ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXII, 11, 1979

УДК 547.963.3:577.17

# СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТКАНЕЙ ЗДОРОВЫХ И ОПУХОЛЕНОСЯЩИХ КРЫС В ПРОЦЕССЕ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

В. М. АСЛАНЯН, С. Г. АРУТЮНЯН, П. П. ЯСЕМ, Ю. С. БАБАЯН, Дж. В. ГАРИБЯН, Г. М. СТЕПАНЯН

Исследовались некоторые изменения в структуре ДНК в процессе опухолевого роста. Обнаружены отличия в степени метилирования и форме кривых плавления ДНК опухоли и ДНК тканей здоровых и опухоленосящих крыс. Показано, что в процессе опухолевого роста увеличивается степень метилирования и количество дестабилизированных дефектных участков (протяженностью как минимум несколько десятков пар оснований) в ДНК и особенно в ДНК, выделенных из опухолевых тканей.

Результаты большого количества экспериментальных работ последних лет, посвященных выявлению различий в физико-химических свойствах ДНК опухолей по сравнению с ДНК нормы, показывают, что в опухолевых ДНК возможны изменения в первичной и вторичной структуре [7—10, 13, 16, 19, 27].

В окончательном формировании вторичной структуры и биологических свойств ДНК у животных существенную роль играет включение метильных групп в пятом положении цитозина (5 МЦ) [1—6, 11, 23, 24], которые, не изменяя количество комплиментарных водородных связей, заметно изменяют внутримолекулярные Ван-дер-Ваальсовые взаимодействия, стабилизируя вторичную структуру ДНК [15].

Вопрос о метилировании представляет особый интерес, так как у опухолевых ДНК выявлены различия в степени метилирования по сравнению с нормой [12, 20], что, по-видимому, находится в прямой корреляции с транскрипцией и, возможно, амплификацией генов [20].

Анализируя полученные ранее данные, можно сказать, что изменения во вторичной структуре ДНК опухолей в основном сводятся к увеличению количества дефектных (однонитчатые разрывы, локально денатурированные участки и т. д.) участков цепи ДНК и к изменению степени метилирования. Эти характерные для опухолевых ДНК дефектные участки могут быть выявлены на кривой плавления. Они могут изменить интервал ($\Delta T$) и температуру ($T_m$) плавления, если имеют длину как минимум несколько десятков пар оснований [1, 2].

Поэтому, чтобы выяснить возможные изменения в структуре ДНК при малигнизации, в настоящей работе УФ-спектрофотометрическим методом исследовались ДНК, выделенные из опухолей и разных органов (селезенка, семенники, печень) здоровых и опухоленосящих крыс.

*Материал и методика.* В опытах использовались здоровые и с трансплантированной саркомой 45 белые беспородные крысы массой 100—120 г. Для исследования кинетики опухолевого роста и анализа возможных изменений в первичной структуре опухолевых ДНК исследовались ДНК из тканей здоровых животных и тканей опухоленосящих крыс, выделенные на 5-й, 8-й и 15-й дни после перезивки саркомы 45. Такой выбор дней объясняется тем, что для этой опухоли первые 5 дней являются периодом интенсивного роста, 8—9-й—периодом максимального роста опухоли, а на 15-й наступает некроз и гибель животного. Замороженную ткань гомогенизировали в стандартном солевом растворе с ЭДТА в присутствии однопроцентного додецилсульфата натрия при pH 8 и из гомогената с помощью хлороформной и фенольной депротеинизации выделяли препараты суммарной ДНК. Полученные препараты обрабатывали панкреатической РНК-азой и затем проназой в стандартных условиях для удаления РНК и белка. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [18], количество белка и РНК препаратов не превышало 0,5%. Для определения нуклеотидного состава ДНК, включая 5 МЦ, препараты высушивали при 105° и гидролизовали до оснований (99%-ная муравьиная кислота, 175°, 30 мин), основания разделяли с помощью двукратной одномерной восходящей хроматографии на бумаге. Разделенные основания определяли спектрофотометрически [26].

Плавление ДНК проводили в буфере 0,1 SSC (1 SSC=0,15 M NaCl+0,015 M цитрат натрия, pH 7,3). Кривые плавления получены на спектрофотометре UNICAM SP-8000 с плотно закрывающимися 5-миллиметровыми кварцевыми кювстами, при непрерывном режиме нагрева растворов ДНК со скоростью 0,25° в мин. Точность определения температуры 0,05°, оптической плотности—0,029 Д. Гиперхромность для всех препаратов ДНК составляла 36—38%, что характерно для нативных ДНК.

