

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ ГИСТОНА H2A И МОДИФИЦИРОВАННОГО ГИСТОНА H2A-TAT С ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

© 2015 г. А.В. Введенский* **, С.В. Сизова*, А.И. Кузьмич* ***

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

**Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1/12;

***Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Академика И.В. Курчатова, 2
E-mail: Vvedenskii@gmail.com

Поступила в редакцию 16.04.15 г.

Гистон H2A способен доставлять трансгенную ДНК в клетки млекопитающих в условиях *in vitro*. Способность доставлять ДНК в условиях *in vivo* еще предстоит оценить, но в экспериментах *in vitro* можно определить факторы, способные определять эффективность доставки *in vivo*. Первый шаг в этом направлении – определение размеров и ζ -потенциалов комплексов H2A с ДНК. В данной работе были получены рекомбинантный гистон H2A и его модификация, содержащая пептид белка TAT вируса иммунодефицита человека (TAT-пептид), способный обеспечивать усиление доставки макромолекул в клетки млекопитающих. В работе измерены эффективные диаметры и ζ -потенциалы частиц, образующихся при смешивании гистона H2A с ДНК, и исследовано влияние TAT-пептида на эти параметры. Комплексы с гистонам H2A и комплексы с модифицированным гистонам H2A-TAT обладали положительным ζ -потенциалом. Комплексы гистона H2A с ДНК имели эффективный диаметр около 200 нм, модификация гистона TAT-пептидом приводила к агрегации комплексов и формированию крупных частиц диаметром около 1 мкм.

Ключевые слова: комплексы гистон–ДНК, гистон H2A, размер частиц, ζ -потенциал частиц, конденсация ДНК, TAT-пептид.

Генная терапия – метод лечения заболеваний различной этиологии при помощи доставки в клетки нуклеиновых кислот. В случае доставки ДНК терапевтический эффект оказывают продукты экспрессии трансгенов. Стратегии, основанные на генной терапии, являются одними из наиболее перспективных подходов для лечения многих типов наследственных заболеваний и различных типов неоплазий [1,2]. В качестве векторов доставки ДНК в клетки в основном используются вирусные системы. Однако векторы на основе вирусов часто обладают ограниченной эффективностью, связанной с развитием иммунного ответа на вирусный носитель [3,4], а их использование в редких случаях может приводить к летальному исходу [5].

В связи с этим возникает необходимость в разработке новых неиммуногенных и эффективных носителей ДНК. Некоторые исследователи считают, что векторы на основе гистонов имеют широкие перспективы применения *in*

vitro и *in vivo* [6,7]. Описано, что данные белки и их производные могут обеспечивать трансфекцию *in vitro* на высоком уровне [8–10]. В нашей лаборатории также было показано, что гистон H2A обладает трансфекционной активностью в условиях *in vitro* (данные не опубликованы). В ряде работ исследователи достигали увеличения трансфекционной активности за счет присоединения к комплексам с ДНК TAT-пептида (YGRKKRRQRRR) из группы CPP (CPP peptide – сокращение от cell penetrated peptide) [11–14]. В нашей лаборатории также исследовалось влияние присоединения TAT-пептида к гистону H2A на эффективность трансфекции *in vitro* (данные не опубликованы).

Вместе с тем высокого уровня трансфекции *in vitro* недостаточно для эффективной работы трансфекционных агентов в условиях *in vivo*. При системном введении в организм большое значение имеет размер и ζ -потенциал частиц (величина ζ -потенциала отражает плотность заряда на поверхности частицы), образующихся

