protein is mediated through its interaction with the PAZ domain of Dicer, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **23**, 1845–1857. First published on Feb 4, 2009.
36. Fareh, M., van Lopik, J., Katechis, I., Bronkhorst, A.W., Haagsma, A.C., van Rij, R.P. and Joo, C. (2018) Viral suppressors of RNAi employ a rapid screening mode to discriminate viral RNA from cellular small RNA, *Nucleic acids research*, **46**, 3187–3197.
37. Valli, A., Busnadiego, I., Maliogka, V., Ferrero, D., Castón, J.R., Rodríguez, J.F. and García, J.A. (2012) The VP3 factor from viruses of Birnaviridae family suppresses RNA silencing by binding both long and small RNA duplexes, *PloS one*, **7**, e45957. First published on Sep 25, 2012.
38. Niu, J., Chen, R. and Wang, J.-J. (2024) RNA interference in insects: the link between antiviral defense and pest control, *Insect science*, **31**, 2–12. First published on May 10, 2023.
39. Millar, A.A. and Waterhouse, P.M. (2005) Plant and animal microRNAs: similarities and differences, *Functional & integrative genomics*, **5**, 129–135. First published on May 5, 2005.

40. Chapman, E.J. and Carrington, J.C. (2007) Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways, *Nature reviews. Genetics*, **8**, 884–896.
41. Margis, R., Fusaro, A.F., Smith, N.A., Curtin, S.J., Watson, J.M., Finnegan, E.J. and Waterhouse, P.M. (2006) The evolution and diversification of Dicers in plants, *FEBS letters*, **580**, 2442–2450. First published on Apr 7, 2006.
42. Hajieghrari, B., Farrokhi, N. and Kamalizadeh, M. (2022) Comparative phylogeny and evolutionary analysis of Dicer-like protein family in two plant monophyletic lineages, *Journal, genetic engineering & biotechnology*, **20**, 103. First published on Jul 12, 2022.
43. Schoggins, J.W. (2019) Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do?, *Annual review of virology*, **6**, 567–584. First published on Jul 5, 2019.
44. Yu, S., Luo, F., Xu, Y., Zhang, Y. and Jin, L.H. (2022) Drosophila Innate Immunity Involves Multiple Signaling Pathways and Coordinated Communication Between Different Tissues, *Frontiers in immunology*, **13**, 905370. First published on Jul 7, 2022.
45. Sabin, L.R., Hanna, S.L. and Cherry, S. (2010) Innate antiviral immunity in Drosophila, *Current opinion in immunology*, **22**, 4–9.
46. Paddison, P.J. (ed.) (2008). *RNA interference*. Springer, Berlin, Heidelberg.
47. Zapletal, D., Kubicek, K., Svoboda, P. and Stefl, R. (2023) Dicer structure and function: conserved and evolving features, *EMBO reports*, **24**, e57215. First published on Jun 13, 2023.
48. Schauer, S.E., Jacobsen, S.E., Meinke, D.W. and Ray, A. (2002) DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development, *Trends in plant science*, **7**, 487–491.
49. Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D. and Doudna, J.A. (2006) Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer, *Science (New York, N.Y.)*, **311**, 195–198.
50. Hansen, S.R., Aderounmu, A.M., Donelick, H.M. and Bass, B.L. (2019) Dicer's Helicase Domain: A Meeting Place for Regulatory Proteins, *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, **84**, 185–193. First published on Mar 16, 2020.
51. Kandasamy, S.K., Zhu, L. and Fukunaga, R. (2017) The C-terminal dsRNA-binding domain of Drosophila Dicer-2 is crucial for efficient and high-fidelity production of siRNA and loading of siRNA to Argonaute2, *RNA (New York, N.Y.)*, **23**, 1139–1153. First published on Apr 17, 2017.
52. Ma, J.-B., Ye, K. and Patel, D.J. (2004) Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain, *Nature*, **429**, 318–322.
53. Kandasamy, S.K. and Fukunaga, R. (2016) Phosphate-binding pocket in Dicer-2 PAZ domain for high-fidelity siRNA production, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, 14031–14036. First published on Nov 21, 2016.
54. Yamaguchi, S., Naganuma, M., Nishizawa, T., Kusakizako, T., Tomari, Y., Nishimasu, H. and Nureki, O. (2022) Structure of the Dicer-2-R2D2 heterodimer bound to a small RNA duplex, *Nature*, **607**, 393–398. First published on Jun 29, 2022.
55. Su, S., Wang, J., Deng, T., Yuan, X., He, J., Liu, N., Li, X., Huang, Y., Wang, H.-W. and Ma, J. (2022) Structural insights into dsRNA processing by Drosophila Dicer-2-Loqs-PD, *Nature*, **607**, 399–406. First published on Jun 29, 2022.
56. Lee, H.Y., Zhou, K., Smith, A.M., Noland, C.L. and Doudna, J.A. (2013) Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing, *Nucleic acids research*, **41**, 6568–6576. First published on May 9, 2013.
57. Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K. and Fukuhara, T. (2005) Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in Arabidopsis thaliana, *Plant molecular biology*, **57**, 173–188.
58. Niraula, P.M. and Fondong, V.N. (2021) Development and Adoption of Genetically Engineered Plants for Virus Resistance: Advances, Opportunities and Challenges, *Plants (Basel, Switzerland)*, **10**. First published on Oct 29, 2021.
59. U.S. Environmental Protection Agency Pesticide Product Label, SmartStax PRO Enlist Refuge Advanced 2017, https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/062719-00707-20170608.pdf.

60. Horn, T. and Boutros, M. (2013) Design of RNAi reagents for invertebrate model organisms and human disease vectors, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **942**, 315–346.
61. Tafer, H., Ameres, S.L., Obernosterer, G., Gebeshuber, C.A., Schroeder, R., Martinez, J. and Hofacker, I.L. (2008) The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs, *Nature biotechnology*, **26**, 578–583. First published on Apr 27, 2008.
62. Ding, Y., Chan, C.Y. and Lawrence, C.E. (2004) Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids, *Nucleic acids research*, **32**, W135–41.
63. Gago-Zachert, S., Schuck, J., Weinholdt, C., Knoblich, M., Pantaleo, V., Grosse, I., Gursinsky, T. and Behrens, S.-E. (2019) Highly efficacious antiviral protection of plants by small interfering RNAs identified in vitro, *Nucleic acids research*, **47**, 9343–9357.
64. Pantaleo, V., Szittya, G. and Burgyán, J. (2007) Molecular bases of viral RNA targeting by viral small interfering RNA-programmed RISC, *Journal of virology*, **81**, 3797–3806. First published on Jan 31, 2007.
65. Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H. and Long, C. *et al.* (2008) Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide, *Cell*, **133**, 116–127. First published on Mar 13, 2008.
66. Becker, W.R., Ober-Reynolds, B., Jouravleva, K., Jolly, S.M., Zamore, P.D. and Greenleaf, W.J. (2019) High-Throughput Analysis Reveals Rules for Target RNA Binding and Cleavage by AGO2, *Molecular cell*, **75**, 741-755.e11. First published on Jul 16, 2019.
67. Knoblich, M., Gursinsky, T., Gago-Zachert, S., Weinholdt, C., Grau, J. and Behrens, S.-E. (2024) A new level of RNA-based plant protection - dsRNAs designed from functionally characterized siRNAs highly effective against Cucumber Mosaic Virus.
68. Christiaens, O., Niu, J. and Nji Tizi Taning, C. (2020) RNAi in Insects: A Revolution in Fundamental Research and Pest Control Applications, *Insects*, **11**. First published on Jul 3, 2020.
69. Beernink, B.M., Amanat, N., Li, V.H., Manchur, C.L., Whyard, S. and Belmonte, M.F. (2024) SIGS vs. HIGS: opportunities and challenges of RNAi pest and pathogen control strategies, *Canadian Journal of Plant Pathology*, **46**, 675–689.
70. Bally, J., McIntyre, G.J., Doran, R.L., Lee, K., Perez, A., Jung, H., Naim, F., Larrinua, I.M., Narva, K.E. and Waterhouse, P.M. (2016) In-Plant Protection against *Helicoverpa armigera* by Production of Long hpRNA in Chloroplasts, *Frontiers in plant science*, **7**, 1453. First published on Sep 29, 2016.
71. Kumar, P., Pandit, S.S. and Baldwin, I.T. (2012) Tobacco rattle virus vector: A rapid and transient means of silencing *manduca sexta* genes by plant mediated RNA interference, *PloS one*, **7**, e31347. First published on Feb 1, 2012.
72. He, L., Huang, Y. and Tang, X. (2022) RNAi-based pest control: Production, application and the fate of dsRNA, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, **10**, 1080576. First published on Nov 29, 2022.
73. Koch, A., Biedenkopf, D., Furch, A., Weber, L., Rossbach, O., Abdellatif, E., Linicus, L., Johannsmeier, J., Jelonek, L. and Goesmann, A. *et al.* (2016) An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery, *PLoS pathogens*, **12**, e1005901. First published on Oct 13, 2016.
74. Forum Bio- und Gentechnologie – Verein zur Förderung (13.09.2022) RNA-Sprays gegen Schädlinge – der biologische Pflanzenschutz der Zukunft? First published on Sep 13, 2022, <https://www.transgen.de/forschung/2860.rna-spray-pflanzenschutz.html>.
75. Reinders, J.D., Moar, W.J., Head, G.P., Hassan, S. and Meinke, L.J. (2023) Effects of SmartStax® and SmartStax® PRO maize on western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) larval feeding injury and adult life history parameters, *PloS one*, **18**, e0288372. First published on Jul 10, 2023.
76. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) GM Approval Database. GM Crop Events List, <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=521>.
77. Li, X., Liu, X., Lu, W., Yin, X. and An, S. (2022) Application progress of plant-mediated RNAi in pest control, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, **10**, 963026. First published on Aug 8, 2022.

78. Zotti, M.J. and Smagghe, G. (2015) RNAi Technology for Insect Management and Protection of Beneficial Insects from Diseases: Lessons, Challenges and Risk Assessments, *Neotropical entomology*, **44**, 197–213. First published on Apr 17, 2015.
79. Kumar, K., Gambhir, G., Dass, A., Tripathi, A.K., Singh, A., Jha, A.K., Yadava, P., Choudhary, M. and Rakshit, S. (2020) Genetically modified crops: current status and future prospects, *Planta*, **251**, 91. First published on Mar 31, 2020.
80. Zhang, J., Khan, S.A., Heckel, D.G. and Bock, R. (2017) Next-Generation Insect-Resistant Plants: RNAi-Mediated Crop Protection, *Trends in biotechnology*, **35**, 871–882. First published on Jul 19, 2017.
81. Tabashnik, B.E., Fabrick, J.A. and Carrière, Y. (2023) Global Patterns of Insect Resistance to Transgenic Bt Crops: The First 25 Years, *Journal of economic entomology*, **116**, 297–309.
82. Silver, K., Cooper, A.M. and Zhu, K.Y. (2021) Strategies for enhancing the efficiency of RNA interference in insects, *Pest management science*, **77**, 2645–2658. First published on Feb 1, 2021.
83. Hough, J., Howard, J.D., Brown, S., Portwood, D.E., Kilby, P.M. and Dickman, M.J. (2022) Strategies for the production of dsRNA biocontrols as alternatives to chemical pesticides, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, **10**, 980592. First published on Oct 10, 2022.
84. Guan, R., Miao, X. and Li, H. (2024) Bacteria-Based Double-Stranded RNA Production to Develop Cost-Effective RNA Interference Application for Insect Pest Management, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **2771**, 73–81.
85. Choudhary, C., Meghwanshi, K.K., Shukla, N. and Shukla, J.N. (2021) Innate and adaptive resistance to RNAi: a major challenge and hurdle to the development of double stranded RNA-based pesticides, *3 Biotech*, **11**, 498. First published on Nov 16, 2021.
86. San Miguel, K. and Scott, J.G. (2016) The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar-applied insecticide, *Pest management science*, **72**, 801–809. First published on Jul 14, 2015.
87. Mitter, N., Worrall, E.A., Robinson, K.E., Li, P., Jain, R.G., Taochy, C., Fletcher, S.J., Carroll, B.J., Lu, G.Q.M. and Xu, Z.P. (2017) Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses, *Nature plants*, **3**, 16207. First published on Jan 9, 2017.
88. Parker, K.M., Barragán Borrero, V., van Leeuwen, D.M., Lever, M.A., Mateescu, B. and Sander, M. (2019) Environmental Fate of RNA Interference Pesticides: Adsorption and Degradation of Double-Stranded RNA Molecules in Agricultural Soils, *Environmental science & technology*, **53**, 3027–3036. First published on Feb 25, 2019.
89. Wytinck, N., Manchur, C.L., Li, V.H., Whyard, S. and Belmonte, M.F. (2020) dsRNA Uptake in Plant Pests and Pathogens: Insights into RNAi-Based Insect and Fungal Control Technology, *Plants (Basel, Switzerland)*, **9**. First published on Dec 16, 2020.
90. Arjunan, N., Thiruvengadam, V. and Sushil, S.N. (2024) Nanoparticle-mediated dsRNA delivery for precision insect pest control: a comprehensive review, *Molecular biology reports*, **51**, 355. First published on Feb 24, 2024.
91. Zhu, K.Y. and Palli, S.R. (2020) Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference, *Annual review of entomology*, **65**, 293–311. First published on Oct 14, 2019.
92. Singh, I.K., Singh, S., Mogilicherla, K., Shukla, J.N. and Palli, S.R. (2017) Comparative analysis of double-stranded RNA degradation and processing in insects, *Scientific reports*, **7**, 17059. First published on Dec 6, 2017.
93. Shukla, J.N., Kalsi, M., Sethi, A., Narva, K.E., Fishilevich, E., Singh, S., Mogilicherla, K. and Palli, S.R. (2016) Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects, *RNA biology*, **13**, 656–669. First published on May 31, 2016.
94. Santos, D., Mingels, L., Vogel, E., Wang, L., Christiaens, O., Cappelle, K., Wynant, N., Gansemans, Y., van Nieuwerburgh, F. and Smagghe, G. *et al.* (2019) Generation of Virus- and dsRNA-Derived siRNAs with Species-Dependent Length in Insects, *Viruses*, **11**. First published on Aug 11, 2019.
95. Khajuria, C., Ivashuta, S., Wiggins, E., Flagel, L., Moar, W., Pleau, M., Miller, K., Zhang, Y., Ramaseshadri, P. and Jiang, C. *et al.* (2018) Development and characterization of the first dsRNA-resistant insect population from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, *PloS one*, **13**, e0197059. First published on May 14, 2018.

