

7. Devoto M. Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype // Hum. Genet.— 1990.— 83, N 2.— P. 317—325.
8. Анализ рестрикционного полиморфизма ДНК-локуса D7S23 при помощи зонда KM-19 методом цепной реакции синтеза ДНК в популяции и в семьях больных муковисцидозом / Т. Э. Иващенко, В. Н. Горбунова, М. В. Асеев и др. // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 2.— С. 55—60.
9. Cystic fibrosis in Finland a molecular and genealogical study / J. Kere, R. Norio, E. Savilahti et al. // Hum. Genet.— 1989.— 83, N 1.— P. 20—25.

Ин-т акушерства и гинекологии АМН СССР, Ленинград
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 05.07.90

УДК 577.212:577.352.27

С. П. Шпилева, И. Е. Костецкий, Т. В. Столяр, Л. И. Лихачева,
Л. Г. Жарова, И. М. Спивак, В. Д. Жестянников,
В. А. Кордюм, Д. М. Иродов

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ *RecA*-БЕЛКА С ХРОМАТИНОМ ЯДЕР (ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ)

Продемонстрирована возможность использования гена *recA* в качестве модельного гена при изучении экспрессии экзогенной ДНК *in vitro* и *in vivo*.

Визуализация *RecA*-белка в цитоплазме и ядрах проведена непрямой иммунофлюоресцентным методом. Бактериальный *RecA*-белок тестировали в культуре *HeLa* после ее обработки чистым *RecA*-белком или белком, заключенным в липосомы, а также после трансфекции культуры сконструированной плазмидой *pKCR2*. Отмечена визуализация *RecA*-белком хроматина ядер, которая зависела от прохождения клеткой фаз митотического цикла.

В системе *in vivo* бактериальная β -галактозидаза и *RecA*-белок обнаруживались через 48 ч после проведения котрансформации печени мышей плазмидами *pGA293A* и *pKCR2*, заключенными в липосомы. Высокий уровень экспрессии *recA*-гена в гепатоцитах экспериментальных животных позволяет использовать его в модельных системах при изучении экспрессии экзогенной ДНК *in vivo*.

Введение. В клетках эукариот, как и в клетках прокариот, могут существовать некоторые SOS-функции. Уже в ранних работах было показано, что клетки млекопитающих способны отвечать на ингибирование репликации индукцией новых белков (в клетках *Escherichia coli* в этом случае генерируется сигнал, вызывающий индукцию *RecA*-белка) [1]. Могут ли продукты генов *recA* (или их аналогов), имеющих различное происхождение, функционально замещать друг друга? Белок *RecA E. coli* представляет собой небольшой по молекулярной массе белок, принимающий участие в процессах рекомбинации, репликации, репарации, мутагенеза, клеточного деления и др. [2]. В ряде работ показано наличие у эукариот белковых факторов, функционально аналогичных белку *E. coli* [3—6]. В реакциях *in vivo* эти белки могут осуществлять гомологичное спаривание сверхспиральной ДНК однонитчатой ДНК [3, 4], перенос нитей ДНК между соответствующими ДНК-субстратами [5]. Некоторые из них, например RRAI [6], локализованы в районе внутренней мембраны ядра. Белок *RecA E. coli* может использовать в качестве субстрата эукариотическую ДНК.

Представлялось интересным изучение возможности функционирования этого белка в эукариотических клетках *in vivo*. С этой целью была изучена вероятность проникновения белка *RecA* через цитоплазматическую мембрану в клетку и ядро.

Материалы и методы. Для введения в культуру *HeLa* и проведения опытов *in vivo* использованы плазмиды *pKCR2*, *pGA293A* и *RecA*-белок. Конструкция *pKCR2* представляет собой плазмиду *pKCR* [7] с клонированным по *BamHI*-сайту полноразмерным *recA*-геном *E. coli*.

© С. П. ШПИЛЕВА, И. Е. КОСТЕЦКИЙ, Т. В. СТОЛЯР, Л. И. ЛИХАЧЕВА, Л. Г. ЖАРОВА, И. М. СПИВАК, В. Д. ЖЕСТЯНИКОВ, В. А. КОРДЮМ, Д. М. ИРОДОВ, 1991

Плазмида *pGA293A* сконструирована на основе плазмиды *pGA293* (получена от д-ра Симинович, Канада) и содержит клонированный по *BamHI*-сайту *Alu*-повтор человека (в предыдущих работах нами показано, что эта последовательность усиливает экспрессию *lacZ*-гена в гепатоцитах мыши [8, 9]).