при конденсации ДНК трансфекционным агентом. Крупные частицы размером 300 нм и более при введении в кровяное русло быстро выводятся из кровотока ретикулоэндотелиальной системой печени, хотя скорость захвата также зависит от состава частиц [15,16]. Кроме того, способность крупных частиц проникать сквозь стенки сосудов сильно ограничена. Так, в случае доставки в опухоли было показано, что частицы размером более 600 нм практически не проникают в опухолевые ткани из кровотока [17]. Возможное влияние величины ζ -потенциала на трансфекцию *in vivo* не столь однозначно. С одной стороны, частицы с отрицательным ζ -потенциалом медленнее выводятся из кровотока [15,18]. С другой стороны, на примере катионных липосом было показано, что для высокого уровня трансфекции необходим положительный заряд на поверхности трансфицирующих частиц [19]. Таким образом, можно сделать вывод, что частицы с диаметром 100–200 нм и небольшим положительным значением ζ -потенциала, при условии высокой трансфекционной активности, могут быть использованы в системах *in vivo*.

Целью нашей работы стало изучение размеров и ζ -потенциалов комплексов, образующихся при конденсации ДНК гистона H2A и модифицированным гистона H2A-ТАТ. Измерения проводили методом динамического светорассеяния. На основании полученных данных сделан прогноз перспектив использования исследованных носителей для доставки ДНК в условиях *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение и очистка плазмидной ДНК. Плазмидную ДНК pCMV-pGL3 (Clontech, США) нарабатывали в штамме DH5 α *E. coli*, выделение и очистку проводили с помощью набора Nucleobond PC 100 (Macherey-Nagel, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Препарат плазмиды ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере и хранили при температуре –20°C. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически по поглощению при 260 нм, чистоту препарата определяли по соотношению абсорбции (A_{260}/A_{280}), а также при помощи электрофореза в 1% агарозном геле.

Клонирование, экспрессия и очистка рекомбинантных гистонов. Экспрессионный бактериальный вектор pET30a(+) (Novagen, США), несущий кодирующую последовательность гистона H2A человека, был любезно предоставлен М.В. Зиновьевой. Последовательность, кодирующую ТАТ-пептид, вносили при помощи

ПЦР с праймерами, один из которых содержал последовательность, кодирующую ТАТ-пептид. Полученный ПЦР-продукт клонировали в вектор pET30a(+). Последовательность полученных конструкций была подтверждена секвенированием. Генетическими конструкциями трансформировали экспрессионный штамм *E. coli* BL21. Трансформированные колонии выращивали в среде LB с 30 мкг/мл канамицина. Синтез белков индуцировали добавлением 1 mM IPTG с последующей инкубацией в течение 3 ч при 37°C при постоянном встряхивании. Клеточную культуру центрифугировали, клетки бактерий ресуспендировали в лизирующем буфере (50 mM трис-HCl, pH 8,0, 5 mM ЭДТА), после чего разрушали при помощи ультразвука. Лизат осветляли центрифугированием (16000 g в течение 35 мин).

Полученный супернатант наносили на колонку со смолой SP Sepharose high performance (GE Healthcare, Великобритания). Элюцию проводили в 50 mM трис-HCl-буфере, pH 8,0, в градиенте NaCl от 0 до 1 M. Далее фракцию, содержащую целевой белок, наносили на колонку BIO Wide Pore C18 (Supelco, Япония) для проведения HPLC. Гистон элюировали в 0,1% трифторуксусной кислоте в градиенте ацетонитрила от 20 до 80%. Затем проводили высушивание препарата в вакуумной центрифуге SpeedVac Concentrator (Savant, США). Полученный сухой остаток растворяли в фосфатно-солевом буфере (Life Technologies, США).

Модифицированный гистон H2A-ТАТ содержал последовательность ТАТ-пептида на С-конце. При выделении модифицированного гистона H2A-ТАТ к полученному после разрушения клеток осветленному супернатанту добавляли раствор HCl до конечной концентрации 0,4 M, центрифугировали при 4000 g 35 мин. Супернатант доводили до pH 4,5, после чего наносили на колонку со смолой Toyopearl SP-650M (Tosoh, Япония). Элюцию проводили в 300 mM Na-ацетатном буфере с pH 5,5 в градиенте NaCl от 0 до 1 M. Далее фракцию с модифицированным гистона H2A-ТАТ очищали при помощи HPLC и концентрировали в вакуумной центрифуге в условиях, аналогичных для гистона H2A. Сухой препарат растворяли в фосфатно-солевом буфере.

