

1. Арцруни Г. Г. Канд. дисс., М., 1973.
2. Арцруни Г. Г., Вардапетян Р. Р. Тез. докл. мол. уч. по органическому синтезу и биорганической химии, посвящ. XXV съезду КПСС, 70, Ереван, 1976.
3. Василеску Д. В кн.: Физико-химические свойства нуклеиновых кислот, 50, М., 1976.
4. Катрушенко А. Г. Канд. дисс., Л., 1968.
5. Киттель Е. В кн.: Введение в физику твердого тела, 380, М., 1978.
6. Ладик Я. В кн.: Квантовая биохимия для химиков и биологов, 122, М., 1975.
7. Мкртчян С. Л., Арцруни Г. Г. Биолог. ж. Армении, 31, 7, 750, 1978.
8. Портнов Ф. Г. В кн.: Проблемы клинической биофизики. Рига, 1972.
9. Портнов Ф. Г. В кн.: Проблемы клинической биофизики. Рига, 1978.
10. Роман А. П. Канд. дисс., Томск, 1976.
11. Hill T. L. J. Amer. Cam. Soc., 8, 2142, 1958.
12. Hill T. L. Proc Natl. Acad. Sci USA, 58, 11, 1967.
13. Duchesne J., Depireux J., Bertinehamps A., Cornet N., van der Kaa J. M. Nature, 188, 405, 1960.
14. Möse J., Schug S., Fischer G. Biomed Techn, 17, 2, 55, 1972.
15. O'Konski C. T., Shirai M. Biopolymers, 1, 557 1963.
16. Subertova E., Prosser V., Drobnik J. Biopolymers, 8, 421, 1969.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 9, 1982

УДК 577.21

ТРАНСПОРТ ГЕНА β -ЛАКТАМАЗЫ В СОСТАВЕ ИСКУССТВЕННЫХ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ В КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ЭКСПРЕССИЯ

Р. А. ЗАХАРЯН, Э. Т. ГАСПАРЯН, Г. В. АПОШЯН

Фрагмент гена плазмиды PBR 322, кодирующий пенициллиновую β -лактамазу, был выделен рестрикцией ДНК PBR 322 эндонуклеазами EcoRI, Bgl и Bam HI. Ген β -лактамазы в составе фрагмента $0,57 \cdot 10^6$ d был включен в присутствии гистонов в преформированную капсиду вируса полиомы с формированием стабильной искусственной вирусоподобной частицы (ИВЧ), в которой ДНК защищена от действия нуклеаз. Инкубация ИВЧ с культурой клеток человека способствует транспорту гена β -лактамазы в клетки. В экстракте трансформированных клеток обнаружена β -лактамазная активность. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ИВЧ является эффективным ген-переносчиком для трансплантации гена в клетки человека.

Ключевые слова: ген-транспорт, искусственная вирусоподобная (полиомоподобная) частица, ген β -лактамазы.

Апошяном и сотрудниками [6] показано, что псевдовирioны полиомы могут служить ген-трансплантирующей системой для транспорта ДНК в ядра мышинных и человеческих клеток. Однако в клетках, при

§ Капсиды вируса полиомы, ассоциированные с гистонами, были получены и электрофоретически анализированы в ПААГ Р. А. Захаряном у проф. Г. Апошяна в Отделе клеточной эволюционной биологии Университета Аризоны, США

сборке псевдовиреонов, в результате энзиматической фрагментации клеточной ДНК в псевдовиреоны включается статистически вероятный набор фрагментов с молекулярной массой $3,5 \times 10^6$ d от генома эукариотической клетки 2×10^{12} d; следовательно, мала вероятность обнаружения экспрессии какого-либо индивидуального гена, транспортированного в составе псевдовиреонов.

Осуществление полноценной по спектру протеинов сборки псевдовиреонов вируса полиомы в бесклеточной системе *in vitro* на основе гомогенного набора участка ДНК по определенному гену позволит осуществить возможную трансплантацию и экспрессию генов, транспортированных в составе вириона, в клетки млекопитающих и человека.

