

HETEROLOGE EXPRESSION DER VIRALEN PROTEINASE DES CHERRY LEAF ROLL VIRUS (CLRV)

Rott, M.; Büttner, C.; von Bargaen, S.

Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Department für Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften
Fachgebiet Phytomedizin; Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin
phytomedizin@agrar.hu-berlin.de



Cherry leaf roll virus (CLRV), ein *Nepovirus* der Subgruppe C, gehört zur 2009 eingeführten Familie der *Secoviridae* (Sanfacon *et al.*, 2009). Das bipartite Genom besteht aus einzelsträngiger RNA, die zwei Polyproteine (P1 und P2) kodiert. P1 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 beinhaltet neben einer Region am 5'-Ende, der noch keine Funktion zugeordnet werden konnte, das *movement protein* (MP), sowie das *coat protein* (CP) (von Bargaen *et al.*, 2012). Die Polyproteine werden posttranslational durch die virale Proteinase zu funktionellen Einheiten prozessiert. Die *in silico*-Analyse der Vollängensequenz zeigt diverse putative Prozessierungsstellen mit der charakteristischen Konsensus-Sequenz (Q,E)/(G,S,M), die analog zu experimentell bestätigten Schnittstellen der verwandten Proteinasen liegen.

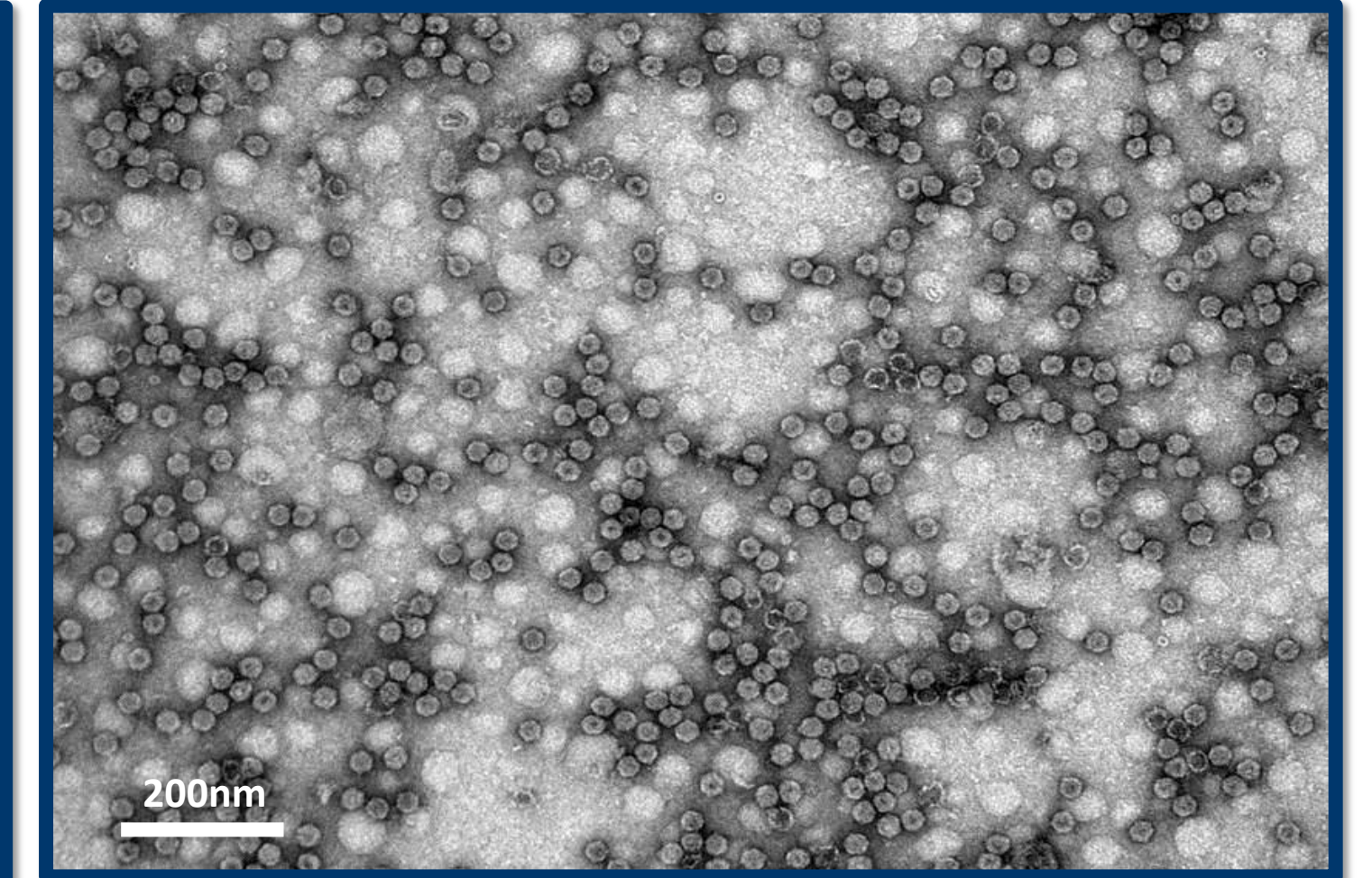


Abb. 1: Darstellung von CLRV-Partikeln (Isolat E395) im Transmissionselektronenmikroskop.

