



# 1 Einleitung

## 1.1 *Pieris rapae* und das Glucosinolat-Myrosinase-System

### 1.1.1 Das Glucosinolat-Myrosinase-System

Pflanzen sind sessile Lebewesen, die zum Schutz vor Fraßfeinden chemische und physikalische Abwehrsysteme entwickelt haben. Ein gut untersuchtes chemisches Abwehrsystem in Pflanzen der Ordnung Brassicales ist das Glucosinolat-Myrosinase-System. Es besteht aus zwei Komponenten, den Glucosinolaten und der Thioglukosidase Myrosinase. Glucosinolate sind aus Aminosäuren abgeleitete anionische Thioglykoside, deren Struktur bereits 1957 aufgeklärt wurde (Ettlinger & Lundeen, 1957). In der intakten Pflanzen liegen Glucosinolate und Myrosinase räumlich getrennt vor. Während Glucosinolate in sogenannten S-Zellen, schwefelreichen Phloem-assoziierten Zellen, akkumulieren, wird die Myrosinase in proteinreichen Idioblasten, den Myrosinzellen, gespeichert (Andréasson et al., 2001; Sarsby et al., 2012). Bei einer Verletzung des Pflanzenmaterials, zum Beispiel durch kauende Herbivoren, wird diese Kompartimentierung aufgehoben und die Myrosinase kommt mit ihrem Substrat in Kontakt. Die thioglykosidische Bindung der Glucosinolate wird gespalten und es entsteht ein instabiles Aglykon, welches sich spontan zum Isothiocyanat umlagert (Ettlinger & Lundeen, 1957). Unter Einfluss von spezifizierenden Proteinen, wie dem Epithionitrilspezifizierenden Protein (ESP), dem Thiocyanatformenden Protein (TFP) oder dem Nitrilspezifizierenden Protein (NSP) können alternative Abbauprodukte, wie Thiocyanate, einfache Nitrile oder Epithionitrile entstehen (Tookey, 1973; Lambrix et al., 2001; Burow et al., 2007, 2009). Die Produkte, deren biologische Wirkung am besten untersucht ist, sind die Isothiocyanate. Isolierte Isothiocyanate wirken antifungal, antibakteriell und insektizid, sowohl bei Aufnahme über die Nahrung als auch bei äußerlichem Kontakt, direkt oder über die Gasphase (Virtanen, 1962; Lichtenstein et al., 1964; Wittstock et al., 2003). Über den Mechanismus der Toxizität ist wenig bekannt, *in vitro* reagieren Isothiocyanate mit Aminogruppen von Proteinen und können Disulfidgruppen spalten (Wittstock et al., 2003). Aber auch andere Abbauprodukte wie Nitrile oder Oxazolidin-2-thione sind giftig, letztere vor allem für Säugetiere, da sie zur Kropfbildung führen (Wittstock et al., 2003).

Trotz der schädlichen Wirkungen von Isothiocyanaten auf viele Insekten gibt es Arten, die sich auf glucosinolathaltige Pflanzen spezialisiert haben. Anpassungsmechanismen sind beispielsweise eine effiziente Entgiftung der entstehenden Isothiocyanate, Sequestrierung intakter Glucosinolate oder die Metabolisierung oder Umleitung der Metabolisierung der Glucosinolate (Winde & Wittstock, 2011). Während hohe Mengen an Glucosinolaten eine effektive Abwehr von Generalisten darstellen, bevorzugen Spezialisten glucosinolatreiche Pflanzen (Li et al., 2000; Müller et al., 2010). In der Abwehr von Spezialisten spielen vermutlich alternative Abbauprodukte eine Rolle. Nitrile sind durch ihre niedrigere Toxizität zwar deutlich weniger effektiv gegen Generalisten (Burow et al., 2006), jedoch könnten sie der indirekten Abwehr von Spezialisten dienen. Bei Experimenten mit *Arabidopsis thaliana* Wildtyp Col-0 und der nitrilbildenden Mutante 35S:ESP wurde gezeigt, dass es auf nitrilbildenden Pflanzen zu einer verminderten Eiablage durch den Spezialisten *Pieris rapae* (Kleiner Kohlweißling, Lepidoptera: Pieridae) kommt und Parasiten des Schädling diese Pflanzen bevorzugen (Mumm et al., 2008).

## 1.1.2 Pieridae und glucosinolathaltige Pflanzen

Unter den auf glucosinolathaltige Pflanzen spezialisierten Herbivoren ist *P. rapae* aus der Familie Pieridae besonders gut untersucht. Der Kleine Kohlweißling gehört zu der Unterfamilie Pierinae, die vor etwa 80 Millionen Jahren einen Wirtswechsel von den Fabales zu den Brassicales vollzogen hat (Wheat et al., 2007), also nur etwa 10 Millionen Jahre nach der Entstehung der Brassicales (Franzke et al., 2011). *P. rapae* hat sich auf vielfältige Weise an seine Futterpflanzen angepasst. Die adulten Weibchen legen ihre Eier ausschließlich auf glucosinolathaltige Pflanzen. Diese erkennen sie durch Chemorezeptoren an den Fußwurzeln an Abbauprodukten vor allem indolischer Glucosinolate auf der Blattoberfläche (de Vos et al., 2008). Auch die Raupen des kleinen Kohlweißlings haben sich sensorisch an ihre Futterpflanzen angepasst. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Glucosinolate als Fraßstimulanz wirken (Renwick & Lopez, 1999; Miles et al., 2005). Auch für die Raupen des kleinen Kohlweißlings sind Isothiocyanate als Hauptabbauprodukte der Glucosinolate giftig, wie in Fütterungsversuchen gezeigt wurde (Agrawal & Kurashige, 2003). Die Raupen haben sich jedoch auch biochemisch an das Glucosinolat-Myrosinase-System angepasst. Bei Untersuchungen des Kots von Raupen, die auf *Sinapis alba* (Brassicaceae) fraßen, wurde festgestellt, dass dieser große Mengen eines Nitrilsulfats enthielt, welches bei Untersuchungen mit radioaktiv markierten Glucosinolaten als Abbauprodukt des Hauptglucosinolats der Pflanze identifiziert wurde (Wittstock et al., 2004). Als Zwischenprodukt dieses Abbauweges wurde das Nitril nachgewiesen (Agerbirk et al., 2006). Die Nitrilbildung wurde auf die Aktivität eines Enzyms zurückgeführt, welches Nitrilspezifizierendes Protein (NSP) genannt wurde und ausschließlich im Darm der Raupen exprimiert wird (Wittstock et al., 2004). Genau wie bei pflanzlichen spezifizierenden Proteinen handelt es sich beim NSP der Raupen um ein Enzym und keinen Cofaktor der Myrosinase (Burow et al., 2006). Das NSP aus dem Darm von *P. rapae* (PrNSP) führt wie einige pflanzliche spezifizierende Proteine zur Bildung der wesentlich ungiftigeren Nitrile anstelle von Isothiocyanaten, hat jedoch keine Ähnlichkeit zu den pflanzlichen Proteinen (Wittstock et al., 2004). Evolutionär eng verwandt ist das NSP dagegen mit sogenannten *major allergens* (MA), deren Funktion noch ungeklärt ist (Fischer et al., 2008).

