

Исследование структурно-функциональных взаимодействий полиэдрина вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) с протеазой и РНК полиэдров.

3. Полиэдры включают малую РНК

Э. А. Козлов, М. И. Вудмаска¹, М. Т. Бобровская, Т. В. Ширина

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

¹НТЦ иммунобиотехнологий НАН Украины, АОЗТ НПК Диапроф-мед
Ул. Светлицкого, 35, Киев, 04123, Украина

kozlov@imbig.org.ua

*Показано, что полиэдры вируса ядерного полиэдроза *B. mori* содержат РНК с молекулярной массой 17–18 кДа (50–60 нуклеотидов). Эта РНК, вероятно, принадлежит к классу малых РНК. Обсуждается ее происхождение.*

Ключевые слова: вирус ядерного полиэдроза, РНК полиэдров, микро-РНК.

Введение. Наши исследования РНК из полиэдров вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) *B. mori* впервые опубликованы в 1969 г. [1]. Тогда мы полагали, что полиэдры содержат крупные фрагменты, вероятнее всего, полиэдриновой мРНК. Предполагалось также, что полиэдры случайно захватывают их при кристаллизации. Поэтому дальнейшее изучение природы РНК полиэдров, на наш взгляд, не имело смысла. Однако открытие в конце прошлого и в начале этого века у эукариотов и крупных ДНК-содержащих вирусов малых РНК (в частности, микро-РНК, miR), играющих регуляторную роль во многих клеточных процессах и во взаимоотноше-

ниях вирус–клетка [2–5], побудило нас возобновить эти исследования. Второе сообщение этой серии работ [6] посвящено выяснению влияния протеазы и РНК полиэдров на процессы ассоциации–диссоциации полиэдрина в растворах с рН 10,5–11,0. Мы показали наличие в полиэдрах малого РНП-комплекса с молекулярной массой (м. м.) 20000–25000, содержащего полипептид с м. м. 10000–12000. Понятно, что РНК этого комплекса имеет м. м. около 10000. Однако поскольку растворы полиэдрина включали и высокомолекулярные РНП-комплексы (13S и более) [6], то малый РНП-комплекс может содержать фрагмент крупной РНК неизвестного происхождения: в условиях растворения полиэдров высокомолекулярная РНК,

если она изначально присутствует в полиэдрах, может разрушаться, к тому же не исключено и наличие нуклеазы в полиэдрах. В связи с вышеизложенным мы решили исследовать природу РНК, выделив ее методом растворения полиэдров в 67 %-м растворе уксусной кислоты или в слабощелочных растворах, исключающих действие ферментов [7]. Результаты этих исследований приведены в настоящем сообщении.

Материалы и методы. *Полиэдры.* Использовали полиэдры, в которых протеолитическая активность либо значительно ниже (полиэдры А и Б) по сравнению со свежевыделенными полиэдрами [6], либо полностью отсутствует (полиэдры В). Полиэдры А выделяли из гусениц 4–5-го возрастов, погибших от ВЯП в естественных условиях (гниль); полиэдры Б – из гемолимфы инфицированных ВЯП гусениц, хранившихся в течение 20 лет. Полиэдры В выделяли из коконов кара-почах: гусеница, инфицированная ВЯП, успевшая до своей гибели свить кокон. Полиэдры выделяют из гомогената гнилых коконов (кара-почах).

Растворители. А – рН 10,5 (0,05 М Na_2CO_3 + 0,05 М NaHCO_3 + 0,1 М NaCl). Б – 67 %-я уксусная кислота. В – рН 7 (0,5 %-й саркозил Na + 25 мМ цитрат Na + 4 М гуанидинтиоцианат + 0,1 М -меркаптоэтанол.)

Электрофорез в 2 %-й агарозе в Na-боратном буфере проводили по описанной методике [8] в гелях, содержащих 2,2 М формальдегида (денатурирующие условия), и без добавления формальдегида (нативные условия). В пробы также либо добавляли, либо не добавляли формальдегид. Один и тот же гель сначала проявляли бромистым этидием, а затем кумасси голубым. В первом случае гели проявляли либо добавлением красителя в пробу (способ 1), либо погружением геля в раствор бромистого этидия на 15 мин с последующим промыванием дистиллированной водой в течение 20–30 мин (способ 2). Необходимо отметить, что при более длительном промывании краситель вымывается и малые РНК не проявляются. После фотографирования проявленного бромистым этидием геля его окрашивали кумасси голубым.