Zielsetzung:

Voraussetzung für die funktionale Charakterisierung viraler Genprodukte ist die Aufklärung der Prozessierung der Polyproteine in ihre maturierten Untereinheiten.

Ziel des Projektes ist daher die Identifikation der Prozessierungsorte der CLRV-Proteinase über *in vitro*-Aktivitätstests nach heterologer Expression in *E. coli* und nativer Aufreinigung.

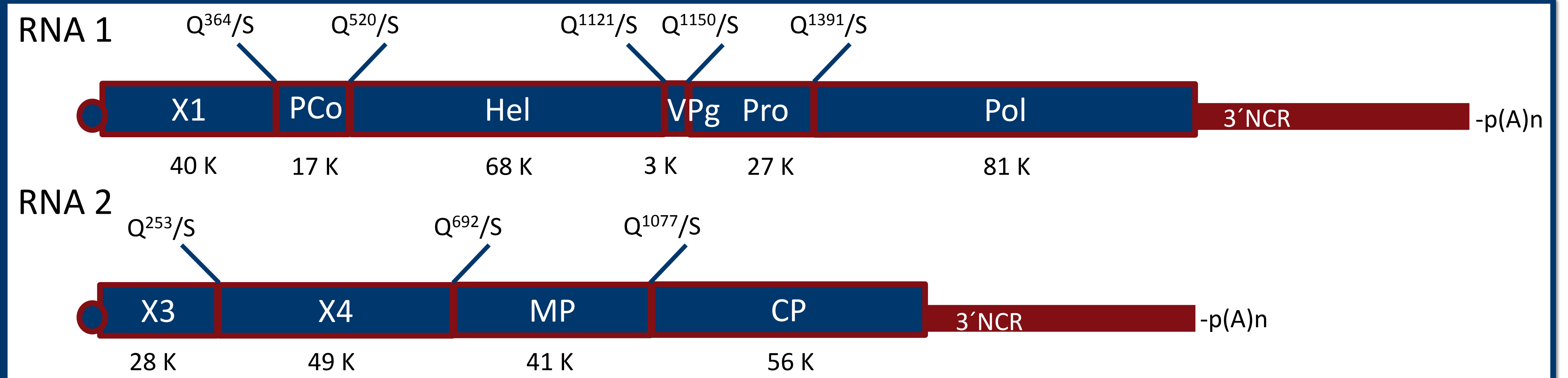


Abb. 2: Schematische Darstellung der Genomorganisation von CLRV. Blaue Rechtecke: auf RNA 1, bzw. RNA 2 kodierte Polyproteine P1 und P2 unter Angabe der putativen Funktion, der putativen Prozessierungsstellen (Q/S) und der molekularen Masse der maturierten Proteine. Rote Rechtecke: Nicht-Proteinkodierende Regionen am 3' Ende mit sich anschließendem Poly-A-Schwanz (p(A)n). Blauer Kreis: VPg am 5' Ende der RNAs.

Methoden und erste Ergebnisse

Da die Anwesenheit des VPg im Precursorprotein der Proteinase (VPg-Pro) Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hat (Chisholm *et al.*, 2001), wurde neben der Proteinase auch das VPg-Pro in die Untersuchungen eingeschlossen. Zur Charakterisierung der proteolytischen Aktivität des CLRV-Pro-, bzw. VPg-Pro-Proteinprecursor-Genproduktes wurden diese mittels RT-PCR aus viraler RNA amplifiziert und in den Expressionsvektor pET28 (*Novagen*) kloniert.