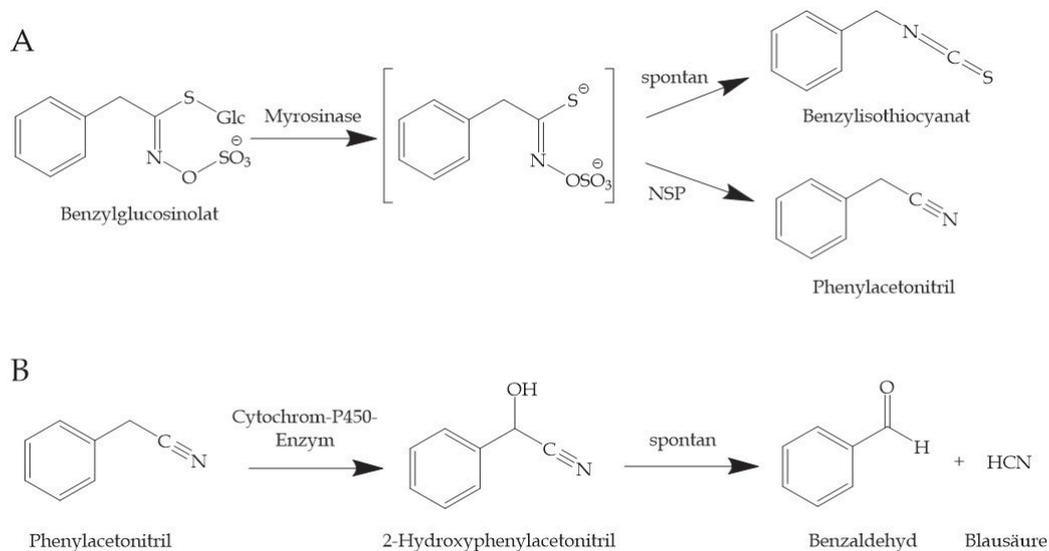
Das NSP war vermutlich für den Wirtswechsel der Pierinae auf glucosinolathaltige Pflanzen essentiell und wird heute als koevolutionäre Schlüsselinnovation nach Ehrlich & Raven (1964) angesehen. Bei der Untersuchung von 13 Arten der Pieridae von mehreren Kontinenten wurde gezeigt, dass nur die Arten, die auf glucosinolathaltigen Pflanzen fressen, NSP Aktivität im Darm zeigen. Pieridae mit anderen Wirtspflanzen, auch solche, die einen sekundären Wirtswechsel von den Brassicales zu anderen Futterpflanzen vollzogen haben, besitzen diese Aktivität nicht (Wheat et al., 2007).

## 1.1.3 Cyanidentgiftung in *Pieris rapae*

### 1.1.3.1 Cyanidbildung

In frühen Brassicales waren von Phenylalanin oder Tyrosin abgeleitete Glucosinolate weit verbreitet (Mithen et al., 2010). Während Glucosinolate mit aliphatischer Seitenkette nach der Umsetzung zum entsprechenden Nitril mit dem Kot der Raupen ausgeschieden werden (Wittstock et al., 2004), liegt bei aromatischen Nitrilen ein komplexerer Stoffwechselweg vor. Eine der Wirtspflanzen von *P. rapae* ist die Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus*, Tropaeolaceae), welche als Hauptglucosinolat in den Blättern Benzylglucosinolat enthält. Bei Raupen, die auf *T. majus* fraßen, konnte das entsprechende Nitril Phenylacetonitril im Kot nicht nachgewiesen werden, obwohl dieser Metabolit *in vitro* bei Inkubation von Benzylglucosinolat mit NSP und der Myrosinase entstand (Vergara et al., 2006, 2007). Bei Fütterungsexperimenten mit radioaktiv markiertem Benzylglucosinolat wurde als Hauptmetabolit Hippursäure als Produkt der Konjugation von Benzoesäure mit Glycin nachgewiesen, was auf einen C1-Verlust in der Glucosinolat-Seitenkette bei der Verstoffwechslung hindeutet (Vergara et al., 2006, 2007). Als möglicher Abbauweg wurde

eine  $\alpha$ -Hydroxylierung zum instabilen  $\alpha$ -Hydroxynitril mit nachfolgendem Zerfall in ein Aldehyd und Cyanid postuliert. Der genaue Metabolismus von Benzylglucosinolat in *P. rapae* wurde von Stauber et al. (2012) aufgeklärt. Bei Assays mit der mikrosomalen Fraktion aus Darmextrakten der Raupen und Phenylacetonitril als Substrat wurde nur bei Zugabe von NADPH eine Bildung des entsprechenden Aldehyds nachgewiesen (Stauber et al., 2012). Dies deutet auf eine Beteiligung von Cytochrom P450 Enzymen hin, welche eine  $\alpha$ -Hydroxylierung des Nitrils katalysieren. Neben Benzaldehyd wurde Cyanid als Reaktionsprodukt nachgewiesen (Abbildung 1.1).



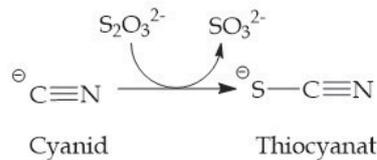
**Abbildung 1.1:** Cyanidbildung in *P. rapae*. **A** Bei Gewebeverletzung werden Glucosinolate durch die Myrosinase zu instabilen Aglyka umgesetzt, welche sich spontan zu Isothiocyanaten umlagern. In Gegenwart von spezifizierenden Proteinen wie dem NSP aus *P. rapae* kommt es zur Bildung von alternativen Produkten, wie Nitrilen. **B** Das aus Benzylglucosinolat entstehende aromatische Nitril wird zu einem instabilen  $\alpha$ -Hydroxynitril verstoffwechselt, welches zu Benzaldehyd und Cyanid zerfällt.