В качестве переносчика плазмидной ДНК использованы отрицательно заряженные моноламеллярные липосомы размером от 10 до 100 нм [10]. В состав липосом входили лецитин, холестерин, дицетилфосфат, фосфатидилэтаноламид в соотношении 7 : 2 : 1 : 0,2. ДНК плазмиды

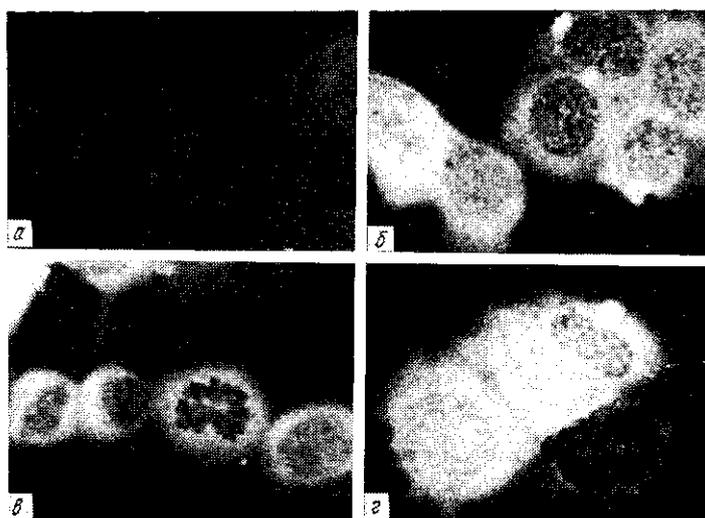


Рис. 1. Флюоресценция клеток *HeLa*, обработанных сывороткой к *RecA*-белку: а — клетки, обработанные ненагруженными липосомами (контроль); б — г — клетки *HeLa* после обработки *RecA*-белком в составе липосом (б — клетки синтерфазными ядрами; в — клетки с метафазной пластинкой хромосом и расходящимися к полюсам хромосомами (крайняя слева); г — клетки после завершения деления)

Fig. 1. Immunofluorescence of *HeLa* cells after treatment by *RecA* antibody

мид заключали в липосомы методом кальциевой плавки (Ca-fusion), количество заключенной в липосомы ДНК составляло 7—10 % от внесенной. Включение *RecA*-белка в липосомы осуществляли, добавляя белок в липидную смесь на стадии «геля» в процессе приготовления липосом. Кроме того, в части опытов *in vitro* применяли ДЭАЭ-декстрановый метод трансфекции культуры клеток *HeLa* плазмидой *pKCR2*.

Трансфекцию культивируемых на покровных стеклах клеток *HeLa* и введение в них *RecA*-белка проводили через сутки после посева в течение 30 мин с последующей 4-минутной экспозицией с 15 %-ным глицерином на среде Хенкса. Монослой клеток фиксировали 20 мин в трех сменах охлажденного ацетона (4 °С) через 24 ч после обработки.

Опыты в системе *in vivo* проведены на 2-месячных мышах линии *BALB/c*. Введение материала в печень животных, изготовление препаратов гепатоцитов подробно описаны в предыдущих публикациях [8, 9]. Бактериальную β -галактозидазу и *RecA*-белок тестировали через 2 сут после инъекции материала непрямым иммунофлюоресцентным (ИФ) методом с последующей микроцитометрией [8].

Кроличьи сыворотки к β -галактозидазе и *RecA*-белку получены в нашей лаборатории. Сыворотки с титрами 1 : 16—1 : 32 дважды осаждали сульфатом аммония с 35 % насыщения, диализировали против 0,0175 М натрий-фосфатного буфера и очищали, пропуская через ионообменную колонку. После дополнительной очистки сывороток печеночным порошком их использовали для иммунохимического окрашивания цитологических препаратов. Меченный ФИТЦ ослиный антикроличий глобулин освобождали от несвязанного флюорохрома на 1 %-ной агарозе.

Результаты и обсуждение. Локализацию *RecA*-белка *E. coli* в эукаротических клетках и возможность его функционирования в этих клетках изучали с использованием обработанных *RecA*-белком, заключенным в липосомы, клеток *HeLa* [11]. Окрашивание клеток *HeLa* непрямым ИФ-методом с применением сыворотки к *RecA*-белку позволяло выявить его локализацию в клетке и оценить количество белка после измерения интенсивности флюоресценции на фотометре.