Электрофорез в 15 %-м полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем DS-Na и 7 М мочевины, про-

водили по специально разработанной для идентификации малых РНК методике [9]. В пробы также добавляли 7 М мочевины. Один и тот же гель проявляли последовательным окрашиванием на РНК и белок, как описано выше.

Получение РНК. П р е п а р а т 1. 100 мг полиэдров растворяли в 4 мл раствора А в течение 1 ч при комнатной температуре. Раствор центрифугировали последовательно при 6000 об/мин (10 мин), а затем при 30000 об/мин (1 ч, 4 °С). рН надосадочной жидкости снижали диализом против фосфатного буфера с рН 7,4 и затем РНК экстрагировали водно-насыщенным фенолом 2 раза. РНК из водной фазы осаждали двукратным объемом охлажденного спирта. Осадок растворяли в фосфатном буфере с рН 7,4, повторно экстрагировали дважды и РНК осаждали спиртом.

П р е п а р а т 2. 100 мг полиэдров растворяли в растворе Б в течение 1 ч при комнатной температуре и центрифугировали, как описано выше. После центрифугирования надосадочную жидкость диализовали на протяжении ночи против дистиллированной воды и затем в течение 15–20 мин против 0,2 М бикарбоната аммония до выпадения в диализном мешочке полиэдрина. Суспензию переносили в центрифужную пробирку и белок осаждали центрифугированием при 6000 об/мин. К надосадочной жидкости добавляли DS-Na до концентрации 1,5 % и РНК экстрагировали, как описано выше.

П р е п а р а т 3 получали аналогично препарату 2 с той лишь разницей, что полиэдрин не осаждали, а РНК экстрагировали после диализа только против дистиллированной воды, добавив DS-Na.

П р е п а р а т 4. 100 мг полиэдров растворяли в растворе В, раствор центрифугировали при 6000 об/мин в течение 10 мин и РНК из надосадочной жидкости экстрагировали по описанной выше методике, но для экстракции применяли смесь фенола с хлороформом в соотношении 1:1.

Результаты и обсуждение. Как показано нами ранее [1], РНК, полученная из полиэдров А щелочным методом (рН 10,5), имела УФ-спектр с отношением поглощения при длине волны 260 нм к поглощению при 280 нм (E_{260}/E_{280}), равным 1,85, и давала гиперхромный эффект 20–22 %. Исходя из этого мы предположили, что растворы содержат высокомо-

лекулярную РНК и/или ее крупные фрагменты. В настоящей работе решено было проверить в первую очередь именно такие препараты РНК. Как показано на рис. 1, препарат 1 РНК при электрофорезе в нативных условиях дает значительную диффузную полосу в диапазоне от 10S до S, менее чем у тРНК, причем диапазон расширяется при увеличении количества экстракций с 2 до 4. Но при двукратной экстракции отчетливо видна интенсивная полоса РНК в области 5S. Однако она содержит небольшую примесь белка по сравнению с препаратом после четырехкратной экстракции. При электрофорезе препарата 1 РНК в денатурирующих условиях диапазон полосы РНК значительно сужается от 5S до < 5S (рис. 2). При этом максимальное количество РНК имеет подвижность большую, чем у тРНК. Можно видеть, что происходит снижение полидисперсности РНК при электрофорезе препарата 1 в денатурирующих условиях. Поскольку препарат 1 РНК получали, растворяя полиэдры в сильно щелочной среде, то для уменьшения вероятности расщепления РНК в этих условиях мы выделили препарат 2 РНК, растворив полиэдры В в 67 %-й уксусной кислоте.

Как видно из данных рис. 3, при электрофорезе в течение 1 ч в денатурирующих условиях более четкая полоса РНК имеет подвижность большую, чем у тРНК. Однако за 2 ч эта полоса значительно сужается, при этом основная часть окраски появляется в диапазоне от 18S до 10S. Чтобы объяснить это явление, а также факт увеличения полидисперсности с возрастанием числа экстракций РНК фенолом (рис. 2), мы осуществили электрофорез проб РНК, в которые добавили формальдегид. Из результатов (рис. 4) следует, что при добавлении формальдегида подавляющее количество красителя движется к катоду, т. е. в противоположную от РНК сторону. Совершенно очевидно, что кажущуюся большую полидисперсность РНК из полиэдров можно объяснить, скорее всего, вымыванием в процессе электрофореза красителя из комплекса с РНК из-за его менее прочного связывания с малой РНК по сравнению с РНК из рибосом.