Дальнейшее изучение процесса реконструкции, самосборки псевдовиреонов полиомы в бесклеточной системе было проведено Апошняном и сотр. с ДНК вируса полиомы [2], Апошняном и Захаряном—с ДНК вируса SV-40, фага λ , ДНК тимуса и вируса простого герпеса [1]; было показано, что в определенных условиях из капсиды вируса полиомы и ДНК вируса полиомы, SV-40, фага λ , ДНК тимуса и вируса простого герпеса реконструируется искусственная вирусоподобная частица с инкапсидированной в преформированной капсиде линейной двухцепочечной ДНК с молекулярной массой $1,1 \times 10^6$ d.

Нами сконструирована искусственная вирусоподобная частица (ИБЧ) из капсиды вируса полиомы и гена пенициллин-ной β -лактамазы и изучена возможность транспорта в составе ИБЧ функционально активного фрагмента ДНК-гена β -лактамазы и его экспрессия в клетки человека.

Материал и методика. Клетки Са OV (раковые клетки женских яичников) культивировались на среде 199 с 10%-ной бычьей сывороткой в присутствии антибиотиков. Рассев клеток производили через каждые 7 дней по 300000 клеток на флакон Кареля со сменой питательной среды на 3-и сут.

ДНК плазмиды РВ 322 получена стандартным методом. Выделение фрагмента ДНК РВР 322, несущего ген β -лактамазы производилось так: ДНК плазмиды РВР 322 разрезали эндонуклеазами рестрикции *EcoRI*, *BglI* и *BamHI*; фрагмент ДНК РВР 322 в $0,57 \times 10^6$ d, несущий ген β -лактамазы, изолировали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле, элюировали из агарозы электрофоретически и отмечали радиометкой [P^{32}] методом *pick-translation* [4].

Препарация и очистка пустых капсидов вируса полиомы описана ранее [1, 2]. Формирование ИБЧ осуществляли так, как описано ранее [1], за исключением того, что ген β -лактамазы был включен в капсиду вируса полиомы в присутствии гистонов H3, H2B, H2A, H4, ассоциированных с капсидными белками; анализ реакционной смеси проводили фракционированием в градиенте сахарозы 10—22%, приготовленном в 0,01 М трис-0,15 М NaCl (pH 7,5). Седиментация в градиенте сахарозы проводилась на ультрацентрифуге УАС-601 при 25000 об/мин, 2 ч при 4°.

Инфекция культуры клеток ИБЧ. Предварительно монослой клеток промывали дважды 4 мл буфера PBS, содержащего 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. ИБЧ добавляли к монослою в буфере PBS и клетки инкубировали в течение 120 мин, после чего среду, содержащую ИБЧ, удаляли и клеточный монослой дважды промывали; к промытому монослою добавляли 5 мл среды Игла, содержащей 10% бычьей сыворотки, и монослой клеток инкубировали 24 ч при 37°.

Для определения β -лактамазной активности после 24 ч инкубации при 37° 10⁻⁷ клетки снимали и осаждали центрифугированием, ресуспендировали и в 1 мл PBS (pH 7,0), обрабатывали ультразвуком, гомогенизировали и обрабатывали 1%-ным тригоном X-100. Надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования клеточной суспензии при 10000 об/мин 10 мин 4°, использовали в реакции с 10⁻⁴ М цефалоспорином [5, 8].

Спектры цефалоспорины и открытого β -лактамазного кольца были сняты на спектрофотометре «Мом» (Венгрия).

Результаты и обсуждение. ДНК плазмиды PBR 322 была фрагментирована эндонуклеазами рестрикции EcoR I, Bgl I, BamH I. Полученные фрагменты ДНК с мол. массой 1,560; 0,570; 0,320 и 0,195 мегадальтон были фракционированы электрофорезом в 1%-ном агарозном геле (рис. 1). Фрагмент ДНК в 0,570 мд, соответствующий 875 парам оснований ДНК, кодирующих

224 аминокислотных остатка структурного гена β -лактамазы [7], был изолирован в количестве 10 мг ДНК и использован в реакционной смеси для самосборки искусственной вирусоподобной частицы.