Контролем к различным вариантам введения *RecA*-белка в культуру *HeLa* служили интактные клетки и клетки, обработанные ненагруженными («пустыми») липосомами. В обоих случаях наблюдалась

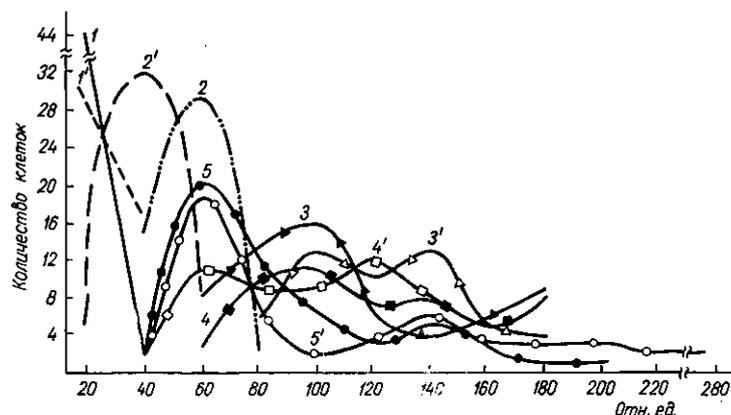


Рис. 2. Распределение клеток *HeLa* по интенсивности иммунофлюоресценции цитоплазмы и ядер через 24 ч: 2, 2' — после обработки ненагруженными липосомами; 3, 3' — *RecA*-белком в составе липосом; 4, 4' — чистым *RecA*-белком; 5, 5' — плазмидой pKCR2 в составе липосом; 1, 1' — интактные клетки; 1 — 5 и 1' — 5' флюоресценция цитоплазмы и ядер соответственно

Fig. 2. Distribution of *HeLa* cells by immunofluorescence intensity of cytoplasm

сходная картина — тускло светящаяся цитоплазма, ядра с темной нуклеоплазмой и довольно четко просматривающимися слабо светящимися нитями хроматина и ядрышками (рис. 1, а). Четкость этих структур ядра, как и их флюоресценция, были несколько выше после обработки культуры чистыми липосомами (рис. 2).

Через 24 ч после введения в культуру *HeLa RecA*-белка в составе липосом или одного *RecA*-белка отмечено его проникновение в цитоплазму и ядра. Резко возрастала светимость цитоплазмы и ядер, яркие нити хроматина и сверкающие ядрышки наблюдались в клетках, находящихся на разных стадиях клеточного цикла (работали на несинхронизированной культуре). Наиболее ярко флюоресцировали ядра, которые, судя по морфологии хроматина, находились на ранних стадиях интерфазы (рис. 1, б). В поздней профазе, когда ядрышки и оболочка ядра уже не обнаруживаются, флюоресценция хроматина прогрессивно снижается и в метафазе видны темные хромосомы (рис. 1, в). Одновременно с этим резко возрастает интенсивность флюоресценции цитоплазмы. Фотометрическими измерениями показано наибольшее количество *RecA*-белка в цитоплазме клеток с мета- и анафазными группами хромосом. По-видимому, при делении клеток может снижаться сродство *RecA*-белка к хроматину (вследствие конденсации хромосом), в результате чего не происходит контрастирования белком ДНК и он диффузно рассивается по клетке. В телофазе одновременно с формированием ядрышек и ядерной оболочки, деконденсации хроматина ядра опять начинают флюоресцировать, в то время как интенсивность флюоресценции цитоплазмы снижается (рис. 1, г). Из вышеизложенного можно заключить, что существует зависимость визуализации хроматина ИФ-методом от его доступности *RecA*-белку на отдельных фазах клеточного цикла. Таким образом, проникновение *RecA*-белка в культивируемые клетки *HeLa* и выявление его в ассоциированном состоянии

на хромосомах ядер позволяют предположить возможность по крайней мере функционирования этого белка в ядрах эукариотических клеток с проявлением некоторых (например, ДНК-связывающих) биохимических активностей. Введение в культуру *HeLa* гена *recA* в составе плазмиды *pKCR2* ДЭАЭ-декстрановым методом продемонстрировало эффективную экспрессию этого гена и появление полноценного продукта — *RecA*-белка в ядрах и цитоплазме клеток (рис. 2). Цитохимически *RecA*-белок обнаруживается как в вариантах опытов с введением в клетки одного *RecA*-белка, так и белка в составе липосом; результатами фотометрирования ядер и цитоплазмы показано, что содержание

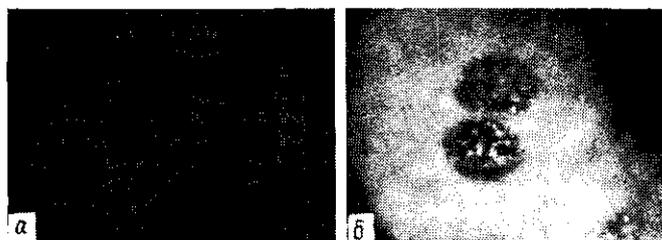


Рис. 3. Флюоресценция гепатоцитов. Препараты обработаны сывороткой к *RecA*-белку: *a* — гепатоциты интактного животного; *b* — 48 ч после котрансформации плазмидами *pGA293A* и *pKCR2*, заключенными в липосомы

Fig. 3. Immunofluorescence of hepatocytes after treatment with antibody to *RecA* protein

продукта экспрессии *pKCR2* — *RecA*-белка — в ядрах было наибольшим по сравнению с другими вариантами введения.

