



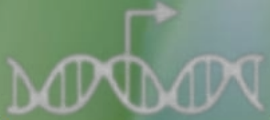
PLANT RNA BIOTECHNOLOGY

Biointelligente RNA-basierte Pflanzenschutzmittel für
einen nachhaltigen und umweltschonenden Obstbau



PLANT RNA BIOTECHNOLOGY

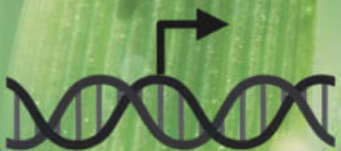
GENE
SILENCING



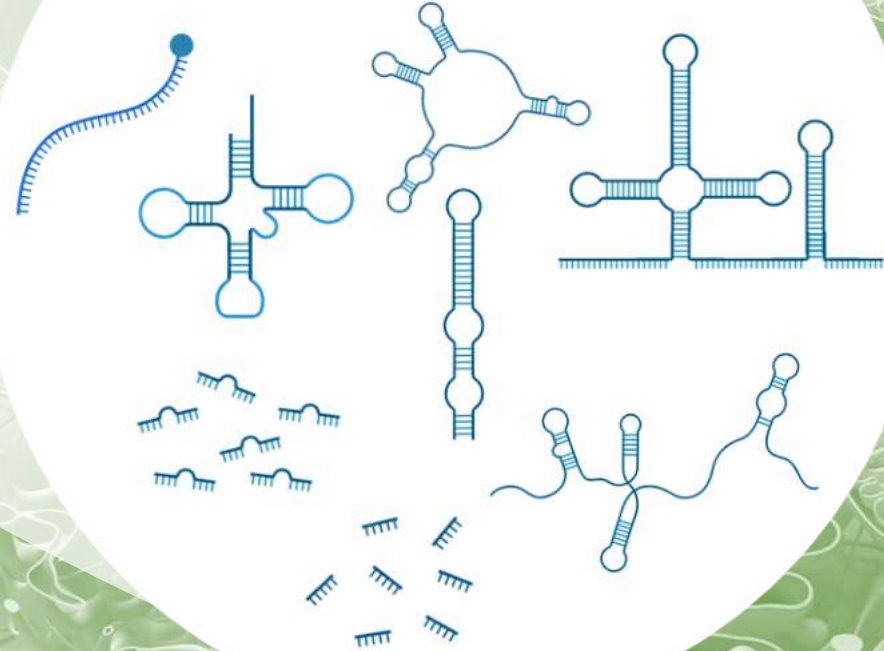
GENE
EDITING



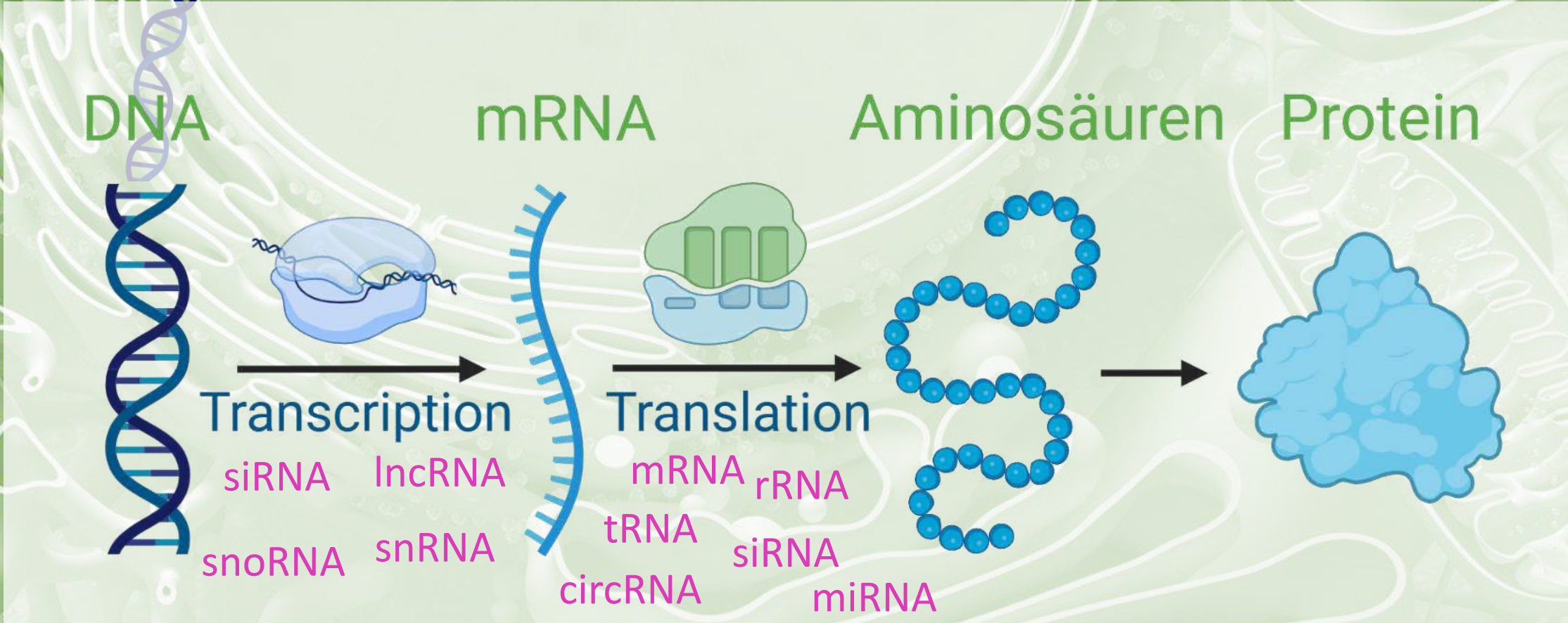
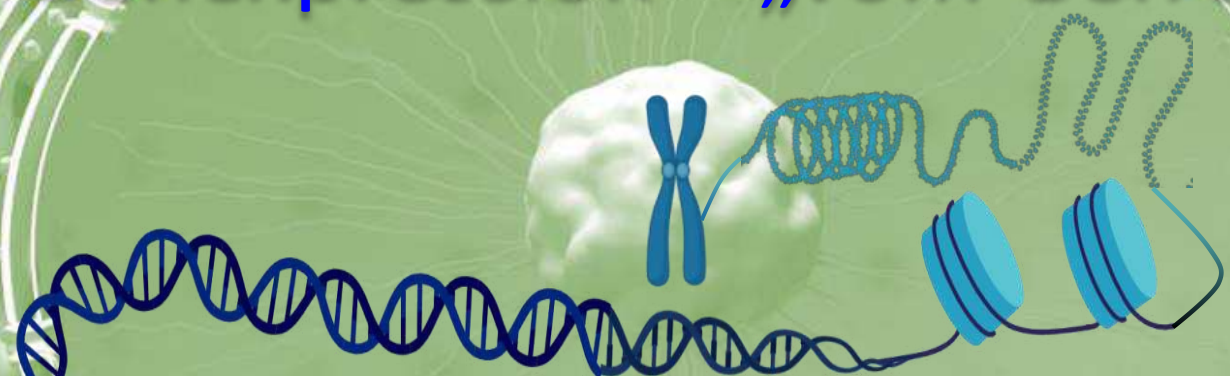
GENE
EXPRESSION



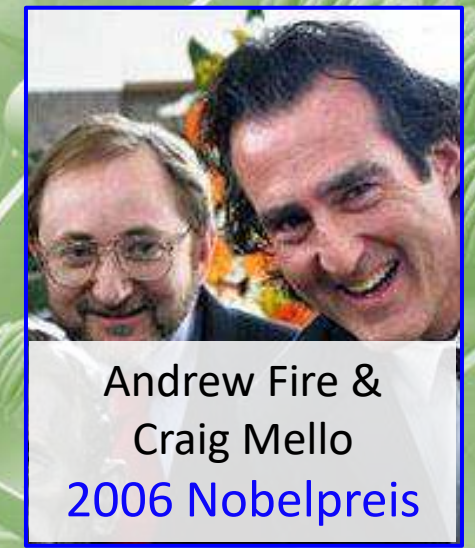
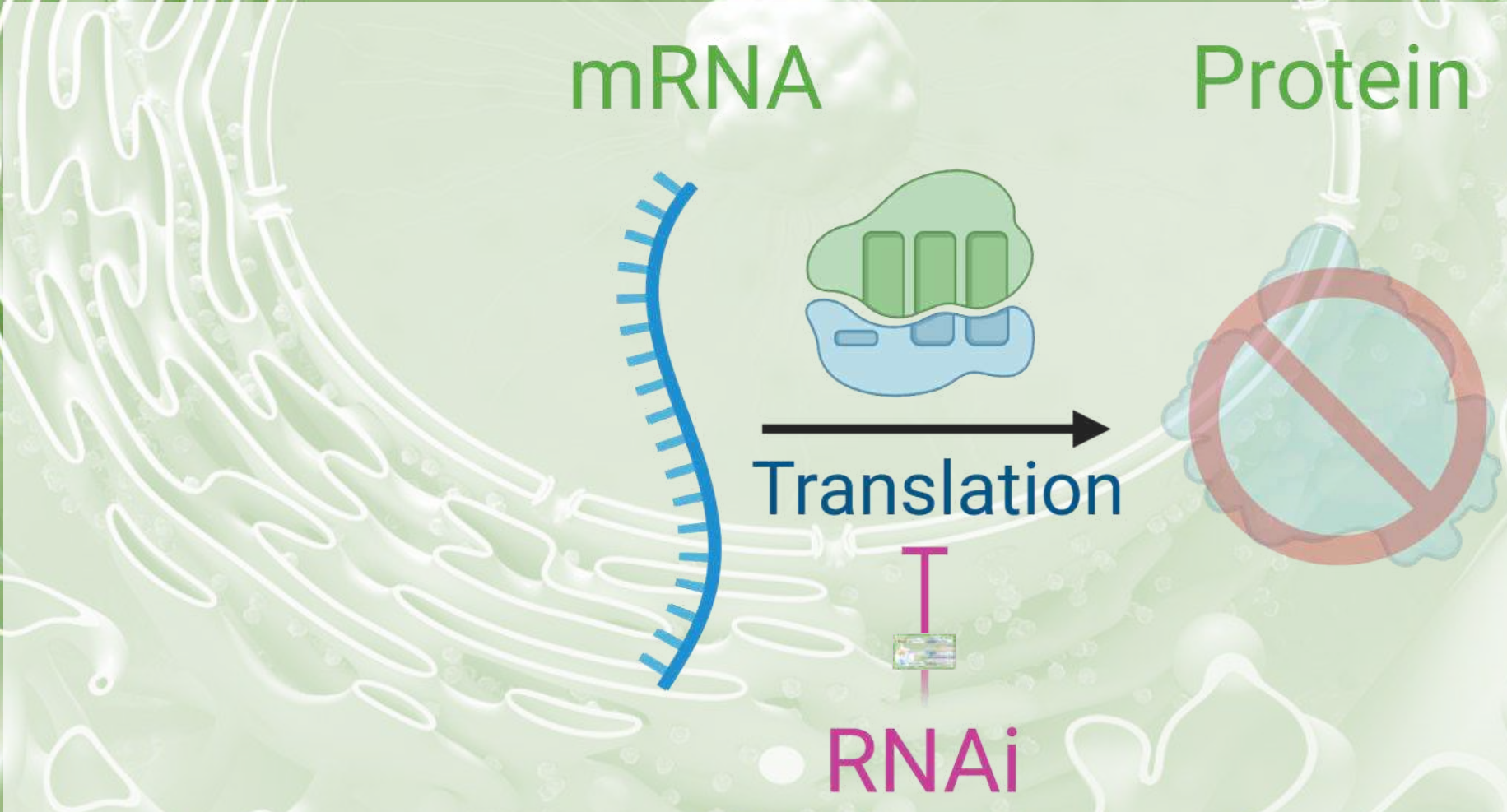
Kodierende und
nicht-kodierende
regulatorische RNAs