Über die durch den Vektor vermittelten C- und N-terminalen HIS-Tags erfolgte nach IPTG-induzierter heterologer Expression in *E. coli* (Stamm BL21DE3) die native Reinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie.

Die erfolgreich induzierte Expression und Reinigung ließen sich mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und im Western blot darstellen.

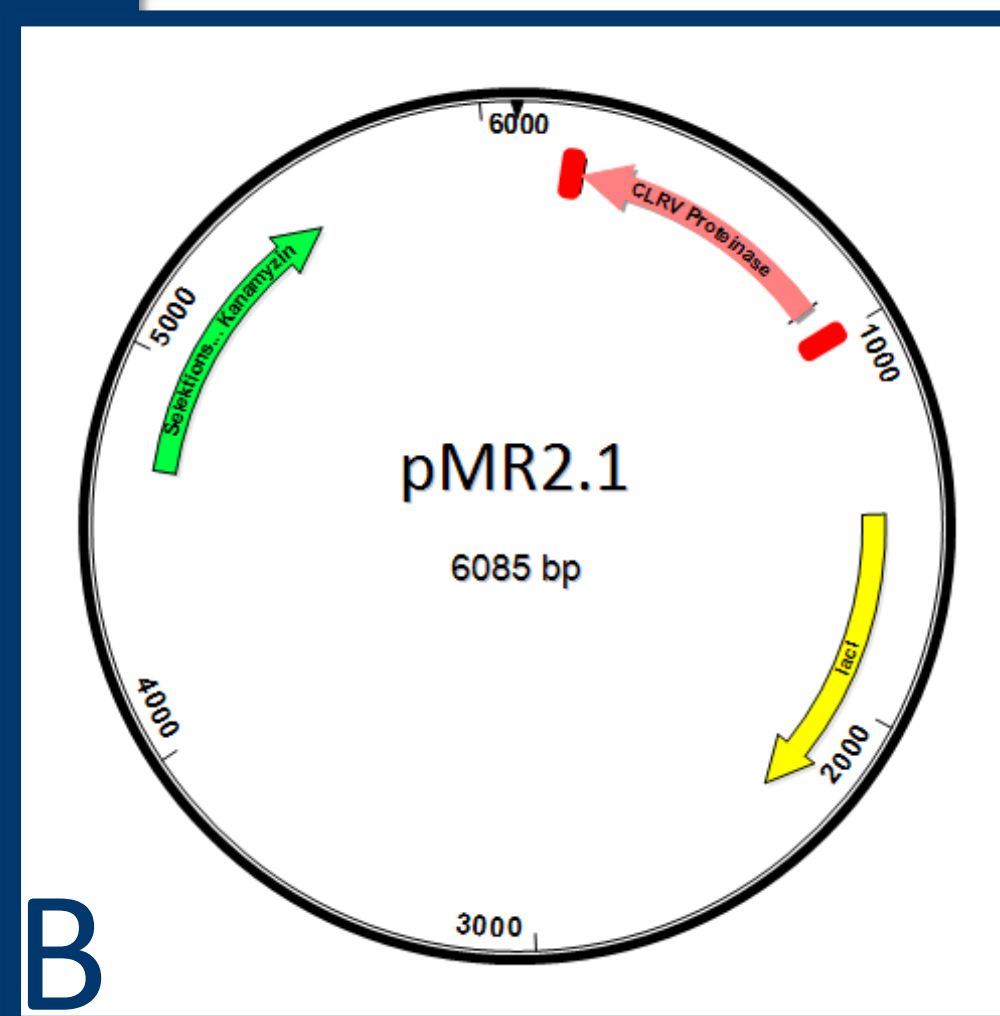
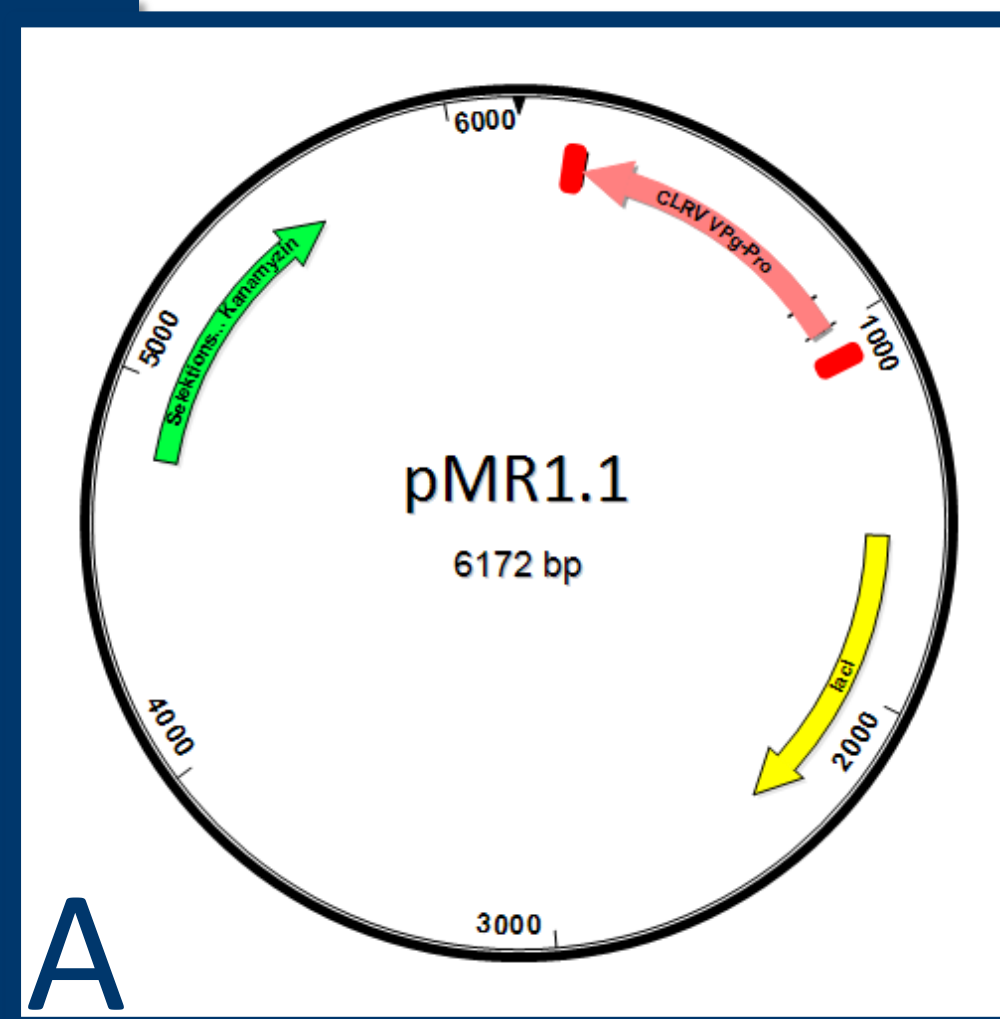