Поскольку на кривых плавления, полученных с помощью спектрофотометра, структурные особенности ДНК проявляются слабо, был осуществлен переход к дифференциальным кривым плавления (ДКП)*. При этом исходная кривая плавления нормировалась и несколько раз сглаживалась многочленом третьего порядка, проведенным через 5 точек методом наименьших квадратов. Затем проводилось численное дифференцирование. Для расчетов использовались ЭВМ ЕС-1022 и ЕС-1030.

*Результаты и обсуждение.* Сравнительное изучение ДНК из семенников, селезенки и печени здоровых животных показывает, что характеристики кривой плавления этих ДНК (температура, Tm и интервал $\Delta T$ плавления), общий вид ДКП (два пика и одно плечо), расположение пиков (на рисунке показан общий вид ДКП всех ДНК органов здоровых животных), степень метилирования (таблица) и нуклеотидный состав (для всех препаратов ДНК соблюдаются правила Чаргаффа) одинаковы.

Анализ ДКП препаратов ДНК, выделенных из органов опухоленосящего животного, показывает, что общий вид их сохраняется, изменяется только начало (рисунок) и место расположения второго пика. Из таблицы следует, что у ДНК из органов опухоленосящих животных есть тенденция к уменьшению Tm и увеличению 5 МЦ по сравнению с нормой. По-видимому, к понижению Tm приводит увеличение количества протяженных дефектных участков, эффект которого превалирует над эффектом возрастания степени метилирования, приводящего к стабилизации ДНК [15]. ДКП опухолевой ткани существенно отличаются

---

* Дифференцирование кривых плавления проведено в НБОХ АН БССР, за что авторы благодарны Д. Ю. Лапдо.

от ДКП ДНК остальных препаратов (рис.). У опухолевой ДНК в начале плавления отмечается дополнительное плечо в интервале 56—60°, которое, по-видимому, свидетельствует о наличии в цепи опухолевой ДНК повышенного количества дестабилизованных дефектных участков, содержащих не менее нескольких десятков пар оснований по сравнению с ДНК нормы и ДНК из органов опухоленосящих животных. Существенно отличаются и другие характеристики (нуклеотидный состав, Tm,

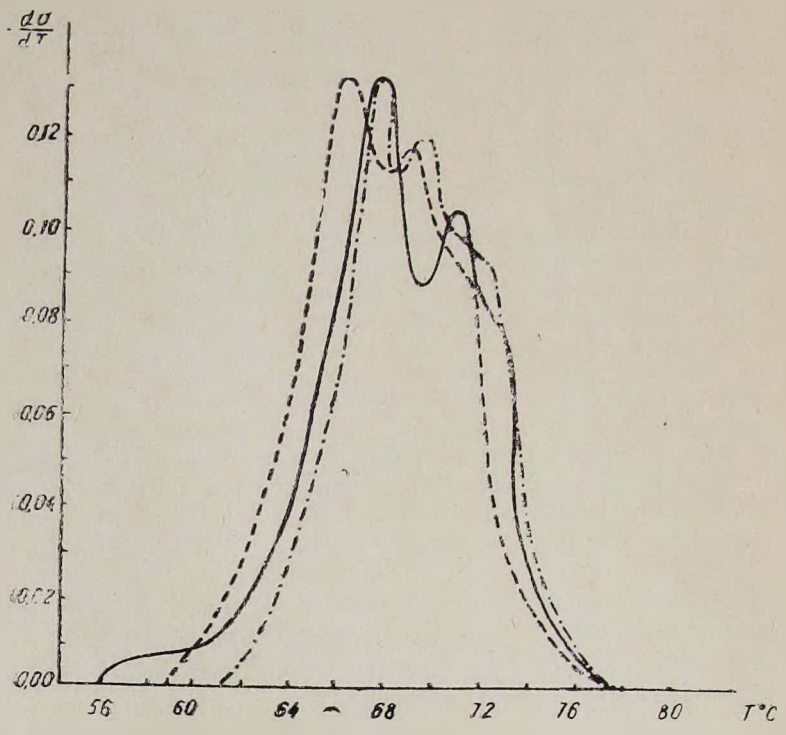


Рис. Дифференциальные кривые плавления ДНК из органов здоровых (———), опухолевых тканей (—.—.—) и из тканей опухоленосящих крыс (— — —) в процессе опухолевого роста. σ—степень спиральности ДНК.

