

ЦИРКУЛЯРНЫЕ ДНК ИЗ КЛЕТОК САРКОМЫ-45 КРЫС

А. С. АГАБАЛЯН, Р. Г. ПОГОСЯН, Г. М. СТЕПАНЯН, С. А. ПАШИНЯН,
 Ю. А. ИСРАЕЛЯН, Р. А. ЗАХАРЯН, Б. Т. ГАРИБДЖАНЫАН

В работе изучались физико-химические и биологические свойства ДНК, выделенной из субклеточных фракций клеток саркомы-45, полученной химическим канцерогенезом. В ядерной и митохондриальной фракциях обнаружены добавочные ДНК с молекулярными весами 3 и 5 мгд, установлена их циркулярная природа. Обнаруженные добавочные молекулы циркулярных ДНК обладали выраженной биологической активностью.

Одним из важнейших открытий в области изучения структуры и функции онкорнавирусов явилось открытие обратной транскриптазы, фермента, посредством которого осуществляется синтез ДНК на матрице РНК. В результате этого процесса формируется промежуточная форма ДНК, «провирус», которая в клетке находится в различных состояниях—интегрированной и свободной, линейной и циркулярной, но почти всегда обладает инфекционными свойствами. Молекулярный вес этих ДНК обычно варьирует в пределах 2—10 мегадальтон (мгд) [4, 5].

В свете сказанного представлялось интересным изучить некоторые физико-химические и биологические свойства ДНК в клетках трансплантированной саркомы-45, первоначально полученной химическим канцерогенезом.

Материал и методика. Опухоль, саркома-45, трансплантировалась крысам по общепринятой методике [2]. Опухолевые клетки, полученные от животных на 15-е сутки перевивки, разрушали в стеклянном гомогенизаторе в 10-ти объемах буфера, содержащего 0,05 М трис-НСl, рН 7,7, 0,005 М MgCl₂, 0,025 М KCl, 0,25 М сахарозы. Гомогенат центрифугировали при 5000 g в течение 15 мин при 4°. Осадок (ядерная фракция) отбирали, а надосадочную жидкость (митохондриальная—микросомальная фракция) центрифугировали при 16000 об/мин в течение 30 мин при 4°. В результате чего получали митохондриальную фракцию. Оба осадка (ядерная и митохондриальная фракции) суспендировали в указанном выше буфере и использовали в дальнейшей работе. Экстракцию ДНК из субклеточных фракций проводили по Мармуру [7]. Количественные и качественные характеристики препаратов ДНК определяли спектрофотометрически.

Электрофоретическую идентификацию ДНК из субклеточных фракций проводили в 0,6%-ном геле агарозы с интеркалирующей краской, этидий бромидом. Окрашенные полосы ДНК элюировали с гелей, элюат осаждали холодным свежеперегнаным этанолом при -20° в течение 4 час., после чего осадок растворяли в буфере с 0,05 М трис-НСl, рН 7,4, и 0,05 М NaCl. Гидролиз РНК в препаратах осуществляли при помощи панкреатической РНК-азы (20 мкг/мл) при 37° в течение 30 мин.

Результаты и обсуждение. После экстракции ДНК получили два препарата: ДНК из ядерной и митохондриальной фракций. На рис. 1 показано, что при электрофорезе в 0,6%-ном агарозном геле в ДНК ядерной фракции наряду с высокомолекулярной хромосомной ДНК (около 30 мгд) присутствуют по крайней мере еще три добавочные ДНК с различными молекулярными весами (10, 5 и 3 мгд). В препаратах ДНК из митохондриальной фракции выявлены две добавочные полосы низкомолекулярной ДНК (5 и 3 мгд).

В серии экспериментов, поставленных с целью изучения добавочных ДНК, было обнаружено, что низкомолекулярные добавочные ДНК обеих фракций имеют циркулярную природу. Этот факт был установлен в результате неоднократного замораживания и оттаивания препаратов ДНК. После двух-трехкратного замораживания и оттаивания при электрофорезе выявляются уже не две окрашенные полосы в нижней части геля, а четыре, которые в свою очередь после последующих замораживаний и оттаиваний вновь проявляются в виде двух полосок (рис. 2). Однако миграция этих молекул в геле четко различает-

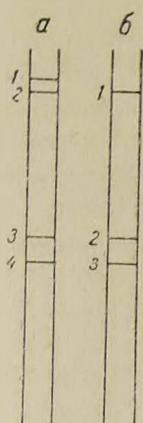


Рис. 1.