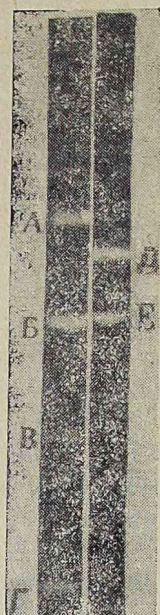


Рис. 1.

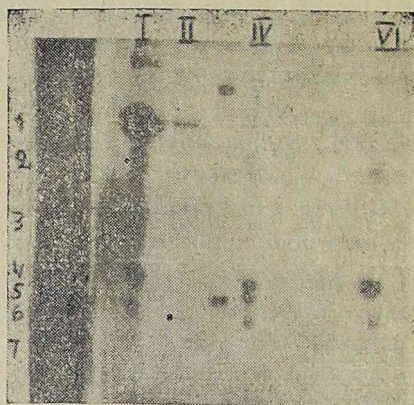


Рис. 2.

Рис. 1. Электрофорез в 1,4%-ном агарозном геле фрагментов ДНК PBR 322, рестрицированной EcoR I, Bgl I, BamH I; фрагменты, мегадальтон: А—1,560; Б—0,570; В—0,320; Г—0,195; Д и Е—фрагменты ДНК SV-40, рестрицированные Hpa II/Pst I в 1,116 и 0,640 мд соответственно. Рис. 2. Электрофорез фракций капсид в 15%-ном ПААГ по Лаеммли; I—1, 2, 3—капсидные белки УР1, 2, 3, 4, 5, 6, 7—гистоны Н2А, Н2В, Н₃ и Н₄; II—очищенная капсида; III—маркеры Н2А, Н2В, Н₃; IV—маркеры Н2А, Н2В, Н₃, выделенные в лаборатории из печени мышей.

В литературе имеется ряд доказательств того, что гистоны в комплексе с белками капсиды вируса полиомы выполняют роль факторов рекогниции, ответственных за транспорт полноценного вируса или псевдовироиона в ядро клетки [3, 8]. Для конструирования ИВЧ нами была использована ассоциированная с гистонами фракция пустых капсид вируса полиомы, сепарированная в градиенте плотности C_2 CI pI, 29 г/см³.

Электрофоретический анализ данной фракции в 15%-ном полиакриламидном геле в системе Лаеммли позволил идентифицировать составные белковые компоненты, использованные в самосборке ИВЧ. Это—капсидные белки УР-1, 2, 3 и гистоны Н₃, Н2В, Н2А и Н₄ (рис. 2).

Анализ реакционной смеси для самосборки искусственного псевдовirusа, состоящей из капсид, гистонов и ДНК-гена β -лактамазы, в градиенте сахарозы свидетельствует о том, что 30% использованной радио-метки ^{32}P ДНК включается в состав пустой капсиды вируса полиомы в форме искусственного псевдовirusа. ИВЧ в данном эксперименте включает 30% от первоначальной радиоактивности в отличие от ранее полученного результата (5%) [1], что свидетельствует о стимулирующей роли гистонов, идентифицированных как H2A, H2B, H3 и H4, в самосборке ИВЧ. Гистоны, ассоциированные с капсидой вируса, хотя и имеют клеточное происхождение, однако отличаются от последних уровнем фосфорилирования и ацетилирования. Надо полагать, что эти химические модификации гистонов существенны в обеспечении специфичности их взаимодействия с белками пустой капсиды вируса полиомы и ДНК в процессе самосборки ИВЧ.

Полученные ИВЧ, несущие ген β -лактамазы, были использованы в «инфицировании» культуры клеток человека с целью передачи гена, экспрессии нового фермента, отсутствующего в клетках эукариот [5].

Результаты показывают, что через 2 ч после контакта ИВЧ с культурой 80% радиоактивности находится в форме, связанной с клетками, через 24 ч эта величина снижается до 30%. Эти данные превышают величины, полученные другими эффективными на сегодня методами транспорта генетического материала в клетки эукариот: кальций-фосфатным и методом липосом [8, 10].