ΔT). В настоящее время нет единого мнения относительно изменения нуклеотидного состава ДНК в процессе опухолевого роста. Одни авторы [21] приводят данные о повышении содержания 5 МЦ, согласно другим [14], содержание 5 МЦ понижается, по сравнению с ДНК нормы. Однако изменение степени метилирования может рассматриваться как один из возможных механизмов регуляции транскрипции [17, 25]. Увеличение степени метилирования ДНК из органов опухоленосящих животных и опухолевой ткани (таблица), по-видимому, можно объяснить изменением структуры хроматина, что дает возможность лучше работать соответствующим метилазам. Следовательно, наши данные о разном содержании 5 МЦ в нормальных и раковых клетках согласуются с данными о неодинаковой акцепторной способности ДНК

при метилировании in vivo в этих клетках, повышении ДНК метилазной активности в раковых клетках [3]. Изменение характеристик опухолевых ДНК достигают насыщения у ДНК, выделенных на 8-й день после перевивки опухоли. Видимо, это связано с тем, что 8—9-й день является периодом максимального роста опухоли. Интересно себя ведут Tm и ΔT. Как следует из таблицы, эти показатели почти не изменяются у ДНК из органов больных животных, тогда как у ДНК опухоли ΔT увеличивается на 0,2°, а Tm уменьшается на 0,5—0,6°. Это соответствует Tm ДНК 8-дневной опухоли. В дальнейшем Tm и ΔT существенных изменений не претерпевают. Полученные результаты можно объяснить исходя из известных предположений о возможном образовании в ДНК из опухолевых тканей повышенного количества дефектных участков, содержащих как минимум несколько пар оснований, и увеличении количества 5 МЦ в опухолевых ДНК по сравнению с ДНК нормы. Следовательно, в процессе опухолевого роста возможны изменения в структуре ДНК как в опухолевых тканях, так и в тканях органов опухоленосящих животных. Сопоставляя данные о метилировании Tm и ΔT, можно сделать вывод об относительной эффективности влияния этих факторов на вторичную структуру ДНК. Например, так как Tm ДНК мало изменяется в 8—15-дневной опухоли (таблица), то, по-видимому,

Таблица

Нуклеотидный состав, температура и интервал плавления ДНК из органов здоровых, опухолевых тканей и из тканей опухоленосящих крыс в процессе опухолевого роста

| Время после перевивки опухоли, сутки | Источник ДНК | Содержание оснований, мол./% | | | Tm° | ΔT° |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | АТ | ГЦ | 5МЦ | | |
| 0 | печень | 55,6 | 43,6 | 1,02±0,022 | 68,9 | 6,0 |
| | селезенка | 56,3 | 42,5 | 1,12±0,018 | 69,1 | 6,0 |
| | семенники | 56,7 | 42,3 | 1,00±0,001 | 68,9 | 6,0 |
| 5 | печень | 56,2 | 42,6 | 1,39±0,021 | 68,9 | 5,9 |
| | селезенка | 56,3 | 41,4 | 1,60±0,03 | 68,7 | 6,0 |
| | семенники | 57,5 | 41,3 | 1,23±0,053 | 68,8 | 5,8 |
| | опухоль | 55,8 | 42,5 | 1,68±0,010 | 68,8 | 6,0 |
| 8 | печень | 57,2 | 41,3 | 1,71±0,045 | 68,7 | 5,8 |
| | селезенка | 58,9 | 39,4 | 1,71±0,035 | 68,7 | 6,0 |
| | семенники | 56,4 | 42,0 | 1,66±0,017 | 68,6 | 5,8 |
| | опухоль | 59,1 | 38,8 | 1,93±0,017 | 68,4 | 6,2 |
| 15 | печень | 59,3 | 39,6 | 1,07±0,011 | 68,8 | 5,8 |
| | селезенка | 56,7 | 41,8 | 1,25±0,022 | 68,7 | 6,0 |
| | семенники | 56,9 | 42,1 | 1,01±0,018 | 68,8 | 5,9 |
| | опухоль | 53,8 | 44,9 | 1,35±0,025 | 68,3 | 6,2 |

у 8-дневной опухоли по сравнению с 15-дневной эффект уменьшения содержания 5 МЦ и количества дефектных участков взаимно компенсируют друг друга по действию на Tm.

Таким образом, изменение характера метилирования генома и дефекты во вторичной структуре могут лежать в основе нарушения регуляции транскрипции генома и клеток в опухолях. Поэтому можно заключить, что рост некоторых опухолевых клеток сопровождается увеличением метилирования генома и изменением вторичной структуры ДНК, а так как, по-видимому, ДНК является мишенью при действии различных противоопухолевых препаратов [22], то можно предположить, что изучение нарушения первичной и вторичной структуры опухолевых ДНК может привести к более целенаправленному синтезу противоопухолевых препаратов.

