
Sektion 34

Molekulare Phytomedizin

34-1 - Funktionelle Charakterisierung der viralen Proteinase des *Cherry leaf roll virus* (CLRV)

Functional characterization of the viral proteinase of Cherry leaf roll virus (CLRV)

Markus Rott, Carmen Büttner, Susanne von Barga

Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland, Markus.Rott@agr.ar.hu-berlin.de

Nepoviren (Familie *Secoviridae*, Sanfacon *et al.*, 2009) besitzen zwei positiv orientierte einzelsträngige RNAs, die zu zwei Polyproteinen P1 und P2 translatiert werden. Das RNA1-kodierte P1 von *Cherry leaf roll virus* (CLRV, Nepovirus der Subgruppe C) beinhaltet charakteristische Domänen für einen Proteinase-Cofaktor (PCo), eine Helikase (Hel), ein genome-linked Protein (VPg), eine Proteinase (Pro) und eine RNA-abhängige Polymerase (Pol). P2 umfasst das movement Protein (MP) und das coat Protein (CP), sowie die Bereiche X3 und X4, denen noch keine Funktion zugeordnet werden konnte (von Barga *et al.*, 2012).

Durch die virale Proteinase werden P1 und P2 an spezifischen Schnittstellen in ihre funktionellen Proteinuntereinheiten zerlegt. Dabei entstehen teilweise prozessierte Intermediate und vollständig prozessierte, reife Proteine, die verschiedene Aktivitäten haben können (Chisholm *et al.*, 2001). Der Regulation der Polyprotein-Prozessierung kann im Rahmen der Verbreitungs- und Vermehrungsstrategie des Virus eine essentielle Funktion zukommen.

Voraussetzung für die funktionale Charakterisierung viraler Genprodukte des CLRV ist die Aufklärung ihrer Prozessierung in die Untereinheiten. Die Analyse der Vollängensequenz zeigt potentielle Prozessierungsstellen für die Proteinase, die analog zu experimentell bestätigten Schnittstellen verwandter Nepoviren liegen (Wang und Sanfacon, 2000, Wetzel *et al.*, 2008).

Die putative Proteinase, sowie ein aus VPg und Proteinase bestehendes Vorläuferprotein wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und nativ gereinigt. Der die putative Schnittstelle zwischen X4 und MP umgebende Bereich des P2 wurde *in vitro* transkribiert und translatiert und für einen *in vitro*-Aktivitätstest als Substrat herangezogen. Die proteolytische Aktivität der Proteinase und des aus VPg und Proteinase bestehenden Vorläuferproteins konnte experimentell bestätigt werden. Die vorhergesagte Prozessierungsstelle zwischen X4 und MP wurde verifiziert. Durch die Etablierung dieses funktionellen Testsystems wird die experimentelle Überprüfung der weiteren putativen Prozessierungsorte sowohl von P1, als auch von P2 ermöglicht.

Literatur

- VON BARGEN, S., J. LANGER, J. ROBEL, A. RUMBOU, C. BÜTTNER, 2012: Complete nucleotide sequence of Cherry leaf roll virus (CLRV), a subgroup C nepovirus. *Virus Research* **163**, 678-683.
- CHISHOLM J., A. WIECZOREK, H. SANFACON, 2001: Expression and partial purification of recombinant tomato ringspot nepovirus 3C-like proteinase: comparison of the activity of the mature proteinase and the VPg-proteinase precursor. *Virus Research* **79**, 153-164.
- SANFACON H., J. WELINK, O. LE GALL, A. KARASEV, R. VAN DER VLUGT, T. WETZEL, 2009: Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. *Archives of Virology* **154**, 899-907.
- WANG A., H. SANFACON, 2000: Proteolytic processing at a novel cleavage site in the N-terminal region of the tomato ringspot nepovirus RNA-1-encoded polyprotein *in vitro*. *Journal of General Virology* **81**, 2771-2781.
- WETZEL T., J. CHISHOLM, A. BASSLER, H. SANFACON, 2008: Characterization of proteinase cleavage sites in the N-terminal region of the RNA1-encoded polyprotein from Arabis mosaic virus (subgroup A nepovirus). *Virology* **375**, 159-169.