

10. Dobritsa S. V. Restriction analysis of the *Frankia* spp. genome // FEMS Microbiol. Lett.— 1985.— 29, N 1—2.— P. 123—128.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 479 с.
12. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res.— 1979.— 7, N 6.— P. 1513—1523.
13. Evidence for nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous *Rhizobium* plasmids / M. P. Nuti, A. A. Lepidi, R. K. Prakash et al. // Nature.— 1979.— 282, N 5738.— P. 533—535.
14. Plasmids in *Frankia* sp. / P. Normand, P. Simonet, J. L. Butour et al. // J. Bacteriol.— 1983.— 155, N 1.— P. 32—35.
15. Restriction enzyme digestion patterns of *Frankia* plasmids / P. Simonet, P. Normand, A. Moiroud, M. Lalonde // Plant and Soil.— 1985.— 87, N 1.— P. 49—60.
16. Normand P., Lalonde M. The genetics of actinorhizal *Frankia*: A review // Nitrogen fixation with non-legumes / Eds F. A. Skinner, P. Uomala.— Dordrecht: Martinus Nijhoff Publ., 1986.— P. 429—453.
17. Localization of *nif* genes on a large plasmid in *Frankia* sp. strain ULQ0132105009 / P. Simonet, J. Haurat, P. Normand et al. // Mol. and Gen. Genet.— 1986.— 204, N 3.— P. 492—495.
18. Стародубцева Л. И., Даниленко В. Н., Навашин С. М. Плазмиды и нестабильность генома *Streptomyces* // Антибиотики.— 1984.— 29, № 7.— С. 536—555.
19. Involvement of circular intermediates in the transfer of T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells / Z. Koukoliková-Nicola, R. D. Shillito, B. Hohn et al. // Nature.— 1985.— 313, N 5999.— P. 191—196.
20. Golden J. W., Robinson S. J., Haselkorn R. Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* // Ibid.— 314, N 6010.— P. 419—423.
21. Ligon J. M., Nakas J. P. Isolation and characterization of the genes from *Frankia* that code for the component I proteins of nitrogenase // Nitrogen fixation research progress / Eds H. J. Evans, P. J. Bottomley, W. E. Newton.— Dordrecht: Martinus Nijhoff Publ., 1985.— P. 188.
22. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli* / C. Quinto, H. de la Vega, M. Flores et al. // Nature.— 1982.— 299, N 5885.— P. 724—726.
23. Scolnick P. A., Haselkorn R. Activation of extra copies of genes coding for nitrogenase in *Rhodospseudomonas capsulata* // Ibid.— 1984.— 307, N 5948.— P. 289—292.

Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР,
Пушкино Моск. обл.

Получено 03.06.86

УДК 572.5:576.312

ТРАНСФОРМАЦИЯ *Ltk-aprt*- КЛЕТОК ДНК В СОСТАВЕ РЕКОНСТРУИРОВАННЫХ НУКЛЕОПРОТЕИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Р. А. Захарян, Г. Г. Галстян,
Н. Р. Геворкян, М. Г. Галстян, Л. М. Амирханова

Введение. Перенос гена в клетки млекопитающих привлекает внимание как метод коррекции генетических дефектов *in vitro* и *in vivo* [1, 2]. Ранее Апошьяном [3] и нами [4] сообщалось о конструировании искусственных вирусоподобных частиц (ИВЧ) на основе преформированных капсид вируса полиомы в качестве переносчика гена в клетки эукариот. Было показано, что трансформирующая активность ИВЧ на два порядка выше таковой ДНК в составе Ca^{2+} -преципитата, ДНК-поликативных комплексов [5—7], метафазной хромосомы [8], липосомных везикул [9, 10]. Использование ИВЧ, однако, в ряде случаев ограничено, так как в преформированную капсиду вируса полиомы может быть включена ДНК с молекулярной массой не более $1,2 \cdot 10^6$.