Abb. 3: Schematische Darstellung der Konstrukte. Grüner Pfeil: Selektionsmarker Kanamycin, gelber Pfeil: lacI zur Induktion; rosa Pfeil: zu exprimierendes Protein. Rote Rechtecke: 6xHIS-Tag. A: pMR1.1, Konstrukt zur Expression von VPg-Pro. B: pMR2.1, Konstrukt zur Expression von Pro.

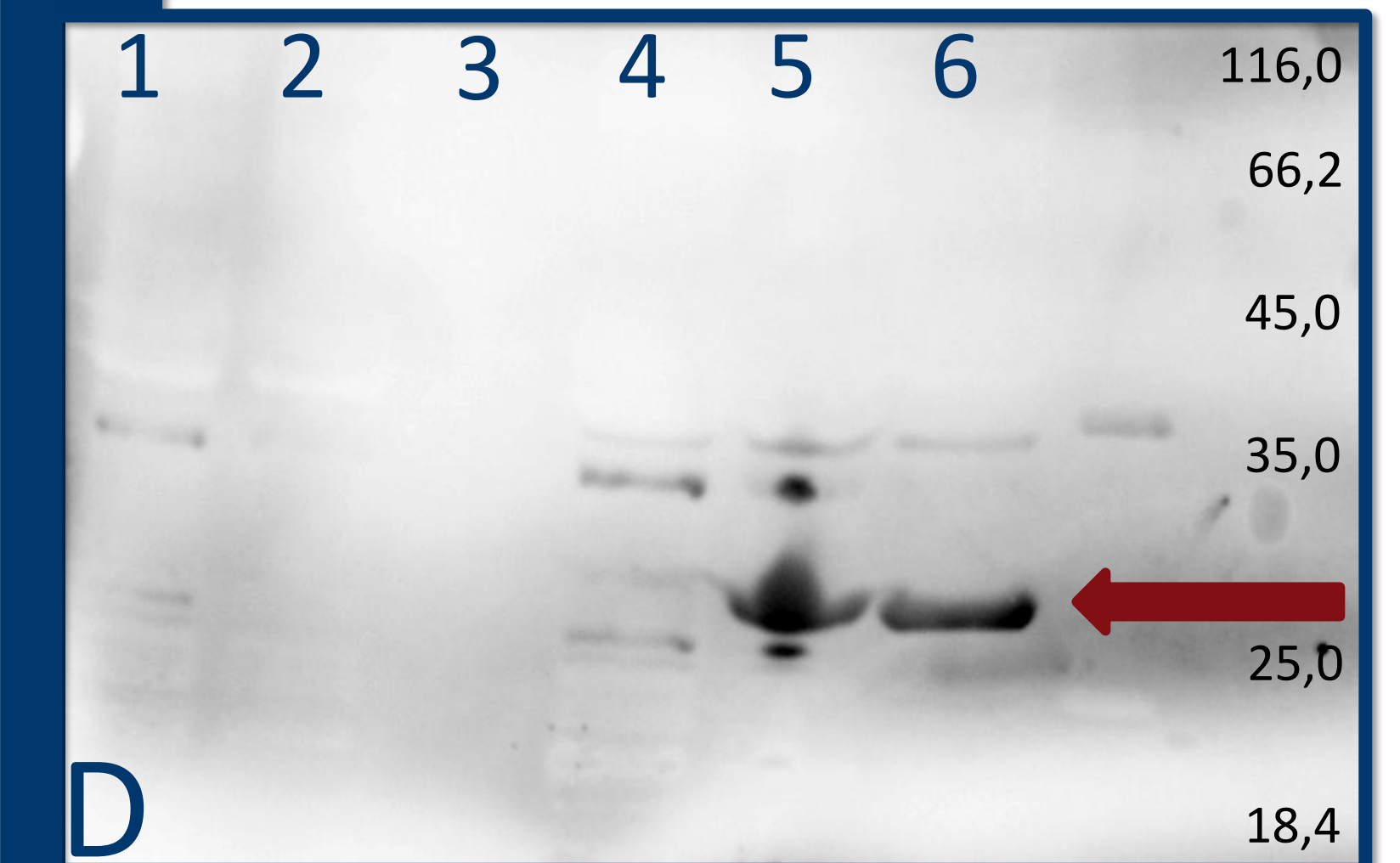