96. Fletcher, S.J., Reeves, P.T., Hoang, B.T. and Mitter, N. (2020) A Perspective on RNAi-Based Biopesticides, *Frontiers in plant science*, **11**, 51. First published on Feb 12, 2020.
97. Hu, X., Steimel, J.P., Kapka-Kitzman, D.M., Davis-Vogel, C., Richtman, N.M., Mathis, J.P., Nelson, M.E., Lu, A.L. and Wu, G. (2019) Molecular characterization of the insecticidal activity of double-stranded RNA targeting the smooth septate junction of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*), *PLoS one*, **14**, e0210491. First published on Jan 10, 2019.
98. Yang, L., Tian, Y., Peng, Y.-Y., Niu, J. and Wang, J.-J. (2020) Expression Dynamics of Core RNAi Machinery Genes in Pea Aphids Upon Exposure to Artificially Synthesized dsRNA and miRNAs, *Insects*, **11**. First published on Jan 21, 2020.
99. Gholamalipour, Y., Karunanayake Mudiyanse, A. and Martin, C.T. (2018) 3' end additions by T7 RNA polymerase are RNA self-templated, distributive and diverse in character-RNA-Seq analyses, *Nucleic acids research*, **46**, 9253–9263.
100. Martin, C.T., Muller, D.K. and Coleman, J.E. (1988) Processivity in early stages of transcription by T7 RNA polymerase, *Biochemistry*, **27**, 3966–3974.
101. Thermo Fisher Scientific RNase A, DNase und Proteasefrei. Katalognummer EN0531, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/EN0531>.
102. Thermo Fisher Scientific RNase T1. Katalognummer EN0542, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EN0542?SID=srch-srp-EN0542>.
103. Skelly, P.J., Da'dara, A. and Harn, D.A. (2003) Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference, *International journal for parasitology*, **33**, 363–369.
104. Urquhart, W., Mueller, G.M., Carleton, S., Song, Z., Perez, T., Uffman, J.P., Jensen, P.D., Levine, S.L. and Ward, J. (2015) A novel method of demonstrating the molecular and functional equivalence between in vitro and plant-produced double-stranded RNA, *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, **73**, 607–612. First published on Sep 8, 2015.
105. Thermo Fisher Scientific In Vitro Transcription Kits for Synthesizing High Yield mRNA, <https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/pharma-biopharma/nucleic-acid-therapeutic-development-solutions/mrna-research/in-vitro-transcription-kits.html>.
106. Zotti, M., Dos Santos, E.A., Cagliari, D., Christiaens, O., Taning, C.N.T. and Smagghe, G. (2018) RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes, *Pest management science*, **74**, 1239–1250. First published on Jan 16, 2018.
107. Silverman, A.D., Karim, A.S. and Jewett, M.C. (2020) Cell-free gene expression: an expanded repertoire of applications, *Nature reviews. Genetics*, **21**, 151–170. First published on Nov 28, 2019.
108. Hunt, A.C., Rasor, B.J., Seki, K., Ekas, H.M., Warfel, K.F., Karim, A.S. and Jewett, M.C. (2025) Cell-Free Gene Expression: Methods and Applications, *Chemical reviews*, **125**, 91–149. First published on Dec 19, 2024.
109. Taning, C.N., Arpaia, S., Christiaens, O., Dietz-Pfeilstetter, A., Jones, H., Mezzetti, B., Sabbadini, S., Sorteberg, H.-G., Sweet, J. and Ventura, V. *et al.* (2020) RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market, *Pest management science*, **76**, 841–845. First published on Dec 17, 2019.
110. Tenllado, F., Martínez-García, B., Vargas, M. and Díaz-Ruiz, J.R. (2003) Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections, *BMC biotechnology*, **3**, 3. First published on Mar 20, 2003.
111. Taracena, M.L., Garcia Caffaro, I., Paiva-Silva, G.O., Oliveira, P.L., Rendon, P.A., Dotson, E.M. and Pennington, P.M. (2022) Delivery of Double-Stranded RNAs (dsRNAs) Produced by *Escherichia coli* HT115(DE3) for Nontransgenic RNAi-Based Insect Pest Management, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **2360**, 279–294.
112. Ma, Z.-Z., Zhou, H., Wei, Y.-L., Yan, S. and Shen, J. (2020) A novel plasmid-*Escherichia coli* system produces large batch dsRNAs for insect gene silencing, *Pest management science*, **76**, 2505–2512. First published on Mar 2, 2020.
113. Takiff, H.E., Chen, S.M. and Court, D.L. (1989) Genetic analysis of the *rnc* operon of *Escherichia coli*, *Journal of bacteriology*, **171**, 2581–2590.

114. Timmons, L., Court, D.L. and Fire, A. (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*, *Gene*, **263**, 103–112.
115. Lee, J.W., Fang, X., Gupta, N., Serikov, V. and Matthay, M.A. (2009) Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of *E. coli* endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 16357–16362. First published on Aug 31, 2009.
116. Figueiredo Prates, L.H., Merlau, M., Rühl-Teichner, J., Schetelig, M.F. and Häcker, I. (2023) An Optimized/Scale Up-Ready Protocol for Extraction of Bacterially Produced dsRNA at Good Yield and Low Costs, *International journal of molecular sciences*, **24**. First published on May 25, 2023.
117. Xue, Q., Avila dos Santos, E., Smagghe, G., Zotti, M.J. and Taning, N.T.C. (2023) Engineering Strategies for Insect Viruses and Microbes for DsRNA Production and Delivery to Insects for Targeted Gene Silencing., *ENTOMOLOGIA GENERALIS*, vol. **43**, pp. 31-53.
118. Chen, Z., He, J., Luo, P., Li, X. and Gao, Y. (2019) Production of functional double-stranded RNA using a prokaryotic expression system in *Escherichia coli*, *MicrobiologyOpen*, **8**, e00787. First published on Dec 27, 2018.
119. Papić, L., Rivas, J., Toledo, S. and Romero, J. (2018) Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant *Escherichia coli* HT115 in fed-batch culture, *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, **20**, e00292. First published on Nov 10, 2018.
120. Oliveira, A., Oliveira, L.C., Aburjaile, F., Benevides, L., Tiwari, S., Jamal, S.B., Silva, A., Figueiredo, H.C.P., Ghosh, P. and Portela, R.W. *et al.* (2017) Insight of Genus *Corynebacterium*: Ascertaining the Role of Pathogenic and Non-pathogenic Species, *Frontiers in microbiology*, **8**, 1937. First published on Oct 12, 2017.
121. Hashiro, S., Mitsuhashi, M. and Yasueda, H. (2019) Overexpression system for recombinant RNA in *Corynebacterium glutamicum* using a strong promoter derived from corynephage BFK20, *Journal of bioscience and bioengineering*, **128**, 255–263. First published on May 7, 2019.
122. Inui, M. and Toyoda, K. (eds.) (2020). *Corynebacterium glutamicum*. Springer International Publishing, Cham.
123. Maeda, T., Tanaka, Y., Takemoto, N., Hamamoto, N. and Inui, M. (2016) RNase III mediated cleavage of the coding region of *mraZ* mRNA is required for efficient cell division in *Corynebacterium glutamicum*, *Molecular microbiology*, **99**, 1149–1166. First published on Feb 10, 2016.
124. Hashiro, S., Mitsuhashi, M., Chikami, Y., Kawaguchi, H., Niimi, T. and Yasueda, H. (2019) Construction of *Corynebacterium glutamicum* cells as containers encapsulating dsRNA overexpressed for agricultural pest control, *Applied microbiology and biotechnology*, **103**, 8485–8496. First published on Sep 5, 2019.
125. Hashiro, S., Chikami, Y., Kawaguchi, H., Krylov, A.A., Niimi, T. and Yasueda, H. (2021) Efficient production of long double-stranded RNAs applicable to agricultural pest control by *Corynebacterium glutamicum* equipped with coliphage T7-expression system, *Applied microbiology and biotechnology*, **105**, 4987–5000. First published on Jun 7, 2021.
126. Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A.-S. and Hatziloukas, E. (2020) *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications, *AIMS microbiology*, **6**, 1–31. First published on Feb 11, 2020.
127. Dai, X., Sharma, M. and Chen, J. (2021) *Fungi in Sustainable Food Production*. Springer International Publishing, Cham.
128. Murphy, K.A., Tabuloc, C.A., Cervantes, K.R. and Chiu, J.C. (2016) Ingestion of genetically modified yeast symbiont reduces fitness of an insect pest via RNA interference, *Scientific reports*, **6**, 22587. First published on Mar 2, 2016.
129. Hapairai, L.K., Mysore, K., Chen, Y., Harper, E.I., Scheel, M.P., Lesnik, A.M., Sun, L., Severson, D.W., Wei, N. and Duman-Scheel, M. (2017) Lure-and-Kill Yeast Interfering RNA Larvicides Targeting Neural Genes in the Human Disease Vector Mosquito *Aedes aegypti*, *Scientific reports*, **7**, 13223. First published on Oct 16, 2017.
130. Álvarez-Sánchez, A.R., Romo-Quinones, C., Rosas-Quijano, R., Reyes, A.G., Barraza, A., Magallón-Barajas, F., Angulo, C. and Mejía-Ruiz, C.H. (2018) Production of specific dsRNA against white spot syndrome virus in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Aquac Res*, **49**, 480–491.

131. Mysore, K., Hapairai, L.K., Sun, L., Harper, E.I., Chen, Y., Eggleston, K.K., Realey, J.S., Scheel, N.D., Severson, D.W. and Wei, N. *et al.* (2017) Yeast interfering RNA larvicides targeting neural genes induce high rates of *Anopheles* larval mortality, *Malaria journal*, **16**, 461. First published on Nov 13, 2017.
132. Dhandapani, R.K., Gurusamy, D., Duan, J.J. and Palli, S.R. (2020) RNAi for management of Asian long-horned beetle, *Anoplophora glabripennis*: identification of target genes, *J Pest Sci*, **93**, 823–832.
133. Duman-Scheel, M. (2019) *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's Yeast) as an Interfering RNA Expression and Delivery System, *Current drug targets*, **20**, 942–952.
134. Baeshen, N.A., Baeshen, M.N., Sheikh, A., Bora, R.S., Ahmed, M.M.M., Ramadan, H.A.I., Saini, K.S. and Redwan, E.M. (2014) Cell factories for insulin production, *Microbial cell factories*, **13**, 141. First published on Oct 2, 2014.
135. Nandy, S.K. and Srivastava, R.K. (2018) A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications, *Microbiological research*, **207**, 83–90. First published on Nov 21, 2017.
136. Drinnenberg, I.A., Weinberg, D.E., Xie, K.T., Mower, J.P., Wolfe, K.H., Fink, G.R. and Bartel, D.P. (2009) RNAi in budding yeast, *Science (New York, N. Y.)*, **326**, 544–550. First published on Sep 10, 2009.
137. Lamontagne, B. and Elela, S.A. (2001) Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Rnt1p nuclease, *Methods in enzymology*, **342**, 159–167.
138. Becher, P.G., Hagman, A., Verschut, V., Chakraborty, A., Rozpędowska, E., Lebreton, S., Bengtsson, M., Flick, G., Witzgall, P. and Piškur, J. (2018) Chemical signaling and insect attraction is a conserved trait in yeasts, *Ecology and evolution*, **8**, 2962–2974. First published on Feb 14, 2018.
139. Hernández-Fernández, M., Cordero-Bueso, G., Ruiz-Muñoz, M. and Cantoral, J.M. (2021) Culturable Yeasts as Biofertilizers and Biopesticides for a Sustainable Agriculture: A Comprehensive Review, *Plants (Basel, Switzerland)*, **10**. First published on Apr 21, 2021.
140. Getinge Applikon Bio, <https://www.getinge.com/de/produkte/applikon-bio/>.
141. Deken, R.H. de (1966) The Crabtree effect: a regulatory system in yeast, *Journal of general microbiology*, **44**, 149–156.
142. Pfeiffer, T. and Morley, A. (2014) An evolutionary perspective on the Crabtree effect, *Frontiers in molecular biosciences*, **1**, 17. First published on Oct 21, 2014.
143. Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P. and Zamore, P.D. (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants, *Genes & development*, **17**, 49–63.
144. Morley, S.J. and Hershey, J.W. (1990) A fractionated reticulocyte lysate retains high efficiency for protein synthesis, *Biochimie*, **72**, 259–264.
145. Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P. and Sharp, P.A. (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro, *Genes & development*, **13**, 3191–3197.
146. Schuck, J., Gursinsky, T., Pantaleo, V., Burgyán, J. and Behrens, S.-E. (2013) AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant in vitro system, *Nucleic acids research*, **41**, 5090–5103. First published on Mar 27, 2013.
147. Thermo Fisher Scientific Micrococcal Nuclease. Katalognummer EN0181, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/EN0181>.
148. Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Wardle, G.S., Tuschl, T. and Patel, D.J. (2009) Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes, *Nature*, **461**, 754–761.
149. Leonetti, P., Consiglio, A., Arendt, D., Golbik, R.P., Rubino, L., Gursinsky, T., Behrens, S.-E. and Pantaleo, V. (2023) Exogenous and endogenous dsRNAs perceived by plant Dicer-like 4 protein in the RNAi-depleted cellular context, *Cellular & molecular biology letters*, **28**, 64. First published on Aug 7, 2023.
150. Cenik, E.S., Fukunaga, R., Lu, G., Dutcher, R., Wang, Y., Tanaka Hall, T.M. and Zamore, P.D. (2011) Phosphate and R2D2 restrict the substrate specificity of Dicer-2, an ATP-driven ribonuclease, *Molecular cell*, **42**, 172–184. First published on Mar 17, 2011.