Bei dem Hauptabbauweg von Benzylglucosinolat in *P. rapae* werden somit äquimolare Mengen an Cyanid freigesetzt, was auf eine hohe Cyanidtoleranz der Raupen hindeutet (Stauber et al., 2012). Die bekannten Cyanidentgiftungsenzyme in Insekten sind die Rhodanese und die  $\beta$ -Cyanoalanin-Synthase (Beesley et al., 1985; Meyers & Ahmad, 1991; Zagrobelny et al., 2004). In den Raupen von *P. rapae* wurden bei Begasungsexperimenten mit  $^{15}\text{N}$ -HCN sowohl  $\beta$ -Cyanoalanin als auch Thiocyanat, das Produkt der Rhodanese-katalysierten Entgiftungsreaktion, als Produkte gebildet, was auf eine Beteiligung beider Enzyme in der Cyanidentgiftung hinweist (Stauber et al., 2012).

Aromatische Glucosinolate mit längerer Seitenkette, wie 2-Phenylethylglucosinolat, können nach Bildung des entsprechenden aromatischen Nitrils 3-Phenylpropionitril über einen Nebenweg zwar auch zur Cyanidbildung führen, werden aber hauptsächlich über pflanzliche Nitrilasen zu Carbonsäuren metabolisiert, welche anschließend an Glycin konjugiert und ausgeschieden werden (Stauber et al., 2012). Für andere aromatische Glucosinolate, die am Aromaten hydroxyliert sind, zeigte sich in *P. rapae* ebenfalls ein komplexer Metabolismus, bei dem es zur Nitrilbildung,  $\beta$ -Hydroxylierung, O-Demethylierung und Sulfatierung kommt (Agerbirk et al., 2010), jedoch nicht zu einem C1-Verlust. Vermutlich durch das Mitwirken von pflanzlichen Nitrilasen werden aus den Nitrilen Carbonsäuren gebildet, die allerdings nicht an Glycin oder andere Aminosäuren konjugiert, sondern direkt ausgeschieden werden (Agerbirk et al., 2010). Dies lässt vermuten, dass für die Metabolisierung unter C1-Verlust ein unhydroxylierter Aromat vorliegen muss.

### 1.1.3.2 Cyanidentgiftung durch die Rhodanese

Die Rhodanese (Thiosulfat:Cyanid-Schwefeltransferase) gehört zu den Schwefeltransferasen. Die klassische Rhodanese-katalysierte Reaktion ist die Entgiftung von Cyanid durch die Bildung von Thiocyanat und Sulfid aus Thiosulfat und Cyanid (Cipollone et al., 2007) (Abbildung 1.2).

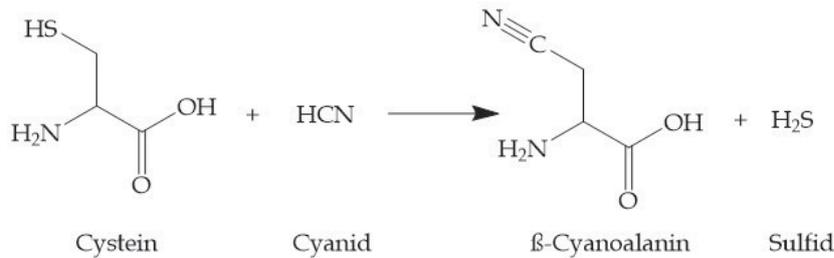


**Abbildung 1.2:** Cyanidentgiftung durch die Rhodanese

Rhodanesen stellen eine weit verbreitete und auf Sequenzebene sehr heterogene Enzymgruppe dar, deren Funktion *in vivo* noch nicht vollständig geklärt ist (Cipollone et al., 2007). Der am besten untersuchte Vertreter ist die Rhodanese aus der Rinderleber, welche zu den Tandem-Domänen-Rhodanesen gehört. Tandem-Domänen-Rhodanesen besitzen zwei Domänen, welche nur geringe Sequenzidentität besitzen, die katalytisch aktive C-terminale Domäne und eine inaktive N-terminale Domäne (Ploegman et al., 1978). Da die beiden Domänen eine ähnliche Größe und Struktur aufweisen, wird eine evolutionärer Ursprung durch Genduplikation eines ursprünglichen Rhodanesegens vermutet (Ploegman et al., 1978). Diese Hypothese wird unterstützt durch die Identifizierung von Einzel-Domänen-Rhodanesen, wie GIpE aus *E. coli*, welchen keine katalytisch inaktive N-terminale Domäne besitzen (Ray et al., 2000). Rhodanesen aus verschiedenen Organismen besitzen nur eine geringe Ähnlichkeit auf Sequenzebene, die dreidimensionale Struktur der Rhodanese-Domänen ist jedoch hochkonserviert (Spallarossa et al., 2001; Cipollone et al., 2007). Die Cyanidentgiftung wurde lange als Hauptfunktion der Rhodanesen angesehen, da diese Enzyme in der Lage sind, Cyanid zu Thiocyanat umzusetzen. Das Vorkommen von Rhodanesen in Geweben, die Cyanid ausgesetzt sein können, sowie ihre subzelluläre Lokalisation hauptsächlich in den Mitochondrien unterstützt eine Funktion in der Cyanidentgiftung (De Duve et al., 1955; Dudek et al., 1980; Sylvester & Sander, 1990). Das ubiquitäre Vorkommen von Rhodanesen, auch in Organismen, die keinen erhöhten Mengen an Cyanid ausgesetzt sind, und die niedrige physiologische Konzentration des Substrats Thiosulfat sprechen eher dagegen (Beesley et al., 1985; Cipollone et al., 2007). Daher liegt es nahe, dass Rhodanesen als Schwefeltransferasen eine Vielzahl an Funktionen erfüllen. So wurden ihnen z.B. Rollen im Schwefel- und Selenmetabolismus oder der Synthese von Eisen-Schwefel-Proteinen zugeschrieben (Bordo & Bork, 2002). Auch in Insekten scheint Rhodanese-Aktivität weit verbreitet zu sein (Beesley et al., 1985), wobei die einzige charakterisierte Rhodanese aus Insekten aus dem Grashüpfer *Zonocerus variegatus* (Orthoptera: Pyrgomorphidae) aufgereinigt wurde (Bessie & Agboola, 2013). Bisher konnte jedoch noch keine Rhodanesesequenz aus Insekten aufgeklärt werden.