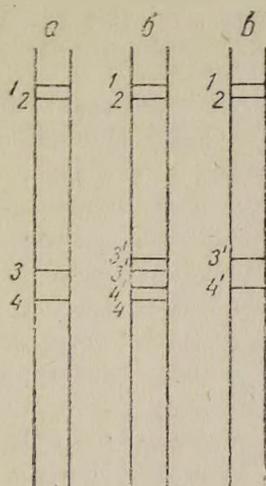


Рис. 2.

Рис. 1. Электрофорез ДНК, выделенной из саркомы-45 крыс. а) ДНК из ядерной фракции. 1—хромосомная ДНК, 2—ДНК—10 мгд, 3—суперспирализованная ДНК—5 мгд, 4—суперспирализованная ДНК—3 мгд. б) ДНК из митохондриальной фракции. 1—митохондриальная ДНК—10 мгд, 2—суперспирализованная ДНК—5 мгд, 3—суперспирализованная ДНК—3 мгд.

Рис. 2. Электрофорез ДНК, выделенной из саркомы-45, после неоднократного замораживания и оттаивания. а) ДНК из ядерной фракции до замораживания и оттаивания. 1—хромосомная ДНК, 2—ДНК—10 мгд, 3—суперспирализованная ДНК—5 мгд, 4—суперспирализованная ДНК—3 мгд. б) ДНК из ядерной фракции после замораживания и оттаивания. 1—хромосомная ДНК, 2—ДНК—10 мгд, 3'—открытая циркулярная форма ДНК—5 мгд, 3—суперспирализованная ДНК—5 мгд, 4'—открытая циркулярная форма ДНК—3 мгд, 4—суперспирализованная ДНК—3 мгд. в) 1—хромосомная ДНК, 2—ДНК—10 мгд, 3'—открытая циркулярная форма ДНК—5 мгд, 4'—открытая циркулярная форма ДНК—3 мгд.

ся от первоначальной. Описанное явление имеет место при переходе суперспирализованных молекул ДНК в открытые циркулярные формы. Подобный конформационный переход ковалентно замкнутых циркулярных ДНК в открытую циркулярную форму вследствие неоднократного замораживания и оттаивания описан в ряде сообщений [3, 8].

Полученные нами данные о конформационном изменении ДНК из субклеточных фракций опухоли саркомы-45 доказывают циркулярную природу обнаруженных низкомолекулярных добавочных ДНК. ДНК же с молекулярным весом 10 мгд аналогична митохондриальной и, возможно, является примесью последней.

В специальных экспериментах изучались канцерогенные свойства суммарных препаратов ДНК, экстрагированных из саркомы-45.

В опыт брали белых беспородных крыс-самцов весом 90—110 г. Суммарные препараты ДНК из ядерной и митохондриальной фракций растворяли в физиологическом растворе, содержащем ДЭАЭ-декстран (0.5 мг/мл). Суспензию вводили интактным животным, причем одна половина получала препарат в дозе 1 мг, а другая—0.5 мг. Контрольные животные получали только физиологический раствор с ДЭАЭ-декстраном. Препараты вводились подкожно в левый бок животного. Введение препаратов ДНК с ДЭАЭ-декстраном обеспечивало защиту ДНК от действия клеточных нуклеаз. Это свойство ДЭАЭ-декстрана описано нами ранее [1].

Ежедневные наблюдения показали, что через 6 суток у всех крыс подопытной группы образовались небольшие, размером с чечевичку, опухолеподобные образования. У контрольных животных подобные образования полностью отсутствовали. Наблюдения, проводимые в течение месяца, не выявили дальнейшего роста этих образований.

На 30-е сутки по 5 крыс из подопытной и контрольной групп были забиты для гистологического анализа. У подопытных животных в подкожной клетчатке были обнаружены плотные, капсулированные опухолевидные образования размером с чечевичку, которые отсутствовали в контроле.

Микроскопический анализ подкожной клетчатки показал, что у подопытных животных, по сравнению с контрольными, произошло заметное разрастание опухолеподобной ткани, с выраженным клеточным и тканевым атипизмом, что напоминает картину изменений при опухолях соединительнотканного происхождения. В паренхиме опухолеподобного разрастания встречаются очаги некроза и лимфогистоцитарные инфильтраты (рис. 3).

Полученные нами данные говорят о биологической активности обнаруженных циркулярных молекул ДНК. Имеют ли эти ДНК вирусную природу или являются нуклеиновыми кислотами клеточного происхождения, сказать пока трудно.

