

УДК 572.5.576.312.

БИОХИМИЯ

Р. А. Захарян, Г. Г. Галстян, М. К. Варданян, Н. Т. Гаспарян

Экспрессия гена тимидинкиназы HSV-I в составе
реконструированных нуклеосом в клетках костного мозга

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР К. Г. Карагезяном 9/XI 1988)

Восвобождение генетического материала в околоклеточную среду имеет место в различных тканях. Источником экзогенного генетического материала, в частности, служат клетки лимфоидного ряда, количество которых в тканях в 40 раз превышает их число в крови, клетки костного мозга и периферической крови, тканевые макрофаги. В организме взрослого человека в костном мозге ежедневно продуцируется 2×10^{11} клеток эритроцитов в результате дифференцировки такого же количества ортохромных и нормобластов в ретикулоциты, сопровождающейся карнорексисом и выталкиванием ядерного и другого нуклеопротеидного материала в околоклеточную среду костного мозга.

Данные, полученные нами (¹⁻³), показали, что взаимодействие полимеров ДНК, РНК, ДНК-протеидных комплексов с плазматической мембраной нейрональной клетки, клеток костного мозга, нейтрофилов, фибробластов индуцирует в клетке прежде всего мембранные эффекты: повышение уровня цАМФ, входа экстрацеллюлярного Ca^{2+} , а в случае двуниевых РНК и повышение в клетке уровня 2—5-олигоаденилата. Повышение уровня ионов Ca^{2+} сопровождается активацией фосфолипазы A_2 и накоплением в мембране клетки лизолецитинов и ненасыщенных жирных кислот (²⁻⁴). Индуцированные в плазматической мембране клетки изменения подготавливают процесс интернализации ДНК, РНК в клетку на фоне относительно высокого уровня фосфорилирования компонентов плазматической мембраны и повышения подвижности в фосфолипидном бислое мембран. Одновременно в экспериментах *in vitro* нами (⁵), а затем и другими (⁶) было показано, что реконструированные нуклеопротеидные комплексы биологически активны в ДНК-опосредованной трансформации клеток млекопитающих.

Очевидно, что нуклеосомная упаковка ДНК в хроматине может рассматриваться как одна из возможных структур, способная обеспечить перенос ДНК через плазматическую мембрану в процессе ее реутилизации *in vivo*, и может быть использована для получения доказательства возможности ДНК-опосредованной трансформации клеток костного мозга в условиях *in vivo*.

Клетки костного мозга получали от мышей линии С 3Н в среде Mc-Coу-5А с 15%-ной сывороткой теленка, содержащей гепарин. 10^7 клеток в 1 мл среды инкубировали с ИВЧ, реконструированными ну-

клеосомами, Са-преципитатом ДНК, которые добавляли прямо в среду из расчета 10 мкг [^3H] ДНК (12000 имп мин/мкг) на 10^5 клеток. Через 2, 4, 6 и 24 ч инкубации клетки обрабатывали ДНКазой 50 мкг/мл 30 мин 37°C , дважды промывали раствором «PBS». Субклеточные фракции клеток костного мозга выделяли по методу, описанному в работе (7), распределение [^3H] ДНК в субклеточных фракциях измеряли в сцинтилляторе в радиосчетчике SL-30 (Франция).

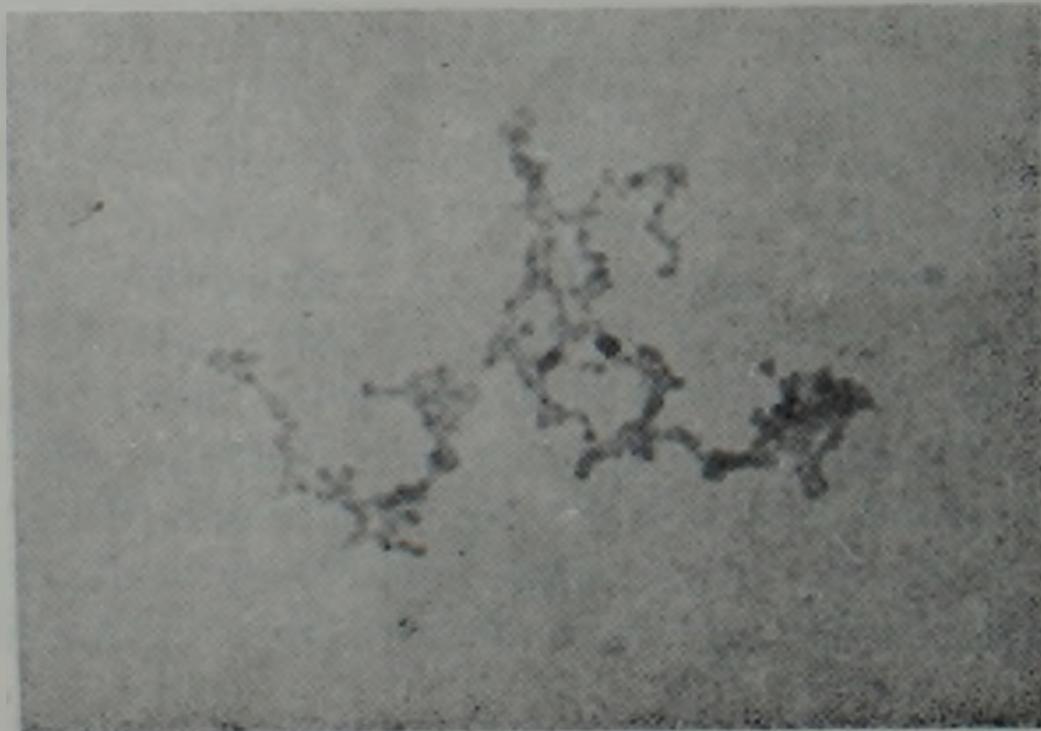
Реконструирование нуклеосом в присутствии набора гистонов и поли- α -глутаминовой кислоты подробно описано в нашем предыдущем исследовании (5) и в работе (8).