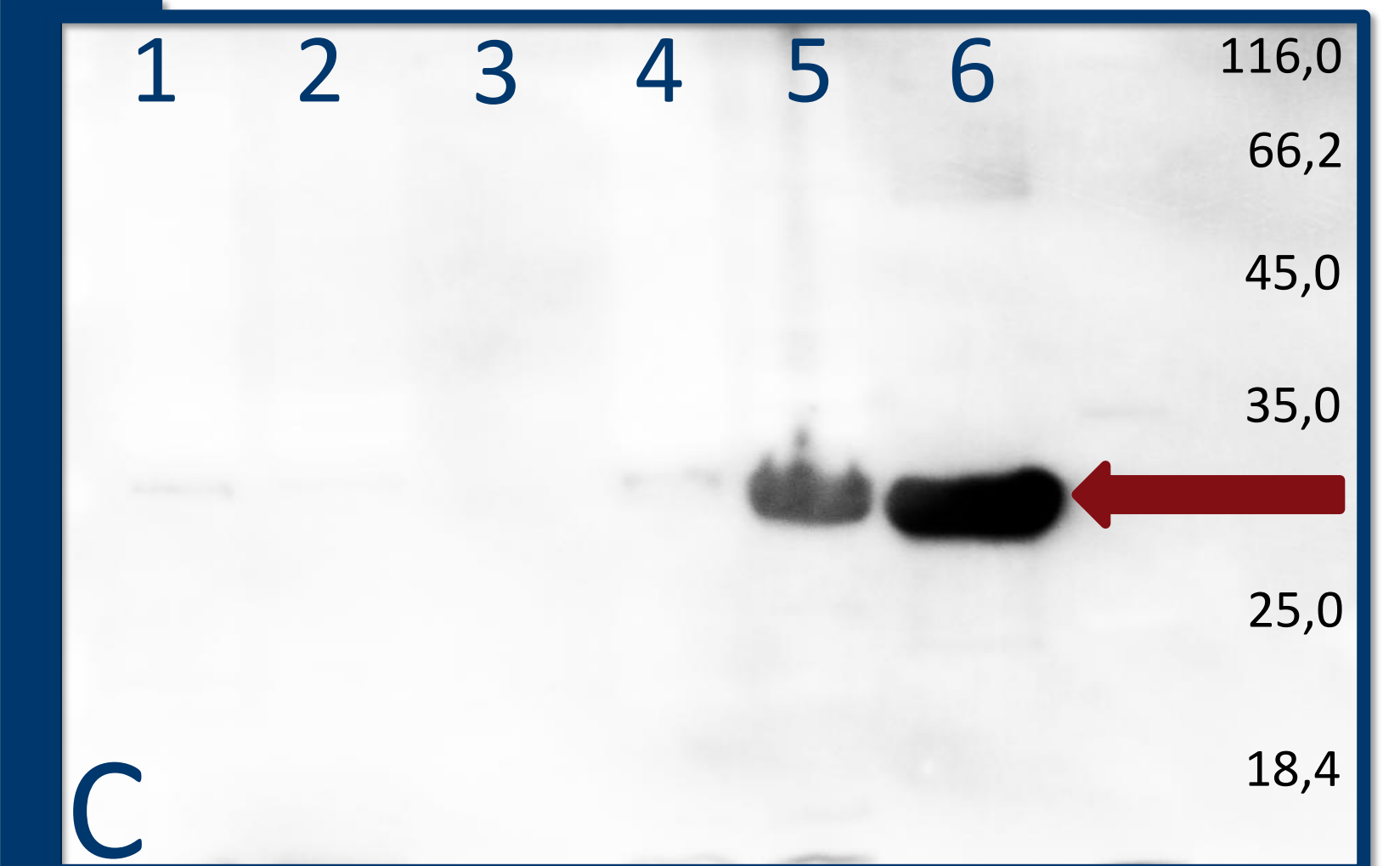
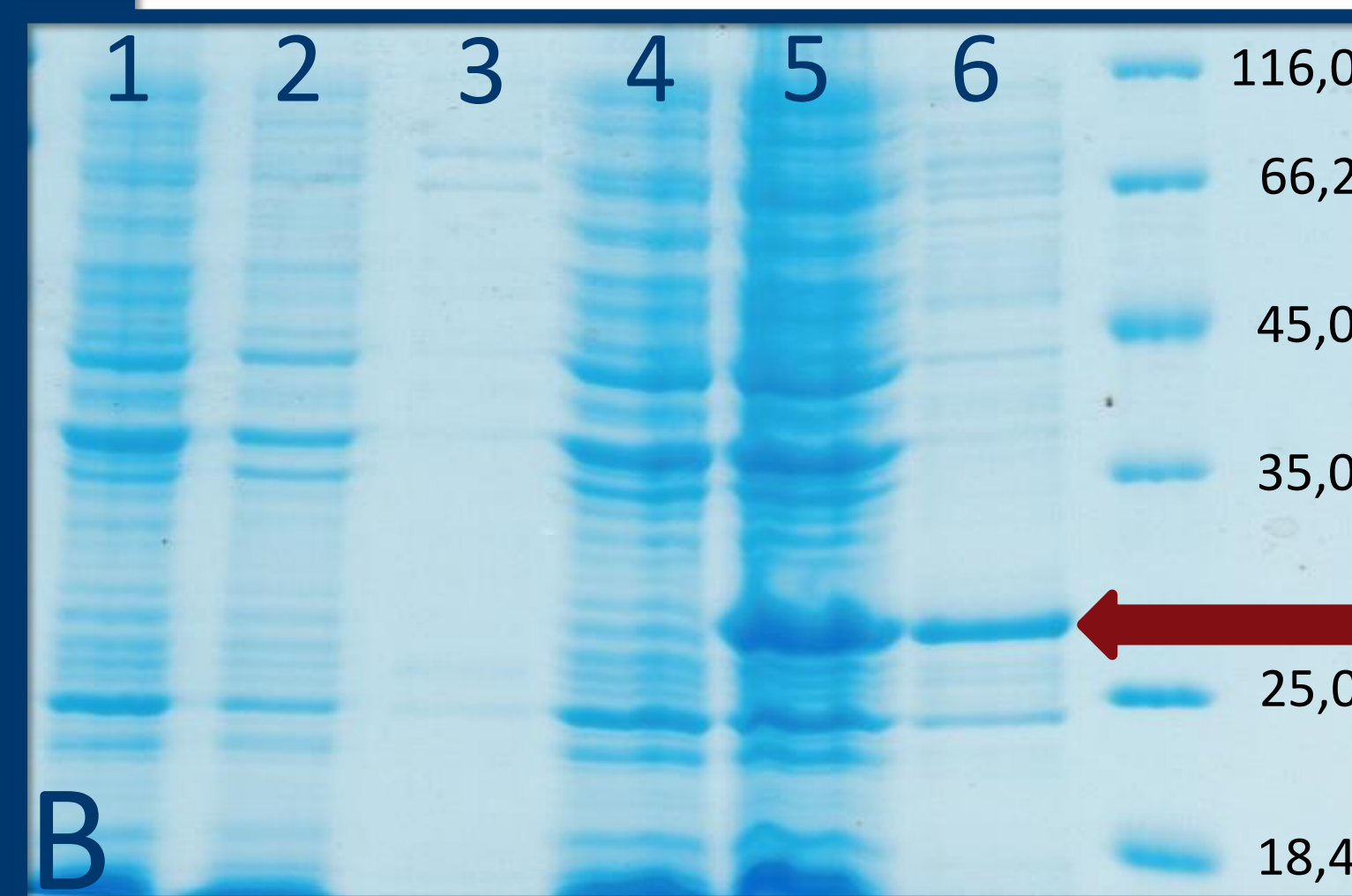
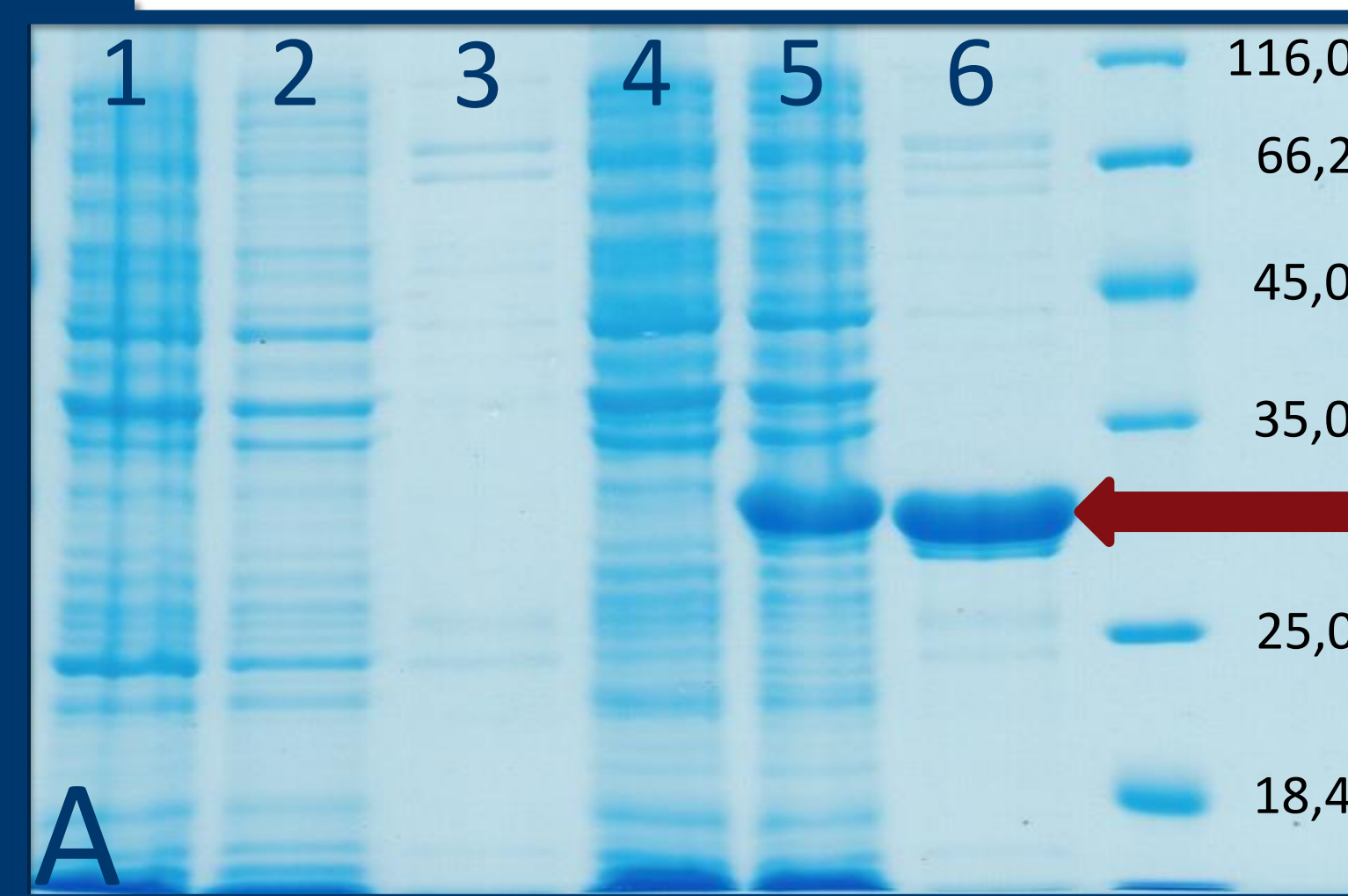