После подтверждения проникновения *RecA*-белка *E. coli* в эукариотические ядра клеток *HeLa* были проведены опыты на мышах, в которых животным вводили заключенные в липосомы плазмиды *pGA293A* и *pKCR2*. На параллельных препаратах тестировали бактериальные β -галактозидазу и *RecA*-белок. Контролем к этой серии опытов служили интактные животные.

Осуществленная котрансформация позволила определить характер функционирования введенных в орган плазмид. В предыдущей публикации приведены результаты эксперимента, в котором через 24 ч после котрансформации этими же плазмидами печени мыши наблюдалась функциональная активность только одной плазмиды — *pKCR2*, в то время как экспрессия *lacZ*-гена находилась на уровне контролей [9]. В последующих экспериментах были отмечены животные, в печени которых функционировали обе плазмиды. Можно допустить, что отсутствие экспрессии гена бактериальной β -галактозидазы у части животных связано с индивидуальным генотипом животного. Флюоресценция препаратов, обработанных сывороткой к *RecA*-белку, была значительно большей, особенно яркая флюоресценция наблюдалась в ядрах гепатоцитов (рис. 3, *b*). Результаты фотометрирования ядер и цитоплазмы также свидетельствуют о значительных количествах *RecA*-белка в ядрах (рис. 4).

Таким образом, нами показана возможность введения в клетку *RecA*-белка *E. coli* с сохранением его биологической активности. Как сам белок, так и продукт экспрессии *recA*-гена одинаково успешно проникали в ядра клеток *HeLa* и гепатоцитов *in vivo* и после обработки цитологических препаратов кроличьей сывороткой к *RecA*-белку последний обнаруживался в ядрах, в основном, ассоциированным с хроматином. Вызывает удивление тот факт, что хроматин и ядрышки в контрольных препаратах также становились доступными микроскопическому наблюдению, это особенно хорошо было заметно в интактных клетках *HeLa*. Кроме того, очевидно, что сродство *RecA*-белка к хроматину находится в определенной зависимости от степени конденсации хроматина и соответственно фаз клеточного цикла. Цитологическим

доказательством этого могут служить мета- и анафазные группы хромосом, которые проявлялись как темные структуры на фоне ярко флюоресцирующей цитоплазмы, в то время как хроматин интерфазных ядер ярко флюоресцирует. Фотометрические измерения часто демонстрировали в интерфазных ядрах большее содержание *RecA*-белка, чем в ци-

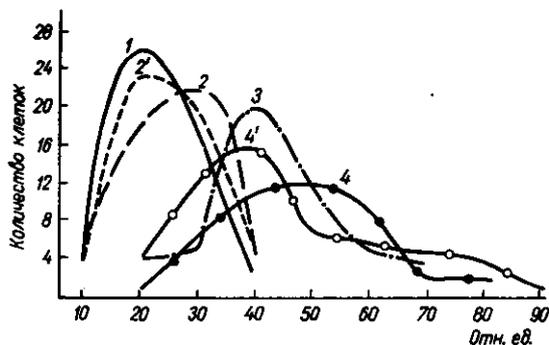


Рис. 4. Распределение гепатоцитов мышей по иммунофлюоресценции цитоплазмы и ядер через 48 ч после котрансформации плазмидами *pGA293A* и *pKCR2*, заключенными в липосомы (3, 4, 4'). Обработка препаратов сывороткой к β -галактозидазе (3); 1 — контроль. Обработка препаратов сывороткой к *RecA*-белку (4, 4'); 2, 2' — контроль. Флюоресценция цитоплазмы после обработки препаратов сывороткой к *RecA*-белку (2, 4) и ядер (2', 4')

Fig. 4. Distribution of mouse hepatocytes by immunofluorescence of cytoplasm and nucleus 48 h after cotransformation by *pGA293A* and *pKCR2* plasmids included in liposomes

топлазме. По-видимому, наблюдавшаяся нами способность *RecA*-белка контрастировать хроматин может быть использована в цитологической практике при проведении работ с данным белком, а также при исследованиях экспрессии *recA*-гена *in vivo*.