Ереванский государственный университет,
кафедра молекулярной физики и биофизики,
ИТОХ АН АрмССР

Поступило 5.X 1979 г

## ԱՌՈՂՋ ԵՎ ՈՒՌՈՒՑՔԱԿԻՐ (ՍԱՐԿՈՄԱ 45) ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐԻՑ ԱՆՋԱՏՎԱԾ ԴՆԹ-ՆԵՐԻ ՀԱՄԵՄԱՏԱԿԱՆ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ ՈՒՌՈՒՑՔԻ ԱՃՄԱՆ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ

Վ. Մ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, Ս. Գ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Պ. Պ. ՅԱՍԵՄ,
Յու. Ս. ԲԱԲՈՅԱՆ, Ջ. Վ. ՂԱՐԻԲՅԱՆ, Հ Մ. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ

*Ուսումնասիրված է ուռուցքի աճման ընթացքում ԴՆԹ-ի կառուցվածքում կատարվող հնարավոր փոփոխությունները։ Հայտնաբերված են տարբերություններ առողջ և ուռուցքակիր առնետների հյուսվածքների ԴՆԹ-ների մեթիլացման աստիճանում և հալման կորերի տեսքում։ Յույց է տրված, որ ուռուցքի աճման ընթացքում ավելանում է ԴՆԹ-ի մեթիլացման աստիճանը և ապակայունացված դևֆեկտային տեղամասերի (առնվազն մի քանի տասնյակ զույգ հիմքեր երկարությամբ) քանակը, հատկապես ուռուցքային հյուսվածքներից անջատված ԴՆԹ-ում։*

## COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF DNA, SEPARATED FROM TISSUES OF HEALTHY AND TUMOR-CARRYING RATS (SARCOMA 45) IN THE PROCESS OF TUMOR-GROWING

V. M. ASLANIAN, S. G. HARUTYUNIAN, P. P. YASEM,
Yu. S. BABAIAN, G. V. GHARIBIAN, G. M. STEPANIAN

The possible changes in structure of DNA in tumor-growing process are investigated. The differences in degree of methylation, in form of tumoral DNA melting curve and DNA tissues of healthy and tumorcarrying rats are found. It's shown, that in the process of tumor-growing the degree of methylation and the quantity of destabilized defective sections (with minimum extent of several tens base-pairs) in DNA and especially strongly in DNA, separated from tumoral tissues, increases.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Ахрем А. А., Ландо Д. Ю., Андрианов В. Т.* Мол. биол., *11*, 1065, 1977.
2. *Ахрем А. А., Ландо Д. Ю., Андрианов В. Т., Крот В. И.* Мол. биол., *11*, 555, 1977.
3. *Бурцева И. Н.* и др. Биохимия, *43*, 11, 2082, 1978.
4. *Ванюшин Б. Ф.* и др. ДАН СССР, *147*, 9581, 1962
5. *Ванюшин Б. Ф.* Успехи совр. биол., *695*, 169, 1968.
6. *Васильев В. К.* и др. ДАН СССР, *205*, 721, 1972.
7. *Жижина Г. П., Бобович С. Н.* и др. ДАН СССР, *295*, 3, 1977.
8. *Жижина Г. П., Бобович С. Н.* и др. ДАН СССР, *217*, 3, 1974.
9. *Кузьмина С. В., Стражевская И. Б.* Биофизика, *15*, 1133, 1970.
10. *Миль Е., Завриев С. К.* и др. ДАН СССР, *209*, 217, 1973.
11. Строение ДНК и положение организмов в системе, 279, М., 1972.
12. *Чачоян А. А.* и др. Журн. эксп. и клин. мед., *17*, 4, 1977.
13. *Чанчанашвили З. Н.* и др. Сб. Конформационные изменения биополимеров в растворах, Тбилиси, 1975.
14. *Desai L. S. et al.* Exptl. Cell. Res., *65*, 260, 1971.
15. *Ehrlich M., Ehrlich K., Mayo J. A.* BBA, *395*, 109, 1975.
16. *Fiel L. S., Bardos T. J. et al.* Cancer. Res., *25*, 1244, 1965.
17. *Kappler J. W.* J. Cell. Physiol., *78*, 33, 1971.
18. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J. et al.* J. Biol. Chem., *193*, 265, 1951.
19. *Susiu P., Postescu P.* Stud. Biophys., *35*, 89, 1973.
20. Syemayer BBA, *224*, 10, 1970.
21. *Silber R. et al.* BBA, *123*, 633, 1965.
22. *Swan P. F., Magee P. W.* J. Biochem., *110*, 39, 1968.
23. *Vanyushin B. F. Tkatchyova S. G. et al.* Nature, *225*, 948, 1970.
24. *Vanyushin B. F. et al.* BBA, *29*, 397, 1973.
25. *Vanyushin B. F. et al.* Clerotologia, *19*, 130, 1973.
26. *Vanyushin B. F., Masin A. L. et al.* BBA, *299*, 1979.
27. *Webb S. J., Bater A.* Phys. Med. Biol., *15*, 271, 1970.