Abb. 4: SDS-PAGE (A, B) und Western blot (C, D) mit Ni-NTA-Agarose-AP-Konjugat der heterolog exprimierten Proteine. A, C: VPg-Pro, Proteinextraktionen aus mit pMR1.1 transformierten *E. coli* und Kontrollen. B, D: Pro, Proteinextraktionen aus mit pMR2.1 transformierten *E. coli* und Kontrollen. Jeweils Spur 1: Gesamtproteinextrakt nicht induzierte Kontrolle leerer Vektor, Spur 2: Gesamtproteinextrakt induzierte Kontrolle leerer Vektor, Spur 3: Affinitätschromatographisch gereinigte lösliche Proteinfraction induzierte Kontrolle leerer Vektor, Spur 4: Gesamtproteinextrakt nicht induzierte, mit pMR1.1/2.1 transformierte *E. coli*, Spur 5: Gesamtproteinextrakt induzierte, mit pMR1.1/2.1 transformierte *E. coli*, Spur 6: Affinitätschromatographisch gereinigte lösliche Proteinfraction induzierte, mit pMR1.1/2.1 transformierte *E. coli*. Größenangaben in kDa. Rote Pfeile: VPg-Pro (ca. 30 kDa) und Pro (ca. 27 kDa).

Fazit und Ausblick

Die CLRV-Proteinase sowie das VPg-Proteinase-Precursorprotein konnten erfolgreich heterolog in *E. coli* exprimiert und nativ gereinigt werden.

Analog werden nun mittels RT-PCR aus viraler RNA die Bereiche um die *in silico* ermittelten putativen Prozessierungsstellen amplifiziert, kloniert, in *E. coli* exprimiert und als Substrate für *in vitro*-Aktivitätstests verwendet. Dies umfasst sowohl die Prozessierungsstellen des Polyproteins P 1 (X1/PCo, PCo/Hel, Hel/VPg, VPg/Pro, Pro/Pol), als auch die auf dem Polyprotein P2 lokalisierten (X3/X4, X4/MP, MP/CP).

Zum *proof-of-concept* werden die Methoden zunächst anhand eines Konstruktes, dass die Schnittstelle zwischen MP und CP beinhaltet, etabliert. Eine mögliche proteolytische Spaltung kann hier mittels des vorhandenen CLRV-CP-Antikörpers und anhand des Ni-NTA-Konjugates gegen das HIS-Tag im Western blot verfolgt werden.

Literatur:
Chisholm, J., Wieczorek, A., Sanfacon, H. (2001); *Virus Research* 79: 153 - 164.
Sanfacon, H., Wellink, J., Le Gall, O., Karasev, A., van der Vlugt, R., Wetzell, T., (2009); *Arch. Virol.* 154, 899 - 907.
von Bargaen, S., Langer, J., Robel, J., Rumbou, A., Büttner, C. (2012); *Virus Research* 163, 678-683.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung dieses Projektes (DFG Projekt BA3961/2-1).