### 1.1.3.3 Cyanidentgiftung durch $\beta$ -Cyanoalanin-Synthasen

$\beta$ -Cyanoalanin-Synthasen katalysieren die Entgiftung von Cyanid durch Bildung der nichtproteinogenen Aminosäure  $\beta$ -Cyanoalanin aus Cystein und Cyanid (Hatzfeld et al., 2000) (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3:** Cyanidentgiftung durch die β-Cyanoalanin-Synthase

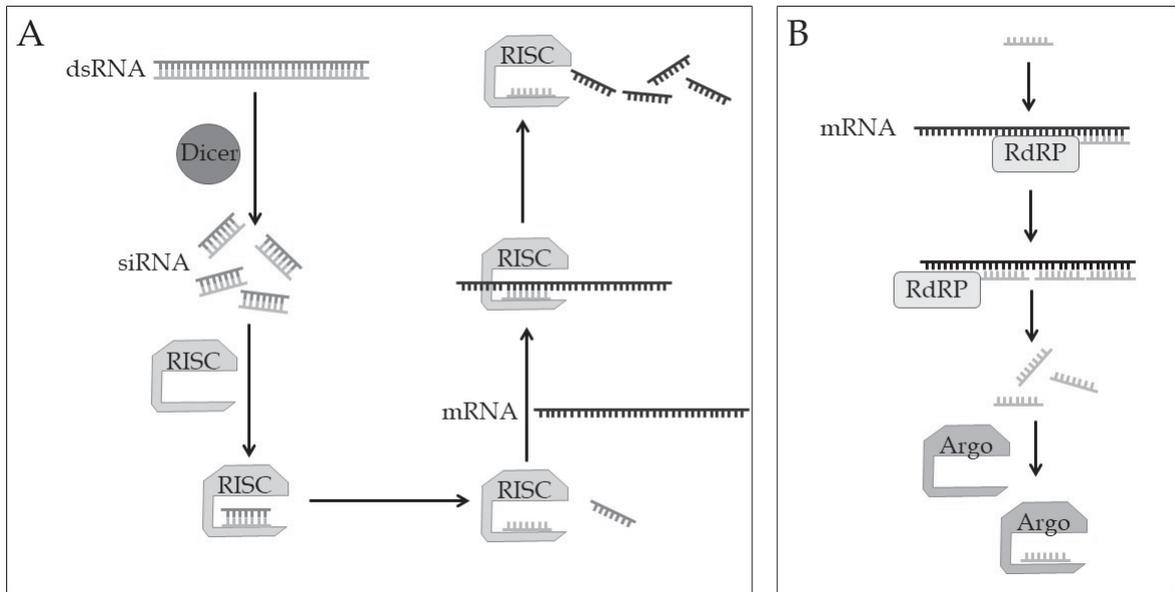
Diese Enzyme gehören neben O-Acetylserin(thiol)lyasen und Cystathionin-β-Synthasen zur Familie der (β-substituiertes Alanin)-Synthasen (BSAS), welche als Cofaktor Pyridoxal-5'-phosphat benötigen (Hatzfeld et al., 2000). Oft besitzen Vertreter der BSAS sowohl β-Cyanoalanin-Synthase- als auch O-Acetylserin(thiol)lyase-Aktivität. Die Zuordnung erfolgt dann über die Affinität zu den jeweiligen Substraten (Hatzfeld et al., 2000; Vozdek et al., 2013). β-Cyanoalanin-Synthasen sind als Cyanidentgiftungsenzyme vor allem in Pflanzen und Bakterien verbreitet (Hatzfeld et al., 2000). Bisher wurde nur in wenigen vielzelligen Tieren β-Cyanoalanin-Synthase-Aktivität nachgewiesen, unter anderem in Arthropoden und Nematoden (Meyers & Ahmad, 1991; Vozdek et al., 2013; Wybouw et al., 2014; van Ohlen et al., 2016). Wie die Funktion in der Cyanidentgiftung nahelegt, sind die meisten bisher identifizierten β-Cyanoalanin-Synthasen in den Mitochondrien lokalisiert (Meyers & Ahmad, 1991; Hatzfeld et al., 2000), aber es wurden auch Vertreter ohne mitochondriale Signalsequenz identifiziert (Vozdek et al., 2013; Wybouw et al., 2014; van Ohlen et al., 2016). Auch das Produkt der katalysierten Engiftungsreaktion, β-Cyanoalanin, kann eine giftige Wirkung besitzen, auf Säugetiere wurde eine neurotoxische Wirkung nachgewiesen (Ressler et al., 1962). In Pflanzen wird β-Cyanoalanin weiter zu proteinogenen Aminosäuren wie Asparagin abgebaut (Blumenthal et al., 1968). Inwiefern β-Cyanoalanin auch für Insekten toxisch ist und ob sie in der Lage sind, es weiter zu verstoffwechseln, ist noch nicht geklärt. Erst kürzlich wurden in Arthropoden Sequenzen von β-Cyanoalanin-Synthasen aufgeklärt (Wybouw et al., 2014; van Ohlen et al., 2016). In *P. rapae* wurden drei β-Cyanoalanin-Synthasen gefunden, deren physiologische Funktion jedoch noch ungeklärt ist (van Ohlen et al., 2016).