151. Doudna, J.A. and Lorsch, J.R. (2005) Ribozyme catalysis: not different, just worse, *Nature structural & molecular biology*, **12**, 395–402.
152. Doherty, E.A. and Doudna, J.A. (2000) Ribozyme structures and mechanisms, *Annual review of biochemistry*, **69**, 597–615.
153. Lea Meschke (2022) Klonierung von Konstrukten zur Expression von doppelsträngiger RNA in *Saccharomyces cerevisiae*, Halle (Saale).
154. Peng, B., Williams, T.C., Henry, M., Nielsen, L.K. and Vickers, C.E. (2015) Controlling heterologous gene expression in yeast cell factories on different carbon substrates and across the diauxic shift: a comparison of yeast promoter activities, *Microbial cell factories*, **14**, 91. First published on Jun 26, 2015.
155. Rodrigues, T.B., Mishra, S.K., Sridharan, K., Barnes, E.R., Alyokhin, A., Tuttle, R., Kokulapalan, W., Garby, D., Skizim, N.J. and Tang, Y.-W. *et al.* (2021) First Sprayable Double-Stranded RNA-Based Biopesticide Product Targets Proteasome Subunit Beta Type-5 in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*), *Frontiers in plant science*, **12**, 728652. First published on Nov 18, 2021.
156. Xu, J., Wang, X.-F., Chen, P., Liu, F.-T., Zheng, S.-C., Ye, H. and Mo, M.-H. (2016) RNA Interference in Moths: Mechanisms, Applications, and Progress, *Genes*, **7**. First published on Oct 19, 2016.
157. Petersen, L. (2019) Impact of Climate Change on Twenty-First Century Crop Yields in the U.S, *Climate*, **7**, 40.
158. Singh, A.D., Wong, S., Ryan, C.P. and Whyard, S. (2013) Oral delivery of double-stranded RNA in larvae of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: implications for pest mosquito control, *Journal of insect science (Online)*, **13**, 69.
159. Niu, X., Kassa, A., Hu, X., Robeson, J., McMahon, M., Richtman, N.M., Steimel, J.P., Kernodle, B.M., Crane, V.C. and Sandahl, G. *et al.* (2017) Control of Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) Reproduction through Plant-Mediated RNA Interference, *Scientific reports*, **7**, 12591. First published on Oct 3, 2017.
160. Nagano, H., Fukudome, A., Hiraguri, A., Moriyama, H. and Fukuhara, T. (2014) Distinct substrate specificities of Arabidopsis DCL3 and DCL4, *Nucleic acids research*, **42**, 1845–1856. First published on Nov 7, 2013.
161. Fukudome, A. and Fukuhara, T. (2017) Plant dicer-like proteins: double-stranded RNA-cleaving enzymes for small RNA biogenesis, *Journal of plant research*, **130**, 33–44. First published on Nov 24, 2016.
162. Welker, N.C., Maity, T.S., Ye, X., Aruscavage, P.J., Krauchuk, A.A., Liu, Q. and Bass, B.L. (2011) Dicer's helicase domain discriminates dsRNA termini to promote an altered reaction mode, *Molecular cell*, **41**, 589–599.
163. Park, J.-E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D.K., Chang, H., Jee, D., Patel, D.J. and Kim, V.N. (2011) Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing, *Nature*, **475**, 201–205. First published on Jul 13, 2011.
164. Tian, Y., Simanshu, D.K., Ma, J.-B., Park, J.-E., Heo, I., Kim, V.N. and Patel, D.J. (2014) A phosphate-binding pocket within the platform-PAZ-connector helix cassette of human Dicer, *Molecular cell*, **53**, 606–616. First published on Jan 30, 2014.
165. Jadhav, V., Vaishnav, A., Fitzgerald, K. and Maier, M.A. (2024) RNA interference in the era of nucleic acid therapeutics, *Nature biotechnology*, **42**, 394–405. First published on Feb 26, 2024.
166. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs (2017) Pesticide Product Label CALANTHA by GreenLight Biosciences, Inc., https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/094614-00002-20240229.pdf.
167. Koch, A. (2024) RNA-based crop protection: potential, challenges, and practical examples, *J Consum Prot Food Saf*, **19**, 127–129.
168. Yan, S., Ren, B.-Y. and Shen, J. (2021) Nanoparticle-mediated double-stranded RNA delivery system: A promising approach for sustainable pest management, *Insect science*, **28**, 21–34. First published on Jul 20, 2020.

169. Atanda, S.A., Shaibu, R.O. and Agunbiade, F.O. (2025) Nanoparticles in agriculture: balancing food security and environmental sustainability, *Discov Agric*, **3**.
170. Ijaz, S., Iqbal, J., Abbasi, B.A., Ullah, Z., Ijaz, N., Yaseen, T., Iqbal, R., Murtaza, G., Usman, M. and Sampath, S. *et al.* (2024) Regulatory and Ethical Concerns of Nanotechnology in Agriculture. In Shahzad, R., Fiaz, S., Qayyum, A., Ul Islam, M. and Lee, I.-J. (eds.), *Revolutionizing Agriculture: A Comprehensive Exploration of Agri-Nanotechnology*. Springer Nature Switzerland, Cham, pp. 395–427.
171. Khalil, S.M.S., Alahmed, A.M. and Munawar, K. (2023) RNAi-mediated mortality of *Culex quinquefasciatus* using two delivery methods of potential field application, *Acta tropica*, **243**, 106938. First published on May 3, 2023.
172. Geymonat, M., Spanos, A. and Sedgwick, S.G. (2007) A *Saccharomyces cerevisiae* autoselection system for optimised recombinant protein expression, *Gene*, **399**, 120–128. First published on May 22, 2007.
173. Karim, A.S., Curran, K.A. and Alper, H.S. (2013) Characterization of plasmid burden and copy number in *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications, *FEMS yeast research*, **13**, 107–116. First published on Nov 20, 2012.
174. Da Silva, N.A. and Srikrishnan, S. (2012) Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS yeast research*, **12**, 197–214. First published on Jan 12, 2012.
175. Bolognesi, R., Ramaseshadri, P., Anderson, J., Bachman, P., Clinton, W., Flannagan, R., Ilagan, O., Lawrence, C., Levine, S. and Moar, W. *et al.* (2012) Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte), *PLoS one*, **7**, e47534. First published on Oct 11, 2012.
176. He, W., Xu, W., Xu, L., Fu, K., Guo, W., Bock, R. and Zhang, J. (2020) Length-dependent accumulation of double-stranded RNAs in plastids affects RNA interference efficiency in the Colorado potato beetle, *Journal of experimental botany*, **71**, 2670–2677.
177. Wang, K., Peng, Y., Fu, W., Shen, Z. and Han, Z. (2019) Key factors determining variations in RNA interference efficacy mediated by different double-stranded RNA lengths in *Tribolium castaneum*, *Insect molecular biology*, **28**, 235–245. First published on Nov 14, 2018.
178. Bally, J., Fishilevich, E., Bowling, A.J., Pence, H.E., Narva, K.E. and Waterhouse, P.M. (2018) Improved insect-proofing: expressing double-stranded RNA in chloroplasts, *Pest management science*, **74**, 1751–1758. First published on Mar 7, 2018.
179. Abou Elela, S. and Ji, X. (2019) Structure and function of Rnt1p: An alternative to RNAi for targeted RNA degradation, *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, **10**, e1521. First published on Dec 11, 2018.
180. Ryter, J.M. and Schultz, S.C. (1998) Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA, *The EMBO journal*, **17**, 7505–7513.
181. Ho, T., Wang, H., Pallett, D. and Dalmay, T. (2007) Evidence for targeting common siRNA hotspots and GC preference by plant Dicer-like proteins, *FEBS letters*, **581**, 3267–3272. First published on Jun 21, 2007.
182. Dong, Z., Han, M.-H. and Fedoroff, N. (2008) The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 9970–9975. First published on Jul 16, 2008.
183. Eamens, A.L., Curtin, S.J. and Waterhouse, P.M. (2011) The Arabidopsis thaliana Double-Stranded RNA Binding (DRB) Domain Protein Family. In Erdmann, V.A. and Barciszewski, J. (eds.), *Non Coding RNAs in Plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 385–406.
184. Zhang, X., Zhang, X., Wu, K., Liu, Z., Li, D. and Qu, F. (2016) Incomplete DRB4-dependence of the DCL4-mediated antiviral defense, *Scientific reports*, **6**, 39244. First published on Dec 16, 2016.
185. van Crielinge, W. and Beyaert, R. (1999) Yeast Two-Hybrid: State of the Art, *Biological procedures online*, **2**, 1–38.
186. Gould, F., Brown, Z.S. and Kuzma, J. (2018) Wicked evolution: Can we address the sociobiological dilemma of pesticide resistance?, *Science (New York, N.Y.)*, **360**, 728–732.