Genexpression – „vom Gen zum Protein“



RNA-Interferenz-vermittelte Genregulation



Lumasiran (Oxlumo[®], 2020)

Patisiran (Onpattro[®], 2018; Verlängerung: 2023)

Givosiran (Givlaari[®], 2020)

Inclisiran (Leqvio[®], 2020)

Vutrisiran (Amvuttra[®], 2022)

dsRNA



1

Bildung doppelsträngiger RNA (dsRNA)

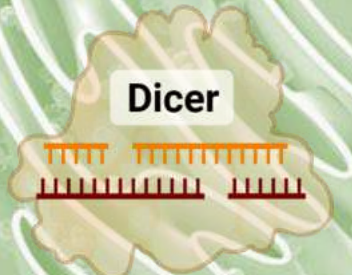
siRNA



4

RISC + siRNA binden komplementäre mRNA.

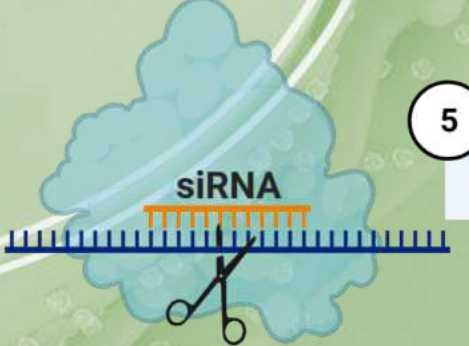
Dicer



2

dsRNA wird von Dicer gebunden und geschnitten

siRNA



5

mRNA wird gespalten

RISC

siRNA



3

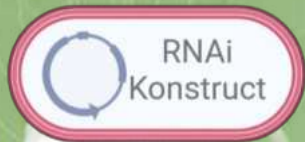
antisense Strang (siRNA) wird in den RISC Komplex inkorporiert

6

gespaltene mRNA wird in der Zelle abgebaut



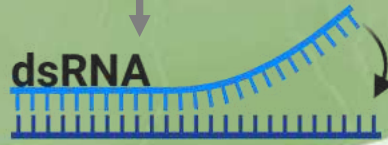
1 Transformation mit RNAi Konstrukt



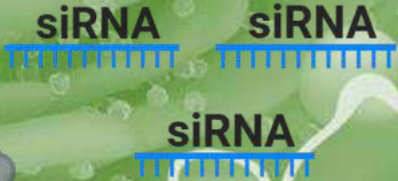
2 Integration Fremd-DNA in genomische DNA der Wirtszelle



3 Transgen-vermittelte Expression und Bildung der dsRNA



4 Export der dsRNA in das Zytoplasma



5 dsRNA wird von Dicer gebunden und geschnitten



6 siRNA liegen in der Wirtszelle vor (ohne Ziel-mRNA)

1

Transformations-
Konstrukt

Host-induced gene silencing (HIGS)

RNAi
Konstrukt

2

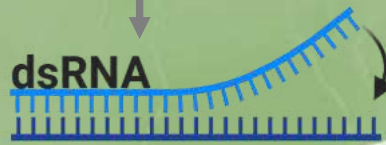
Integration Fremd-DNA in
genomische DNA der Wirtszelle



3

Transgen-vermittelte Expression
und Bildung der dsRNA

dsRNA



4

Export der dsRNA in das
Zytoplasma

siRNA

siRNA

siRNA



5

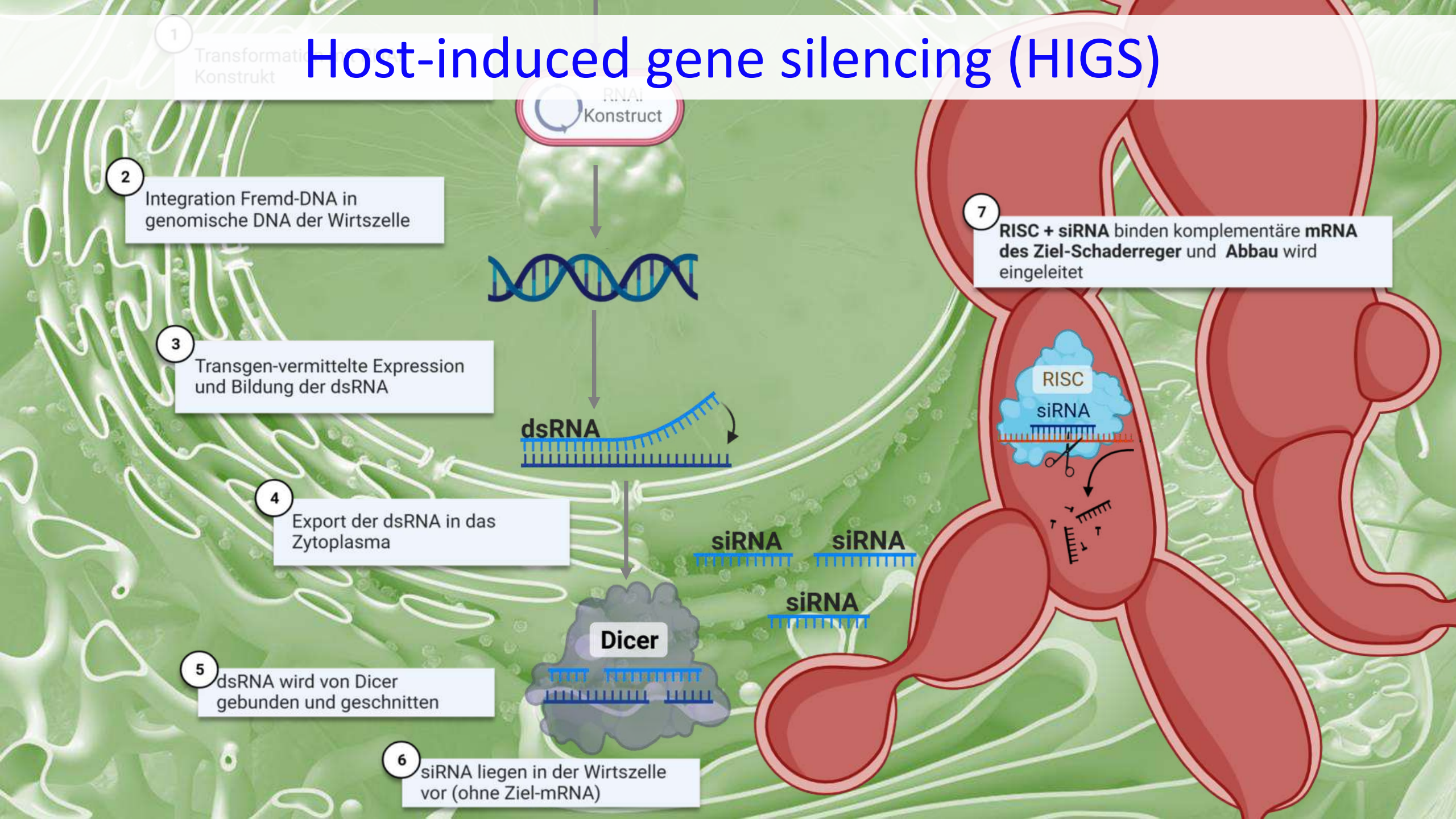
dsRNA wird von Dicer
gebunden und geschnitten

6

siRNA liegen in der Wirtszelle
vor (ohne Ziel-mRNA)

7

RISC + siRNA binden komplementäre mRNA
des Ziel-Schaderreger und **Abbau** wird
eingeleitet



Host-induced gene silencing (HIGS)

Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species

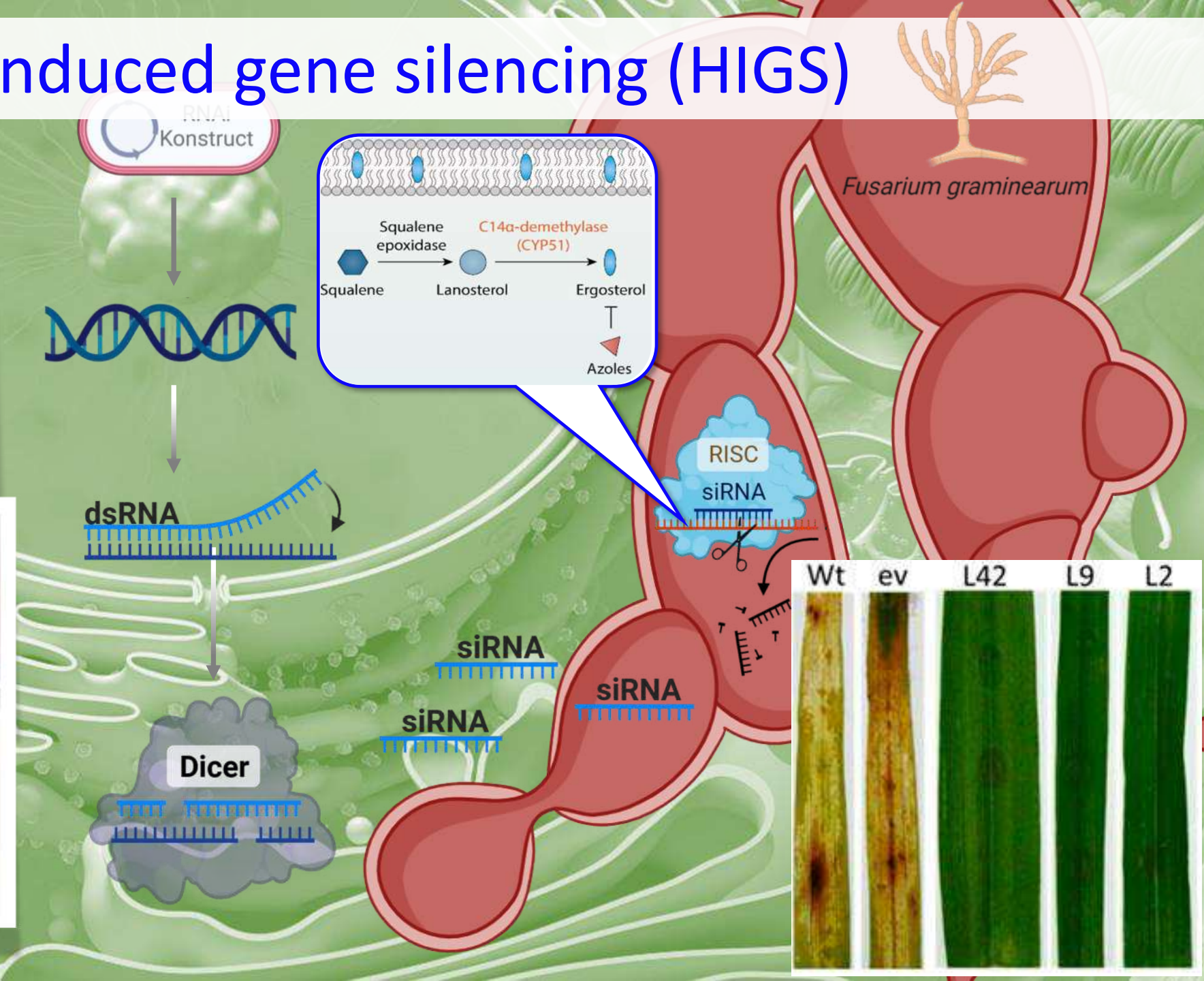
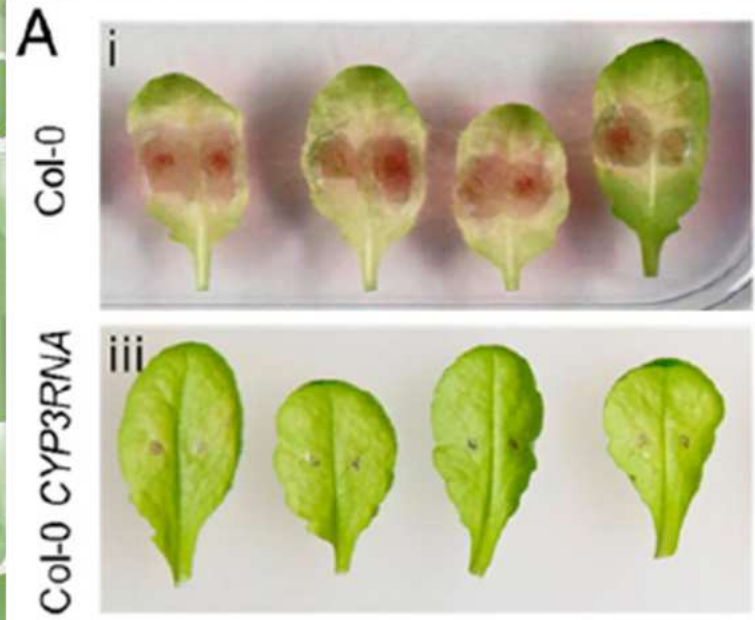
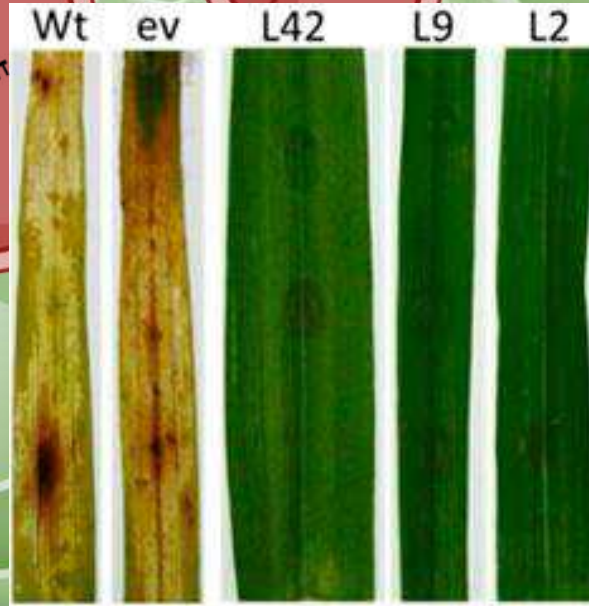
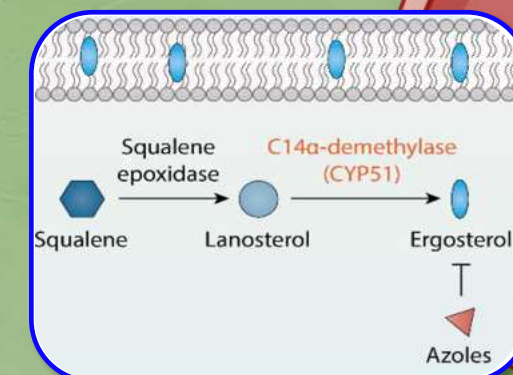
Aline Koch¹, Neelendra Kumar², Lennart Weber³, Harald Keller⁴, Jafargholi Imani⁵, and Karl-Heinz Kogel^{1*}

¹Institute for Phytopathology and Applied Zoology and ²Institute for Microbiology and Molecular Biology, Centre for Bio Systems, Land Use, and Nutrition, Justus Liebig University, D-35392 Giessen, Germany; and ³Institut Sophia Agrobiotech, Unité Mixte de Recherche 1305 Institut National de la Recherche Agronomique Centre National de la Recherche Scientifique, Université Nice-Sophia Antipolis, 06001 Sophia Antipolis, France

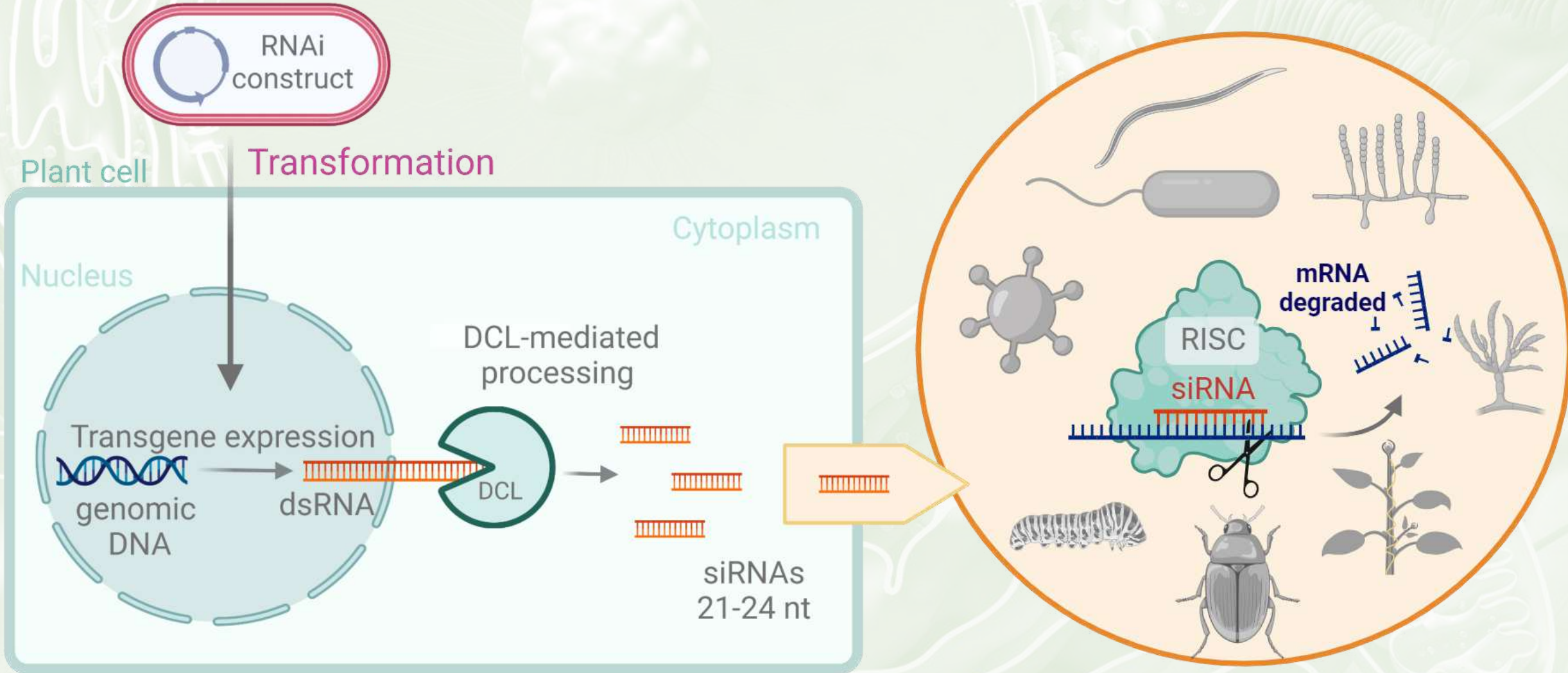
Edited by Dier van Wieringen, Washington State University, Pullman, WA, and approved October 11, 2013 (received for review April 5, 2013)