Выделение ДНК плазмиды PBR322 tk, P ν -фрагмента гена tk HSV-I, «Ник»-трансляцию, реконструирование искусственных вирусоподобных частиц, гибридизацию на нитроцеллюлозных фильтрах, определение активности тимидинкиназы (tkHSV-I) проводили как описано в работе (9). Инкубационная среда для определения активности tk HSV-I содержала 0,5 мМ [^{14}C] dCyd, 5мМ Mg^{2+} АТР, 0,3мМ тетрагидроуридина, 25мМ NaF.

Активность tk HSV-I выражали в наномолях dCyd, фосфорилированного 2×10^6 кл. в течение 1 ч. ДНК в составе комплексов метилч акридиновым оранжевым и степень фагоцитоза определяли в люминесцентном микроскопе Люмам Р-2.

Степень фагоцитоза Са-преципитата ДНК, ДНК-протеидных комплексов клетками костного мозга оценивали в процентах по числу фагоцитирующих клеток и по количеству фагоцитированных частиц на одну клетку (фагоцитарный индекс).

На электронной микрофотографии (рисунок) показана реконструкция нуклеосомоподобных комплексов ДНК PBR 322 tk. Глобуляр-



Электронная микрофотография реконструированной в нуклеосомоподобные комплексы молекул ДНК PBR 322 tk. Ув. 200×10^3

ные частицы, обнаруживаемые вдоль молекулы ДНК, морфологически близки к нуклеосомам, обнаруживаемым при электронной микроскопии хроматина. Формирование нуклеосом в условиях нашего эксперимента нами подтверждено ранее также данными по нуклеазному расщеплению полученных комплексов (5).

В табл. 1 приведены данные, позволяющие оценить процесс интернализации Са-преципитата ДНК и ДНК-протейдных комплексов в клетки костного мозга.

Таблица 1
Фагоцитоз клетками костного мозга ДНК-протейдных комплексов

ДНК	Фагоцитоз, %			Фагоцитарный индекс	
	Время инкубации, ч				
	2	4	6	2	4
Са-преципитат ДНК	10	18	34	1-2	1-2
ДНК-протейдный комплекс	25	52	92	2-3	3-4

Существенное повышение степени фагоцитоза ДНК-протейдных комплексов относительно Са-преципитата отмечается для всех изученных интервалов времени, одновременно выше и фагоцитарный индекс. Полученный результат указывает на то, что реконструированные нуклеосомные комплексы биологически активны и более эффективно, чем искусственные Са²⁺-комплексы ДНК, преодолевают барьер плазматической мембраны клеток костного мозга.

В следующей серии экспериментов было изучено внутриклеточное распределение экзогенной ДНК, интернализованной в клетки в составе Са-ДНК и ДНК-протейдного комплекса. Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что нуклеосомоподобная упаковка ДНК облегчает преодоление барьера как плазматической, так и ядерной мембраны; возможно, что в силу своей нуклеофильности обеспечивает относительно быструю миграцию комплекса из цитоплазмы в ядро.

Таблица 2

Внутриклеточное распределение ДНК, интернализованной в клетках костного мозга в составе Са-преципитата и ДНК-протейдного комплекса (процент радиоактивности)

Субклеточные частицы	Са-преципитат ДНК			ДНК-протейдный комплекс		
	Время инкубации, ч					
	0	2	4	0	2	4
Плазматическая мембрана	92	46	35	83	64	32
Цитоплазма	5	45	47	8	18	9
Ядро	2	8	12	2	10	11
Инкубационная среда	1	3	6	1	10	48

О функциональной активности гена tkHSV-1 в ДНК плазмиды PBR 322 tk, интернализованной в клетки костного мозга в виде нуклеопротейдного комплекса, свидетельствовала индукция транзиторной активности вирусной (HSV-1) tk в клетках.

