



# Untersuchung RNA2 kodierter Proteine (X3, X4, MP) des *Cherry leaf roll virus* (CLRV) und eines Nicht-Strukturproteins des *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV)

Demiral R, von Bargaen S, Roßbach J, Mühlbach H-P, 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@agrar.hu-berlin.de

## Einleitung

Sowohl das *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) als auch das *Cherry leaf roll virus* (CLRV) sind in Bäumen des öffentlichen Grüns und im Forst weit verbreitet (Büttner *et al.*, 2013). Beide Viren enthalten Genomregionen, die für Proteine mit unbekannter Funktion kodieren. Es handelt sich beim **EMARaV** um das von der **RNA4** kodierte **27 kDa Protein** (Abb. 2). Für das **RNA2** kodierte **P2 des CLRV** konnten mögliche Prozessierungs-Schnittstellen zwischen den putativen Proteinen X3 und X4, X4 und dem Transportprotein (*movement protein* MP, 41 kDa) festgestellt werden. Die Funktionen des N-terminalen **X3 Proteins** und des **X4 Proteins** sind noch unbekannt (Abb. 1). Zur Funktionsaufklärung der viralen Proteine können Lokalisationsstudien *in planta* beitragen.

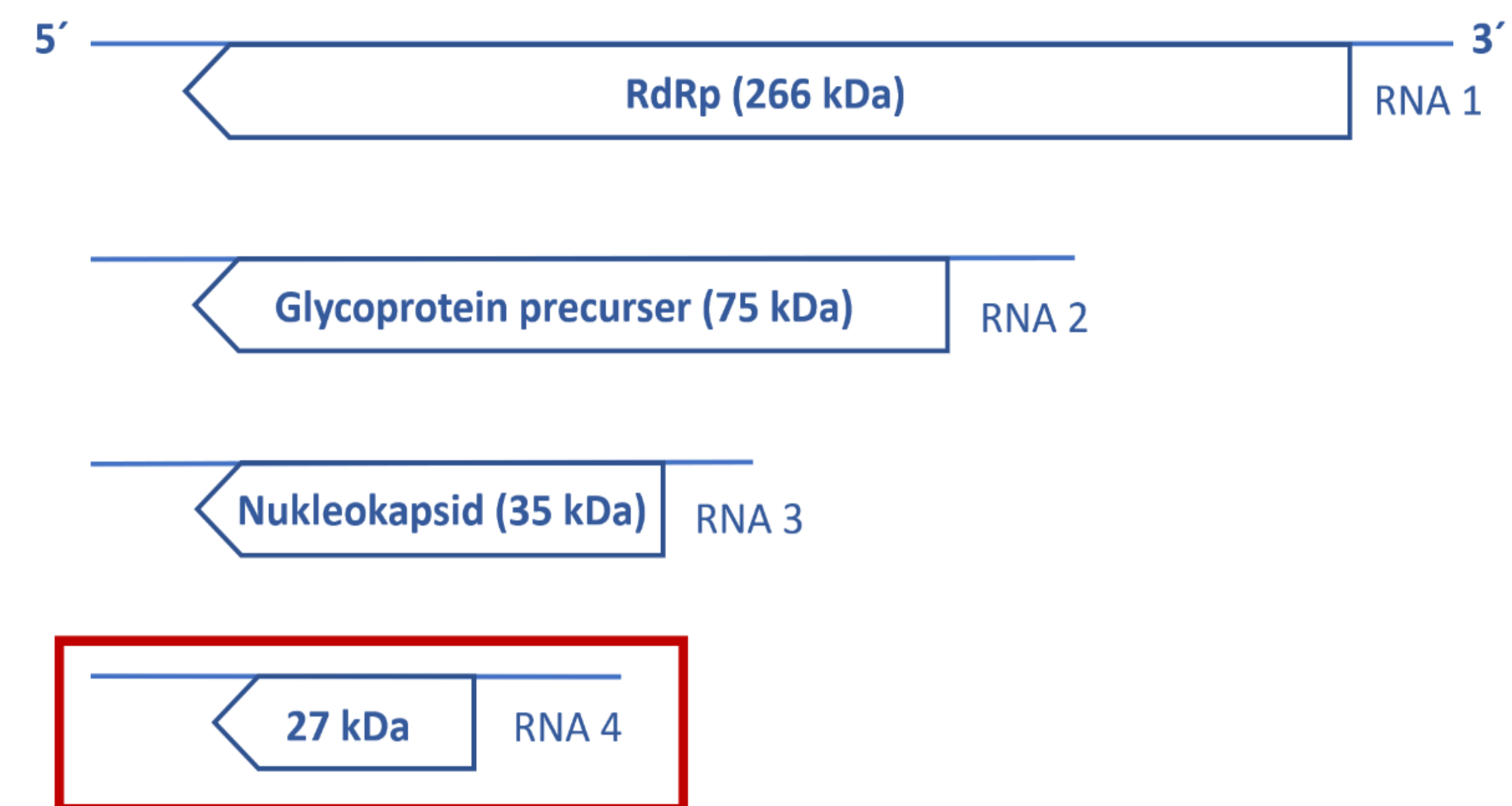


Abb. 2: Modifizierte schematische Darstellung der 4 RNAs des EMARaV unter Angabe der molekularen Masse der kodierten Proteine (nach Mielke und Mühlbach., 2007).