187. Dr David Mota-Sanchez Knowledge is power in the fight against pesticide resistance, https://www.scientia.global/wp-content/uploads/David_Mota-Sanchez/David-Mota-Sanchez.pdf.
188. Demortain, D. (2021) The science behind the ban: the outstanding impact of ecotoxicological research on the regulation of neonicotinoids, *Current opinion in insect science*, **46**, 78–82. First published on Mar 15, 2021.
189. Verheggen, F., Barrès, B., Bonafos, R., Desneux, N., Escobar-Gutiérrez, A.J., Gachet, E., Laville, J., Siegwart, M., Thiéry, D. and Jactel, H. (2022) Producing sugar beets without neonicotinoids: An evaluation of alternatives for the management of viruses-transmitting aphids, *entomologia*, **42**, 491–498.
190. Chen, Y.H., Cohen, Z.P., Bueno, E.M., Christensen, B.M. and Schoville, S.D. (2023) Rapid evolution of insecticide resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, *Current opinion in insect science*, **55**, 101000. First published on Dec 13, 2022.
191. Schnaars-Uvino, K. and Baker, M.B. (2021) High-level field-evolved resistance to spinosad in Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, in organically managed fields, *Pest management science*, **77**, 4393–4399. First published on May 24, 2021.
192. Scott, I.M., Vickruck, J., Hann, S., Krolkowski, S., MacKinley, P., Stokes-Rees, J., Hatten, G. and Moffat, C. (2023) Regional differences in susceptibility to spinosyn insecticides registered for Colorado potato beetle management in Canada, *Pesticide biochemistry and physiology*, **193**, 105459. First published on May 5, 2023.
193. Rabea, E.I., Nasr, H.M. and Badawy, M.E.I. (2010) Toxic effect and biochemical study of chlorfluazuron, oxymatrine, and spinosad on honey bees (*Apis mellifera*), *Archives of environmental contamination and toxicology*, **58**, 722–732. First published on Oct 8, 2009.
194. Casagrande, R.A. (1987) The Colorado Potato Beetle: 125 Years of Mismanagement, *Bulletin of the Entomological Society of America*, **33**, 142–150.
195. Weber, D. (2003) Colorado beetle: pest on the move, *Pest. Outlook*, **14**, 256.
196. Göldel, B., Lemic, D. and Bažok, R. (2020) Alternatives to Synthetic Insecticides in the Control of the Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) and Their Environmental Benefits, *Agriculture*, **10**, 611.
197. Gallinger Maschinenbau / Maschinenverleih Beetle Collector - KSG (Kartoffelkäfer Sammler Gallinger), <http://www.gallinger-maschinenbau.de/>.
198. Aguiar, E.R.G.R., Olmo, R.P. and Marques, J.T. (2016) Virus-derived small RNAs: molecular footprints of host-pathogen interactions, *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, **7**, 824–837. First published on May 12, 2016.
199. Chen, M.-N., Ye, Z.-X., Feng, K.-H., Yuan, J.-N., Chen, J.-P., Zhang, C.-X., Li, J.-M. and Mao, Q.-Z. (2024) Genetic Characterization of Two Novel Insect-Infecting Negative-Sense RNA Viruses Identified in a Leaf Beetle, *Aulacophora indica*, *Insects*, **15**. First published on Aug 15, 2024.
200. Yamaguchi, J., Mizoguchi, T. and Fujiwara, H. (2011) siRNAs induce efficient RNAi response in *Bombyx mori* embryos, *PLoS one*, **6**, e25469. First published on Sep 30, 2011.
201. Cappelle, K., Oliveira, C.F.R. de, van Eynde, B., Christiaens, O. and Smagghe, G. (2016) The involvement of clathrin-mediated endocytosis and two Sid-1-like transmembrane proteins in double-stranded RNA uptake in the Colorado potato beetle midgut, *Insect molecular biology*, **25**, 315–323. First published on Mar 9, 2016.
202. Vega, F.E. and Dowd, P.F. (2005) The Role of Yeasts as Insect Endosymbionts. In Vega, F.E. and Blackwell, M. (eds.), *Insect-Fungal Associations Ecology and Evolution*. Oxford University Press New York, NY, pp. 211–243.
203. Georgiou, G.P. (1990) Overview of Insecticide Resistance. In Green, M.B., LeBaron, H.M. and Moberg, W.K. (eds.), *Managing Resistance to Agrochemicals*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 18–41.
204. Hasan, W., M, R.N., R, A.B., Saivamsireddy, G., Choudhuri, S., Parmar, S., Charitha, K. and Pandey, S.K. (2024) Advancing RNAi-based Strategies for Eco-friendly and Targeted Insect Pest Management in Sustainable Agriculture, *J. Exp. Agric. Int.*, **46**, 833–863.

205. Dubelman, S., Fischer, J., Zapata, F., Huizinga, K., Jiang, C., Uffman, J., Levine, S. and Carson, D. (2014) Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils, *PLoS one*, **9**, e93155. First published on Mar 27, 2014.
206. Fischer, J.R., Zapata, F., Dubelman, S., Mueller, G.M., Uffman, J.P., Jiang, C., Jensen, P.D. and Levine, S.L. (2017) Aquatic fate of a double-stranded RNA in a sediment---water system following an over-water application, *Environmental toxicology and chemistry*, **36**, 727–734. First published on Sep 19, 2016.
207. OECD (2020) Considerations for the Environmental Risk Assessment of the Application of Sprayed or Externally Applied ds-RNA-Based Pesticides. Series on Pesticides and Biocides <https://doi.org/10.1787/576d9ebb-en>, Paris.
208. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) (2023) Final human health risk assessment for the new end-use product Calantha™. https://childrenshealthdefense.org/wp-content/uploads/EPA-HQ-OPP-2021-0271-0005_content.pdf.
209. Gantier, M.P. and Williams, B.R.G. (2007) The response of mammalian cells to double-stranded RNA, *Cytokine & growth factor reviews*, **18**, 363–371. First published on Aug 14, 2007.
210. Rodrigues, T.B. and Petrick, J.S. (2020) Safety Considerations for Humans and Other Vertebrates Regarding Agricultural Uses of Externally Applied RNA Molecules, *Frontiers in plant science*, **11**, 407. First published on Apr 23, 2020.
211. Wang, K., Peng, Y., Pu, J., Fu, W., Wang, J. and Han, Z. (2016) Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation in vivo, *Insect biochemistry and molecular biology*, **77**, 1–9. First published on Jul 20, 2016.
212. Cooper, A.M., Silver, K., Zhang, J., Park, Y. and Zhu, K.Y. (2019) Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects, *Pest management science*, **75**, 18–28. First published on Aug 13, 2018.
213. Lucht, J.M. (2015) Public Acceptance of Plant Biotechnology and GM Crops, *Viruses*, **7**, 4254–4281. First published on Jul 30, 2015.
214. Chen, Y. and Schutter, K. de (2024) Biosafety aspects of RNAi-based pests control, *Pest management science*, **80**, 3697–3706. First published on Apr 5, 2024.
215. Mishra, S., Dee, J., Moar, W., Dufner-Beattie, J., Baum, J., Dias, N.P., Alyokhin, A., Buzza, A., Rondon, S.I. and Clough, M. *et al.* (2021) Selection for high levels of resistance to double-stranded RNA (dsRNA) in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) using non-transgenic foliar delivery, *Scientific reports*, **11**, 6523. First published on Mar 22, 2021.
216. Koch, A. (2023) Development of RNAi-based biopesticides, regulatory constraints, and commercial prospects, *Development and Commercialization of Biopesticides*. Elsevier, pp. 149–171.

7 Anhang

7.1 Abbildungen und Tabellen

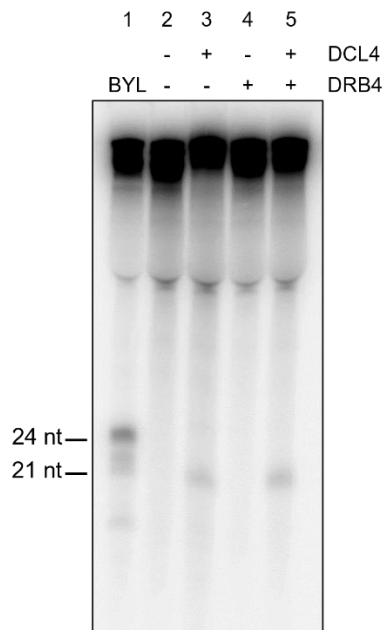


Abbildung 29: Einfluss von DRB4 auf die DCL4-Aktivität im DCL-Assay

Radioaktiv markierte CMV-dsRNA 2 wurde durch endogene DCL-Enzyme in BYL oder durch heterolog exprimiertes *DCL4* im Hefe-Rohextrakt in 21-24 nt lange sRNAs prozessiert. Spur 2, 3 und 4 enthielten jeweils 10 µl Hefe-Rohextrakt, wohingegen Spur 5 je 5 µl Hefe-Rohextrakt mit heterolog exprimiertem *DCL4* bzw. *DRB4* umfasste. Als Negativkontrolle (Spur 2) diente Hefe-Rohextrakt, welcher Leervektor enthielt. Die Auftrennung erfolgte in einem 12,5%igen Harnstoff-Polyacrylamid-Gel.

Tabelle 18: C_t-Werte der edsRNA nach Hitzeinaktivierung

Hitzeinaktivierung (min)	C _t -Wert
0	15,20
5	14,22
10	13,62
30	13,47

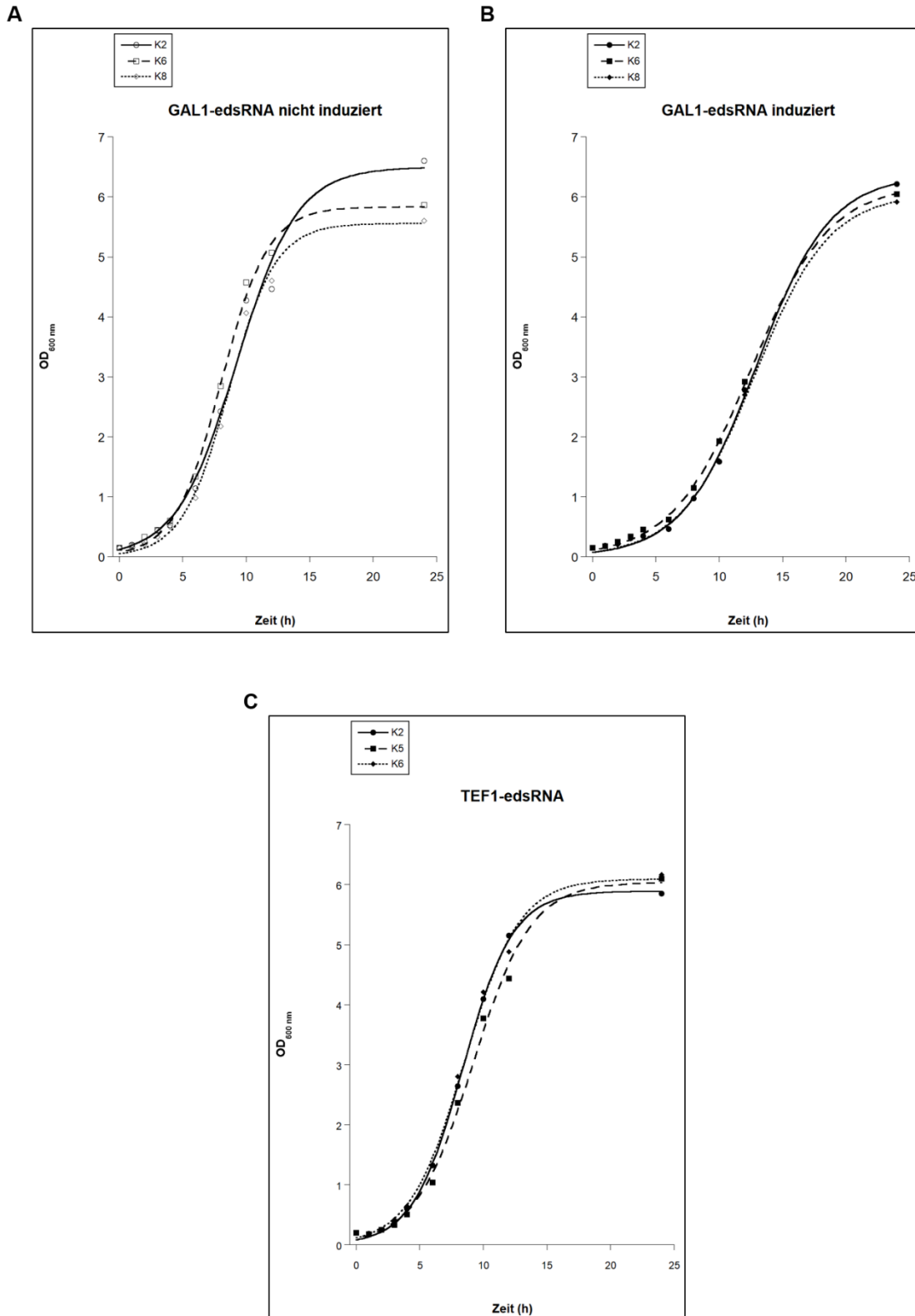


Abbildung 30: Wachstumskurven

Wachstumskurven von Hefen, welche ein edsRNA-Konstrukt unter Kontrolle des GAL1-Promotors (**A, B**) bzw. TEF1-Promotors (**C**) enthielt. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Klone analysiert.

7.2 Plasmide

Tabelle 19: verwendete Plasmide

Das folgende Plasmid wurde von M. Sc. Konstantin Stopp (Abteilung Mikrobielle Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.	
pYES2	Hefevektor, welcher als <i>backbone</i> für Klonierungen und als Leervektor für Hefetransformationen verwendet wurde.
Das folgende Plasmid wurde von Euroscarf (Scientific Research and Development GmbH, Oberursel, D) erworben.	
pGREG503	Hefevektor, welcher als <i>backbone</i> für Klonierungen verwendet wurde (#P30348).
Das folgende Plasmid wurde von GeneScript Biotech (New Jersey, USA) erworben	
pUC57_DCL4opt	Das Plasmid enthält den ORF für das codon-optimierte <i>NbDCL4</i> mit FLAG-tag.
Das folgende Plasmid wurde von Dipl.-Biologin Katja Rostowski (Abteilung Mikrobielle Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.	
p2315_HANbDRB4	Das Plasmid enthält den ORF für <i>NbDRB4</i> mit HA-tag und diente der Herstellung des PCR-Templates für die Klonierung des Gens in den Hefevektor pYES.
Folgendes Plasmid wurde von Prof. Fernando Garcia-Arenal Rodriguez (Universidad Politécnica de Madrid) und Prof. John Carr (University of Cambridge) zur Verfügung gestellt.	
pFny209	Das Plasmid beinhaltet die cDNA entsprechend der genomischen RNA 2 von CMV (Fny). Der cDNA-Klon der CMV-RNA diente der Herstellung des PCR-Templates für die <i>in-vitro</i> -Transkription der genomischen CMV-RNA 2 (Stamm Fny).
Das folgende Plasmid wurden von Dr. Marie Knoblich (Abteilung Mikrobielle Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.	
p-dsbbCMV21nt	Das Plasmid enthält sechs 21 nt lange esiRNAs (3x AGO1-präferiert, 3x AGO2-präferiert) aus CMV-RNA 2 sowie zwei pseudo-siRNAs zwischen flankierenden T7-Promotoren und VSV-Terminatoren
Die folgenden Plasmide wurden von B. Sc. Lea Meschke (Abteilung Mikrobielle Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.	
pYES_dsRe-MK-Sc2.1	Das Plasmid enthält die edsRNA gegen CMV-RNA 2 (codierende Sequenzen wie bei p-dsbbCMV21nt) als Haarnadel-Konstrukt. Die revers komplementäre edsRNA-Sequenz befindet sich <i>downstream</i>