Концентрацию белков определяли по методу Бредфорда и спектрофотометрически с использованием величины молярного коэффициента экстинкции для гистона H2A и H2A-ТАТ – 3840 л·моль⁻¹·см⁻¹ (<https://www.neb.com/products/m2502-histone-h2a-human-recombinant>). Чистоту препаратов определяли при помощи денатурирующего гель-электрофореза в 15% полиакри-

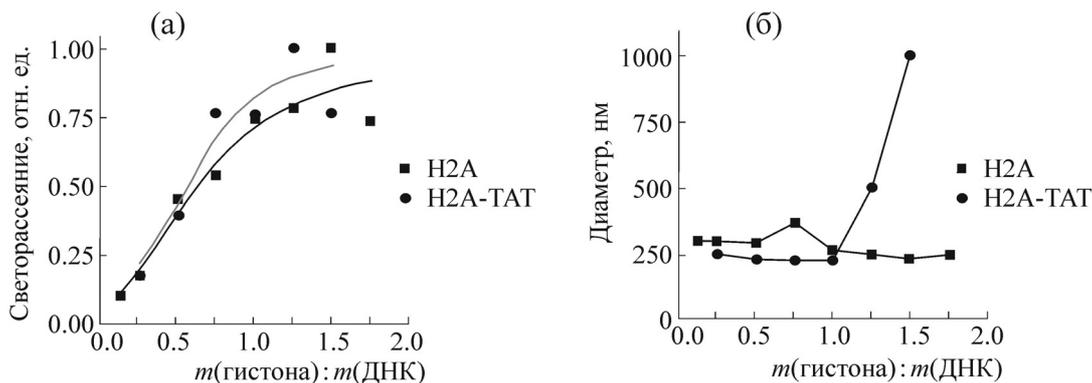


Рис. 1. Связывание молекул гистонов с ДНК. 20 мкг ДНК в 2 мл фосфатно-солевого буфера смешивали с гистонами (использовали соотношения ДНК:гистон по массе 1:0,125; 1:0,25; 1:0,5; 1:0,75; 1:1; 1,25; 1:1,5; 1:1,75). (а) – Зависимости светорассеяния раствора плазмидной ДНК от концентрации гистонов. По результатам измерений построены зависимости согласно уравнению Больцмана для сигмовидной кривой. Серым цветом показана кривая светорассеяния для модифицированного гистона H2A-TAT, черным цветом – для гистона H2A. (б) – Зависимости эффективных диаметров комплексов от концентрации гистона.

ламидном геле с последующей окраской гелей красителем Кумасси.

Приготовление комплексов гистонов с ДНК. Комплексы гистонов с плазмидной ДНК готовили в фосфатно-солевом буфере следующим образом: в пробу суммарным объемом 2 мл добавляли ДНК до конечной концентрации 10 мкг/мл (C_p , концентрация фосфатных групп – 30 мкМ), затем добавляли различные количества гистона (диапазон конечных концентраций составлял от 1,25 до 500 мкг/мл). Пробу тщательно перемешивали и инкубировали 30 мин при комнатной температуре, далее производили измерения.