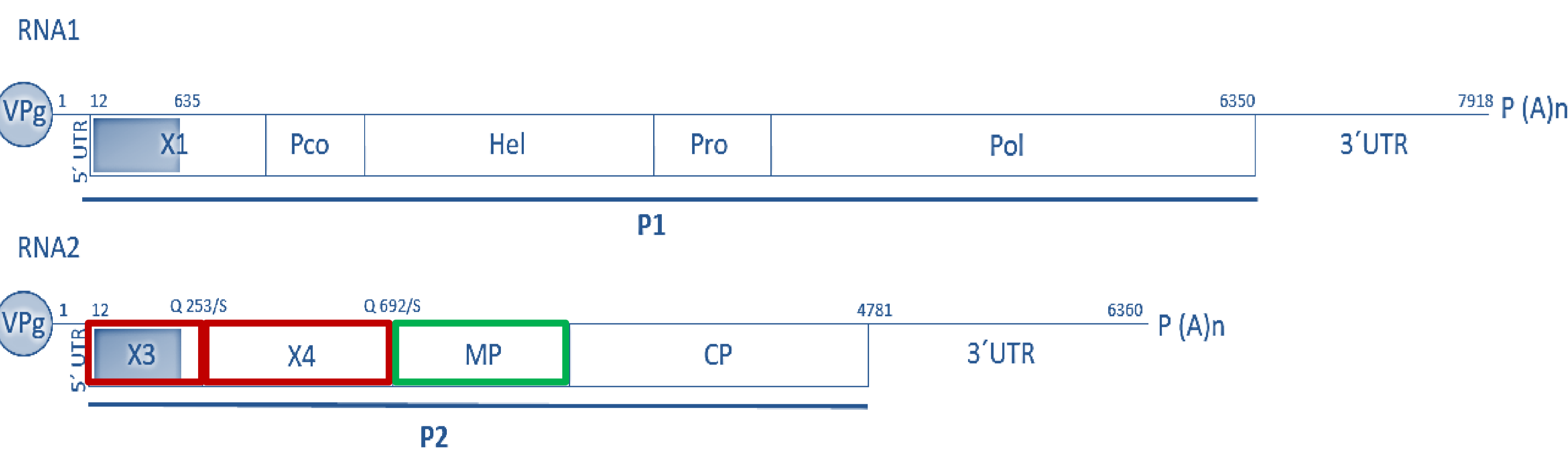


Abb. 1: Modifizierte schematische Darstellung der Genomorganisation der RNA1 und RNA2 des CLRV. Die ORFs der RNA2 kodierten Proteine sind mit Nummern und den Q/S Schnittstellen angegeben. Die fast identischen 653 nt der N-terminalen Bereiche werden durch eine blaue Markierung veranschaulicht (nach von Bargaen *et al.*, 2012).

## Material und Methoden

Für Lokalisationsstudien *in planta* wurden GFP-Fusionskonstrukte von CLRV -X3 und -MP und dem Fusionsprotein X3/X4 sowie dem 27 kDa- Protein des EMARaV hergestellt. Die Expression der Fusionskonstrukte in Blattmaterial Agrobakterien-infiltrierter *Nicotiana benthamiana* wurde mithilfe des Elektrolot-Immunoassay (EBIA) untersucht, indem sie mittels GFP-spezifischem monoklonalem Antikörper in pflanzlichen Gesamt-Proteinextrakten detektiert wurden (Abb. 3).