Вместе с тем были получены данные о возможности циркуляции ДНК пневмококка и вируса полиомы в крови без существенной деградации, и что 20-кратное повышение количества введенной в кровь ДНК не меняло количества циркулирующей радиоактивной инфекционно активной ДНК [11]. Это указывает на наличие в крови компонентов, комплексообразование с которыми определяет уровень циркулирующей внеклеточной ДНК крови, недоступной для нуклеазного рас-

щепления. Об этом свидетельствует и обнаружение анионной природы ДНК-связывающих белков плазмы крови [12, 13]. Представлялось целесообразным использовать ДНК-связывающие белки плазмы крови анионной природы в качестве фактора самосборки нуклеосомоподобных структур и изучить эффективность переноса гена в клетки млекопитающих в составе реконструированных нуклеосомоподобных структур. Тот факт, что некоторым из ДНК-связывающих белков крови присуща избирательная способность проникать в клетки определенных тканей, опухолей путем обусловленного рецепторами эндоцитоза [14], дает основание надеяться применять их в качестве целенаправленного переносчика ДНК. Нуклеосомная упаковка ДНК в хроматине может рассматриваться как одна из возможных структур, способных обеспечить процесс переноса ДНК через плазматическую мембрану. В ряде случаев была продемонстрирована относительная эффективность процесса трансформации с помощью переноса ДНК в составе метафазных хромосом [8].

Материалы и методы. Выделение ДНК-связывающих белков анионной природы из плазмы крови мышей проводили после предварительной очистки сыворотки на QAE-сефадексе А-50 [12] методом аффинной хроматографии на колонке ДНК-целлюлозы [15]. В экспериментах по реконструированию нуклеосом использован тотальный препарат ДНК-связывающих белков сыворотки крови.

Реконструирование нуклеосомоподобных структур. В реконструировании нуклеосомоподобных структур использованы гистоны H2A, H2B, H3 и H4, выделенные из печени мышей по методу, описанному в работе [16]. Концентрацию кор гистонов определяли спектрофотометрически: $A_{230} = 4,2$ и $A_{280} = 0,43$ соответствуют 1 мг кор гистонов в 1 мл [17]. Концентрацию ДНК определяли исходя из того, что $A_{260} = 20,0$ для 1,0 мг ДНК в 1 мл. Самосборку нуклеосомоподобных комплексов проводили в буферном растворе А (10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,15 М NaCl, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид (ФСФ), 0,2 мМ Na₂ЭДТА) при соотношении гистоны: ДНК-связывающие белки : ДНК, равном 1,5 : 5 : 1. Гистоны смешивали с ДНК-связывающими белками плазмы крови в соотношении 1,5 : 5 в 10 мМ трис-НСl-буфере, рН 8,0, содержащем 2 М NaCl, 0,2 мМ Na₂ЭДТА, 0,25 мМ ФСФ, и диализовали 12 ч против буфера А при трехкратной его смене.

Реконструирование нуклеопротеидного комплекса проводили в буфере А в полиэтиленовых пробирках: к 20 мкл ДНК (1 мг/мл) добавляли комплекс гистоны : ДНК-связывающие белки в соотношении гистоны : белки : ДНК, равном 1,5 : 5 : 1; конечный объем смеси доводили до 200 мкл; смесь инкубировали при 37 °С в течение 3 ч. Полученные комплексы пропускали через колонку с сефарозой-4В, уравновешенную буфером А; реконструированные нуклеосомоподобные комплексы элюировали в свободном объеме.

Хроматин, освобожденный от H1- и H5-гистонов был получен по [18] и обработан микрококковой нуклеазой по [19].

Культура клеток. Культура клеток *Ltk-aprt⁻* получена из Всесоюз. коллекции культур Ин-та цитологии АН СССР. Клетки содержали в среде DMEM с 10 %-ной бычьей сывороткой и 50 мкг/мл диаминпурина.