Измерение эффективного диаметра и ζ -потенциала комплексов. Измерения эффективного диаметра проводили методом динамического светорассеяния на приборе Brookhaven 90plus particle size analyzer (Brookhaven, США), температура измерения 25°C, 10 циклов, продолжительность каждого цикла 1 мин. При помощи программного обеспечения 90Plus Particle sizing software, предоставленного производителем оборудования, вычисляли эффективный диаметр частиц, для отображения данных использовали модель логнормального распределения частиц по размерам. Кроме того, определяли ζ -потенциал частиц суспензии методом электрофоретического рассеяния света при помощи модуля VI-PALS. Измерения проводили в тех же условиях. ζ -Потенциал рассчитывали по уравнению Смолуховского с использованием программного обеспечения PALS Zeta Potential Analyzer software, предоставляемого производителем.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Степень конденсации ДНК и параметры комплексов ДНК–гистон зависят от концентрации белка. Способность полученных гистонов связывать плазмидную ДНК определяли при помощи динамического светорассеяния. В фосфатно-солевом буфере плазмидную ДНК смешивали с гистонами, после чего с помощью динамического светорассеяния измеряли светорассеивание раствора и оценивали эффективный диаметр образующихся частиц (рис. 1).

При смешивании гистонов и плазмидной ДНК происходило их взаимодействие, ведущее к формированию частиц гистон–ДНК, что сопровождалось ростом светорассеяния в образцах. Известно, что при взаимодействии ДНК с полианионами происходит конденсация ДНК, причем процент конденсированной ДНК находится в сигмовидной зависимости от концентрации полианиона [20,21]. В нашем эксперименте добавление белка также приводило к сигмовидному росту величины светорассеяния, отражающей степень конденсации ДНК. Светорассеивание выходило на плато, что можно рассматривать как полную конденсацию ДНК в растворе, при соотношении белок:ДНК по массе около 1:1, что соответствовало соотношению положительных и отрицательных зарядов около 0,7. Способность белка конденсировать ДНК может быть охарактеризована с помощью параметра EC_{50} – концентрации гистона, которая необходима для конденсации 50% ДНК [21]. Оба гистона обладали сходной способностью к конденсации ДНК со значениями EC_{50} , равными 0,6 по массе (отношение массы

Эффективные диаметры и ζ -потенциалы комплексов ДНК с гистоном Н2А и модифицированным гистоном Н2А-ТАТ в фосфатно-солевом буфере*

Измеряемый параметр	m(ДНК):m(гистона)		
	1:15	1:25	1:50
Н2А диаметр, нм	168,1 ± 1,10	189,3 ± 1,6	253,4 ± 3,1
Н2А ζ -потенциал, мВ	2,32 ± 2,34	12,91 ± 1,93	11,92 ± 2,08
Н2А-ТАТ диаметр, нм	974,3 ± 22,7	977,0 ± 25,9	2144,6 ± 219,3
Н2А-ТАТ ζ -потенциал, мВ	9,50 ± 2,09	15,45 ± 0,63	14,88 ± 0,75

Примечание. *Значения представлены в виде среднего по десяти измерениям ± стандартное отклонение.

гистона к массе ДНК) и 0,4 по соотношению положительных и отрицательных зарядов.

Также были рассчитаны эффективные диаметры образующихся комплексов (рис. 1б). В начале титрования диаметры комплексов Н2А-ДНК и Н2А-ТАТ-ДНК существенно не различались, значения варьировали в пределах около 220–300 нм. Однако после того, как весовое соотношение Н2А-ТАТ:ДНК превышало 1, наблюдалось резкое увеличение эффективного диаметра частиц до 1 мкм, что можно объяснить переходом процесса конденсации ДНК к последующей агрегации комплексов с образованием крупных частиц. При этом такой агрегации не наблюдалось при увеличении концентрации гистона Н2А в растворе.

Таким образом, точка с весовым соотношением гистон:ДНК, равным 1 для Н2А-ТАТ, соответствует двум событиям – полной конденсации ДНК и переходу от конденсации к последующей агрегации, который происходит с дальнейшим увеличением доли гистона в растворе. В этом же эксперименте измеряли значения полидисперсности (данные не приводятся). Интересно, что при весовом соотношении 1:1 смесь обоих гистонов с ДНК характеризовалась наименьшей величиной полидисперсности – 0,07 и 0,06 для Н2А-ТАТ и Н2А соответственно. То есть при данном соотношении в растворе наблюдалась наименее гетерогенная смесь частиц. При других соотношениях значения полидисперсности превышали 0,1.