Резюме

Продемонстрована можливість використання гену *recA* як модельного при вивченні експресії екзогенної ДНК *in vitro* та *in vivo*.

Візуалізація *RecA*-білку в цитоплазмі і ядрах проведена непрямим імунофлюоресцентним методом. Бактеріальний *RecA*-білок виявляли в культурі клітин *HeLa* після її обробки чистим білком *RecA* або ж білком, що міститься в ліпосомах, а також після трансфекції культури сконструйованою плазмідною *pKCR2*. Відзначена візуалізація *RecA*-білком хроматину ядер, яка залежить від проходження клітиною фаз мітотичного циклу.

У системі *in vivo* бактеріальна β -галактозидаза і *RecA*-білок виявляли через 48 годин після проведення котрансформації печінки мишей плазмидами *pGA293A* та *pKCR2*, які були вміщені в ліпосоми. Високий рівень експресії *recA*-гену у гепатоцитах експериментальних тварин дозволяє використовувати його в модельних системах при вивченні експресії екзогенної ДНК *in vivo*.

Summary

Gene *recA* can be used as a model gene when studying the expression on exogenic DNA *in vitro* and *in vivo*.

The indirect immunofluorescent method has been used for *RecA* protein visualization in cytoplasm and nuclei. The bacterial *RecA* protein has been tested in *HeLa* culture after treatment with *RecA* protein alone or included in liposomes, and after transfection of culture by plasmid *pKCR2*. *RecA* protein was shown to contrast nucleus chromatin intensively and this process depended on the phase of mitotic cycle.

Bacterial β -galactosidase and *RecA* protein have been observed *in vivo* 48 hours after cotransformation of mouse liver with *pGA293A* and *pKCR2* plasmids, included in liposomes.

High level of *recA* gene expression in hepatocytes of liver allows to use it in model systems when studying the exogenic DNA expression *in vivo*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mallick U., Pahmsdorf H. J., Herrlich P. Protein «X» synthesis in mammalian cells // Chromosome damage and repair: Proc. NATO Adv. Study Ins.— New York, 1981.— P. 199—204.
2. Ланцов В. А. Бактериальный белок *RecA*: биохимический, генетический и физико-химический анализ // Генетика.— 1985.— 21, № 9.— С. 1414—1427.
3. Topological linkage of circular DNA molecules promoted by *Ustilago Rec I* protein and topoisomerase / E. B. Kmiec, P. E. Kroeeger, M. J. Brougham, W. K. Holloman // Cell.— 1983.— 34, N 3.— P. 919—929.
4. Cassuto E., Lightfoot L.-A., Howard-Flanders P. Partial purification of an activity from human cells that promotes homologous pairing and the formation of heteroduplex DNA in the presence of ATP // Mol. and Gen. Genet.— 1987.— 203, N 1—2.— P. 10—14.
5. Use of *RecA* protein to enrich genes in genomic library / B. Taidi-Laskowski, D. Tyan, S. M. Honigberg et al. // Nucl. Acids Res.— 1988.— 16, N 16.— P. 8157—8169.
6. *KIN*, a mammalian nuclear protein immunologically related to *E. coli RecA* protein / J. F. Angulo, P. L. Moreau, J. Laporte et al. // Mutat. Res. DNA Rep.— 1989.— 217, N 2.— P. 123—134.
7. O'Hare K., Benoist C., Breathnach R. Transformation of mouse fibroblasts to methotrexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolatreductase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1981.— 78, N 3.— P. 1527—1531.
8. Экспрессия β-галактозидазы *Escherichia coli* в гепатоцитах мыши / И. Е. Костецкий, С. П. Шпилевая, Л. И. Лихачева и др. // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 2.— С. 51—58.
9. Сравнительное изучение эффективности экспрессии бактериальной β-галактозидазы *in vivo* с помощью иммунофлюоресцентного анализа / С. П. Шпилевая, И. Е. Костецкий, Л. И. Лихачева и др. // Там же.— 1990.— 6, № 1.— С. 63—66.
10. Билич К. М., Иродов Д. М., Кордюм В. А. Некоторые ультраструктурные аспекты прямой инъекции липосом, содержащих плазмидную ДНК, в печень мыши // Там же.— С. 73—81.
11. Восстановление сниженной кофейном выживаемости γ-облученных клеток *HeLa RecA*-белком *E. coli* / И. М. Спивак, И. Е. Костецкий, С. П. Шпилевая и др. // Цитология.— 1989.— 31, № 6.— С. 1126.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 30.07.90