## 1.2 RNA-Interferenz (RNAi)

### 1.2.1 Hintergrund

Die RNA-Interferenz ist eine Methode zur Eliminierung von Transkripten durch komplementäre doppelsträngige RNA (dsRNA). Sie wurde erstmals 1998 für den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Rhabditida: Rhabditidae) beschrieben (Fire et al., 1998). Die Gruppe um Andrew Fire fand heraus, dass die Injektion von dsRNA, welche komplementär zu der Gensequenz von *unc-22* ist, einem Gen welches für ein Myofilament-Protein codiert, in den Nachkommen zu einem zuckenden Phänotyp führt. Die Injektion von einzelsträngiger RNA dagegen hatte nur einen marginalen Effekt, der vermutlich auf Verunreinigungen mit dsRNA zurückzuführen war. Weitere Untersuchungen ergaben, dass es sich hierbei um einen sehr spezifischen Mechanismus handelt, bei dem es zur Abnahme bzw. Eliminierung der komplementären mRNA-Transkripte kommt. Die zu der dsRNA komplementäre mRNA wird vermutlich schon im Kern abgebaut, da im Cytoplasma keine Transkripte durch *in situ* Hybridisierung nachweisbar waren (Montgomery et al., 1998). Für die Entdeckung der RNAi in *C. elegans* wurden Andrew Fire und Craig Mello 2006 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet. Neben der Injektion von dsRNA führte auch das Verfüttern von dsRNA-produzierenden *Escherichia coli* oder das Tränken der Fadenwürmer in dsRNA-haltigem Medium zu einer Interferenz, auch wenn diese nicht so stark ausgeprägt war wie nach Mikroinjektion von dsRNA (Timmons & Fire, 1998; Tabara et al., 1998). Der Mechanismus der RNAi wurde in den darauffolgenden Jahren aufgeklärt

(Abbildung 1.4 A). Die doppelsträngige RNA wird in den Zellen durch den Dicer, eine Nuklease aus der RNase III-Familie, in 21 bp große dsRNA-Stücke (siRNAs) zerschnitten (Bernstein et al., 2001). Diese siRNAs werden anschließend in einen Ribonukleoproteinkomplex mit Nuklease-Aktivität, den sogenannten RISC (**R**NA-**i**nduced **s**ilencing **c**omplex) integriert (Hammond et al., 2000). Die siRNA bindet an das Argonaut-Protein des RISC, der Leitstrang der RNA verbleibt in dem Komplex, während der Folgestrang entfernt wird. Der RISC Komplex mit dem kurzen einzelsträngigen RNA-Abschnitt kann nun an komplementäre mRNA in der Zelle binden und diese zerstören (Hammond et al., 2001).



**Abbildung 1.4:** Postulierter Mechanismus der RNA-Interferenz. **A** Aufgenommene dsRNA wird durch die Nuklease Dicer in kurze, doppelsträngige siRNAs zerschnitten. Diese werden in den RISC integriert, welcher komplementäre mRNAs erkennt und schneidet. **B** In *C. elegans* kommt es durch RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRP) zu einer Vervielfältigung des RNAi-Signals, indem sie die einzelsträngigen siRNAs als Primer benutzen, um aus der einzelsträngigen komplementären Ziel-RNA sekundäre siRNAs zu generieren. Diese binden an sekundäre Argonauten-Komplexe (Argo), welche wiederum komplementäre mRNA zerstören.

### 1.2.2 Variabilität der RNAi-Effizienz in Insekten

Das Reduzieren des Transkriptniveaus ("Silencing") von Genen durch RNAi birgt ein großes Potential für die Untersuchung von Genfunktionen, aber auch für die Anwendung zur Schädlingsbekämpfung. Während die RNAi in *C. elegans* eine einfache und effiziente Methode ist, gibt es jedoch in Insekten eine hohe Variabilität der RNAi-Effizienz (Baum & Roberts, 2014). Ein Grund für das schlechtere Ansprechen auf die Verabreichung von dsRNA könnte in einer unterschiedlichen Enzymausstattung liegen. Während Dicer und RISC in Eukaryoten hochkonservierte Proteine sind (Ghildiyal & Zamore, 2009), gibt es Unterschiede in der Ausstattung mit weiteren beteiligten Proteinen. In *C. elegans* ist im Gegensatz zu vielen Insektenarten zusätzlich zur zellautonomen RNAi auch systemische RNAi, also die Ausbreitung des Signals zwischen verschiedenen Zellen und Geweben, möglich (Fire et al., 1998). Zwei Proteine, welche für die Aufnahme von dsRNA aus der Umwelt und die Verbreitung zwischen den Zellen verantwortlich sind, wurden durch Mutanten ohne systemische RNAi (systemic RNA interference deficient, sid) identifiziert (Winston et al., 2002). Der interzelluläre Transport der dsRNA, welcher für eine systemische RNA Interferenz nötig ist, wird in *C. elegans* durch das Transmembranprotein SID-1 ermöglicht, welches vor allem in Zellen mit direktem Umweltkontakt exprimiert wird und vermutlich durch Bildung eines Kanals einen passiven Transport von dsRNA in Zellen ermöglicht (Winston et al., 2002; Feinberg & Hunter, 2003). Das zweite identifizierte Protein SID-2 ist

zusammen mit SID-1 für die Aufnahme von dsRNA aus dem Darmlumen nötig (Winston et al., 2007). Ein Enzym, welches in *C. elegans* vermutlich eine Funktion in der Vervielfältigung des RNAi-Signals hat, ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase (**R**NA-**d**e**p**endent **R**NA **p**olymerase, RdRP) (Sijen et al., 2001). Die RdRP ist offenbar in der Lage, den Leitstrang der gebildeten siRNAs als Primer zu benutzen, um aus der einzelsträngigen komplementären Ziel-RNA sekundäre siRNAs zu generieren. Diese können durch die Bindung an sekundäre Argonauten-Komplexe wiederum die Zerstörung komplementärer mRNA bewirken (Abbildung 1.4 B) (Ghildiyal & Zamore, 2009). Dies könnte ein Grund dafür sein, dass z.B. in *C. elegans* die Injektion von nur wenigen Molekülen dsRNA schon ein effizientes *Gene Silencing* auslöst, obwohl deutlich mehr mRNA-Transkripte in den Zellen vorhanden sind als dsRNA injiziert wurde. Bei einem Vergleich von RNAi-relevanten Genen in Pflanzen und Tieren wurde deutlich, dass *sid-1*-Orthologe mit der Ausnahme von Diptera zwar in allen untersuchten tierischen Genomen vorhanden waren, allerdings liegen kaum Informationen zu deren Expression oder Funktion vor. *RdRP*-Gene dagegen konnten in Insekten nicht nachgewiesen werden (Gordon & Waterhouse, 2007).