Модификация гистона Н2А ТАТ-пептидом приводит к увеличению эффективного диаметра и ζ -потенциала комплексов гистон-ДНК. Ранее в нашей лаборатории М.В. Зиновьевой было показано, что комплексы ДНК с гистоном Н2А, образующиеся при соотношениях по массе 1:15, 1:25 и 1:50, проявляют наибольшую трансфицирующую активность для широкого диапазона клеточных линий млекопитающих в условиях *in vitro* (данные не опубликованы). Эти соотношения значительно выше тех, при которых

наблюдалась полная конденсация плазмидной ДНК в наших экспериментах. Чтобы выявить зависимость физико-химических параметров комплексов гистон-ДНК от структуры белка и соотношения ДНК:гистон, мы провели оценку параметров комплексов, образующихся при смешивании полученных гистонов с плазмидной ДНК при соотношениях по массе 1:15, 1:25 и 1:50. Полученные данные приведены в таблице.

В исследованном диапазоне концентраций эффективный диаметр комплексов Н2А-ДНК составлял около 200 нм (таблица), при этом диаметр комплексов увеличивался с увеличением концентрации гистона. Комплексы на основе Н2А-ТАТ имели значительно больший диаметр (около 1 мкм) при соотношениях 1:15 и 1:25 и увеличивались более чем в два раза при соотношении 1:50. Больший диаметр комплексов, по всей видимости, был обусловлен высоким уровнем агрегации.

В исследованном диапазоне весовых соотношений ДНК:гистон образующиеся частицы имели положительный ζ -потенциал (таблица). Его значения возрастали при увеличении соотношения ДНК:гистон от 1:15 к 1:25. При дальнейшем увеличении концентрации гистонов значения ζ -потенциалов не увеличивались. При всех исследованных соотношениях значения ζ -потенциала частиц Н2А-ТАТ-ДНК превышали значения ζ -потенциала частиц Н2А-ДНК (наибольшее различие наблюдалось при соотношении ДНК:белок по массе 1:15), что, вероятно, отчасти связано с большим количеством положительных зарядов белка в пробах, содержащих Н2А-ТАТ, а отчасти с большей плотностью заряда на молекуле Н2А-ТАТ.

Зависимость эффективного диаметра комплексов Н2А-ТАТ-ДНК от концентрации соли. Комплексы модифицированного гистона Н2А-ТАТ с ДНК обнаруживали значительно больший диаметр (порядка 1 мкм) по сравнению с немодифицированным гистоном. Мы попыта-

лись подобрать условия формирования комплексов, исключая повышенную агрегацию. Известно, что противоионы соли экранируют заряды поликатионов, ослабляя их взаимодействие с ДНК [22]. Показано, что при образовании комплексов полиэтиленимина с ДНК происходит формирование мелких частиц при низкой концентрации соли и крупных агрегатов при высокой концентрации [22]. Чтобы подтвердить выполнение данной закономерности для Н2А-ТАТ, мы приготовили комплекс Н2А-ТАТ-ДНК при соотношении 1:25 в 20 мМ NaCl, далее мы ступенчато увеличивали концентрацию соли в суспензии комплекса и определяли эффективный диаметр частиц методом динамического светорассеяния (рис. 2).

При низкой концентрации соли (20 мМ) в суспензии наблюдались небольшие частицы со средним диаметром 135 нм. Однако эффективный диаметр частиц быстро увеличивался при увеличении концентрации соли: 584 нм при 80 мМ NaCl, около 1 мкм при концентрации соли 150 и 500 мМ, при увеличении концентрации соли до 1000 мМ происходило уменьшение диаметра частиц, что, по всей видимости, было связано с частичным разрушением комплексов ДНК-Н2А-ТАТ при высокой концентрации соли.