Перед трансформацией клетки выращивали в отсутствие диаминпурина, повторно рассевали в соотношении 1 : 4 в среде DMEM с 10 %-ной бычьей сывороткой в количестве $0,5 \cdot 10^6$ клеток на чашку. Для трансформации использовали тотальную нативную и рестрицированную эндонуклеазами *HindIII* и *BamHI* ДНК печени кролика в количестве 20 мкг на 10^6 клеток в составе Ca²⁺-преципитата и реконструированной нуклеосомоподобной структуры, использованной также в виде Ca²⁺-преципитата.

Для отбора *tk⁺*-трансформантов клетки выращивали на селективной среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин, тимидин [1]; для селекции *aprt⁺*-клонов трансформированные клетки рассевали в среде, содержащей 0,05 мМ азасерин и 0,1 мМ аденин. Колонии выросших клонов *tk⁺* и *aprt⁺* подсчитывали через 20 дней.

Электронно-микроскопическое исследование реконструированных нуклеосом (коровые глобулы) проводили по методу, описанному в работе [17].

Продукты расщепления ДНК-протеидного комплекса микрококковой нуклеазой анализировали электрофорезом в 3 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ) и 0,5 %-ной агарозе.

Результаты и обсуждение. Процесс самосборки хроматина из ДНК и гистонов в присутствии некоторых ДНК-связывающих кислых белков в качестве стимуляторов описан в работах [16, 21].

Мы изучили способность кислых ДНК-связывающих белков плазмы крови стимулировать в физиологических условиях самосборку нуклеосом из гистонов и очищенной ДНК. В буфере А при близкой к

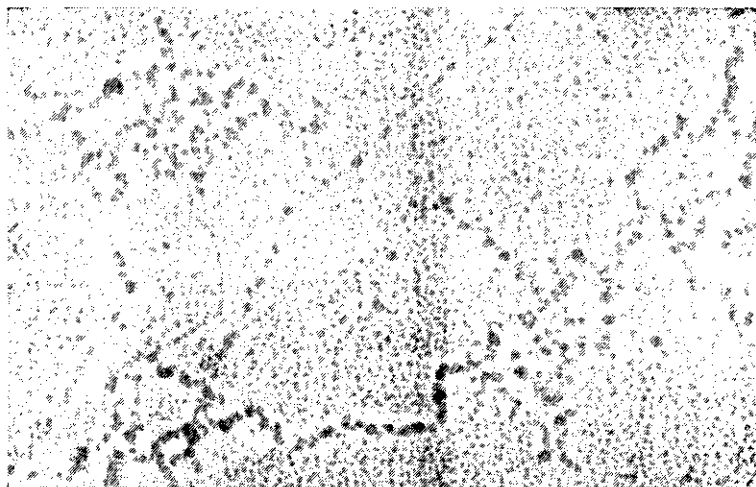


Рис. 1. Электронная микрофотография реконструированных в нуклеосомоподобные комплексы молекул геномной ДНК печени кролика. Ув. $200 \cdot 10^3$

Fig. 1. Electron microscopy study of reconstructed nucleosomes in the presence of histones, DNA-binding proteins from plasma, DNA from the rabbit liver. Magnification 200×10^3

физиологической ионной силе гистоны, добавленные к ДНК, вызвали необратимую преципитацию нуклеопротеидных структур, что было ранее показано и в других работах [22, 23]. В системе самосборки нуклеосом, описанной в методах, взаимодействие комплекса гистоны — кислые белки с ДНК не приводило к преципитации ДНК, наблюдалось некоторое помутнение смеси, которая к 3 ч инкубации просветлялась. Полученные ДНК-белковые комплексы после очистки через сефарозу 4В, были изучены с помощью электронной микроскопии. На рис. 1 показано, что кислые ДНК-связывающие белки плазмы крови действительно способствуют реконструкции нуклеосомоподобных комплексов в

Таблица 1

Трансформация *Ltk⁻aprt⁻*-клеток тотальной геномной ДНК кролика в составе Ca^{2+} -преципитата и реконструированного нуклеопротеидного комплекса
The transformation *Ltk⁻aprt⁻* cells by rabbit total genome DNA in a composition of Ca^{2+} -precipitate and reconstructed nucleoprotein complex