Из вышеизложенного можно сделать вывод о том, что раствор полиэдров после осаждения полиэдров содержит РНК с меньшей м. м., чем у тРНК,

и не содержит высокомолекулярной РНК. Однако в случае препарата 2 РНК не исключено, что часть ее может ассоциироваться с полиэдрином при осаждении последнего. В случае же препарата 1 РНК, как уже отмечалось, не исключено действие нуклеаз, присутствие или отсутствие которых в полиэдрах никто не исследовал. Поэтому мы выделяли препараты РНК, не осаждая полиэдрин из растворов полиэдров В, полученных в условиях, исключающих действие нуклеаз и протеаз. Как видно из рис. 5, препарат 2 РНК из полиэдров В также содержит РНК с подвижностью, несколько большей, чем у тРНК (дорожка 1), и не содержит высокомолекулярной РНК. В состав препаратов 3 и 4 РНК также не входит высокомолекулярная РНК, но входит РНК с чуть меньшей подвижностью, чем у тРНК (дорожки 2 и 3 соответственно). Однако эти препараты включают значительную примесь белка (рис. 5, б, дорожки 2 и 3). Это похоже на препарат 1 РНК после двукратной экстракции фенолом (рис. 1, б, дорожка 2). Очевидно, что при экстракции РНК из растворов без осаждения полиэдров препарат РНК не удается полностью очистить от белка (такие растворы полиэдров содержат около 1 % РНК). Вероятно, препараты 3 и 4 представляют собой ассоциат белка с РНК с меньшей м. м., чем у тРНК, который, очевидно, не разрушается в условиях данного электрофореза. Это предположение подтверждается электрофорезом препаратов 3 и 4 РНК в ПААГ, содержащем 7 М мочевины. Как видно из рис. 6, а, оба препарата, полученные из растворов полиэдров без осаждения полиэдров, содержат РНК с большей подвижностью, чем подвижность тРНК. При сравнении данных рис. 5 и рис. 6 очевидно, что окраска дорожек 2 и 3 бромистым этидием совпадает с окраской кумасси. Однако подвижность полос на этих дорожках по отношению к подвижности тРНК отличается: подвижность на рис. 5 чуть меньше, чем у тРНК, а на рис. 6 – больше.

Мы полагаем, что в условиях электрофореза в агарозе (рис. 5) РНК полиэдров ассоциирована с белком, а в условиях электрофореза в ПААГ РНК и белок диссоциируют. Очевидно, что диссоциация происходит под влиянием 7 М мочевины в пробе и в геле. Тот факт, что окраска кумасси (рис. 6, б) совпадает с окраской бромистым этидием свиде-

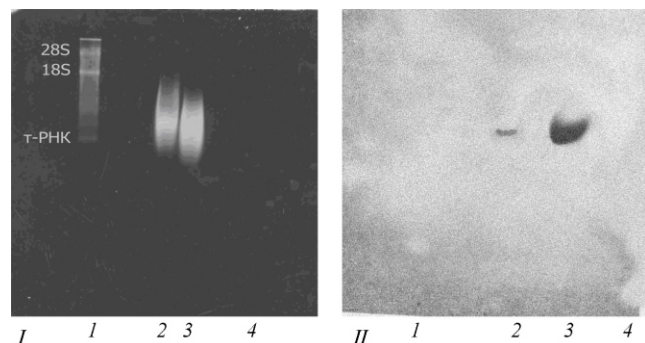


Рис. 1. Электрофорез в 2 %-й агарозе в нативных условиях препарата 1 РНК из полиэдров А. Время электрофореза 1 ч. I – окраска бромистым этидием по способу 1 (краситель добавлен в пробу); II – окраска кумасси голубым (I – маркер РНК из рибосом, 2 – РНК из полиэдров, экстрагированная дважды; 3 – РНК из полиэдров, экстрагированная 4 раза; 4 – полиэдрин)

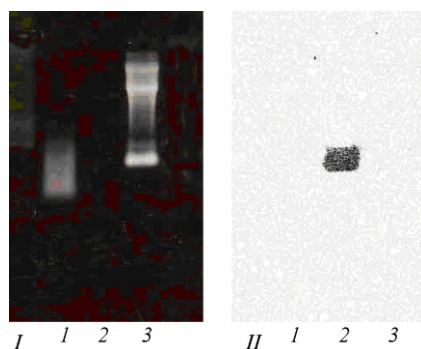


Рис. 2. Электрофорез в 2 %-й агарозе в денатурирующих условиях препарата 1 РНК из полиэдров А. Время электрофореза 1 ч. I – окраска бромистым этидием по способу 1; II – окраска кумасси голубым (I – РНК из полиэдров, экстрагированная 4 раза; 2 – полиэдрин; 3 – маркер РНК из рибосом)