Полученные данные свидетельствуют о том, что размер комплексов Н2А-ТАТ-ДНК сильно зависит от концентрации соли в суспензии. Формирование крупных агрегатов может существенно снизить эффективность доставки генов при использовании Н2А-ТАТ, так как комплексы размером больше 300 нм могут быстро выводиться из кровотока ретикулоэндотелиальной системой [15,16], а их проникновение в ткань может быть сильно затруднено [17].

В то же время гистон Н2А при взаимодействии с ДНК образует комплексы с эффективным диаметром около 200 нм. Частицы такого размера больше подходят для доставки ДНК в условиях *in vivo*. Чем можно объяснить существенное различие в размерах комплексов двух белков с ДНК? ТАТ-пептид сам по себе обладает способностью конденсировать ДНК [24]. По-видимому, добавление к С-концу Н2А-последовательности ТАТ-пептида приводит к формированию дополнительного центра связывания с ДНК, что переключает равновесие в системе в сторону образования более крупных комплексов в растворе с физиологической концентрацией соли. При низкой концентрации соли данный эффект не наблюдается. ζ -Потенциал комплексов ДНК с обоими гистонами лежит в пределах значений, позволяющих ис-

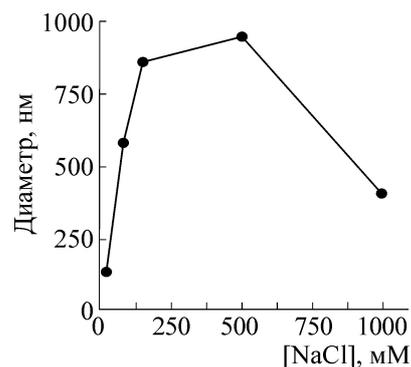


Рис. 2. Зависимость эффективного диаметра комплексов Н2А-ТАТ-ДНК от концентрации соли. 20 мкг ДНК в 2 мл 0,16-кратного фосфатно-солевого буфера, разбавленного в 16 раз, смешивали с 500 мкг модифицированного гистона Н2А-ТАТ (соотношение 1:25 по массе ДНК к Н2А-ТАТ). Начальная концентрация NaCl составляла 20 мМ. Далее в кювету небольшими порциями добавляли фосфатно-солевой буфер с 5 М NaCl так, чтобы конечная концентрация соли в суспензии последовательно возрастала до значений 80 мМ, 150 мМ, 150 мМ, 500 мМ и 1 М.

пользовать данные комплексы в экспериментах *in vivo* [15].