Ein alternativer Weg der dsRNA-Aufnahme nach oraler Applikation wurde in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) gezeigt (Ulvila et al., 2006). In einem Experiment wurden 2000 dsRNA Fragmente aus einer cDNA-Bibliothek an *D. melanogaster* S2-Zellen auf ihre Relevanz für die RNAi getestet. Hierzu wurden die Zellen zunächst in der zu testenden dsRNA-Lösung und anschließend mit dsRNA eines für die Zelle überlebenswichtigen Gens getränkt. Die dsRNA der Gene, welche essentiell für RNAi sind, führte durch ein Unterdrücken der RNAi zum Überleben der Zellen. Hierbei wurde neben bekannten RNAi-relevanten Genen ein *Clathrin*-Gen identifiziert, für welches eine Funktion in der Endocytose bekannt ist. In weiteren Untersuchungen wurden außerdem zwei Scavenger-Rezeptoren identifiziert, welche für die Aufnahme von über 90 % der dsRNA verantwortlich waren. Vermutlich findet in *D. melanogaster* also eine Scavenger-Rezeptor-vermittelte Endocytose von dsRNA statt (Ulvila et al., 2006). Interessanterweise führt die Unterdrückung der Expression der orthologen Gene in *C. elegans* dazu, dass keine systemische RNAi mehr stattfindet, was auf ein Zusammenspiel beider Wege hindeutet (Saleh et al., 2006). In einer Studie am Kartoffelkäfer *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), welcher über eine effiziente RNAi-Antwort verfügt, wurde erstmals gezeigt, dass sowohl SID-Proteine als auch Endocytose an der dsRNA-Aufnahme im Darm des Insekts beteiligt sind (Cappelle et al., 2016).

Bei RNAi-Versuchen in Insekten zeigte sich in der Ordnung Coleoptera die größte Effizienz. Hier können schon kleinste Mengen oral verabreichter dsRNA einen starken Effekt zur Folge haben, während die Erfolgsraten bei Diptera deutlich geringer und bei Lepidoptera sehr variabel sind (Terenius et al., 2011; Baum & Roberts, 2014). Das bessere Ansprechen von Coleoptera gegenüber Lepidoptera auf dsRNA wurde in mehreren Studien untersucht. Bei der Analyse kurzer RNA in den Larven von *Diabrotica virgifera virgifera*, *L. decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), sowie *Spodoptera frugiperda* und *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) nach dem Fraß auf Pflanzen wurden in den Coleoptera-Arten größere Mengen kurzer RNA pflanzlichen Ursprungs gefunden, in den beiden Lepidoptera dagegen war der Anteil verschwindend gering. Dies deutet auf eine schlechtere Aufnahme oder Instabilität der dsRNA hin (Ivashuta et al., 2015). Bei Untersuchungen an Zelllinien von *L. decemlineata* und *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) wurde zwar in beiden Zelllinien eine erfolgreiche Aufnahme fluoreszenzmarkierter dsRNA nachgewiesen, diese führte in den Zellen der Lepidoptera-Art jedoch nicht zu signifikanten *Silencing*-Effekten und es wurde keine siRNA nachgewiesen. Bei Injektion der dsRNA in Raupen der beiden Arten kam es zu einem starken Abbau der dsRNA in *H. virescens*, nicht jedoch in *L. decemlineata* (Shukla et al., 2016). In einer Zelllinie aus Ovarzellen von *S. frugiperda* akkumulierte fluoreszenzmarkierte dsRNA in den Endosomen, was ein Grund für die schlechte Effizienz von RNAi in dieser Zelllinie sein könnte (Yoon et al., 2017).

## 1.2.3 RNAi in Lepidoptera

### 1.2.3.1 Bis 2011 durchgeführte Versuche

In einem ausführlichen Reviewartikel von Terenius et al. (2011) wurden sowohl erfolgreiche als auch erfolglose RNAi Experimente an Lepidoptera zusammengefasst. Erfolgreiche Experimente gab es in einigen Arten, allen voran *Bombyx mori* (Bombycidae) und *Manduca sexta* (Sphingidae), außerdem in Vertretern der Crambidae, Noctuidae, Plutellidae, Pyralidae, Saturniidae und Tortricidae. Unterschiede ergaben sich vor allem in der Applikationsart. Während die Fütterung von dsRNA zwar eine sehr einfache und dadurch attraktive Methode ist, führte sie nur in wenigen Arten zu Erfolg. Dagegen war die Injektion von dsRNA sowie die Transfektion von Zelllinien oder die Verwendung transgener Insekten, welche Hairpin-RNAs exprimieren, generell erfolgreich. Diese Ergebnisse deuteten auf Barrieren in der Aufnahme von dsRNA hin. In dem Review wurden auch die Zielgene nach Gewebeart und Funktion analysiert. Hier zeigten sich besonders Gene und Gewebe, die Teil des Immunsystems waren, empfindlich für RNAi. Epidermale Gewebe und Gene, welche eine Funktion in der Proteinbindung besitzen, waren dagegen eher resistent (Terenius et al., 2011).