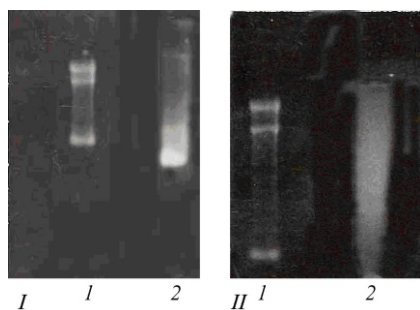


Рис. 3. Электрофорез в 2 %-й агарозе в денатурирующих условиях препарата 2 РНК из полиэдров Б. I – время электрофореза 1 ч; II – время электрофореза 2 ч (I – маркер РНК из рибосом, 2 – РНК из полиэдров). Окраска бромистым этидием по способу 1

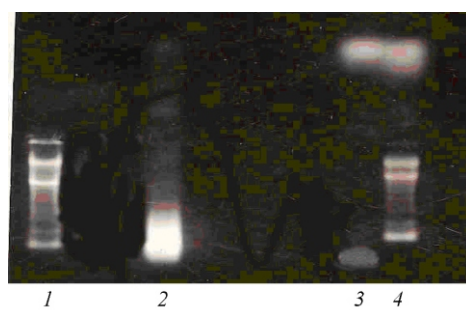


Рис. 4. Электрофорез в 2 %-й агарозе в денатурирующих условиях препарата РНК 1 из полиэдров А. Время электрофореза 1 ч. Окраска бромистым этидием по способу 1 (I, 4 – маркеры РНК из рибосом; 2, 3 – РНК из полиэдров; 3, 4 – в пробу добавляли формальдегид)

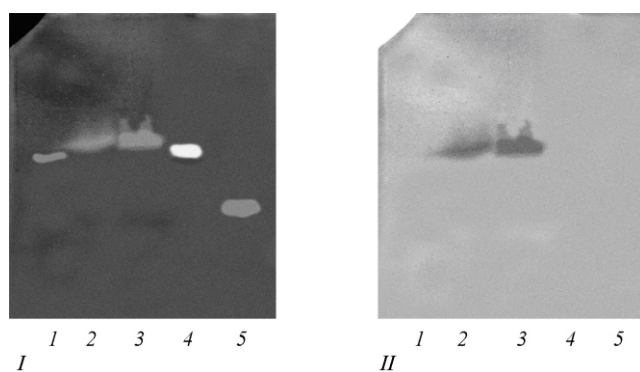


Рис. 5. Электрофорез в 2 %-й агарозе в денатурирующих условиях препаратов РНК из полиэдров В. Время электрофореза 1 ч. I – окраска бромистым этидием по способу 2 (погружение геля в раствор красителя); II – окраска кумасси голубым (I – препарат 2 РНК из полиэдров; 2, 3 – препараты 3 и 4 РНК соответственно; 4 – тРНК из *Escherichia coli*; 5 – синтетический 25-членный олигонуклеотид)

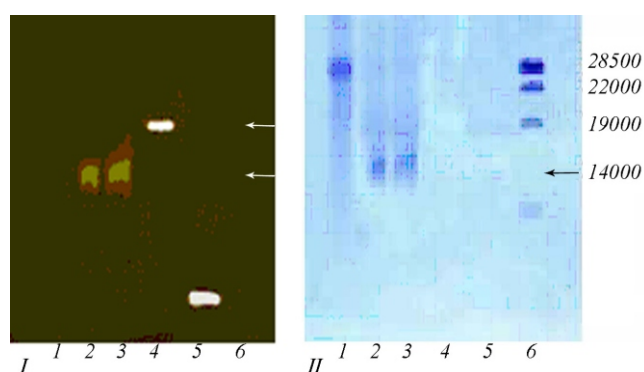


Рис. 6. Электрофорез в 15 %-м ПААГ, содержащем DS-Na и 7 М мочевины, препаратов РНК 3 и 4 из полиэдров В. Время электрофореза 1,5 ч. I – окраска бромистым этидием по способу 2; II – окраска кумасси голубым (I – полиэдрин; 2, 3 – препараты 3 и 4 РНК соответственно; 4 – тРНК из *E. coli*; 5 – синтетический 25-членный олигонуклеотид). Стрелками обозначены положения фрагментов полиэдрина с соответствующими молекулярными массами [10]