Head blight, which is caused by mycotoxin-producing fungi of the genus *Fusarium*, is an economically important crop disease. We assessed the potential of host-induced gene silencing targeting the fungal cytochrome P450 lanosterol C-14 α -demethylase (CYP51) genes, which are essential for ergosterol biosynthesis, to restrict fungal infections. In axenic cultures of *Fusarium graminearum*, *in vitro* feeding of CYP3RNA, a 791-nt double-stranded (ds)RNA complementary to CYP51A, CYP51B, and CYP51C, resulted in growth inhibition [half-maximum growth inhibition (IC₅₀) = 1.2 nM] as well as altered fungal morphology, similar to that observed after treatment with theazole fungicide tebuconazole, for which the CYP51 enzyme is a target. Expression of the same dsRNA in *Arabidopsis*

their discovery in the 1970s. Therefore, it is hardly surprising that reduced sensitivity, or even resistance to DMI fungicides, has begun to develop in many plant pathogenic fungi (8–14). The emergence of DMI-resistant *Fg* isolates over the last few years (15) further underscores the need for alternative control strategies. RNA interference (RNAi) has emerged as a powerful genetic tool that has both accelerated research in plant biotechnology and facilitated the validation of potentially useful agronomical traits. RNAi is known as a conserved integral part of the gene-regulatory processes present in all eukaryotes (16, 17); in plants, it is also named posttranscriptional gene silencing (18). Posttranscriptional gene silencing starts with the initial processing



Host-induced gene silencing (HIGS)



u.a. Nowara et al. 2010, *Plant Cell*; Koch et al. 2013, *PNAS*; Koch & Wassenecker 2021, *New Phytol.*

GVO-RNAi Mais



SmartStax[®] PRO

With **RNAi** TECHNOLOGY

Plant cell

Transformation

Cytoplasm

Nucleus

DCL-mediated processing

siRNAs
21-24 nt





Spray-induced gene silencing (SIGS)



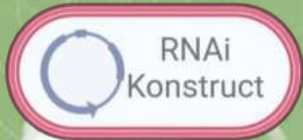
- übertragbar
- einfacher
- schneller
- adaptiv
- günstiger

Gewebekultur
GV-Pflanzen



- Limitiert
- Kompliziert
- Langwierig
- Teuer

1 Transformation mit RNAi Konstrukt



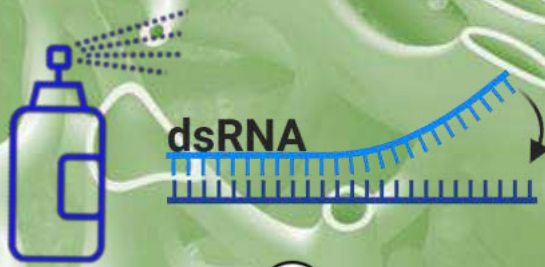
2 Integration Fremd-DNA in genomische DNA der Wirtszelle



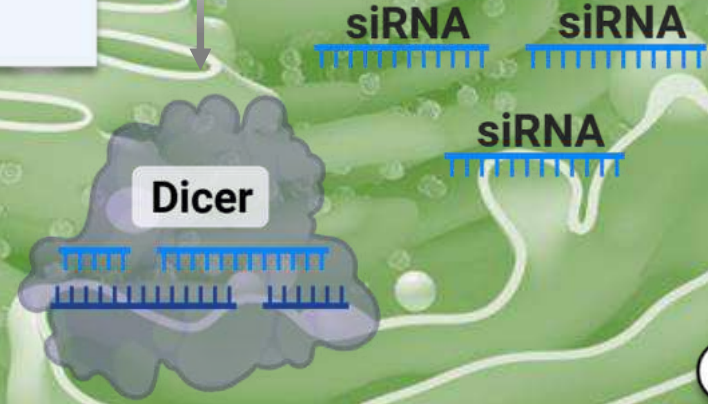
3 Transgen-vermittelte Expression und Bildung der dsRNA



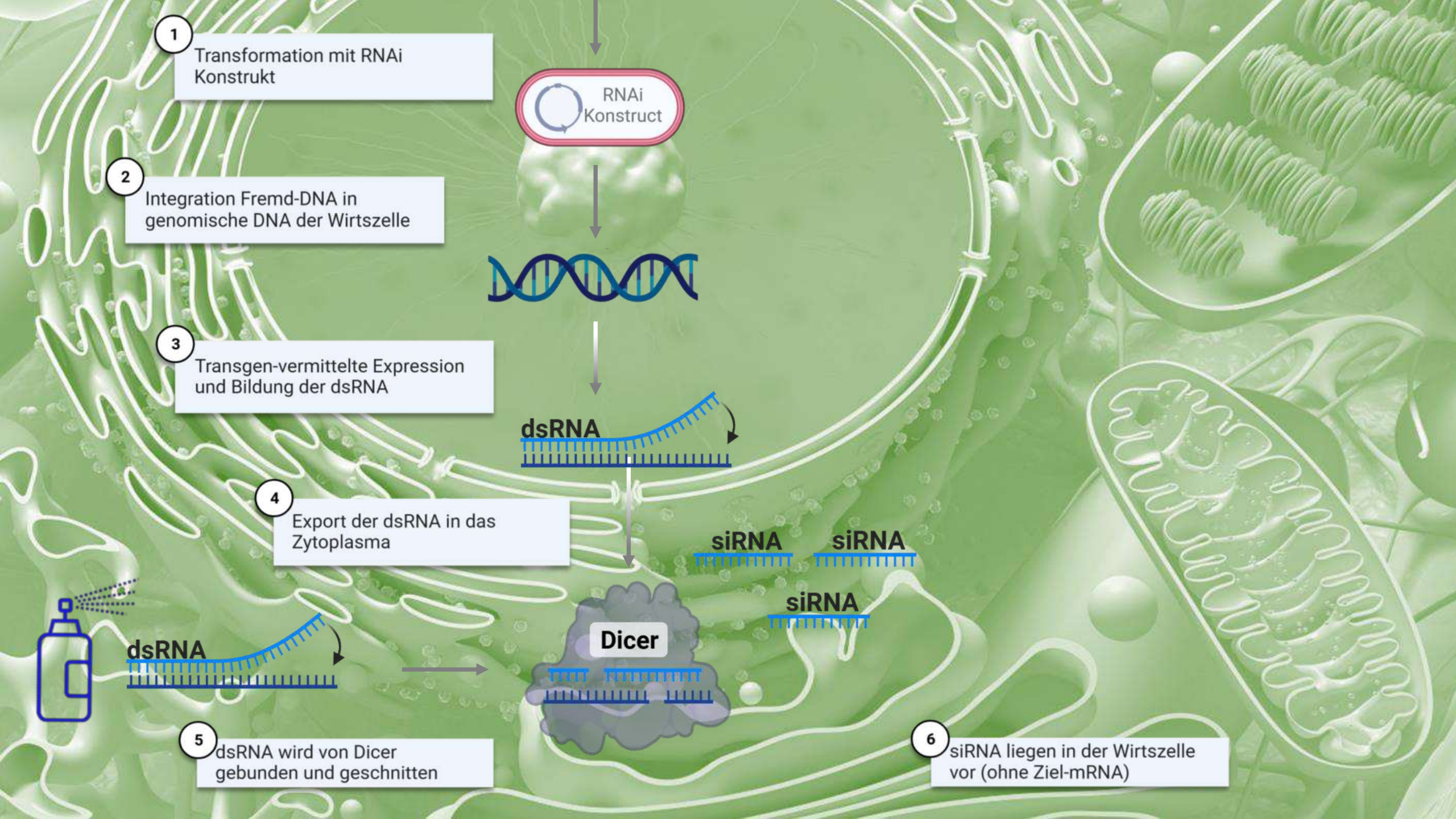
4 Export der dsRNA in das Zytoplasma



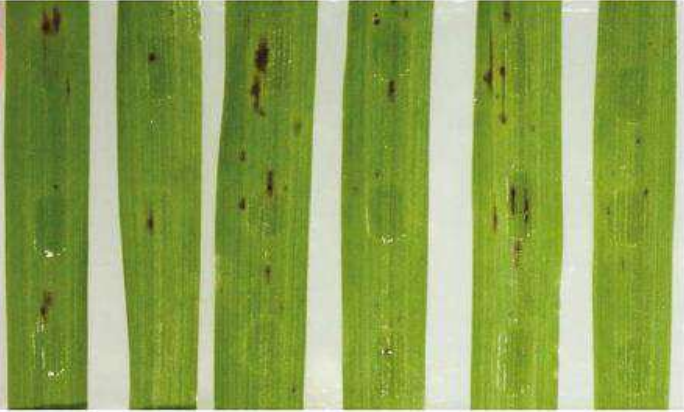
5 dsRNA wird von Dicer gebunden und geschnitten