## Ergebnisse

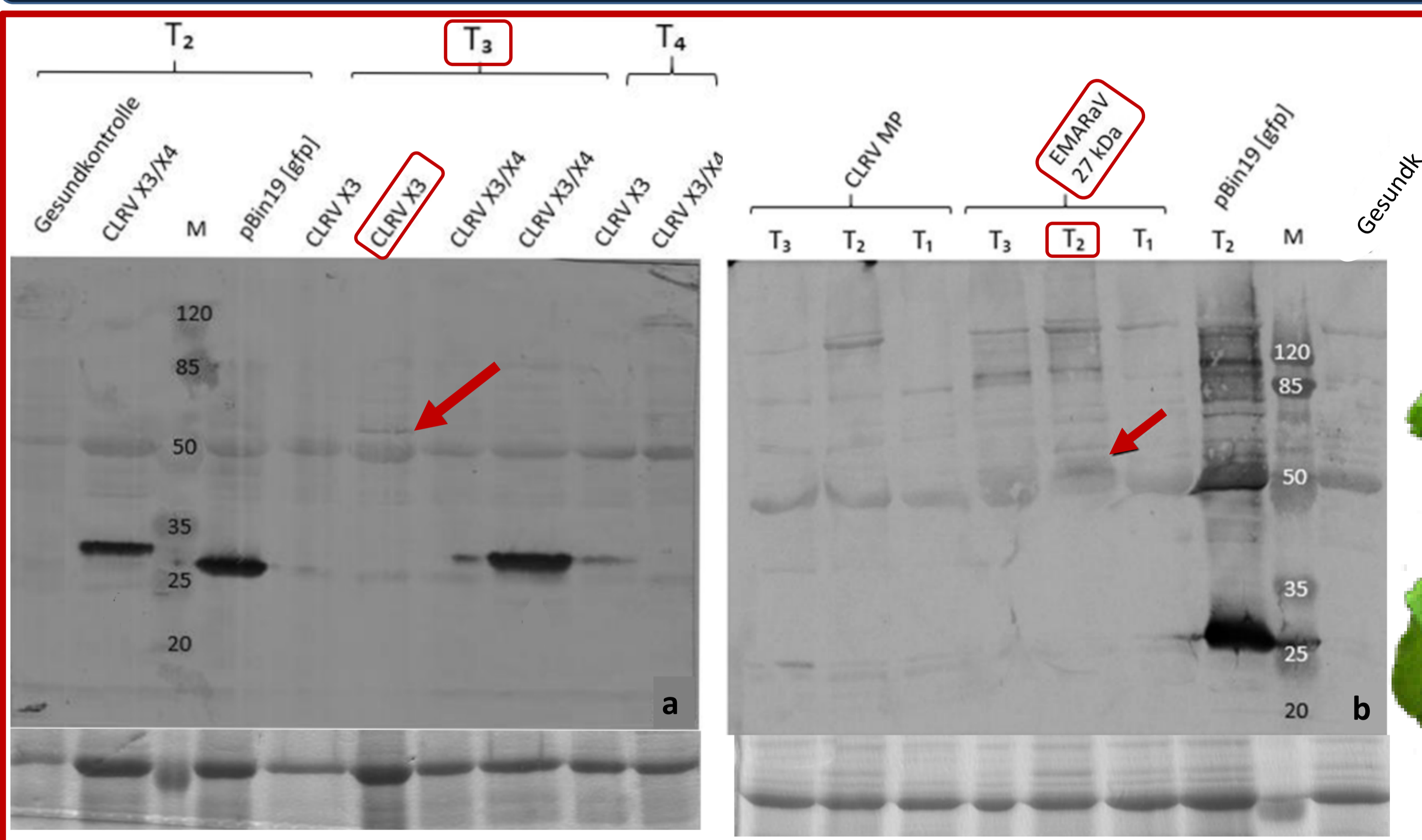


Abb. 3: Membran nach EBIA (oben) sowie SDS-Gel nach Coomassie Färbung (unten). Proben (a): CLRV X3, CLRV X3/X4 zu den Probeentnahmezeitpunkten T<sub>2</sub> (48 h), T<sub>3</sub> (72 h) und T<sub>4</sub> (7 d) post Infiltration. (b) CLRV MP und EMARaV 27 kDa zu den Probeentnahmezeitpunkten T<sub>1</sub> (24 h), T<sub>2</sub> (48 h), T<sub>3</sub> (72 h) post Infiltration. (a,b) Positivkontrolle: pBin19 [gfp] (Tan, 2008), Gesundkontrolle: *N. benthamiana*. M: Prestained MW Marker (120 kDa; Thermo Scientific).



### Funktionelle Konstrukte

✓ 35S-CLRV-395-X3::gfp-pCambia1302

72 h post Infiltration

✓ 35S-EMARaV 27 kDa ::gfp-pCambia1302

48 h post Infiltration

## Fazit

- Die Lokalisation des 35S-CLRV-395-X3::gfp-pCambia1302 Fusionsproteins und des 35S-EMARaV 27 kDa ::gfp-pCambia1302 Fusionsproteins, zu den in dieser Arbeit ermittelten Expressionszeitpunkten, können in Untersuchungen mittels **Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)** eingesetzt werden, um Indizien zur Funktion der Proteine zu sammeln.
- Bei dem X3/X4 Fusionsprotein und der CLRV-MP::gfp Fusion handelt es sich um nicht-funktionelle Konstrukte. Es kam zu keiner Expression der Proteine in infizierten *Nicotiana benthamiana*.

## Literatur

Büttner, C., von Bargaen, S., Bandte, M., Mühlbach, H.-P. (2013): Forest diseases caused by viruses. Chap. 3 In: Infectious forest diseases. Gonthier P., Nicolotti G. (eds), CABI, pp. 50-75.  
Mielke-Ehret, N., Mühlbach, H.P. (2007): Emaravirus: A novel genus of multipartite, negative strand RNA plant viruses. Viruses 4: 1515-1536.  
Tan, X. (2008): A comparative testing of Cucumber mosaic virus (CMV)-based constructs to generate virus resistant plants in tobacco species.  
von Bargaen, S., Langer, J., Robel, J., Rumbou, A., Büttner, C. (2012): Complete sequence of Cherry leaf roll virus (CLRV), a subgroup C nepovirus. Virus Research 163: 678-683.

## Danksagung

Die Arbeit wurde von der DFG gefördert (Projektnummer: BU 890/27-1 und BA 3961/2-1)