Хюбнер и Тодаро [6] сформулировали гипотезу, предполагающую вертикальную передачу информации РНК-содержащего вируса С-типа (виروهена) у большинства позвоночных. Этот виروهен служит эндогенным источником онкогенной информации онкогеном, который транс-

формирует нормальную клетку в опухолевую. По предположению авторов, все спонтанные или индуцированные химическим или физическими канцерогенными агентами опухоли являются результатом депрес-

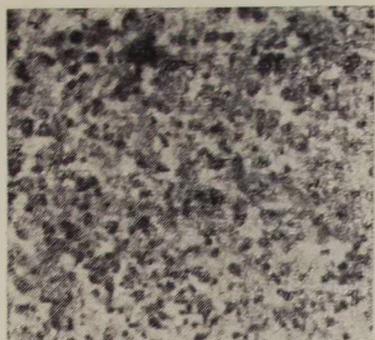


Рис. 3. Очаги некроза на паренхиме опухолеподобной ткани. Окр. гематоксилин-эозином. Ув. 250.

сии онкогена в геноме клетки. Выявленные нами добавочные ДНК в субклеточных фракциях опухоли могут быть следствием активации онкогена в геноме и стимуляции нового синтеза, в результате которого формируются циркулярные ДНК, обладающие биологической активностью.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР,
Институт тонкой органической химии им. А. Л. Мнджояна
АН АрмССР

Поступило 21.II 1979 г.

ՅԻՐԿՈՒԷՅԱՐ ԴՆԹ ՍԱՐԿՈՄԱ.—45 ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՌԻՌՈՒՅՔԱՅԻՆ ԲՋԻՋՆԵՐԻՑ

Ա. Ս. ԱՂԱՐՍՅԱՆ, Ռ. Գ. ՊՈՂՈՍՅԱՆ, Գ. Ս. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ, Ս. Ա. ՓԱՇԻՆՅԱՆ,
ՅՈՒ. Ա. ԻՍՐԱՅԻՆՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Բ. Տ. ՂԱՐԻՔՉԱՆՅԱՆ

Հոդվածը նվիրված է ԴՆԹ-ի ֆրիզիկա-քիմիական և կենսաբանական հատկությունների ուսումնասիրմանը, որն անջատված է քիմիական կանցերոգենով ստացված սարկոմա—45 ուռուցքային բջիջների ենթաբջջային ֆրակցիաներից:

Պարզվել է, որ միջուկային և միտոքոնդրիալ ֆրակցիաներում կան լրացուցիչ ԴՆԹ-ներ՝ 3 և 5 մդդ մոլեկուլյար կշիռներով: Հաստատվել է նրանց ցիրկուլյար բնույթը: Յույց է տրվում, որ այդ լրացուցիչ ԴՆԹ-ներն ունեն խիստ արտահայտված կենսաբանական ակտիվություն, քանի որ նրանց ներմտումը ինտակտ կենդանիների օրգանիզմի մեջ վերջիններիս մոտ առաջացնում է ուռուցքանման աճեր:

THE CIRCULAR DNA FROM SARCOMA TUMOR CELLS

A. S. AGABALIAN, R. G. POGOSIAN, G. M. STEPANIAN, S. A. PASHINIAN,
Y. A. ISRAELIAN, R. A. ZAKARIAN, B. T. GARIBDJANIAN

The physico-chemical and biological properties of DNA isolated from subcell fractions of sarcoma 45 tumor cells received by chemical cancerogen has been studied. Supplementary DNA with molecular weights 3 and 5 megadaltons in the nuclear and mitochondrial fractions have been found and the circular nature of these DNA has been established. Supplementary DNA possesses sharply expressed biological activity—after their injection into intact animals in latters appear tumor-like accretions with all the features characteristic for the tumor-like tissue.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агабян А. С., Мельших Л. К., Ершов Ф. И. *Вопр. вирусол.*, 5, 527—531, 1971.
2. Чернов В. А. *Методы экспериментальной химиотерапии*. 357, М., 1971.
3. Aaij C., Borst P. *Biochim. Biophys. Acta*, 269, 197—200, 1972.
4. Canaoni E., Duesberg P., Dino D. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74, 29—33, 1977.]
5. Gianni A., Hulton J., Smotcin D., Weinberg R. *Science*, 191, 569—571, 1972.
6. Huebner R., Todaro J. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 64, 1087—1094, 1969.
7. Marmur J. J. *Mol. Biol.*, 12, 468—487, 1961.
8. Meyers J., Sanchez D., Etwell L., Falkow S. *J. Bacteriol.*, 127, 1529—1537, 1976.