### 1.2.3.2 Injektion von dsRNA

Seit 2011 wurden zahlreiche weitere erfolgreiche RNAi-Experimente in Lepidoptera veröffentlicht, ein Großteil davon in Arten aus der Familie Noctuidae, hier wurde vor allem *Helicoverpa armigera* oft verwendet. Viele der publizierten Ergebnisse wurden, wie schon durch Terenius et al. (2011) beschrieben, mit der Injektion von dsRNA oder siRNA erzielt (Oda et al., 2010; Yao et al., 2010; Xiang et al., 2011; Choi et al., 2012; Du et al., 2012; Hanin et al., 2012; Tang et al., 2012; Wang et al., 2012a,b; Dong et al., 2013; Meng et al., 2013; Ningshen et al., 2013; Wang et al., 2013b; Yokoi et al., 2013; Feng et al., 2014; Han et al., 2014; Li et al., 2014; Qiao et al., 2014; Xu et al., 2015; Zhang et al., 2014; Cao et al., 2015; Li et al., 2015c; Liu et al., 2015; Li et al., 2015b; Lu et al., 2015; Wu et al., 2016; Zhang et al., 2016; Dong et al., 2017; Kim et al., 2017; Meng et al., 2017a). Hierbei wurden im Regelfall Raupen injiziert, was in den meisten Fällen zu Erfolg führte, jedoch in zwei Experimenten keinen Effekt auf die Genexpression oder den Phänotyp hatte (Di Lelio et al., 2014; Yokoi et al., 2013). Die Gruppe um Yokoi untersuchte die Injektion von 3 µg dsRNA für verschiedene Targets in das Hämocoel von Raupen von *Mythimna separata* (Noctuidae). Zielgene waren hierbei Gene mit verschiedenen Funktionen, unter anderem auch im Immunsystem. Allerdings führte keine der applizierten dsRNAs in den untersuchten Geweben zu einer signifikanten Reduktion der Expression des Zielgens (Yokoi et al., 2013). Ein möglicher Grund für die Ineffektivität der Injektion von dsRNA in die Hämolymphe ist die Anwesenheit von dsRNA-abbauenden Enzymen. Garbutt et al. (2013) zeigte in einem Versuch mit *M. sexta* und der Deutschen Schabe *Blattella germanica* (Blattodea: Ectobiidae), dass dsRNA *ex vivo* durch ein Enzym aus dem Plasma der Hämolymphe von *M. sexta* innerhalb kurzer Zeit abgebaut wurde. Dies wurde auf die Anwesenheit von Nucleasen mit dsRNase-Aktivität in der Hämolymphe von Lepidoptera zurückgeführt. Die Inkubation mit Plasma der Hämolymphe von *B. germanica* hatte dagegen selbst nach 24 h keinen Effekt auf die Stabilität der dsRNA (Garbutt et al., 2013). Auch in *H. armigera* wurde der Abbau von dsRNA durch Plasma der Hämolymphe gezeigt (Zhao et al., 2016). Ein weiteres Beispiel für die erfolglose Injektion von dsRNA ist der Vergleich von Verfütterung und Injektion von dsRNA in Raupen von *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) zur Unterdrückung eines Zielgens mit einer Funktion in der Immunantwort der Raupen, das hauptsächlich in den Hämocyten exprimiert wird. Der Effekt wurde durch die Rate der Einkapselung injizierter Beads gemessen. Während die Verfütterung von 45 und 450 ng dsRNA die Einkapselungsrate um etwa 90 % reduzierte, führte die Injektion der höheren Menge dsRNA in das Hämocoel der Raupen zu keinem Effekt (Di Lelio et al., 2014). In den

nah verwandten Arten *Spodoptera exigua* und *Spodoptera litura* war die Injektion von dsRNA in Raupen oder Imagos dagegen erfolgreich (Yao et al., 2010; Wang et al., 2012b; Meng et al., 2013; Feng et al., 2014; Li et al., 2014; Lu et al., 2015).

### 1.2.3.3 Verfüttern von dsRNA

Der Anteil erfolgreicher Verfütterungsexperimente von dsRNA ist seit dem Reviewartikel von Terenius et al. (2011) deutlich gestiegen. Insgesamt wurde die dsRNA in 20 von 57 publizierten und hier ausgewerteten Experimenten oral verabreicht. Ein Grund für die unerwartet hohe Erfolgsrate könnte die gesteigerte Nutzung der pflanzenvermittelten RNAi (PMRi) sein. Hierbei wurden entweder stabile dsRNA-produzierende Pflanzenlinien verwendet (Mao et al., 2011; Poreddy et al., 2015; Reddy et al., 2016; Maligeppagol et al., 2017) oder Pflanzen z.B. durch virus-induced gene silencing, kurz VIGS, transient transformiert (Kumar et al., 2012, 2014; Bao et al., 2016). Die Technik der PMRi findet bereits Anwendung im Pflanzenschutz beim Anbau von Mais. Ein großes Problem, besonders in den USA und Kanada ist hier der Maiswurzelbohrer *D. virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), gegen den bisher bereits transgene Maispflanzen eingesetzt wurden, welche insektizide Toxine des Bodenbakteriums *Bacillus thuringiensis* produzieren. Da sich Resistenzen gegen Insektizide schnell entwickeln und nicht alle Insekten für *Bt*-Toxine empfindlich sind, wurde die Wirksamkeit von transgenen Pflanzen getestet, welche gegen essenzielle Insektengene gerichtete dsRNAs produzieren (Baum et al., 2007). Als besonders effizient erwiesen sich transgene Pflanzen, welche sowohl das Cry3Bb1 Protein aus *B. thuringiensis* als auch Maiswurzelbohrer-spezifische dsRNAs exprimieren (Baum & Roberts, 2014), diese wurden im Juni 2017 unter dem Namen SmartStax PRO von der US-amerikanischen Umweltbehörde EPA zugelassen. Der Vorteil dieser Methoden liegt in der kontinuierlichen Zuführung großer Mengen dsRNA. Dadurch kann das Fehlen einer RdRP in Insekten ausgeglichen werden, das eine Vervielfältigung des RNAi-Signals für ein erfolgreiches *Silencing* verhindert. Die Nutzung dsRNA-produzierender Pflanzen gegenüber der externen Applikation von dsRNA-haltiger Lösung auf die Pflanzen hat zudem den Vorteil, dass nur die Herbivoren beeinflusst werden, die tatsächlich die Pflanze beschädigen. Eine dsRNA-Lösung müsste zudem vor dem Aufbringen auf die Pflanze vermutlich weiter stabilisiert werden, um ein frühzeitiges Degradieren zu verhindern. Jedoch waren auch einige Experimente erfolgreich, bei denen dsRNA auf Blattscheiben aufgebracht oder in eine künstliche Diät eingearbeitet wurde (Porta et al., 2011; Zhang et al., 2012; Camargo et al., 2015; Wang et al., 2015; Cao et al., 2017; Chaitanya et al., 2017; Meng et al., 2017b). Da hierbei eine Vielzahl verschiedener Gene in verschiedenen Geweben Target war, muss in den untersuchten Arten trotz der Abwesenheit einer RdRP eine effiziente Aufnahme von dsRNA und Transport oder Ausbreitung des Signals in umgebende Gewebe stattfinden.