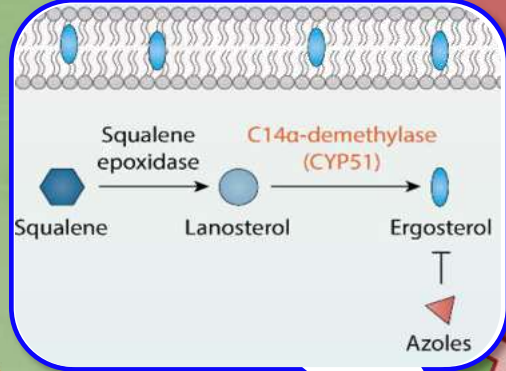
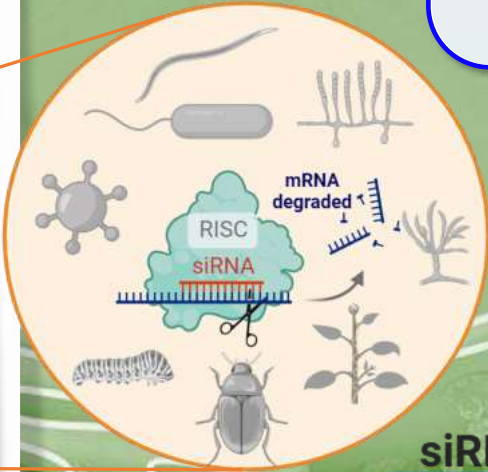
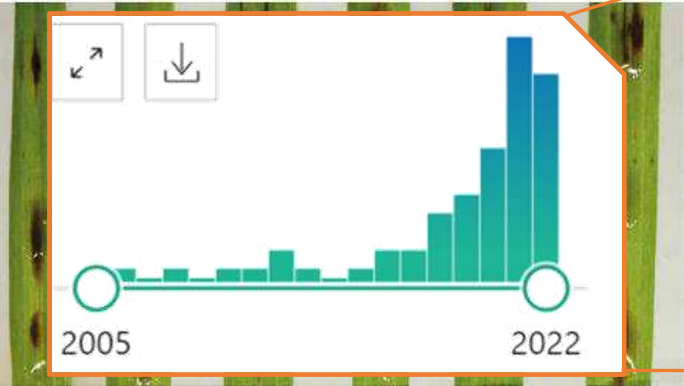
6 siRNA liegen in der Wirtszelle vor (ohne Ziel-mRNA)



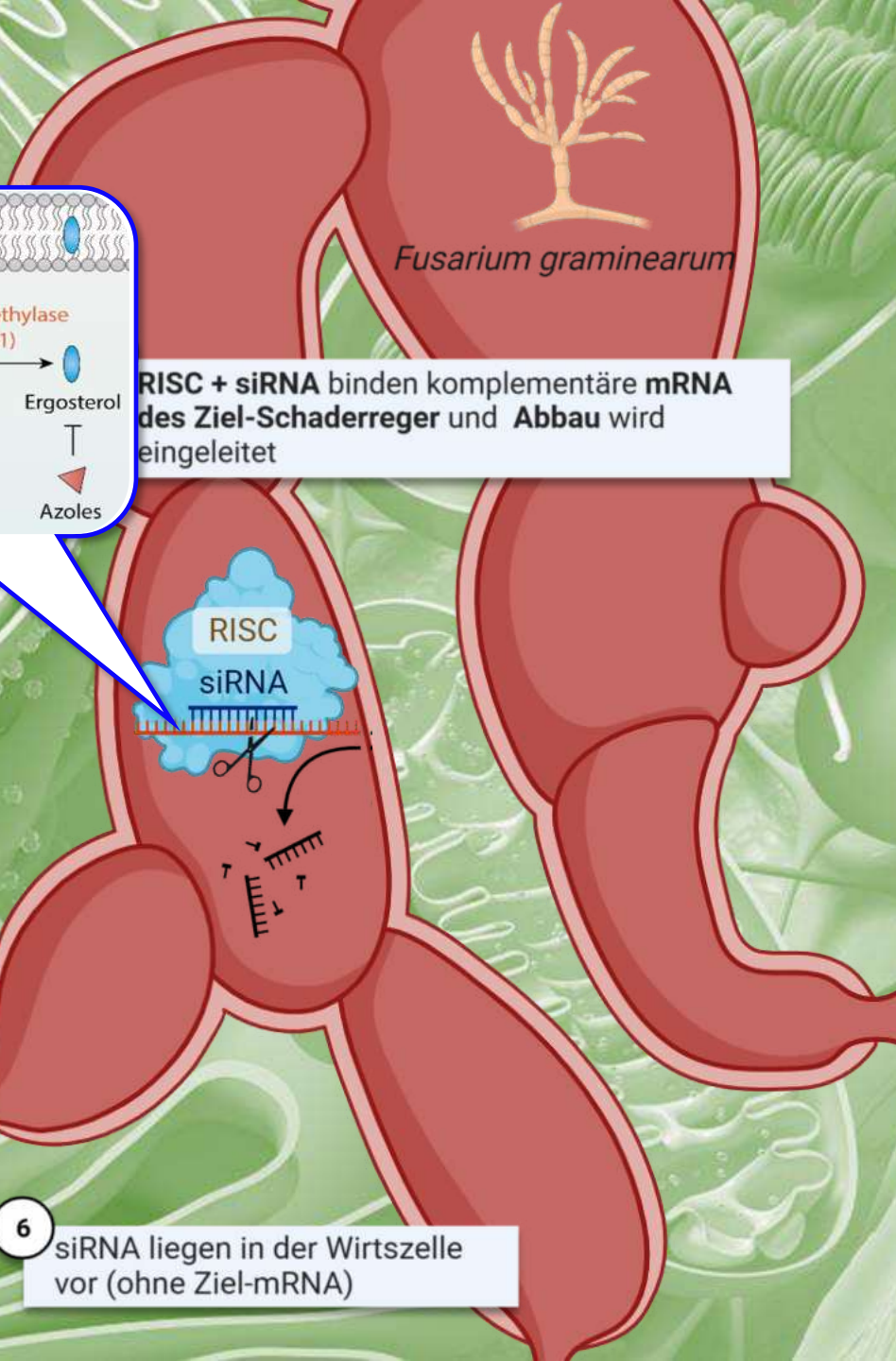
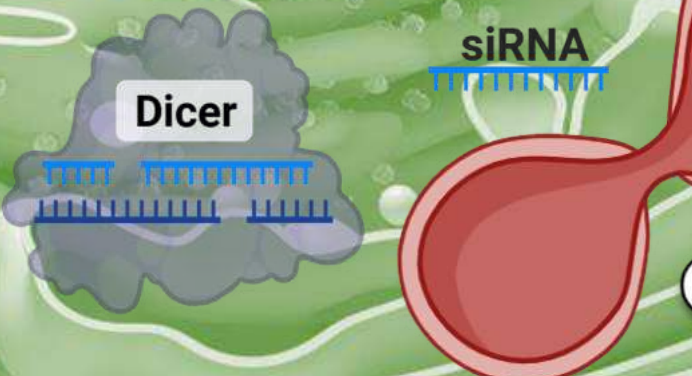
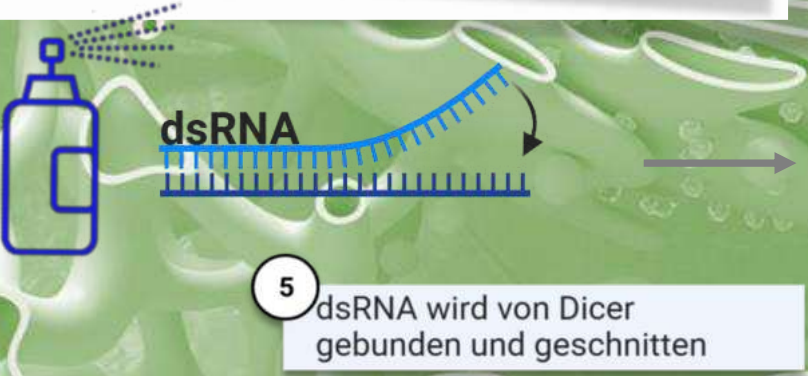
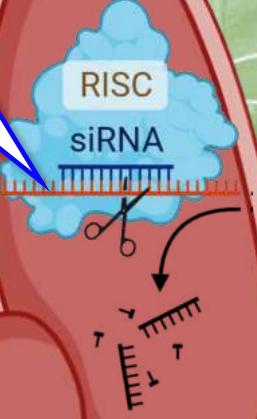
A CYP3-dsRNA



TE



RISC + siRNA binden komplementäre mRNA des Ziel-Schaderreger und Abbau wird eingeleitet