Геномная ДНК кролика	Число <i>tk⁺</i> -колоний на три чашки	Число <i>aprt⁺</i> -колоний на три чашки
Ca^{2+} -преципитат	24	9
	31	7
	46	6
Нуклеопротеидный комплекс	228	94
	290	81
	342	73

Таблица 2

Трансформация *Ltk⁻aprt⁻*-клеток геномной ДНК кролика, расщепленной эндонуклеазой рестрикции и реконструированной в нуклеопротеидные комплексы
The transformation *Ltk⁻aprt⁻* cells by rabbit genome DNA, restricted by endonucleases and reconstructed into nucleoprotein complexes

Эндонуклеаза	Число <i>tk⁺</i> -колоний на чашку	Число <i>aprt⁺</i> -колоний на чашку
<i>HindIII</i> *	85	26
<i>BamHI</i>	0	0

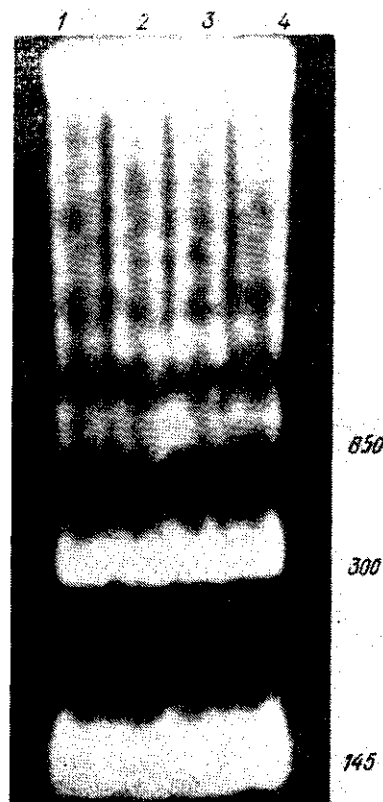
* Среднее из трех чашек для каждого эксперимента.

условиях низкой ионной силы. Глобулярные частицы, обнаруживаемые вдоль молекулы ДНК, морфологически близки к нуклеосомным комплексам, обнаруживаемым при электронно-микроскопическом изучении хроматина [24]. Формирование нуклеосомоподобных структур подтверждено данными нуклеазного расщепления полученных комплексов. Представленные на рис. 2 результаты свидетельствуют о том, что в реконструированных нуклеопротеидных структурах наименьшая величина фрагмента ДНК, защищенного от воздействия микрококковой нуклеазы, равна 140 парам оснований, что соответствует величине ДНК из интактной «коровой» нуклеосомной частицы. Обнаруженные гомогенные полосы более высокой молекулярной массы также указывают на формирование реконструированных комплексов с упорядоченной структурой.

В следующей серии экспериментов изучена биологическая активность реконструированных комплексов. Результаты, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о том, что полученные в работе нуклеосомоподобные комплексы биологически активны, причем трансформирующая активность ДНК в составе этих комплексов на порядок выше по сравнению с ДНК в составе Ca^{2+} -преципитата. Данные табл. 2 подтверждают трансформирующую активность ДНК в составе реконструированных нуклеопротеидных

Рис. 2. Электрофорез в 3 %-ном ПААГ и 0,5 %-ном агарозном геле фрагментов ДНК (пары оснований), выделенных из нуклеосомоподобных комплексов, обработанных микрококковой нуклеазой: 1 — хроматин, освобожденный от H1- и H5-гистонов (маркер); 2—4 — ДНК-белковые комплексы, полученные в трех отдельных экспериментах по реконструкции

Fig. 2. Micrococcal nuclease digestion of the products of in vitro assembly. Deproteinized DNA electrophoresis in 3% PAAG-0.5% agarose gel; DNA fragments of 140 b. p. were protected.