	von einem Actin1-Intron von <i>S. cerevisiae</i> . Die Haarnadel-RNA wird durch die RNA-Polymerase II exprimiert (unter Kontrolle des GAL1-Promotors) und es befindet sich <i>upstream</i> von der ersten pseudo-siRNA die codierende Sequenz für ein <i>Hammerhead</i> -Ribozym und <i>downstream</i> von der zweiten pseudo-siRNA die codierende Sequenz für ein Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym.
pYES_dsRe-MK-Sc7.1	Das Plasmid enthält die edsRNA gegen CMV-RNA 2 (codierende Sequenzen wie bei p-dsbbCMV21nt) als Haarnadel-Konstrukt. Die revers komplementäre edsRNA-Sequenz befindet sich <i>downstream</i> von einem Actin1-Intron von <i>S. cerevisiae</i> . Die Haarnadel-RNA wird durch die T7-Polymerase exprimiert und es befindet sich <i>downstream</i> von der zweiten pseudo-siRNA die codierende Sequenz für ein Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym.
pYES_dsRe-MK-Sc7.2	Das Plasmid enthält die edsRNA gegen CMV-RNA 2 (codierende Sequenzen wie bei p-dsbbCMV21nt) mit zwei T7-Promotoren in gleichläufiger Richtung. Die revers komplementäre edsRNA-Sequenz befindet sich <i>downstream</i> von dem ersten VSV-Terminator. Die RNA wird durch die T7-Polymerase exprimiert und es befindet sich jeweils <i>downstream</i> von der zweiten pseudo-siRNA die codierende Sequenz für ein Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym.
pGREG503_dsRe-MK-Sc2.1	Das Plasmid enthält die edsRNA gegen CMV-RNA 2 (codierende Sequenzen wie bei p-dsbbCMV21nt) als Haarnadel-Konstrukt. Die revers komplementäre edsRNA-Sequenz befindet sich <i>downstream</i> von einem Actin1-Intron von <i>S. cerevisiae</i> . Die Haarnadel-RNA wird durch die RNA-Polymerase II exprimiert (unter Kontrolle des GAL1-Promotors) und es befindet sich <i>upstream</i> von der ersten pseudo-siRNA die codierende Sequenz für ein <i>Hammerhead</i> -Ribozym und <i>downstream</i> von der zweiten pseudo-siRNA die codierende Sequenz für ein Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym.
Die folgenden Plasmide wurden von Eurofins Genetics EU P&D GmbH (Ebersberg, D) erworben.	
pEX-A128_MB6G1	Das Plasmid enthält die erste Hälfte des edsRNA-Konstrukts gegen die Target-RNA <i>PSMB5</i> des Kartoffelkäfers mit den Restriktionsschnittstellen HindIII und Bpil.
pEX-A128_MB6G2	Das Plasmid enthält die zweite Hälfte des edsRNA-Konstrukts gegen die Target-RNA <i>PSMB5</i> des Kartoffelkäfers mit den Restriktionsschnittstellen Bpil und SphI.

pEX-A128_MB6G3	Das Plasmid enthält die erste Hälfte des Konstrukts zur Generierung der Negativkontrolle (<i>Firefly</i> -Luciferase) mit den Restriktionsschnittstellen HindIII und BsaI.
pEX-A128_MB6G4	Das Plasmid enthält die zweite Hälfte des Konstrukts zur Generierung der Negativkontrolle (<i>Firefly</i> -Luciferase) mit den Restriktionsschnittstellen BsaI und SphI.
pEX-A128_MB6G5	Das Plasmid enthält die erste Hälfte des Konstrukts zur Generierung der Positivkontrolle (dsRNA abgeleitet vom kommerziellen Produkt <i>Calantha</i> TM) mit den Restriktionsschnittstellen HindIII und BpI.
pEX-A128_MB6G6	Das Plasmid enthält die zweite Hälfte des Konstrukts zur Generierung der Positivkontrolle (dsRNA abgeleitet vom kommerziellen Produkt <i>Calantha</i> TM) mit den Restriktionsschnittstellen BpI und SphI.
Die folgenden Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert.	
pYES_FLAGNbDCL4opt	Das Plasmid enthält den ORF für das codon-optimierte <i>NbDCL4</i> mit FLAG-tag und ist für Genexpression in Hefe geeignet.
pYES_HANbDRB4	Das Plasmid enthält den ORF für <i>NbDRB4</i> mit HA-tag und ist für Genexpression in Hefe geeignet.
pYES_dsRe-MK-Sc2.1_TEF1	Das Plasmid ist in derselben Weise aufgebaut wie pYES_dsRe-MK-Sc2.1, die Expression erfolgt jedoch unter Kontrolle des TEF1-Promotors.
pYES_dsRe-MK-Sc2.1_TDH3	Das Plasmid ist in derselben Weise aufgebaut wie pYES_dsRe-MK-Sc2.1, die Expression erfolgt jedoch unter Kontrolle des TDH3-Promotors.
pYES_GAL1_PSMB5-edsRNA-Konstrukt	Das Plasmid diente der Expression des Haarnadel-Konstrukts mit Actin1-Intron zur Generierung der edsRNA gegen <i>PSMB5</i> des Kartoffelkäfers in Hefe (Design an pYES_dsRe-MK-Sc2.1 angelehnt).
pYES_GAL1_Negativkontroll-Konstrukt	Das Plasmid diente der Expression des Haarnadel-Konstrukts mit Actin1-Intron zur Generierung der Negativkontrolle (<i>Firefly</i> -Luciferase) in Hefe (Design an pYES_dsRe-MK-Sc2.1 angelehnt).
pYES_GAL1_Positivkontroll-Konstrukt	Das Plasmid diente der Expression des Haarnadel-Konstrukts mit Actin1-Intron zur Generierung der Positivkontrolle (abgeleitet vom kommerziellen Produkt <i>Calantha</i> TM) in Hefe (Design an pYES_dsRe-MK-Sc2.1 angelehnt).