ВЫВОДЫ

В работе исследованы физико-химические параметры частиц, образующихся при конденсации ДНК различными вариантами гистонов. Гистон Н2А и модифицированный гистон Н2А-ТАТ способны конденсировать ДНК при весовом соотношении ДНК:гистон 1:1. Комплексы Н2А-ДНК, обладающие способностью трансфицировать клетки, имеют эффективный диаметр около 200 нм и положительный ζ -потенциал. Комплексы Н2А-ТАТ-ДНК имеют несколько бóльший ζ -потенциал и формируют агрегаты с эффективным диаметром около 1 мкм. Хотя ТАТ-пептид используется для увеличения эффективности доставки комплексов во многих системах, значительный размер комплексов Н2А-ТАТ с ДНК может серьезно ограничивать их применение в условиях *in vivo*, так как выход таких комплексов из кровяного русла может быть сильно затруднен, а также в силу высокой скорости выведения из кровотока. В связи с этим для доставки плазмидной ДНК в условиях *in vivo* предпочтительно использовать комплексы с гистоном Н2А, имеющие более подходящий размер.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-04-04589).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. D. Sverdlov, *Curr. Gene Ther.* **11** (6), 501 (2011).
2. C. Sheridan, *Nat. Biotechnol.* **29** (2), 121 (2011).
3. J. R. Mendell, K. Campbell, L. Rodino-Klapac, et al., *N. Engl. J. Med.* **363** (15), 1429 (2010).
4. A. C. Nathwani, E. G. Tuddenham, S. Rangarajan, et al., *N. Engl. J. Med.* **365** (25), 2357 (2011).
5. S. E. Raper, N. Chirmule, F. S. Lee, et al., *Mol. Genet. Metab.* **80** (1–2), 148 (2003).
6. В. В. Соловьева, Н. В. Кудряшова и А. А. Ризванов, *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* **6** (3), 29 (2011).
7. M. Kaouass, R. Beaulieu, D. Balicki, *J. Control Release* **113** (3), 245 (2006).
8. J. D. Fritz, H. Herweijer, G. Zhang, et al., *Hum. Gene Ther.* **7** (12), 1395 (1996).
9. M. Bottger, S. V. Zaitsev, A. Otto, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1395** (1), 78 (1998).
10. D. Balicki, E. Beutler, *Mol. Med.* **3** (11), 782 (1997).
11. D. Rahmat, M. I. Khan, G. Shahnaz, et al., *Biomaterials* **33** (7), 2321 (2012).
12. V. P. Torchilin, T. S. Levchenko, R. Rammohan, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (4), 1972 (2003).
13. H. Hashida, M. Miyamoto, Y. Cho, et al., *Br. J. Cancer* **90** (6), 1252 (2004).
14. S. F. Ye, M. M. Tian, T. X. Wang, et al., *Nanomedicine* **8** (6), 833 (2012).
15. C. He, Y. Hu, L. Yin, et al., *Biomaterials* **31** (13), 3657 (2010).
16. D. Liu, A. Mori, and L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta* **1104** (1), 95 (1992).
17. S. K. Hobbs, W. L. Monsky, F. Yuan, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (8), 4607 (1998).
18. D. Oupicky, M. Ogris, K. A. Howard, et al., *Mol. Ther.* **5** (4), 463 (2002).
19. K. K. Ewert, A. Zidovska, A. Ahmad, et al., *Top. Curr. Chem.* **296**, 191 (2010).
20. Ю. Д. Нечипуренко, А. М. Вольф и Ю. М. Евдокимов, *Биофизика* **48** (5), 802 (2003).
21. D. Huang, N. Korolev, K. D. Eom, et al., *Biomacromolecules* **9** (1), 321 (2008).
22. N. Korolev, N. V. Berezhnoy, K. D. Eom, et al., *Nucl. Acids Res.* **37** (21), 7137 (2009).
23. M. Ogris, P. Steinlein, M. Kurska, et al., *Gene Ther.* **5** (10), 1425 (1998).
24. I. A. Ignatovich, E. B. Dizhe, A. V. Pavlotskaya, et al., *J. Biol. Chem.* **278** (43), 42625 (2003).

Physicochemical Properties of Histone H2A and Modified Histone H2A-TAT Complexes with Plasmid DNA

A.V. Vvedenskii* **, S.V. Sizova*, and A.I. Kuzmich* ***

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

***Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Akademika Kurchatova 2, Moscow 123182 Russia

Histone H2A can deliver transgenic DNA into mammalian cells *in vitro*. The ability of DNA delivery *in vivo* is a question of the further work, but it is possible to estimate factors in *in vitro* experiments, which affect delivery *in vivo*. The first step in this direction was to determine sizes and ζ -potentials of histone H2A complexes with DNA. In this work, we produced recombinant histone H2A and its modification, containing TAT-peptide from human immunodeficiency virus TAT protein, which is capable of enhancing macromolecule delivery into mammalian cells. The effective diameters and ζ -potentials of histones-DNA complexes were estimated. Complexes of histone H2A and complexes of modified histone H2A-TAT with DNA had positive ζ -potentials. Complexes of histone H2A with DNA had an effective diameter of about 200 nm. Histone modification with TAT-peptide led to aggregation and formation of massive particles of about 1 μm in diameter.

Key words: histone–DNA complexes, histone H2A, particle size, ζ -potential of particles, DNA condensation, TAT-peptide