GreenLight Produkt Calantha™ gegen Kartoffelkäfer

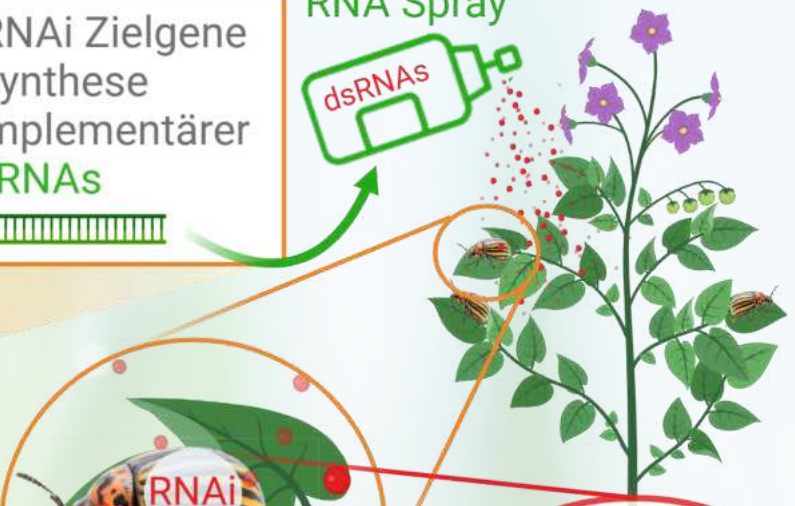


Potatoes protected in field trials



Auswahl RNAi Zielgene und Synthese mRNA-komplementärer dsRNAs

RNA Spray



PFANZENSCUTZ | 23

RNA-Wirkstoffe gegen den Kartoffelkäfer sind vielversprechend

Das RNAi-Verfahren ist eine relativ neue Technologie zur Bekämpfung des Kartoffelkäfers. Die RNA-Wirkstoffe werden so ausgebracht und konzipiert, dass sie ausschließlich an die mRNA des Schädigers binden und dadurch die Synthese des entsprechenden Proteins verhindern. Erste Praxisversuche in den USA im Freiland zeigen eine gute Wirkung gegen Kartoffelkäfer, weil neben den Larven auch adulte Käfer damit kontrolliert werden können. Allerdings ist die Zulassungssage in Deutschland noch nicht geklärt.

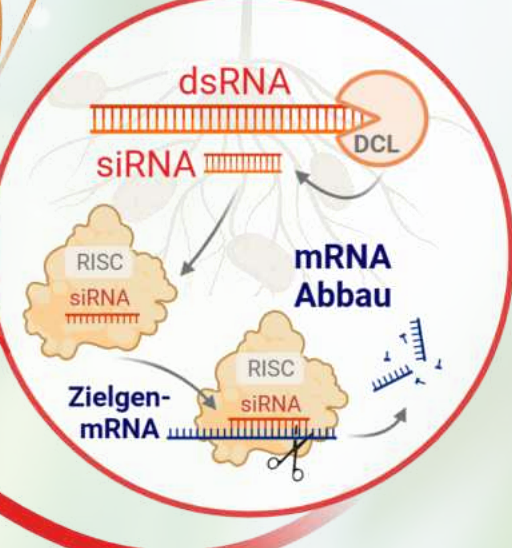
Prof. Dr. Alwin Koch, Universität Regensburg, Institut für Pflanzenwissenschaften

Unsere heutige Pflanzenproduktion hat eine enorme Steigerung des Ertrags erreicht, der Ertragsrückgang durch Krankheiten, Insektenbefall und Konkurrenz durch Unkräuter ist ein ernstes Problem. Alternative Pflanzenschutzmittel sind selten, wobei die Verwendung von Insektiziden mit steigender Resistenzentwicklung und geringem Wirkstoffverbrauch ein Problem darstellt. Eine vielversprechende Methode ist der Einsatz der RNA-Interferenz (RNAi)-Technologie. Diese ist ein natürlicher, selbstregulierender Prozess, bei dem kleine RNA-Moleküle, sogenannte siRNAs (small interfering RNAs), die Genexpression von Zielgenen in der Zelle hemmen. Dieser Prozess wurde erstmals im Herbst 1998

Das RNAi-Verfahren ist eine relativ neue Technologie zur Bekämpfung des Kartoffelkäfers. Die RNA-Wirkstoffe werden so ausgebracht und konzipiert, dass sie ausschließlich an die mRNA des Schädigers binden und dadurch die Synthese des entsprechenden Proteins verhindern. Erste Praxisversuche in den USA im Freiland zeigen eine gute Wirkung gegen Kartoffelkäfer, weil neben den Larven auch adulte Käfer damit kontrolliert werden können. Allerdings ist die Zulassungssage in Deutschland noch nicht geklärt.

Prof. Dr. Alwin Koch, Universität Regensburg, Institut für Pflanzenwissenschaften

Unsere heutige Pflanzenproduktion hat eine enorme Steigerung des Ertrags erreicht, der Ertragsrückgang durch Krankheiten, Insektenbefall und Konkurrenz durch Unkräuter ist ein ernstes Problem. Alternative Pflanzenschutzmittel sind selten, wobei die Verwendung von Insektiziden mit steigender Resistenzentwicklung und geringem Wirkstoffverbrauch ein Problem darstellt. Eine vielversprechende Methode ist der Einsatz der RNA-Interferenz (RNAi)-Technologie. Diese ist ein natürlicher, selbstregulierender Prozess, bei dem kleine RNA-Moleküle, sogenannte siRNAs (small interfering RNAs), die Genexpression von Zielgenen in der Zelle hemmen. Dieser Prozess wurde erstmals im Herbst 1998



Vom Laborversuch in die Anwendung



SELEKTIV

STABIL

SICHER

EFFEKTIV

ANWENDBAR

ÜBERTRAGBAR

Insekten sind eine Herausforderung



Vom Laborversuch in die Anwendung



SAFEbugBeads
RNA DELIVERY – MACROENCAPSULATION



ho[RtikulturNA]
RNA DELIVERY – MICROENCAPSULATION



RNA Delivery - Microverkapselung - ho[RtikulturNA]

Chitosan-basierte Mikrogel-Container & RNAi Technologie

RNA-Stabilität und Selektivität

DWI Leibniz-Institut
für Interaktive Materialien

Prof. Pich
Functional and Interactive Polymers



Prof. Petschenka
Applied Entomology

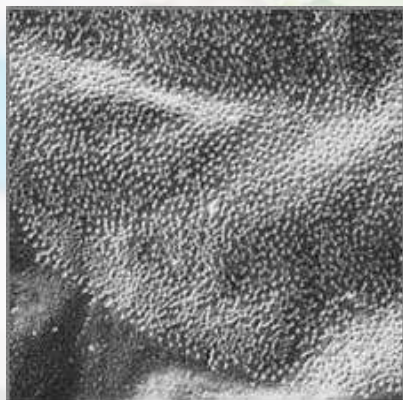
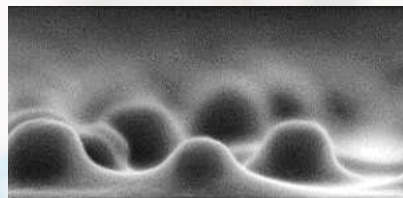
RWTHAACHEN
UNIVERSITY

Prof. Conrath
Biochemistry and Molecular Biology of Plants

Gefördert durch



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages



Meurer,..., Pich (2017), Angewandte Chemie



RNA Delivery - Microenverkapselung - ho[RtikulturNA]



Plutella xylostella
(Kohlschabe)

Spodoptera exigua
(Zuckerrübeneule)

Agrotis segetum
(Saateule)

Mamestra brassicae
(Kohleule)



- Speichel/Darm
- Nukleasen
- extrem alkalischer pH



Phaseolus vulgaris



Solanum lycopersicum



Solanum tuberosum



Brassica oleracea



RNA Delivery - Macroverkapselung - SAFEbugBeads



Bioökonomie
Baden-Württemberg

Baden-Württemberg
MINISTERIUM FÜR LÄNDLICHEN RAUM
UND VERBRAUCHERSCHUTZ



KATZ BIOTECH AG



UNIVERSITÄT
HOHENHEIM

Prof. Petschenka
Applied Entomology



Parthu
RNAi – Insects
SAFEbugBeads



RNA Delivery - Macroverkapselung - SAFEbugBeads

So wirkt die „RNA-Schluckimpfung“ gegen Schwanzen

55 Wissenschaftler*innen | Science Translational Medicine | 10.11.2016 | www.nature.com/scientifictranslationalmedicine

Das Wichtigste in Kürze

Die Schwanze ist ein gefährliches Insektenschädling, der in großen Mengen vorkommt. Die Wissenschaftler haben eine Methode entwickelt, um die Schwanze gegen die Wirkung von dsRNA zu immunisieren. Diese Methode ist für den Einsatz in der Landwirtschaft geeignet. Die Schwanze frisst die Blätter der Pflanzen und überträgt dabei die dsRNA auf die Pflanze. Die Pflanze ist dann immun gegen die Schwanze.

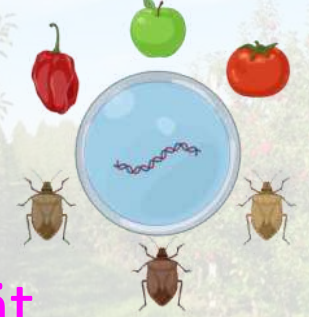
Die Forscher

Die Forscher haben eine Methode entwickelt, um die Schwanze gegen die Wirkung von dsRNA zu immunisieren. Diese Methode ist für den Einsatz in der Landwirtschaft geeignet. Die Schwanze frisst die Blätter der Pflanzen und überträgt dabei die dsRNA auf die Pflanze. Die Pflanze ist dann immun gegen die Schwanze.