7.3 Plasmidkarten

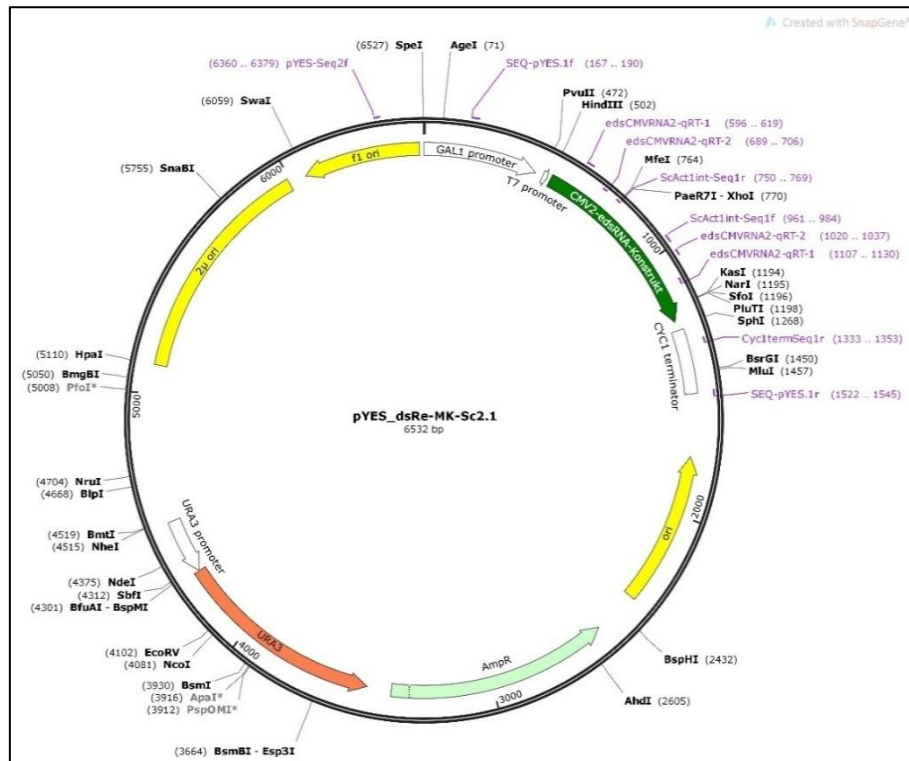


Abbildung 31: Plasmidkarte pYES_dsRe-MK-Sc2.1

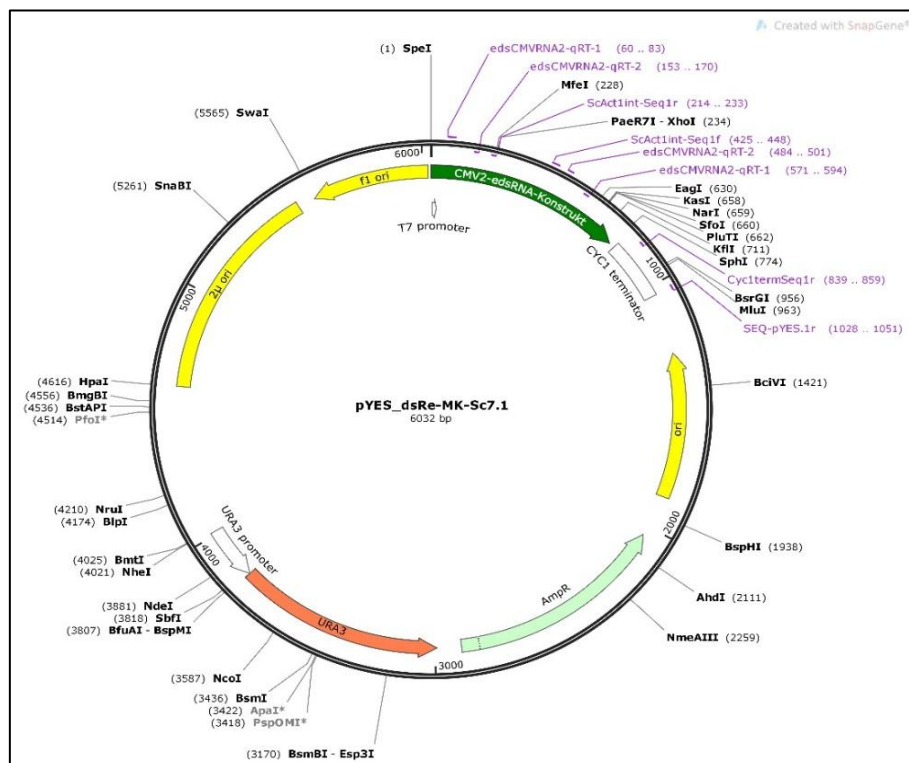


Abbildung 32: Plasmidkarte pYES_dsRe-MK-Sc7.1

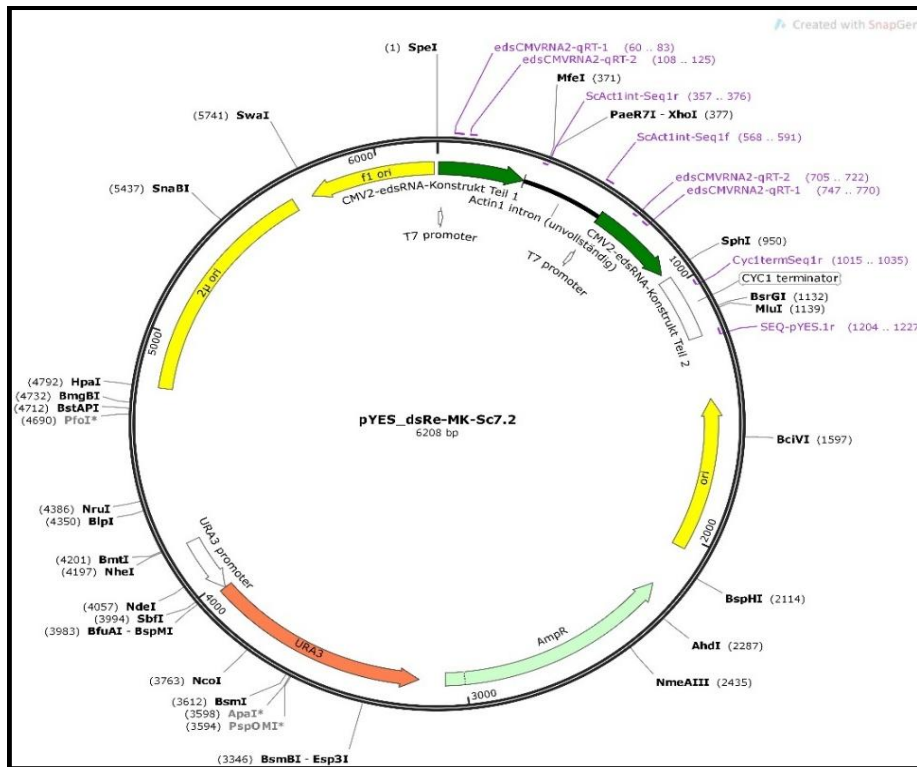


Abbildung 33: Plasmidkarte pYES_dsRe-MK-Sc7.2

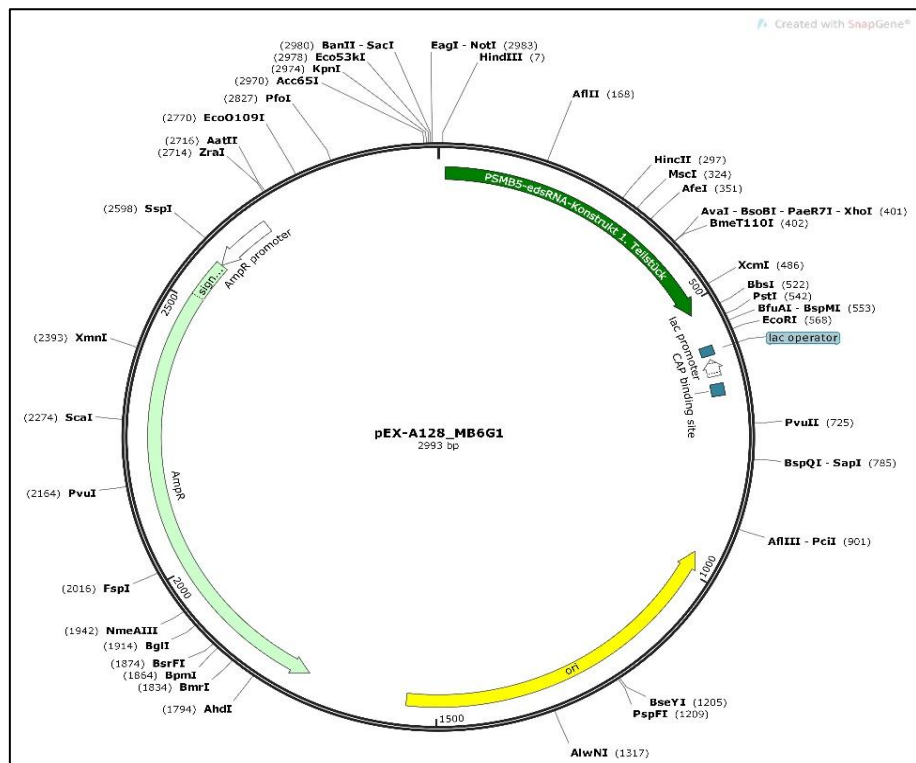


Abbildung 34: Plasmidkarte pEX-A128_MB6G1

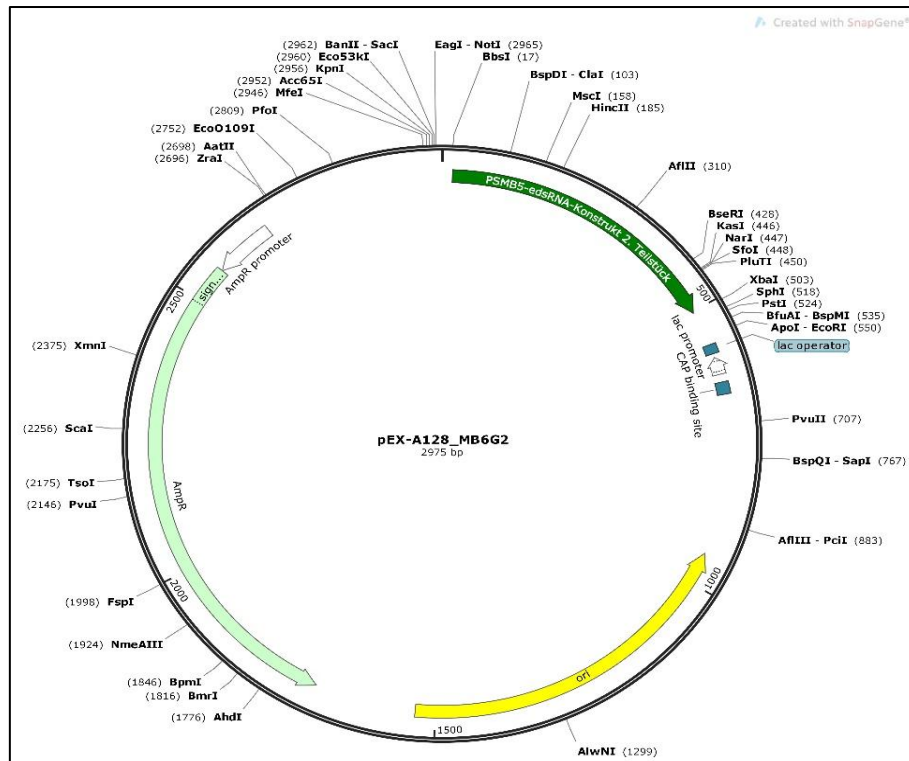


Abbildung 35: Plasmidkarte pEX-A128_MB6G2

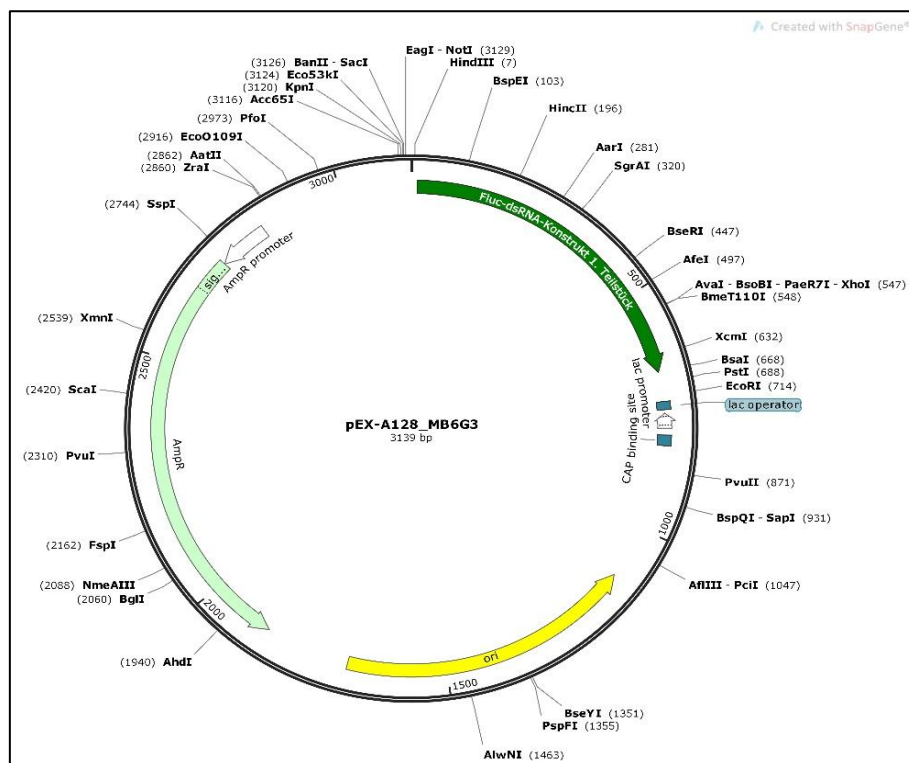


Abbildung 36: Plasmidkarte pEX-A128_MB6G3

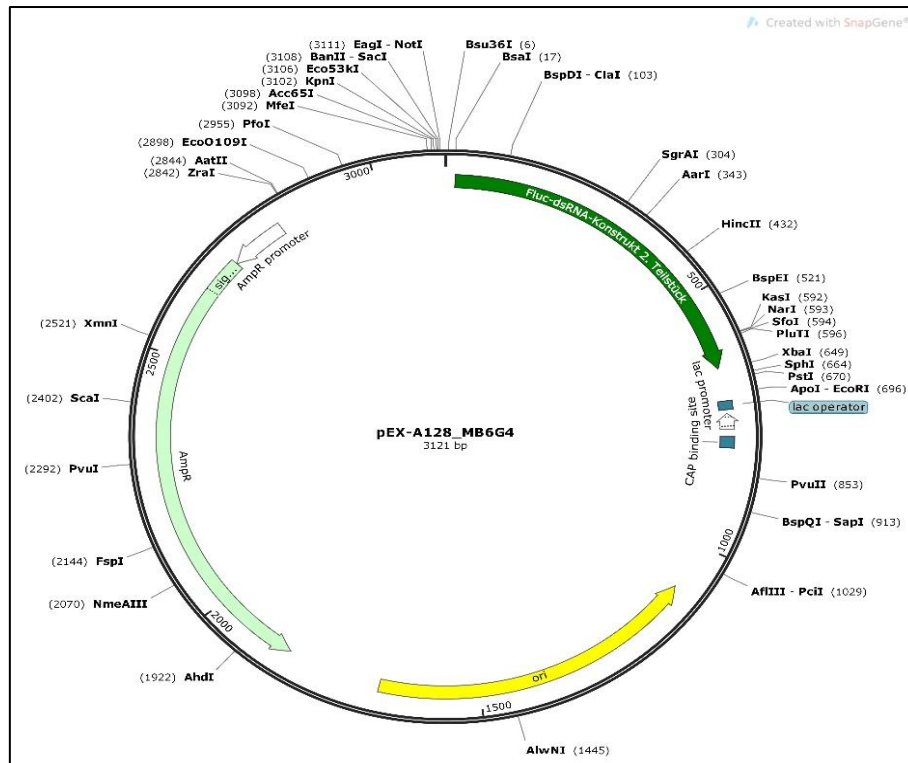


Abbildung 37: Plasmidkarte pEX-A128_MB6G4

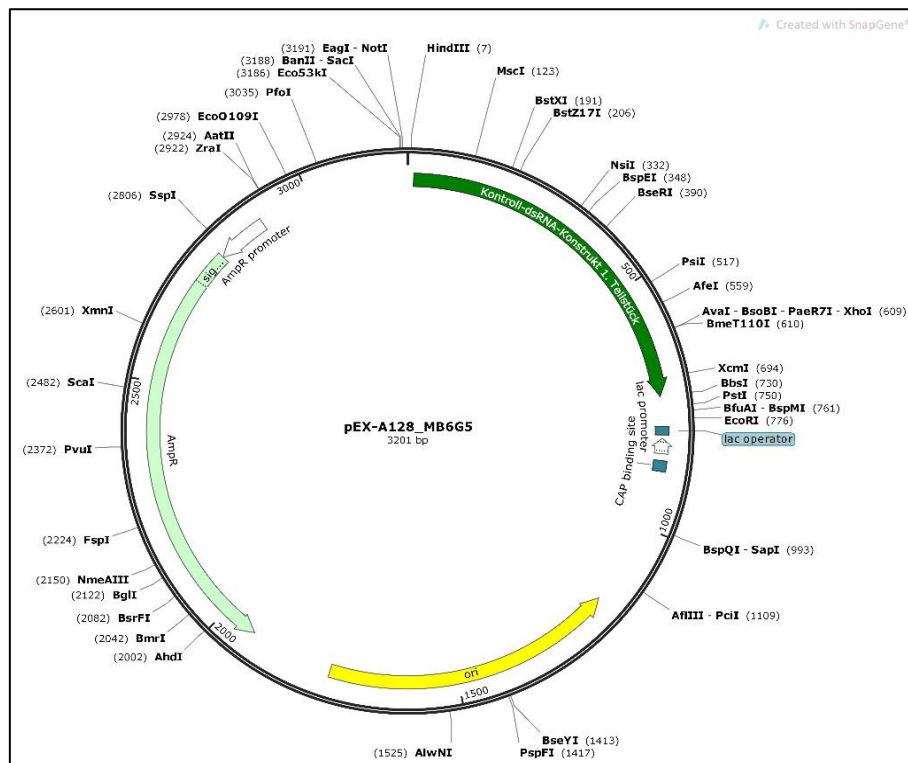


Abbildung 38: Plasmidkarte pEX-A128_MB6G5

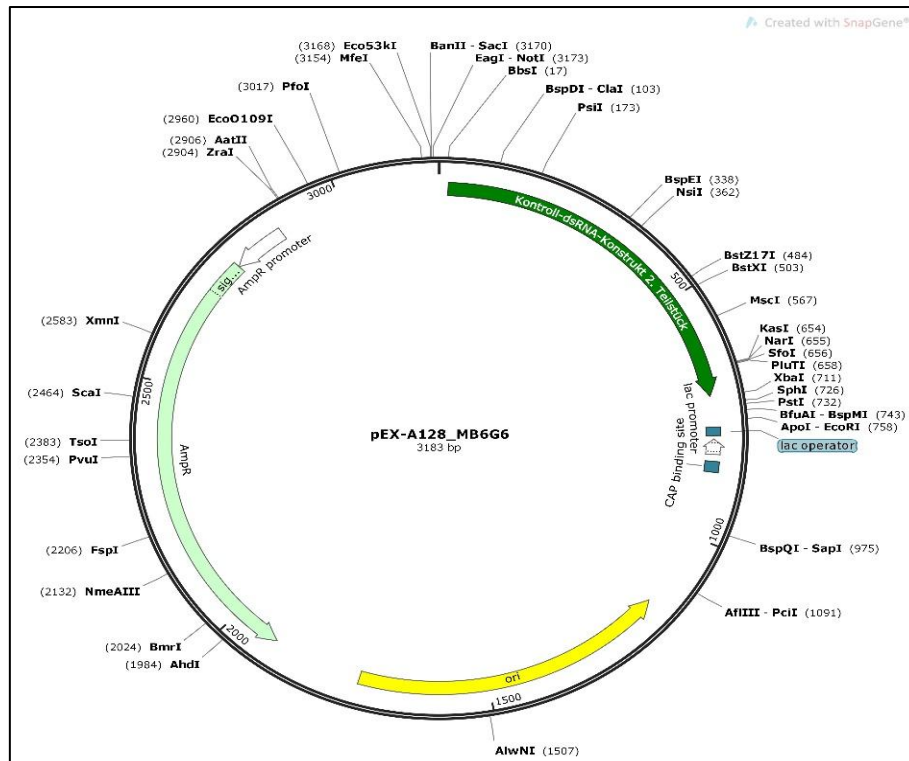


Abbildung 39: Plasmidkarte pEX-A128_MB6G6

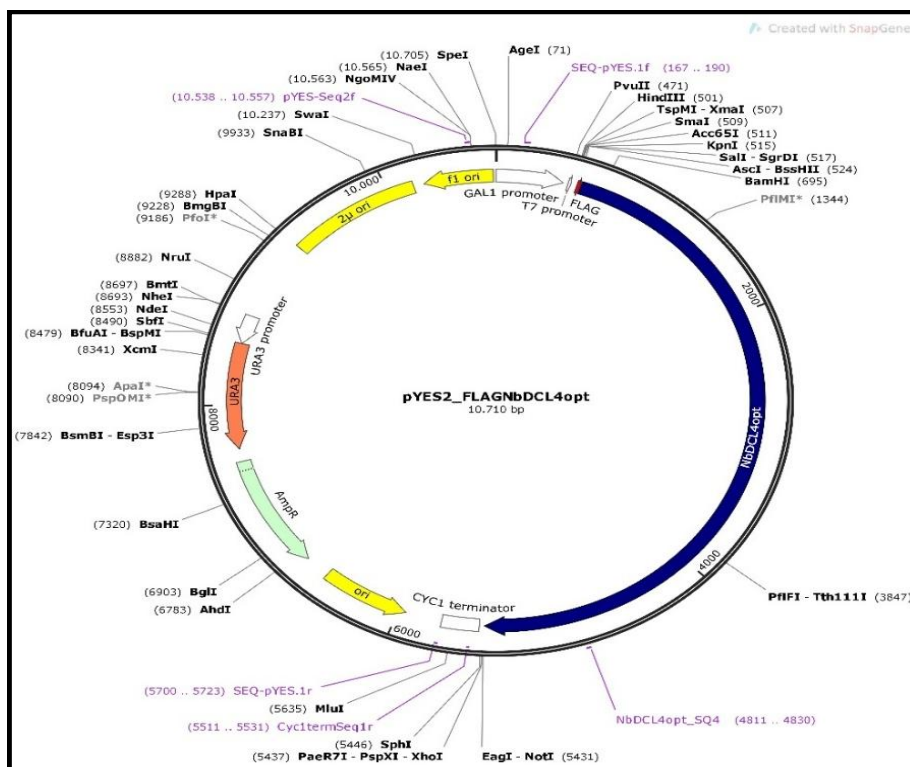
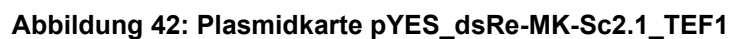
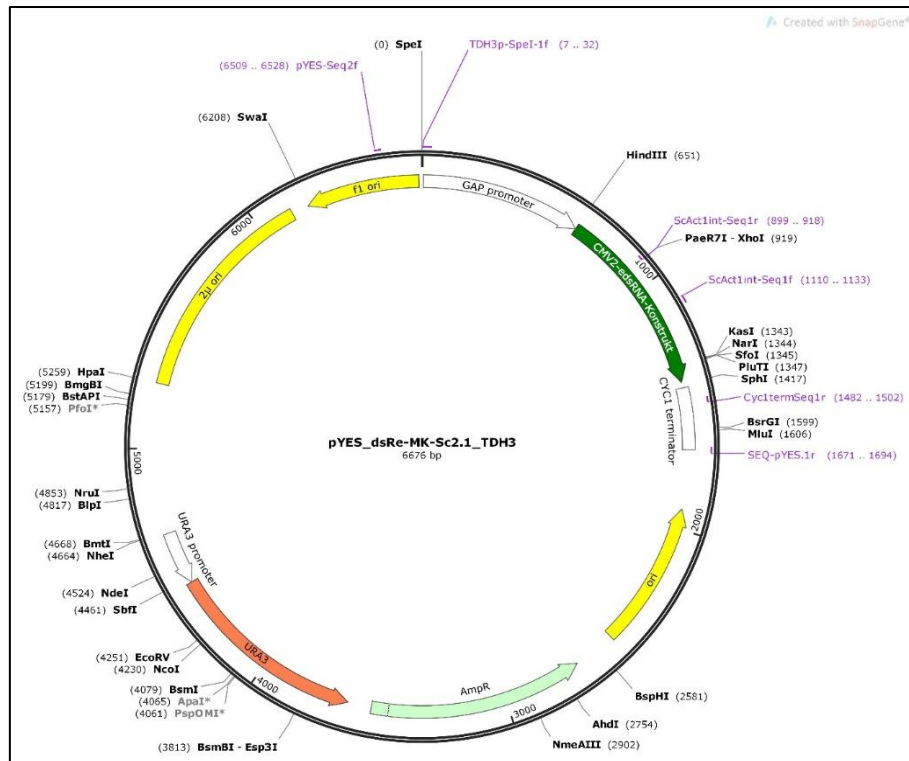


Abbildung 40: Plasmidkarte pYES2_FLAGNbDCL4opt



Abbildung 43: Plasmidkarte pYES₂dsRe-MK-Sc2.1_TDH3Abbildung 44: Plasmidkarte pYES₂PSMB5-edsRNA-Konstrukt

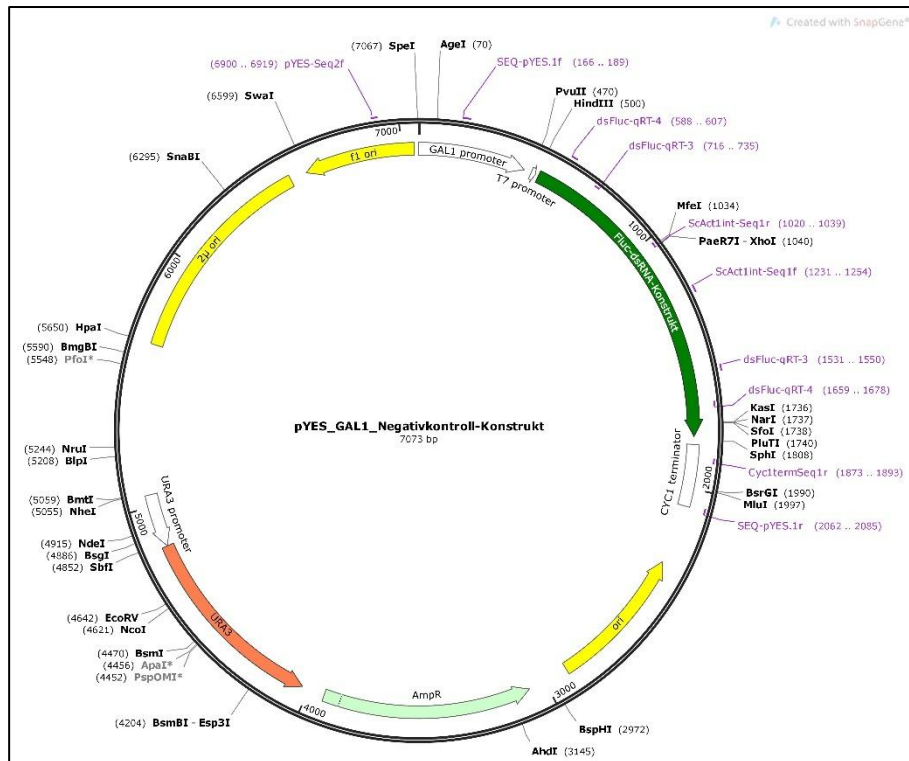


Abbildung 45: Plasmidkarte pYES2_GAL1_Negativkontroll-Konstrukt



Abbildung 46: Plasmidkarte pYES2_GAL1_Positivkontroll-Konstrukt

7.4 Oligonukleotide

Tabelle 20: verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
Primer zur Klonierung von pYES_<i>HANbDRB4</i>	
HA- <i>NbDRB4</i> -KpnI-BsaI-f1	GGGGTACCGGTCTCGTGGTATGTACCCATACGATGTTCCAG
MA108	AGCGACCAGCATTACATAC
Primer zur Klonierung von pYES_<i>TEF1</i> und pYES_<i>TDH3</i>	
TEF1-SpeI-1f	GGACTAGTCGTATAAACAATGCATACTTTGTACG
TEF1-HindIII-1r	CGGTAAGCTTGGGGGATCCCATTTTG
TDH3p-SpeI-1f	CGTACTAGTTCATTATCAATACTGCCATTTCAAAG
TDH3p-HindIII-1r	GCGAAGCTTTCGAAACTAAGTTCTTGGTG
Primer für Kolonie-PCRs und Sequenzierungen	
<i>DRB4NbSQ1f</i>	CGCCGAATGACATTCAGGAG
<i>NbDCL4opt_SQ4</i>	AGCTAGAATGGCAGCTCAAC
SEQ-pYES.1f	AAATTGGCAGTAACCTGGCCCCAC
SEQ-pTEF1.1f	GAGACCGCCTCGTTTCTTTTTC
Cyc1termSeq1r	CTTCCTTTTCGGTTAGAGCGG
SEQ-pYES.1r	TTAATGCAGGGCCGCAAATTAAAG
TDH3p-SpeI-1f	CGTACTAGTTCATTATCAATACTGCCATTTCAAAG
ScAct1int-Seq1r	CAATTGGGACCGTGCAATTC
pYES-Seq2f	CCCCATTTAGAGCTTGACGG
ScAct1int-Seq1f	GTCTCATGTACTAACATCGATTGC
Primer zur Generierung der PCR-Templates für die <i>in-vitro</i>-Transkription der CMV2-ModellsRNA (168 bp ohne Intron und Ribozyme (67))	
SeqUPN	AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG
SeqRPN	CAATTTACACAGGAAACAGCTATG
TrasiR6CMV-A1-1r	GGGAGACCGGCAGATCTG
TrasiR6CMV-A2-1r	GGGCGAATTGGGTACCGG

Primer zur Generierung des PCR-Templates für die <i>in-vitro</i>-Transkription des CMV-RNA 2-Targets	
T7CMV2_MK1f	CCCTAATACGACTCACTATAGGTTTATTTACAAGAGCGTAC
TraCMV2T_MK1r	TGGTCTCCTTTTGGAGGCC
Primer zur Generierung der PCR-Templates für die <i>in-vitro</i>-Transkription des CMV2-Modell-edsRNA-Konstrukts (Expression in Hefe)	
T7-si6-1f	CGTAATACGACTCACTATAGGCATCCGGTATCCCACCG
Tra-si6-1r	GGTGATGAGCTCCTTGTCGC
T7-si6-2f	CGTAATACGACTCACTATAGGTGATGAGCTCCTTGTCGC
Tra-si6-2r	GGCATCCGGTATCCCACCG
Primer zur Generierung der PCR-Templates für die <i>in-vitro</i>-Transkription des PSMB5-edsRNA-Konstrukts (Expression in Hefe)	
T7-edsPSMB5-1f	CGTAATACGACTCACTATAGGGCATCCGGTATCCCACCG
Tra-edsPSMB5-1r	GGACCGTGTACTGGCCAAAC
T7-edsPSMB5-2f	CGTAATACGACTCACTATAGGACCGTGTACTGGCCAAAC
Tra-edsPSMB5-2r	GGGCATCCGGTATCCCACCG
Primer zur Generierung der PCR-Templates für die <i>in-vitro</i>-Transkription der Negativkontrolle (Expression in Hefe)	
Fluc_NK_F_T7	CGTAATACGACTCACTATAGGGTCCGGTTATGTAAACAATCCG GA
Tra-dsFluc-1r	GGGTCGAGTTTTCCGGTAAGACCT
Fluc_NK_R_T7	CGTAATACGACTCACTATAGGGTCGAGTTTTCCGGTAAGACCT
Tra-dsFluc-2r	GGGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGA
Primer zur Generierung der PCR-Templates für die <i>in-vitro</i>-Transkription der Positivkontrolle (Expression in Hefe)	
T7-dsLedprona-1f	CGTAATACGACTCACTATAGGAGGTGCGGCAGACTG
Tra-dsLedprona-1r	GGGCAAATCTTCCTTCTCAGCCTG
T7-dsLedprona-2f	CGTAATACGACTCACTATAGGGCAAATCTTCCTTCTCAGCCTG
Tra-dsLedprona-2r	GGAGGTGCGGCAGACTG
Primer für cDNA-Synthesen	
edsCMVRNA2-qRT-1	GCTGTATACTCTTCTTATGATACG

edsPMBS5-qRT-4	CGCTCCCTGTTCTTAATTTG
dsFluc-qRT-4	GTAAACAATCCGGAAGCGAC
dsLedprona-qRT-4	GCTTCCAAATTGATGGCAAAC
Oligo-dT-Primer	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
qPCR-Primer	
edsCMVRNA2-qRT-1	GCTGTATACTCTTCTTATGATACG
edsCMVRNA2-qRT-2	TGATGAGCTCCTTGTCGC
edsPMBS5-qRT-2	GTGGAAATCAATGATTAGATGGC
edsPMBS5-qRT-4	CGCTCCCTGTTCTTAATTTG
dsFluc-qRT-3	GAGCCACCTGATAGCCTTTG
dsFluc-qRT-4	GTAAACAATCCGGAAGCGAC
dsLedprona-qRT-3	CCTGAACCCACACTAAAGAC
dsLedprona-qRT-4	GCTTCCAAATTGATGGCAAAC
Primer zur Überprüfung des Niveaus der Expression der Target-RNA in Kartoffelkäferlarven	
CPB_qRT_PSMB5_132_F1	TCCAGCAGCAAAGGTATCAC
CPB_qRT_PSMB5_279_R1	AAATTGTCCGCCTGTAGCTC
CPB_qRT_RP18_F	TAGAATCCTCAAAGCAGGTGGCGA
CPB_qRT_RP18_R	AGCTGGACCAAAGTGTTCCTACTGC