тельствует, на наш взгляд, о том, что подвижность полипептида с м. м. 14000 аналогична подвижности РНК из полиэдров. Поскольку подвижность тРНК (м. м. 26000) такая же, как полипептида с м. м. 19000–20000, можно предположить, что м. м. РНК из полиэдров равна 17000–18000 (50–60 нуклеотидов). Эта РНК, скорее всего, принадлежит к классу малых РНК. В полиэдрах может быть не одна, а несколько малых РНК с одинаковой м. м.

Откуда могут появляться в полиэдрах малые РНК? В настоящее время под термином «малые» РНК обычно понимают короткие, длиной 19–28 нуклеотидов, РНК экзогенного и эндогенного происхождения, участвующие в защитных и регуляторных механизмах, регулируя такие процессы, как рост и дифференциация клеток [11, 12], онкогенез [13, 14], развитие эукариотов [15–20], в том числе метаморфоз насекомых [19]. Наиболее обширный класс малых РНК эндогенного происхождения – miR. Первая версия появления miR в полиэдрах – хозяйская. Мы выделяли полиэдры из личинок пятого возраста (полиэдры А и Б), зачастую уже образовавших кокон (полиэдры В). В этот период в организме насекомого происходят значительные физиологические изменения, связанные с переходом личинки в куколку. Понятно, что подобный метаморфоз может регулироваться miR [19], синтезируемой в этот период. В таком случае захват полиэдрами хозяйской miR можно рассматривать как попытку вируса задержать на выгодной для него стадии развитие хозяина, т. е. на стадии, «благоприятной» для максимального накопления полиэдров. Вторая версия появления miR в полиэдрах – вирусная. Дело в том, что гены miR обнаруживаются в геномах крупных ДНК-содержащих вирусов [5]. Функции этих miR в процессе репликации вирусов или во взаимоотношениях вирус–клетка не ясны. Не исключено, что и ДНК ВЯП бакуловирусов может содержать гены miR.

Поскольку кристаллизация полиэдров происходит в ядре, то полиэдрин может захватывать либо первичный (primary) транскрипт miR (pri-miR), либо предшественник (precursor) miR (pre-miR), который процессируется из pri-miR в ядре [21, 22]. Обычно pri-miR могут содержать от сотни до нескольких сотен (даже 1000 и более) нуклеотидов.

Известно, что в качестве pri-miR могут выступать мРНК [23]. Полиэдры включают РНК из 50–60 нуклеотидов, что совместимо с размерами pre-miR (обычно 50–80 нуклеотидов). Вероятно, полиэдры могут избирательно захватывать продукт процессинга pri-miR. Кандидатом на роль pri-miR может выступать мРНК самого полиэдрина – максимальный продукт трансляции в этот период инфекции [24]. С этой точки зрения интересно применить компьютерные технологии для определения наличия miR в гене полиэдрина [25]. Выяснению этого вопроса будет посвящено следующее сообщение из этой серии публикаций.

E. A. Kozlov, M. I. Vudmaska, M. T. Bobrovskaja, T. V. Shirina

Investigation of structure-function interaction of polyhedron of *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV) with polyhedra protease and RNA. 3. Polyhedras contain small RNA

Summary

It was shown that polyhedras of Bombyx mori Nuclear Polyhedrosis Virus contain RNA with molecular weight of 17-18 kDa (50-60 nucleotides). This RNA is likely to belong to the minor RNA class and its origin is discussed.

Key words: nuclear polyhedrosis virus, polyhedra RNA, microRNA.

E. A. Козлов, М. І. Вудмаска, М. Т. Бобровська, Т. В. Шіріна

Дослідження структурно-функціональних взаємодій поліедрину вірусу ядерного поліедрозу тутового шовкопряда (*Bombyx mori*) з протеазою та РНК поліедрів. 3. Поліедри містять малу РНК

Резюме

Показано, що поліедри вірусу ядерного поліедрозу B. mori містять РНК з молекулярною масою 17–18 кДа (50–60 нуклеотидів). Ця, РНК, імовірно, належить до класу малих РНК. Обговорюється її походження.

