

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

Investigation of RNA2 encoded proteins (X3, X4, MP) of Cherry leaf roll virus (CLR) and a non-structural protein of European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV)

Rana Demiral^{1*}, Susanne von Barga¹, Jenny Roßbach¹,
Hans-Peter Mühlbach² und Carmen Büttner¹

Einleitung

Sowohl das *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) als auch das *Cherry leaf roll virus* (CLR) 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. Dabei handelt es sich beim EMARaV um das von der RNA4 kodierte 27 kDa Protein. Für das RNA2 kodierte P2 des CLR konnten mögliche Prozessierungs-Schnittstellen zwischen den putativen Proteinen X3 und X4, X4 und dem Transportprotein (*movement protein* MP, 41 kDa) festgestellt werden (VON BARGEN *et al.* 2012). Die Funktionen des N-terminalen X3 Proteins und des X4 Proteins sind noch unbekannt. Zur Funktionsaufklärung der viralen Proteine können Lokalisationsstudien *in planta* beitragen. Ziel dieser Arbeit war somit, die Herstellung von GFP-Fusionskonstrukten von CLR X3, -MP und dem Fusionsprotein X3/X4 sowie dem 27 kDa- (RNA4) p4 des EMARaV für Lokalisationsstudien in *Nicotiana benthamiana* Pflanzen. Die Überprüfung der Expression der GFP-Fusionskonstrukte erfolgte mithilfe des Elektrolot-Immunoassay (EBIA).

Material und Methoden

Virusisolate: Das Isolat CLR-E395 wurde für die Erstellung der CLR-Proteine X3 und der X3/X4 Kombination als Fusion mit dem *green fluorescent protein* (GFP) verwendet. Die CLR-MP kodierende Region des Isolates lag kloniert als GFP-Fusion im Vektor pCambia1302 (MGT Inc.) vor ebenso wie die 27 kDa-kodierende Region des EMARaV aus einer virus-infizierten Eberesche (E51609) vom Standort Berlin-Dahlem.

Plasmide: Die Subklonierung wurde mit dem Klonierungsvektor pJET1.2/blunt (Thermo Scientific) durchgeführt. Für die gerichtete Klonierung und anschließende Agrobakterien-infiltration von *Nicotiana benthamiana* diente ein modifizierter pflanzliche Expressionsvektor pCambia 1302-Hyg, aus dem die Hygromycin-Expressionskassette entfernt worden war.

Bakterienstamm: Für die Infiltration der Expressionsvektoren in *N. benthamiana* wurden elektrokompente *Agrobacterium tumefaciens* Stamm C58C1 mit den GFP-Fusionskonstrukten transformiert.

Überprüfung der Expression: Es wurden GFP-Fusionskonstrukte von CLR -X3 und -MP und dem Fusionsprotein X3/X4 sowie dem 27 kDa- Protein des EMARaV für Lokalisationsstudien *in planta* hergestellt. Die Expression der Fusionskonstrukte in Blattmaterial Agrobakterien-infiltrierter *N. benthamiana* wurde mithilfe des EBIA untersucht, indem sie mittels GFP-spezifischem monoklonalem Antikörper in pflanzlichen Gesamt-Proteinextrakten detektiert wurden.

Ergebnisse und Diskussion

Die Subklonierung bzw. der Nachweis der Expression der GFP-Fusionsprodukte im Western Blot gelang für die Konstrukte CLR-X3::GFP und EMARaV 27 kDa::GFP. Im EBIA konnte 72 h *post* Infiltration eine Bande der erwarteten Größe des CLR-X3::GFP Fusionsproteins von 56 kDa nachgewiesen werden (Abb. 1a), wodurch die Expression der X3::GFP Konstruktes in der Pflanzenzelle gezeigt werden konnte. Dieses ist Voraussetzung für die Untersuchungen zur Lokalisation des CLR X3 Proteins in der Pflanze mittels konfokalem Laser Scanning Mikroskop (CLSM), um Indizien zur Funktion des Proteins zu erhalten. Der Expressionszeitpunkt 72 h *post* Infiltration (T3) kann in zukünftigen Studien als Orientierung für eine Untersuchung des CLR X3 Proteins *in planta* dienen. Auch das EMARaV-27 kDa::GFP Fusionskonstrukt kann zur Untersuchung mittels CLSM eingesetzt

werden, da die Expression in planta mittels EBIA in dieser Studie gezeigt werden konnte (Abb. 1b). Mit den CLRV-X3/X4::GFP Fusionen gelang die Agroinfiltration von *N. benthamiana* Pflanzen. Eine Detektion der Konstrukte im Western Blot mittels Anti-GFP-Antikörper gelang nicht, da beim Nachweis der X3/X4::GFP Fusion 48 h post Infiltration 72 h post Infiltration um ca. 75 kDa verkürzte Peptidexpressionssignale (bei ca. 30 kDa) auftraten (Abb. 1a) anstatt bei der erwarteten Größe des Peptids von 105 kDa. Eine Erklärung dafür könnte die Synthese eines nicht-funktionalen-Proteins durch ein C-Terminal gelegenes ATG sein, wodurch zwar die GFP-kodierende Sequenz, aber ohne Fusion des CLRV X3/X4 Protein synthetisiert wurde. Auch die Expression der CLRV-MP::GFP Fusion konnte im Western Blot zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Die CLRV-X3/X4::GFP und CLRV-MP::GFP Konstrukte sind aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit als nicht funktionell *in planta* zu bewerten und müssen für zukünftige Untersuchungen erneut hergestellt werden.