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: RNAi-Mechanismus in Insekten	4
Abbildung 2: Domänenorganisation der DCR und DCL	5
Abbildung 3: Anwendung der RNAi-Technologie.....	8
Abbildung 4: Bioreaktor	41
Abbildung 5: Nachweis der DCL4-Aktivität im <i>S. cerevisiae</i> -Rohextrakt	51
Abbildung 6: Design der CMV2-edsRNA-Konstrukte	54
Abbildung 7: <i>In-vitro</i> -Transkription der edsRNA-Konstrukte 7.1 und 7.2	56
Abbildung 8: DCL- <i>Slicer</i> -Assay mit <i>in vitro</i> transkribierten Konstrukten 7.1 und 7.2	57
Abbildung 9: Nachweis der Transkription von edsRNA in <i>S. cerevisiae</i>	61
Abbildung 10: Bestimmung der Wiedergewinnungsrate an dsRNA nach Trizol-Extraktion	63
Abbildung 11: Vergleich der Menge an edsRNA von individuellen Klonen mit unterschiedlichen Promotoren	64
Abbildung 12: Einfluss von Gesamt-RNA aus Wildtyp-Hefe auf die DCL-vermittelte Prozessierung und AGO1-vermittelte Spaltung einer Target-RNA im DCL- <i>Slicer</i> -Assay	66
Abbildung 13: <i>Feeding</i> -Profil des in Abbildung 14 dargestellten Fermentationslaufs	68
Abbildung 14: Parameterübersicht eines Fermentationslaufs der edsRNA-Produktion in <i>S. cerevisiae</i>	69
Abbildung 15: Prozessierung der edsRNA durch DCL4 <i>in vivo</i>	73
Abbildung 16: Größenverteilung von sRNAs (20-25 nt) nach Prozessierung <i>in vivo</i> transkribierter CMV-edsRNA in <i>S. cerevisiae</i> -Zellextrakten	74
Abbildung 17: Verteilung der 21 nt langen <i>reads</i> über die Gesamtlänge der edsRNA	76
Abbildung 18: Anteil der 21 nt esiRNA <i>reads</i> an der Gesamtheit der 21 nt sRNA <i>reads</i>	76
Abbildung 19: Inaktivierung von <i>S. cerevisiae</i> und Überprüfung der edsRNA-Integrität	79
Abbildung 20: Quantifizierung der (e)dsRNA der Hefeproben für das <i>in-vivo</i> -Experiment	82
Abbildung 21: Ausgestanzte Blattscheibe eines Kartoffelpflanzenblatts mit Hefesuspension	83
Abbildung 22: Versuchsaufbau der (e)dsRNA-Applikation gegen CPB	84
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Diagramm der Behandlung von Kartoffelkäferlarven mit (e)dsRNAs	86
Abbildung 24: Phänotyp von Kartoffelkäferlarven im Vergleichsexperiment am vierten Versuchstag ..	88
Abbildung 26: Phänotyp von Kartoffelkäferlarven im Vergleichsexperiment am elften Versuchstag	89
Abbildung 27: Kaplan-Meier-Diagramm der Behandlung von Kartoffelkäferlarven mit maximaler dsRNA-Konzentration.....	90
Abbildung 28: Repräsentative Bilder von Kartoffelkäferlarven nach Hefeapplikation mit maximaler dsRNA-Menge	91
Abbildung 29: Änderung des <i>PSMB5</i> -Expressionslevels nach Hefeapplikation	93
Abbildung 30: Einfluss von DRB4 auf die DCL4-Aktivität im DCL-Assay	128
Abbildung 31: Wachstumskurven	129
Abbildung 32: Plasmidkarte pYES_dsRe-MK-Sc2.1	133
Abbildung 33: Plasmidkarte pYES_dsRe-MK-Sc7.1	133
Abbildung 34: Plasmidkarte pYES_dsRe-MK-Sc7.2	134

Abbildung 35: Plasmidkarte pEX-A128_MB6G1	134
Abbildung 36: Plasmidkarte pEX-A128_MB6G2	135
Abbildung 37: Plasmidkarte pEX-A128_MB6G3	135
Abbildung 38: Plasmidkarte pEX-A128_MB6G4	136
Abbildung 39: Plasmidkarte pEX-A128_MB6G5	136
Abbildung 40: Plasmidkarte pEX-A128_MB6G6	137
Abbildung 41: Plasmidkarte pYES2_FLAG <i>NbDCL4</i> opt	137
Abbildung 42: Plasmidkarte pYES2_HAN <i>NbDRB4</i>	138
Abbildung 43: Plasmidkarte pYES_dsRe-MK-Sc2.1_TEF1	138
Abbildung 44: Plasmidkarte pYES2_dsRe-MK-Sc2.1_TDH3	139
Abbildung 45: Plasmidkarte pYES2_P <i>SMB5</i> -edsRNA-Konstrukt	139
Abbildung 46: Plasmidkarte pYES2_GAL1_Negativkontroll-Konstrukt	140
Abbildung 47: Plasmidkarte pYES2_GAL1_Positivkontroll-Konstrukt	140

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Medien	21
Tabelle 2: verwendete Puffer und Lösungen	21
Tabelle 3: verwendete Antibiotika	23
Tabelle 4: Reaktionsansatz der T4 DNA-Ligase-Reaktion	25
Tabelle 5: Reaktionsansatz der <i>DreamTaq</i> - und <i>Phusion</i> -Polymerase	26
Tabelle 6: Reaktionsbedingungen der <i>DreamTaq</i> - und <i>Phusion</i> -Polymerase Reaktionen	26
Tabelle 7: Reaktionsansatz <i>in-vitro</i> -Transkription	27
Tabelle 8: Reaktionsansatz zur Generierung radioaktiv markierter RNA	28
Tabelle 9: Zusammensetzung von Harnstoff-Polyacrylamid-Gelen	30
Tabelle 10: Reaktionsbedingungen der qPCR	35
Tabelle 11: Zusammensetzung von vier SDS-Gelen	37
Tabelle 12: verwendete prokaryotische Stämme	38
Tabelle 13: Zusammensetzung des DCL-Assays	44
Tabelle 14: Zusammensetzung einer <i>in-vitro</i> -Translation	45
Tabelle 15: Glukosekonzentration des in Abbildung 14 dargestellten Fermentationslaufs	70
Tabelle 16: Überlebensrate des Kaplan-Meier-Diagramms aus Abbildung 23	87
Tabelle 17: Überlebensrate des Kaplan-Meier-Diagramms aus Abbildung 26	90
Tabelle 18: C _T -Werte der edsRNA nach Hitzeinaktivierung	128
Tabelle 19: verwendete Plasmide	130
Tabelle 20: verwendete Oligonukleotide	141

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Sven-Erik Behrens für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Sie haben mich seit Beginn meiner akademischen Laufbahn begleitet und mich stets mit konstruktiven Hinweisen in die richtige Bahn gelenkt.

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

Bei Herrn Prof. Dr. Ralph Golbik möchte ich mich besonders für die Zeit während meiner Bachelor-, Master- und Dissertationsarbeit bedanken. Durch Sie konnte ich mich enorm sowohl wissenschaftlich als auch persönlich weiterentwickeln. Vielen Dank für Ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft und Geduld in der einen oder anderen scharfen Diskussion. Mir haben die letzten Jahre sehr viel Freude bereitet und ich werde unsere Zusammenarbeit und externen Diskurse vermissen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Torsten Gursinsky für die Unterstützung bei allgemeinen Fragestellungen sowie besonders bei Fragestellung rund ums Thema Klonierung bedanken. Mich haben vor allem unsere Gespräche über sportliche Themen sehr erfreut. Vielen Dank auch für Dein Korrekturlesen der Dissertationsarbeit.

Frau Dr. Selma Gago-Zachert gebührt besonders großer Dank für die Unterstützung in der Etablierung der qPCR-Analysen und das Design der edsRNA-Konstrukte. Ohne Dich wäre ich sehr wahrscheinlich nicht in der Kürze der Zeit ans Ziel gekommen.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Christine Hamann für die angenehme Laboratmosphäre, die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft sowie die unermüdliche Motivation während meiner gesamten Dissertation. Ebenfalls möchte ich mich bei Dir für die Durchführung der Bestimmung der Glukosekonzentrationen bedanken.

Frau Dipl.-Biologin Katja Rostowski möchte ich für die Einarbeitung in das Hefeprojekt sowie für die allgemeine Organisation der Arbeit im Labor danken. Mir hat unsere Zeit beim Mittagessen als Abwechslung zum stressigen Laboralltag sehr geholfen.

Weiterhin möchte ich den aktuellen Doktoranden (Tamara, Aysan und Juliane) sowie den ehemaligen Mitarbeitern (besonders M. Sc. Konstantin Stopp) für den regen Austausch und der gegenseitigen Motivation danken. Zudem tat es gut, sich manchmal gegenseitig sein Leid zu klagen.

Ebeso möchte ich Herrn PD Dr. Knut Krohn für die durchgeführten NGS-Analysen sowie Herrn PD Dr. Jan Grau für die bioinformatische Auswertung und der angenehmen Kommunikation danken.

Ich danke dem BTL Bio-Testlabor in Sagerheide für die Möglichkeit, die *in-vivo*-Experimente mit Kartoffelkäferlarven durchführen zu können. Dabei gilt auch ein besonderer Dank an M. Sc. Juliane Schulz, denn ohne Dich wären diese Experimente nicht zustande gekommen.

Ein weiterer Dank gilt B. Sc. Lea Meschke, die für mich die Klonierung der CMV2-Modell-edsRNA-Konstrukte in die Hefevektoren im Rahmen Ihrer Bachelorarbeit durchgeführt hat.

Besonders danke ich meiner Familie bei der jahrelangen Unterstützung während meines gesamten Studiums sowie meiner Frau Vanessa. Du hast mich durch Höhen und Tiefen begleitet und mir stets motivierend beiseite gestanden. Vielen Dank, dass ich immer auf Euch zählen kann!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Dennis Arendt

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

Seit 11/2021

Promotion

Dissertationsarbeit: „Etablierung eines *S. cerevisiae*-basierten Systems zur Herstellung von Biopestiziden gegen agrarökonomisch-relevante Schädlinge“

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Institut für Biochemie und Biotechnologie,

Abteilung Mikrobielle Biotechnologie,

Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

10/2019 – 10/2021

Master of Science Biochemie

Masterarbeit: „Rekonstruktion des RISC aus *Nicotiana benthamiana* mit dem Fokus auf *Dicer-like* Enzyme“,

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Institut für Biochemie und Biotechnologie,

Abteilung Mikrobielle Biotechnologie,

Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

10/2016 – 09/2019

Bachelor of Science Biochemie

Bachelorarbeit: „Molekulare Charakterisierung der Variante W274A des viralen Suppressor-Proteins p38 aus dem *Turnip Crinkle Virus*“,

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Institut für Biochemie und Biotechnologie,

Abteilung Mikrobielle Biotechnologie,

Betreuer: Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

2008 – 2016

Abitur am Scharnhorst-Gymnasium, Hildesheim

Publikationsliste

Leonetti, P., Consiglio, A., Arendt, D., Golbik, R. P., Rubino, L., Gursinsky, T., Behrens, S.-E. & Pantaleo, V. (2023). Exogenous and endogenous dsRNAs perceived by plant Dicer-like 4 protein in the RNAi-depleted cellular context. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 28(1), 64.

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), den

Dennis Arendt