Ключові слова: вірус ядерного поліедрозу, РНК поліедрів, мікро-РНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козлов Э. А., Согуляева В. М., Левитина Т. Л., Верещак В., Серебряный С. Б. Очистка полиэдренного белка вируса ядерного полиедроза тутового шелкопряда и исследование процессов его ассоциации–диссоциации в растворах // Биохимия.–1969.–**39**, № 4.–С. 679–684.
2. Ruvkun G. Glimpses of a tiny RNA world // Science.– 2001.–**294**.–Р. 797–799.
3. Zamore P. D. Ancient pathways programmed by small RNAs // Science.– 2002.–**296**.– Р. 1265–1269.
4. Krutzfeldt J., Poy M.N., Stoffel M. Strategies to determine the biological function of microRNAs // Nat. Gen.– 2006.–**38**.–S14.
5. Cullen B. R. Viruses and microRNAs // Nat. Gen.–2006.–**38**.–S25.

6. Козлов Э. А., Ниязова Н., Бобровская М. Т., Ширин Т. В. Исследование структурно-функциональных взаимодействий полиэдрина вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) с протеазой и РНК-полиэдров. 2. Влияние протеазы на диссоциацию полиэдрина в процессе гель-фильтрации через Sepharose 6В // Биополимеры и клетка.–2006.–**22**, № 3.–С. 192–200.
7. Hamilton A., Voinnet O., Chappel Z., Baulcombe. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing // EMBO J.–2002.–**21**.–P. 4671–4679.
8. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual.–New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1982.–545 p.
9. Mette M. F., Aufsatz W., van der Winden J., Matzke M. A., Matzke A. J. M. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded // EMBO J.–2000.–**19**.–P. 5194–5201.
10. Kozlov E. A., Levitina T. L., Gusak N. M. The primary structure of baculovirus inclusion body proteins. Evolution and structure-function aspects // Curr. Top. Microbiol. and Immunol.–1986.–**131**.–P. 135–164.
11. Raftopoulou M. MicroRNA signals cell fate // Nat. Cell Biol.–2006.–**8**.–P. 112.
12. Boehm M., Slack F. J. MicroRNA control of lifespan and metabolism // Cell Cycle.–2006.–**5**.–P. 237–240.
13. Cousin J. Cancer biology. A new cancer player takes the study // Science.–2005.–**310**.–P. 766–767.
14. Ruvkun G. Clarification on miRNA and cancer // Science.–2006.–**311**.–P. 36–37.
15. Jover-Gil S., Candela H., Ponce M.R. Plant microRNAs and development // Int. J. Develop. Biol.–2005.–**49**.–P. 733–744.
16. Plasterk R. H. MicroRNA in animal development // Cell.–2006.–**124**.–P. 877–881.
17. Seggerson K., Tang L., Moss E. G. Two genetic circuits repress the *Cenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation // Develop. Biol.–2002.–**243**.–P. 215–225.
18. Sempere L. F., Sokol N. S., Dubrovsky E. B., Berger E. M., Ambros V. Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by normal signals and Broad-Complex gene activity // Develop. Biol.–2003.–**259**.–P. 9–1.
19. Bashirullah A., Pasquinelli A. E., Kiger A. A., Perrimon N., Ruvkun G., Tummel C. S. Coordinate regulation of small temporal RNAs at the onset of *Drosophila melanogaster* metamorphosis // Develop. Biol.–2003.–**259**.–P. 1–8.
20. Carrington J. S., Ambros V. Role of microRNAs in plants and animal development // Science.–2003.–**310**.–P. 336–338.
21. Lee J., Jeon K., Lee J.-T., Kim S., Kim V. N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization // EMBO J.–2002.–**21**.–P. 4663–4670.
22. Zeng J., Ji R., Cullen B. R. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha // EMBO J.–2005.–**24**.–P. 138–148.
23. Cai X., Hagedorn C. H., Cullen B. R. Human microRNA are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNA // RNA.–2004.–**10**.–P. 1957–1966.
24. Okano K., Vanarsdall A. L., Mikhailov V. S., Rohrman G. F. Conserved molecular systems of *Baculoviridae* // Virology.–2006.–**344**.–P. 77–87.
25. Berezikov E., Cuppen E., Plasterk H. A. Approaches to microRNA discovery // Nature Gen.–2006.–**38**.–S2.

УДК 576.858.77

Надійшла до редакції 27.10.07