комплексов: геномная ДНК кролика, расщепленная эндонуклеазами *HindIII* или *BamHI* и реконструированная в нуклеосомоподобные комплексы, сохраняла свою трансформирующую активность в зависимости от отсутствия (*HindIII*) или наличия (*BamHI*) сайта рестрикции внутри генов *tk⁻* и *aprt⁻* [27]. В экспериментах по трансформации активность комплекса ДНК — ДНК-связывающие белки была низкой, в среднем 1—2 колонии на чашку. Добавление гистонов к ДНК, как указывалось выше, вызывало необратимую преципитацию образовавшегося комплекса ДНК — гистон, который не обладал трансформирующей активностью.

В данном сообщении продемонстрирована принципиальная возможность использования кислых ДНК-связывающих белков плазмы крови для реконструкции нуклеосомоподобных структур на основе индивидуальных генов и трансформации полученными комплексами клеток млекопитающих.

Можно допустить, что нуклеосомоподобная упаковка облегчает преодоление ДНК барьеров плазматической, ядерной мембран и создает благоприятные условия для комбинационных процессов; гистоны также могут способствовать в силу своей нуклеофильности миграции комплекса из цитоплазмы в ядро.

В настоящее время описан целый ряд факторов, стимулирующих самосборку «коровой» нуклеосомной глобулы из ДНК и гистонов [16, 21, 22, 25, 26]. По нашим предварительным данным, нуклеосомная упаковка ДНК независимо от природы факторов самосборки достаточна для относительно более эффективного переноса ДНК в клетки и трансформации. Вместе с тем природа фактора самосборки способна обеспечить селективное преимущество в переносе гена через плазматические мембраны и трансформации клеток определенных тканей; например, нами уже получены данные о том, что кислые ДНК-связывающие белки плазмы, нуклеоплазмин и трансферрин, в составе комплекса с ДНК и «коровой» нуклеосомой существенно повышают уровень трансформации миелоидных клеток костного мозга, по-видимому, за счет обусловленного рецепторами эндоцитоза.

TRANSFORMATION OF LTK-APRT- CELLS BY DNA ASSEMBLED IN NUCLEOPROTEIN COMPLEXES

R. A. Zakharian, G. G. Galstian, N. R. Gevorkian, M. G. Galstian, L. M. Amirhanova
Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Summary

The nucleosome reconstitution was carried out in the presence of DNA, histones and anionic DNA-binding proteins of blood plasma, which serve as a stimulator of self-assembly process. The least sizes of DNA fragment protected from the micrococcal nuclease action corresponds to the DNA value from intact core nucleosome particle.

Reconstructed complexes are biologically active in transformation of eukaryotic cells (*Ltk-aprt*⁻).