Viele Untersuchungen zeigten, dass lange dsRNA beim Verfüttern einen besseren *Silencing*-Effekt hervorruft als kürzere dsRNAs (Bolognesi et al., 2012). In zwei Studien, in der pflanzenvermittelte RNAi zur Unterdrückung der Expression von Cytochrom P450-Enzymen in *H. armigera* bzw. *M. sexta* verwendet wurden, führte das gleichzeitige *Silencing* der pflanzlichen Dicer-Gene im Vergleich zu einfach transformierten Pflanzen zu einer stärkeren Wirkung auf die Transkriptlevel der Raupen (Mao et al., 2007; Kumar et al., 2012). Dieses Phänomen wurde auch in der Entwicklung von Chloroplasten-transformierten Pflanzen ausgenutzt. Hierbei wurden transplastomische Kartoffelpflanzen hergestellt, welche lange dsRNAs produzieren, die gegen das  $\beta$ -Actin des Kartoffelkäfers (*L. decemlineata*) gerichtet sind. Da es hier zu einer Produktion und Anreicherung der dsRNA in den Chloroplasten kommt, welche aufgrund ihrer prokaryotischen Herkunft keinen Dicer besitzen, wird die lange produzierte dsRNA nicht schon in der Pflanze sondern erst in den Insekten zu den kurzen siRNAs prozessiert. Nach fünf Tagen lag die Mortalität der Käferlarven bei 100 %, wobei schon nach 24 h kein Fraßschaden mehr auftrat. Bei Kern-transformierten Pflanzen dagegen war kein Effekt auf die Larven des Käfers sichtbar.

(Zhang et al., 2015b). Die postulierte Aufnahme von dsRNA aus dem Darm erfolgt über das Protein SID-1 (siehe Abschnitt 1.2.2). In einer Studie an *D. melanogaster* Zelllinien konnte ein passiver Transport durch Bildung eines Kanals für dsRNA durch SID-1 gezeigt werden. Die Aufnahme von langer dsRNA war hierbei deutlich effizienter als die Aufnahme kürzerer dsRNAs (Feinberg & Hunter, 2003). Eine Beteiligung von SID-1 an der Aufnahme von dsRNA, beispielsweise aus der Nahrung, würde die verminderte Wirkung von kürzeren dsRNAs, wie siRNAs, erklären. Ein interessantes Gegenbeispiel liefert die Studie von Wang et al. (2015). In dieser Studie wurden Raupen von *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) verschiedene Mengen von dsRNA und siRNA verfüttert, welche komplementär zu verschiedenen essentiellen Genen waren. Durch fluoreszenzmarkierte doppelsträngige RNAs wurde gezeigt, dass sowohl längere dsRNA als auch siRNA von den Raupen aufgenommen wurde, die Aufnahme der längeren dsRNA allerdings etwas effizienter war. Die Verfütterung von siRNA führte hier jedoch zu identischen phänotypischen Effekten und hatte die gleiche Reduktion der Expression zur Folge wie die Verfütterung von längerer dsRNA (Wang et al., 2015). Da der genaue Mechanismus der Aufnahme von dsRNA in Insekten nicht bekannt ist und neben den SID-Proteinen in einigen Arten auch Endocytose beteiligt zu sein scheint, könnte dies diese verschiedenen Ergebnisse erklären.

#### 1.2.3.4 Weitere Applikationsarten

Neben dem Verfüttern und der Injektion von dsRNA gab es auch Versuche, in denen die Aufnahme von dsRNA über die Haut gezeigt wurden. Hierzu wurden von Wang et al. (2011) frisch geschlüpfte Raupen von *Ostrinia furnacalis* (Pyralidae) mit einer dsRNA-Lösung (50 ng/ $\mu$ l) besprüht. Über fluoreszenzmarkierte dsRNA wurde gezeigt, dass diese über die Epidermis in die Hämolymphe der Raupen aufgenommen wurde. Es kam zu einer erhöhten Mortalität im Vergleich zum Besprühen mit dsRNA des *yellow fluorescent protein* (YFP). Auch die Expression der entsprechenden Gene war reduziert, jedoch korrelierte diese nicht immer mit der Mortalität, was auf unspezifische Effekte der dsRNA schließen lässt (Wang et al., 2011). In einem weiteren Experiment wurden Raupen des ersten Larvenstadiums von *O. furnacalis* und *H. armigera* (Noctuidae) mit dsRNA-Lösung (50 ng/ $\mu$ l) besprüht. Diese war komplementär zu der Gensequenz verschiedener Domänen eines Proteins aus *O. furnacalis*. Alle dsRNAs führten in *O. furnacalis* zu systemischer RNAi. Eine der dsRNAs bewirkte auch in der nur entfernt verwandten Art *H. armigera* eine erhöhte Mortalität. Dies wurde auf die relativ ähnliche Sequenz eines VHDL-Rezeptor-Gens zurückgeführt, dessen Expression auch reduziert war. Ebenso wie in der ersten Studie von Wang et al. (2011) waren jedoch unspezifische Effekte beteiligt (Zhang et al., 2015a). Diese Versuche sind ein weiteres Beispiel für systemische RNAi in Lepidoptera trotz der Abwesenheit von RdRP. Offensichtlich gibt es zumindest in einigen Arten einen anderen Mechanismus der Vervielfältigung des RNAi-Signals.

#### 1.2.3.5 Zielgene

Während Terenius et al. (2011) ein besonders gutes Ansprechen von Genen des Immunsystems in der RNAi beobachteten, kann diese Tendenz bei den neueren Publikationen nicht bestätigt werden. Nur in einem kleinen Teil der Artikel waren die untersuchten Gene am Immunsystem beteiligt (Oda et al., 2010; Wang et al., 2012b,a; Di Lelio et al., 2014; Han et al., 2014; Qiao et al., 2014; Li et al., 2015c; Liu et al., 2015; Xu et al., 2015). Am häufigsten wurden Gene mit Beteiligung an Vorgängen in der Häutung und Metamorphose (Yao et al., 2010; Zhang et al., 2012; Camargo et al., 2015; Cao et al., 2015; Bao et al., 2016; Reddy et al., 2016; Wu et al., 2016; Cao et al., 2017; Chaitanya et al., 2017; Ganbaatar et al., 2017), sowie der Fortpflanzung der Lepidoptera-Arten untersucht (Choi et al., 2012; Du et al., 2012; Hanin et al., 2012; Dong et al., 2013; Li et al., 2014; Zhang et al., 2014; Lu et al., 2015; Zhang et al., 2015a, 2016; Dong et al., 2017; Maligeppagol et al., 2017). Auch Gene für Stoffwechsellzyme mit einer Rolle in der Entgiftung, wie Glutathion-S-Transferase (Shabab et al., 2014; Li et al., 2015b) und Cytochrom