

## Studien zur Translationsinitiation der Polyproteine 1 und 2 des *Cherry leaf roll virus* (CLRV)

Breuhahn M, von Barga S, Langer L, Rott M, Büttner C

Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, D 14195 Berlin, Email: phytomedizin@agrار.hu-berlin.de

*Cherry-leaf roll virus* (CLRV), ein *Nepovirus* der Subgruppe C aus der Familie der *Secoviridae* (Sanfacon *et al.*, 2009) besitzt ein bipartites Genom. Das aus einzelsträngiger positiv orientierter RNA bestehende Genom kodiert für zwei Polyproteine (P1 und P2). Das Virus weist aufgrund seiner weltweiten Verbreitung an Obst- und Laubgehölzen eine Vielzahl von genetischen Polymorphismen auf. Sequenzvariabilitäten zeigen sich unter anderen in der 5' terminalen Region der viralen RNA. Einige CLRV Isolate besitzen nur ein Start-Codon, wohingegen andere über ein zweites ATG *in frame* verfügen, welches ebenfalls zur Translationsinitiation dienen könnte. Ziel der Studie war die Überprüfung welches Start-Codon zur Translation der Polyproteine von CLRV genutzt wird.

Die 5' terminalen Regionen der RNA1 und RNA2 von CLRV Isolaten zweier separater phylogenetischer Gruppen wurde amplifiziert, in pJet1.2 kloniert und durch Sequenzierung überprüft, bevor sie hinter den T7-Promoter in den Expressionsvektor pET28a(+)überführt wurden. Die pJet-Konstrukte dienten als Template, um Punktmutationen mittels *overlap extension* PCR (Heckman and Pease 2007) einzufügen, um das erste, das zweite oder aber beide Start-Codons zu eliminieren. Mutierte 5' terminale Fragmente wurden ebenfalls in pET28a(+) kloniert und sequenziert. Die Expression der Polypeptide von den Wildtyp- bzw. mutierten Konstrukten erfolgte *in vitro* mit Hilfe eines gekoppelten Transkriptions- und Translationsystems in Verbindung mit einer Biotinylierung. Markierte Polypeptide wurden anschließend durch SDS PAGE nach Größe aufgetrennt und mittels eines Streptavidin-Alkalische Phosphatase Konjugates im *Western blot* detektiert. Die Konstrukte für die vergleichende Analyse der Translationsinitiation der RNA1 und RNA2 der verschiedenen Isolate konnten erfolgreich hergestellt werden. Erste Ergebnisse zur Identifikation der Start-Codons, die zur Expression von P1 und P2 des CLRV dienen, werden vorgestellt.

Heckman KL, Pease LR, 2007. *Nature Protocols* 2, 924-932.