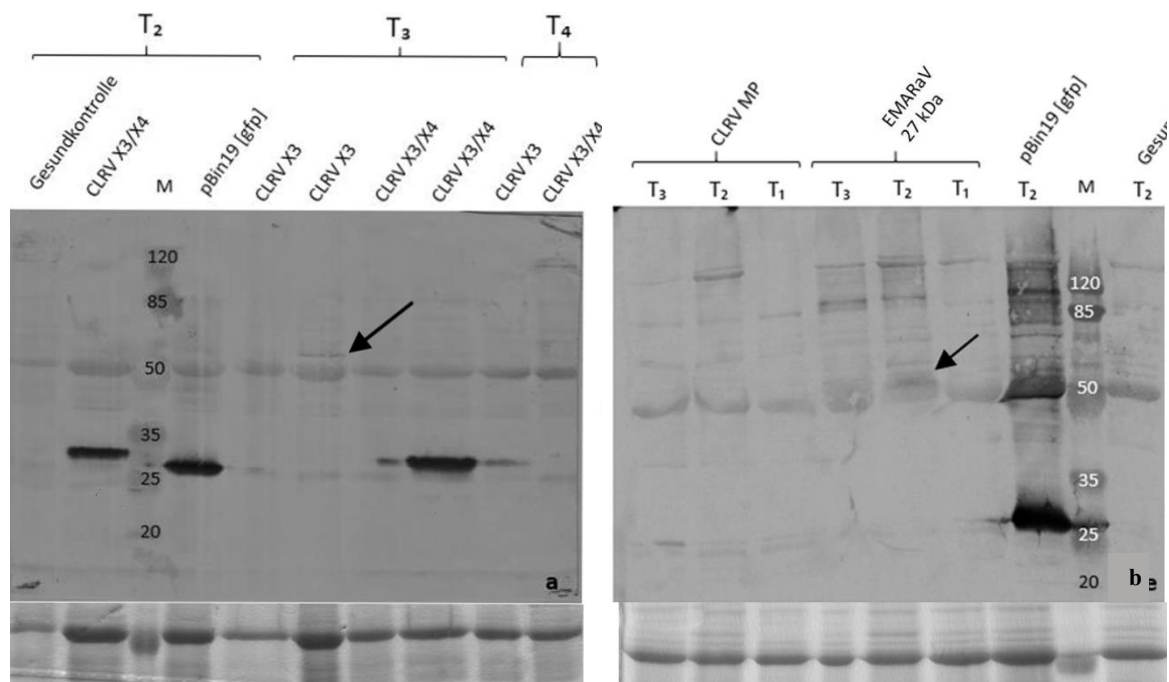


Abbildung 1: Membran nach EBIA (oben) sowie SDS-Gel nach Coomassie Färbung (unten). Proben (a): CLRV X3, CLRV X3/X4 zu den Probeentnahmezeitpunkten T₂ (48 h), T₃ (72 h) und T₄ (7 d) post Infiltration. (b) CLRV MP und EMARaV 27 kDa zu den Probeentnahmezeitpunkten T₁ (24 h), T₂ (48 h), T₃ (72 h) post Infiltration. (a, b) Positivkontrolle: pBin19 [gfp] (TAN, 2008), Gesundheitskontrolle: *N. benthamiana*. M: Prestained MW Marker (120 kDa; Thermo Scientific).

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden GFP-Fusionskonstrukte von CLRV -X3, -MP und der Fusion X3/X4 sowie dem 27 kDa-Protein des EMARaV für Lokalisationsstudien in *N. benthamiana* hergestellt und die Expression mithilfe des Western Blot untersucht. Dabei konnte eine Expression der Fusionskonstrukte CLRV-X3::GFP 72 h post Infiltration und des EMARaV-27 kDa::GFP 48 h post Infiltration festgestellt werden. Die in dieser Arbeit ermittelten Expressionszeitpunkte der Konstrukte können in zukünftigen Lokalisationsstudien mittels Konfokalem Laser Scanning Mikroskop (CLSM) als Orientierung dienen. 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 Agro-inokulierten *Nicotiana benthamiana*.

Abstract

In this study GFP fusions of CLRV – X3, -MP and the fusion proteins X3/X4 as well as the 27 kDa EMARaV protein were constructed and evaluated for their suitability for cell localisation studies in *N.*

benthamiana. Expression in planta was visualised using the EBIA. Expression of the fusion construct CLRV X3::GFP could be demonstrated 72 hours *post* infiltration and for the EMARaV 27 kDa::GFP 48 hours *post* infiltration. These expression times can serve as an orientation in future localisation studies using confocal laser scanning microscopes (CLSM). The X3/X4 fusionprotein and the CLRV-MP::GFP fusion are probably non-functional constructs. No expression of the proteins in agro-inoculated *Nicotiana benthamiana* could be ascertained.

Literatur

BÜTTNER C, VON BARGEN 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.
TAN X, 2008: A comparative testing of Cucumber mosaic virus (CMV)-based constructs to generate virus resistant plants in tobacco species.
VON BARGEN 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.

Adressen der Autoren

¹ Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin

² Universität Hamburg, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Fachbereich Biologie, Biozentrum Klein Flottbek, Molekulare Pflanzengenetik, Ohnhorststr. 18, D-22609 Hamburg

* Ansprechpartnerin: MSC Rana DEMIRAL, rana.demiral@agrar.hu-berlin.de