ДНК в виде Са-преципитата, реконструированных вирусоподобных частиц (ИВЧ) и ДНК-протейдных комплексов, вводилась в коли-

честве 50 мкг в просвет бедренных костей мышей, через 48 ч в выделенных клетках костного мозга определяли активность тимидинкиназы (см. методы) по фосфорилированию [¹⁴C]-дезокситидина (табл. 3).

Таблица 3

Тимидинкиназная активность в трансформированных клетках костного мозга

ДНК	Активность tk (в наномолях*) [¹⁴ C]dCd, фосфорилированного 4 × 10 ⁶ кл./час.
ИВЧ	
Са-преципитат ДНК	0.89
ДНК-протеиновый комплекс	0.14
Контроль (ДНК)	0.32
	Не определяется

* Средняя из результатов трех экспериментов.

Перенос гена tk в составе ДНК PBR322 tk, интернализованной в клетки костного мозга в виде нуклеопротеинового комплекса, обеспечивала через 48 ч достаточно выраженный транзитный синтез фермента tk HSV-I, обнаруживаемого реакцией фосфорилирования дезоксицитидина, специфичной для tk вирусного (HSV-I) происхождения.

Активность tk, индуцированная в клетках костного мозга ИВЧ, содержащими ген tk, была в 7 и 3 раза выше, чем от применения Са-преципитата ДНК PBR322 tk и ДНК-протеинового комплекса, соответственно.

Через 48 ч после инъекции в полость бедренных костей ДНК-протеиновых комплексов (Pv II-фрагмент) в ДНК ядер клеток костного мозга, после расщепления ДНК эндонуклеазами и разделения полученных фрагментов в агарозном геле, методом гибридизации на нитроцеллюлозных фильтрах были выявлены интактные гены tk HSV-I.

Полученный результат свидетельствует в пользу того, что ДНК-протеиновый материал, освобождаемый в околклеточную среду костного мозга, может проникать в клетки костного мозга, достигать ядра и некоторое время сохраняться в клетке в интактном виде и функционировать; при этом можно полагать, что транзитная экспрессия генов может избирательно контролироваться клеточными регуляторами процессов транскрипции и трансляции в зависимости от функционального состояния трансформируемой клетки.

Институт экспериментальной
биологии Академии наук
Армянской ССР

Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Զ. Գ. ԴԱՎՍՏՅԱՆ, Մ. Կ. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ, Ն. Տ. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ

Ոսկրուղեղի բջիջներում վերակառուցված նուկլեոսոմների կազմում
HSV-I տիմիդինկինազայի զենի էֆայրեսիան

Ցույց է տրված, որ արտարգրչային 'ԻնՔ'-ի PBR 322 tk նուկլեոսոմային
փաթեթավորումը հնարավոր է դարձնում 'ԻնՔ'-ի տեղափոխումը ոսկրուղեղի

բջիջների պլազմատիկ մեմբրանի միջոցով նուկլեոպրոտեիդների կոմպլեքսի կազմում ԴՆԹ-ն հարաբերականորեն արագ է տեղափոխվում ցիտոպլազմայից կորիզ և պահպանվելով որոշակի ժամանակ կորիզում ինտակտ վիճակում գործում է որպես մատրիցա ԴՆԹ-ի և HSV-1 տիմիդինկինազայի ֆերմենտի սինթեզի համար:

Ստացված են ապացույցներ, որոնք վերաբերվում են արտաբջջային ԴՆԹ-ի գենների տրանզիտորային էքսպրեսիային՝ նրա ոսկրուղեղի բջիջներով ուստիլիզացիայի պրոցեսի ընթացքում:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ե Լ Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- ¹ С. Н. Айрапетян, Р. А. Захарян, Г. Е. Рыжков и др., ДАН СССР; т. 284, № 6, с. 1499 (1985). ² Р. А. Захарян, Г. Е. Рыжков, С. С. Дадалян и др., Нейрохимия, т. 5, № 3 с. 239 (1986). ³ L. A. Rouchkian, R. A. Zakharian, 4 International Congress o Cell Biology Abstracts, B-1013, P 5, 1. 6. (1988). ⁴ R. A. Zakharian, K. G. Karagyegyan, S. S. Ovaktimian, ISF-JOCS WORLD Congress, Abstracts, 3P12 (1988). ⁵ Р. А. Захарян, Г. Г. Галстян, Н. Р. Геворкян и др., Биополимеры и клетка, т. 4, № 1, с. 48 (1988). ⁶ Р. А. Захарян, Биополимеры и клетка, т. 3, № 4 с. 215 (1987). ⁷ L. P. Villarreal, R. T. White, P. Berg, J. Virol, v. 29, p. 209 (1979). ⁸ J. Oohara, A. Suyama, A Wada, Biochem. Biophys Acta, v. 741, p. 322 (1983). ⁹ U. Wlenhues, K. Hosokawa, A. Hojeler et al., DNA, v. 6, № 1, с. 81 (1987).