Биологическая активность β -лактамазы в синтезе фермента в трансформированных клетках человека была тестирована спектрофотометрически по Каллагану [5]. Метод основан на том, что фермент β -лактамазы разрывает β -лактамазное кольцо хромогенного цефалоспорина и резко сдвигает максимум поглощения данного соединения от 400 мкмк в зону 500 мкмк. Экстракты культуры клеток CaOV через 24 ч после контакта с ИВЧ имели ферментативную активность, идентичную или близкую к β -лактамазе. Контрольные тесты на β -лактамазную активность с культурой клеток и с питательной средой культуры клеток через 2 ч после контакта с ИВЧ были отрицательными.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что гистоны в значительной степени стимулируют самосборку ИВЧ, несущую ген β -лактамазы, и что ИВЧ является эффективной ген-транспортной системой для передачи клеткам нового фенотипа.

Насколько стабильна данная трансформация и является ли она результатом интеграции введенного извне гена в ДНК клетки? Эти вопросы представляют принципиальный интерес и находятся в процессе исследования.

Авторы благодарят к. м. н. Казарян К. А. за предоставление культуры клеток CaOV.

Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР

Поступило 5.IV 1982 г.

β—ԼԱԿՏԱՄԱՋ ԳԵՆԻ ՏՐԱՆՍՊՈՐՏԸ ԱՐԶԵՍԱԿԱՆ ՎԻՐՈՒՍԱՏԻՊ
ՄԱՍՆԻԿՆԵՐԻ ԿԱԶՄՈՒՄ ԴԵՊԻ ՄԱՐԴՈՒ ԲՋԻՋՆԵՐԸ
ԵՎ ՆՐԱ ԷՔՍՊՐԵՍԻԱՆ

Ռ. Ա. ԶԱԽԱՐԻԱՆ, Է. Տ. ԳԱՍՊԱՐԻԱՆ, Հ. Վ. ԱՊՈՇԻԱՆ

PBR 322 պլազմիդի գենի β—լակտամազ կոդավորող հատվածը ստացվել է ԴՆԹ-ի ռեստրիկցիայի եղանակով: β—լակտամազի գենը $0,57 \cdot 10^6$ d հիստոնների առկայությամբ ներառվել էր պոլիոմայի վիրուսի վերակառուցված կապսիդի մեջ, ստաբիլ արհեստական վիրուսատիպ մասնիկի առաջացմամբ (ԱՎՄ):

ԱՎՄ-ի ինկուբացիան մարդու բջջային կուլտուրայի հետ նպաստում է β—լակտամազի գենի տրանսպորտին (անցմանը) բջջի մեջ:

Վերափոխված բջիջների էքստրակտի մեջ հայտնաբերված է β—լակտամազի ակտիվություն:

TRANSPORT OF β-LACTAMASE GENE INTO HUMAN
CELLS BY PLP AND ITS EXPRESSION

R. A. ZAKHARIAN, E. T. GASPARIAN, H. V. APOSHIAN

A restriction fragment $0,57 \cdot 10^6$ d, which encodes for β-lactamase activity as a part of PBR 322 DNA, was isolated and entrapped in polyoma empty capsid in the presence of H3, H2B, H2A. H4 histones with the formation of a stable polyoma-like particles (PLP). The incubation of the PLP with human cultured cells results in the uptake of DNA with high efficiency.

Extracts of the transformed cells show β-lactamase activity. The results obtained indicate that PLP acts as effective genecarriers for human cells.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Aposhian H., Zakharian R. A. *Advances in Enzyme Regulation*, 18, 275, 1980.
2. Barr S. M., Keck K., Aposhian H. V. *J. Virology*, 96, 656, 1979.
3. Mac Kay R. L., Consigli R. A. *J. Virology*, 19, 620, 1976.
4. Maniatis T., Jeffrey A., Kleid D. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1184, 1975.
5. O Callaghan C. H., Morris A., Kirby S. M., Shingler A. H. *Antimicrob. Agents Chemotherap*, 1, 283, 1972.
6. Qasba P. K., Aposhian H. V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 1945, 1971.
7. Sutcliffe J. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 9797, 1978.
8. Tai-Kin Wonge, Nicolau C., Hofschneider P. H. *Gene*, 10, 87, 1980.
9. Trost E., Bourgaus P. *J. Virology*, 68, 245, 1975.
10. Wigler M., Sweet R., Sin G. K., Axel R. *Cell*, 16, 777, 1979.