1. Shews T. B., Sakaguchi A. Y. Gene transfer and mapping in mammalian cells in culture // *In vitro*.— 1980.— 11, N 1.— P. 55—76.
2. Insertion of drug resistance genes in animals / M. Bar-Eli, K. E. Mercola, D. J. Slamon et al. // *J. Cell. Physiol.*— 1982.— 111, N 1.— P. 213—217.
3. Stilaty S. N., Aposhian H. V. Gene-transfer by polyoma-like particles assembled in a cell free system / *Science*.— 1983.— 220, N 4598.— P. 725—727.
4. Захарян Р. А., Гаспарян Э. Т., Апошян В. Г. Транспорт гена β-лактамазы в составе искусственных вирусоподобных частиц в клетки человека и его экспрессия // *Биол. журн. Армении*.— 1982.— 35, № 9.— С. 730—733.
5. Pellicer A., Wigler M., Axel R. The transfer and stable integration of the HSV thymidine kinase gene into mouse cells // *Cell*.— 1978.— 14, N 1.— P. 133—141.
6. Milman G., Herrberg M. Efficient DNA transfection and rapid assay for thymidine kinase activity and viral antigenic determinants // *Somatic Cell Genet.*— 1981.— 7, N 2.— P. 161—170.
7. Farber F. E., Eberle R. Effects of cytochalasin and alkaloids drugs on the biological expression of HSV DNA // *Exp. Cell Res.*— 1976.— 103, N 1.— P. 15—22.
8. Miller C. L., Ruddle F. H. Cotransfer of human X-linked markers into murine somatic cells via isolated metaphase chromosome // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1978.— 75, N 7.— P. 3345—3350.
9. Liposomes as carriers for gene transfer in vivo / C. Nicolau, Ph. Soriano, C. le Pape et al. // *Biol. Cell*.— 1983.— 47, N 1.— P. 121—129.
10. Schaeffer-Ridder M., Wang Yuan, Hofschneider P. A. Liposomes as a gene carriers: efficient transformation of mouse L-cells by thymidine kinase gene // *Science*.— 1982.— 215, N 4526.— P. 166—168.
11. Bendich A., Vilcrok T., Borenfreund E. Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis // *Ibid.*— 1965.— 148, N 3668.— P. 374—376.
12. Brehm S. P., Hoch S. O., Hoch J. A. DNA-binding proteins in human serum // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*— 1975.— 63, N 1.— P. 24—31.
13. The fractionation and isolation of DNA-binding proteins from human serum / A. A. Siddiqui, R. H. Jeremy, H. Davies, J. A. Hill // *Biochem. Soc. Trans.*— 1979.— 7, N 5.— P. 1088—1089.
14. Hemmaphard D., Morgan E. H. Transferrin uptake and release by reticulocytes treated with proteolytic enzymes and neuramidase // *Biochim. et biophys. acta*.— 1976.— 426, N 2.— P. 385—393.
15. Litman R. M. A deoxyribonucleic acid polymerase from *Micrococcus luteus* isolated on deoxyribonucleic acid-cellulose // *J. Biol. Chem.*— 1968.— 243, N 23.— P. 6222—6233.
16. Rat liver HMG1: a physiological nucleosome assembly factor / C. Bonne-Andrea, F. Harper, J. Sobczak, A. M. DeRecondo // *The EMBO J.*— 1984.— 3, N 5.— P. 1193—1199.

17. *Thomas J. O., Butler P. J. G.* Characterization of the octamer of histones free in solution // *J. Mol. Biol.*— 1977.— **116**, N 4.— P. 769—781.
18. *Libertini L. J., Small E. W.* Salt induced transitions of chromatin core particles studied by tyrosine fluorescence anisotropy // *Nucl. Acids Res.*— 1980.— **8**, N 16.— P. 3517—3533.
19. *Lutter L. J.* Kinetic analysis of DNAase I cleavages in the nucleosome core: evidence for a DNA superhelix // *J. Mol. Biol.*— 1978.— **124**, N 2.— P. 391—420.
20. *Hayashi K.* Distribution of histone F1 on calf thymus nucleosome DNA // *Ibid.*— 1975.— **94**, N 2.— P. 397—402.
21. *Nucleosomes* are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA / *R. A. Laskey, B. M. Honda, A. D. Mills, J. T. Finch* // *Nature.*— 1978.— **275**, N 5679.— P. 416—420.
22. *Stein A., Whitlock J. P., Bina M.* Acidic polypeptides can assemble both histones and chromatin *in vitro* at physiological ionic strength // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1979.— **76**, N 10.— P. 5000—5004.
23. *Ruiz-Cattilo A., Jorcano J. L., Eder G.* *In vitro* core particle and nucleosome assembly at physiological ionic strength // *Ibid.*— N 7.— P. 3284—3288.
24. *Landmore J. P., Wooley J. C.* Chromatin architecture: investigation of a subunit of chromatin by dark field electron microscopy // *Ibid.*— 1975.— **72**, N 7.— P. 2091—2095.
25. *Laskey R. A., Earnshaw W. C.* Nucleosome assembly // *Nature.*— 1980.— **286**, N 5775.— P. 763—767.
26. *Nelson T., Wiegand K., Brutlag D.* Ribonucleic acid and other polyanions facilitate chromatin assembly *in vitro* // *Biochemistry.*— 1981.— **20**, N 9.— P. 2594—2601.
27. *DNA* mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells / *M. Wigler, A. Pellicer, S. Silverstein et al.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1979.— **76**, N 3.— P. 1373—1376.

Ил-т эксперим. биологии АН АрмССР, Ереван

Получено 21.01.86