Bioökonomie
Baden-Württemberg



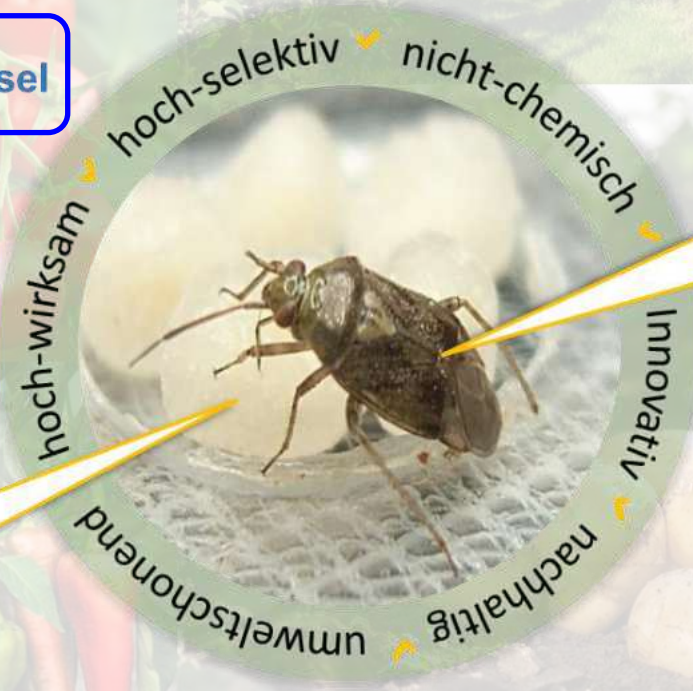
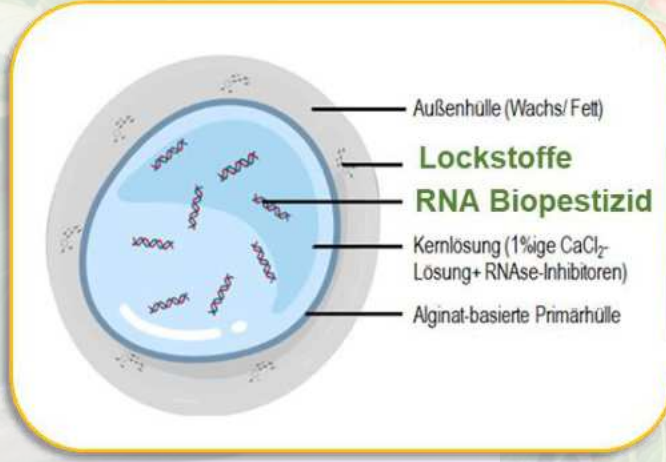
UNIVERSITÄT HOHENHEIM
Prof. Petschenka
Applied Entomology



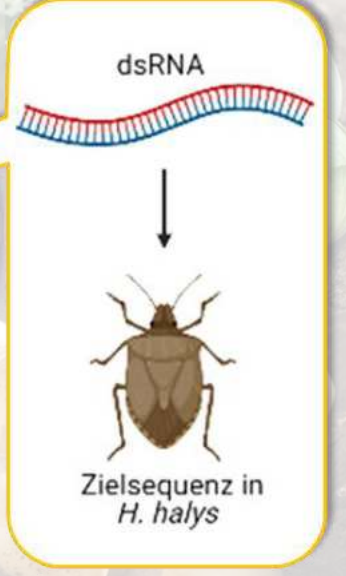
Parthu
RNAi – Insects
SAFEbugBeads

RNA Stabilität & Selektivität

Alginatbasierte 'Attract and Kill'-Kapsel

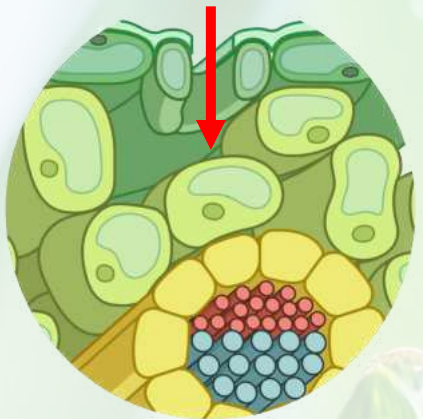


RNAi Wirkweise

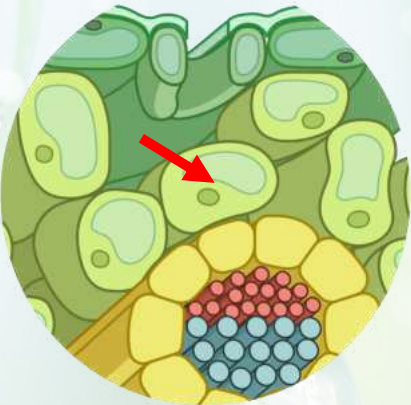


Grundlagenforschung zur RNA Aufnahme und Transport

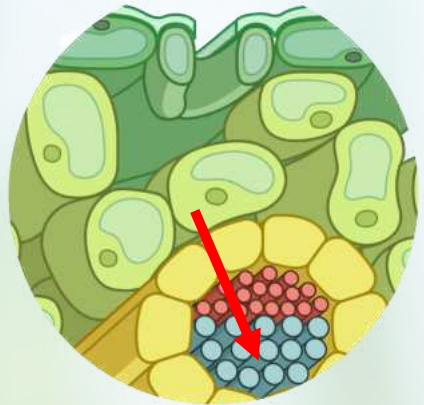
...in die Pflanze



...in die Zellen



...zwischen Zellen/Organismen





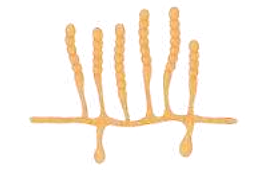
Oberflächenstabilität
Umweltfaktoren



Aufnahme **dsRNA** aus
dem Apoplast



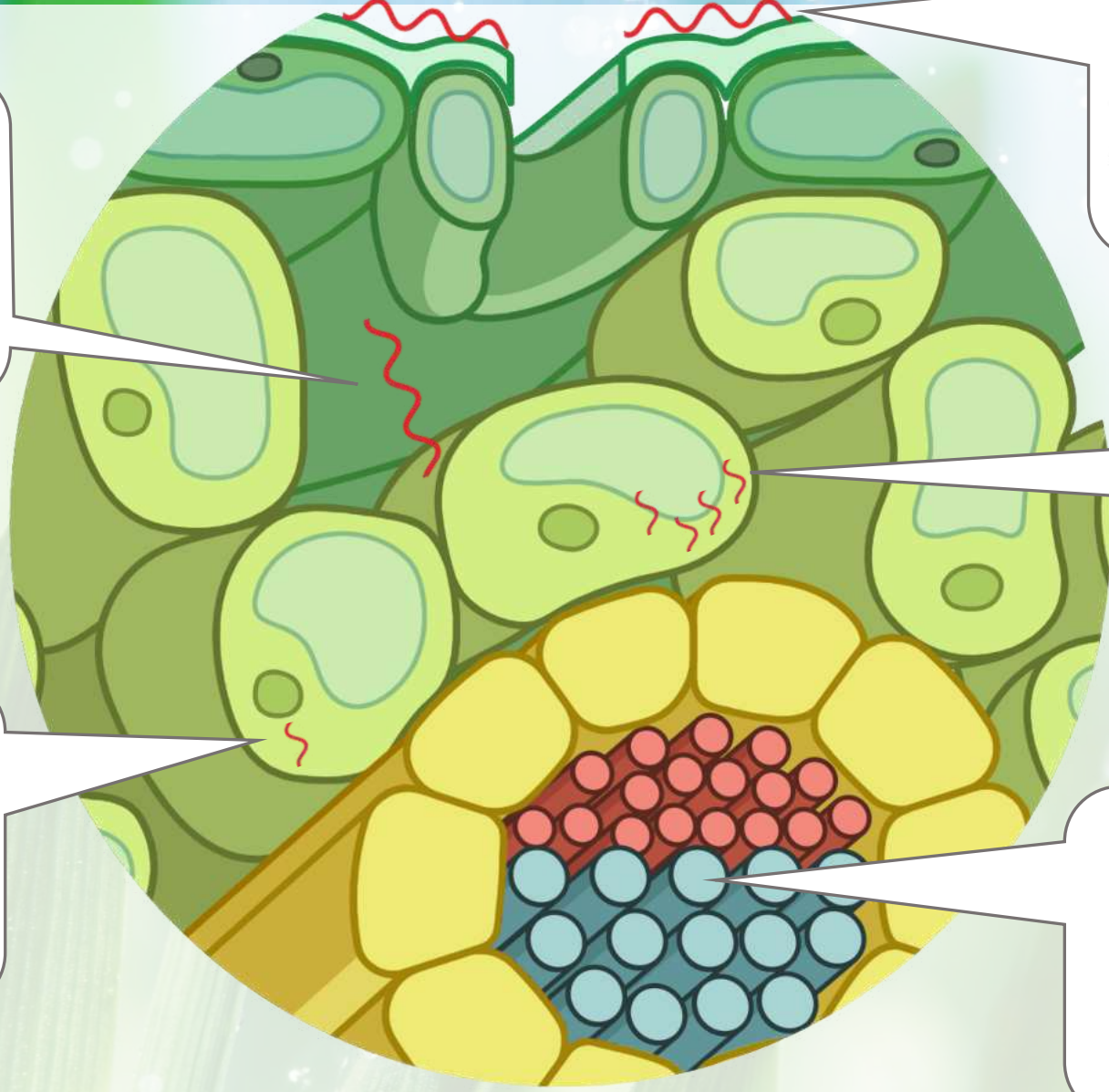
Aufnahme **siRNA** aus
der Zelle (Symplast)



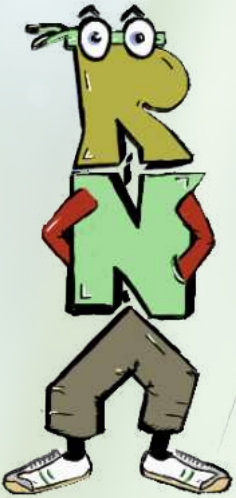
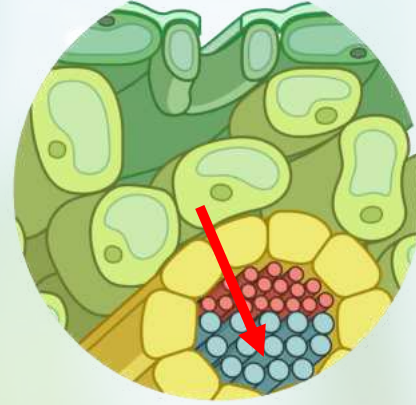
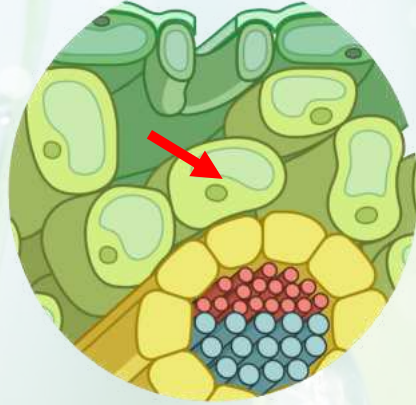
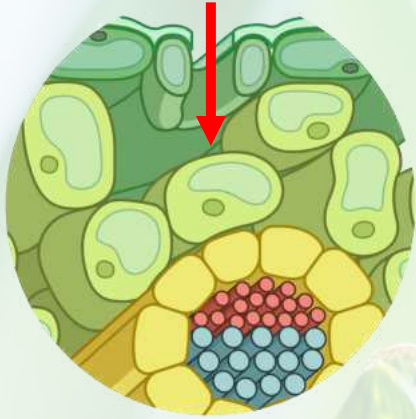
Zell-zu-Zell Transport



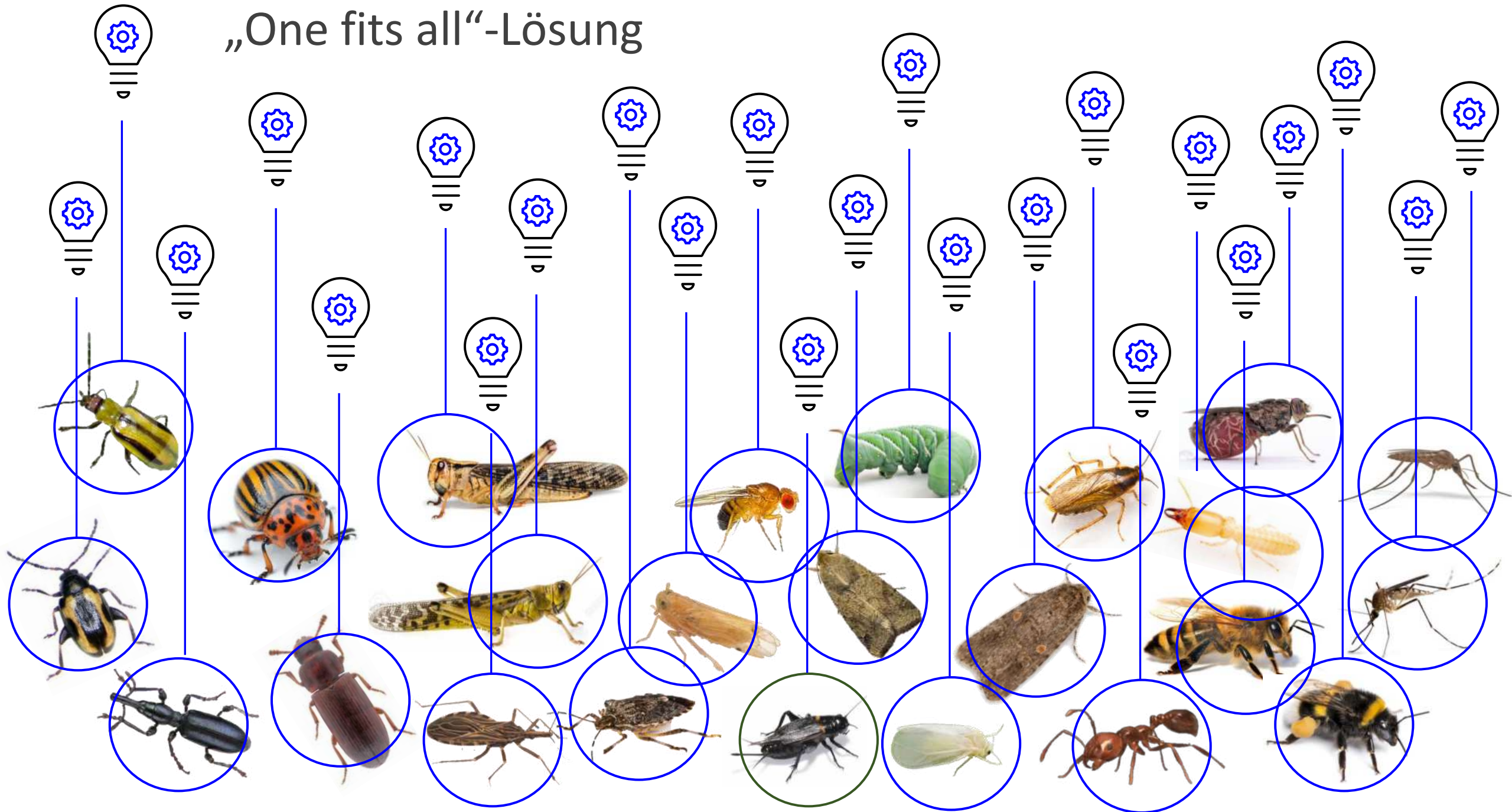
Phloem/Xylem-basierte
Schaderreger



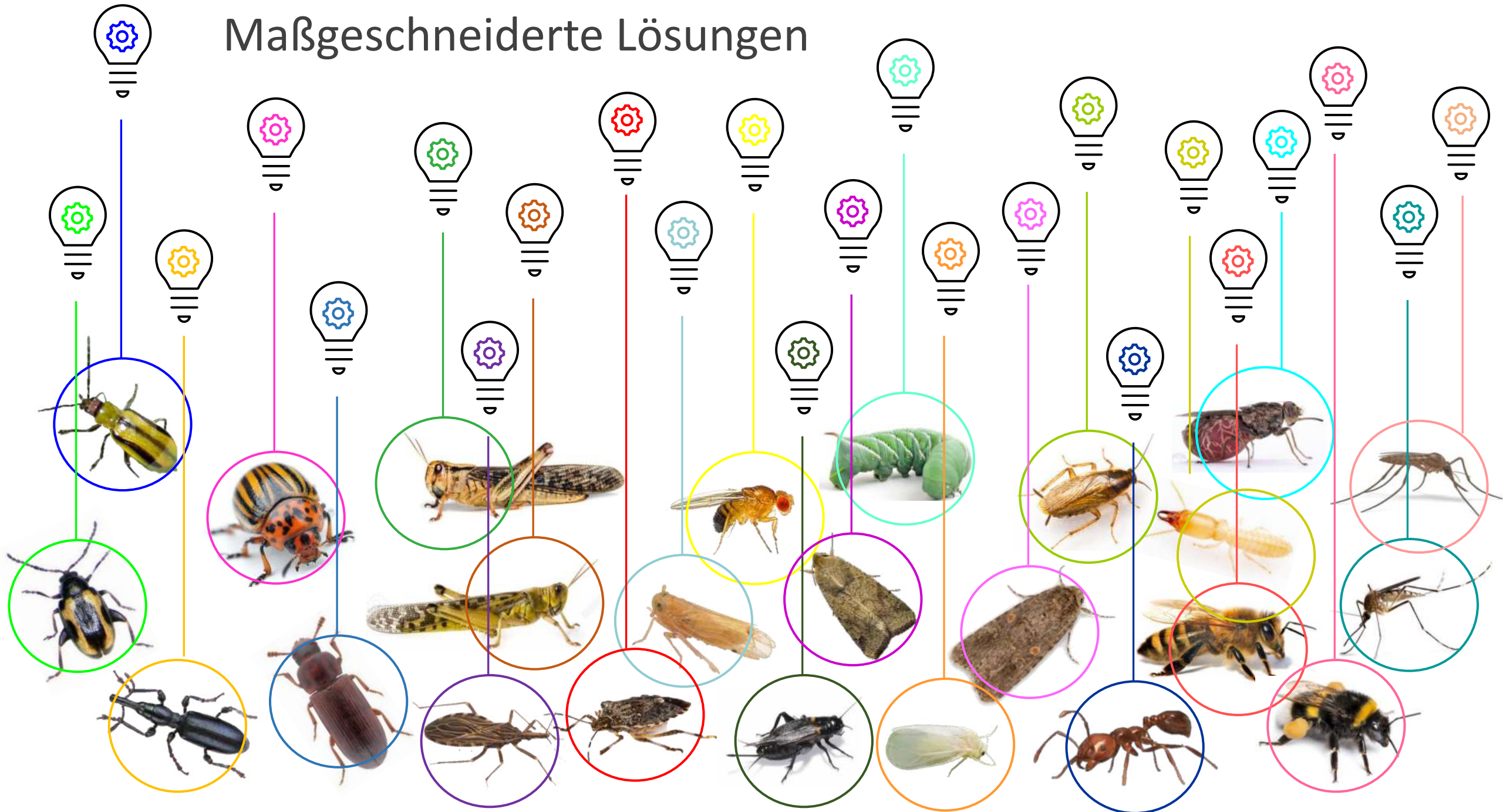
Wissensbasierte Lösungsansätze!



„One fits all“-Lösung



Maßgeschneiderte Lösungen





Vom Labor in die Anwendung

Labor- versus Freilandbedingungen (Stabilität)

Konservierte versus artspezifische Targets (Selektivität)

Modellpflanze versus Kulturpflanze (Übertragbarkeit)

Nano- versus biobasierte Formulierungen (Sicherheit)



BarEpiEdit



EXmRNA



SAFEbugBeads

PLANT RNA BIOTECHNOLOGY



ho[RtikulturNA]



BlOtrophRNA



caRNAapp