

УДК [577.12:616—006].59

БИОХИМИЯ

Дж. В. Гарибян, Г. М. Степанян, И. С. Даниелян,
 Ю. С. Бабалян, Б. Т. Гарибджанян, В. М. Асланян

Сравнительное изучение структуры и свойств ДНК некоторых экспериментальных опухолей

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР А. А. Галояном 20/II 1979)

Важное значение для проявления терапевтического эффекта противоопухолевых препаратов имеет взаимодействие активного вещества со структурными элементами клетки, т. е. их биохимическое действие связано в основном с непосредственной атакой ДНК, что вызывает повышенный интерес исследователей к отличиям в структуре ДНК опухолевых и нормальных клеток. В литературе имеются указания о связи метилирования ДНК с дифференциацией и специализацией клеток, а также о том, что опухолеродное перерождение клеток сопряжено с изменением метилирования их ДНК (¹), т. е. в трансформированных клетках с измененной регуляцией транскрипции и репликации генома может иметь место иной характер метилирования ДНК по сравнению с нормальными клетками (²).

Метилирование ДНК—энзиматический процесс включения метильных групп из S-аденозилметионина в азотистые основания полинуклеотидной цепи ДНК. Продукт метилирования в ДНК животных—исключительно 5-метилцитозин.

Некоторые исследователи при изучении перевиваемых опухолей мышей и крыс различной локализации наблюдали количественную корреляцию содержания ДНК со скоростью их роста. Так, например, содержание ДНК в медленно растущих гепатомах крыс находится в нормальных пределах, несколько увеличено в гепатомах с большей скоростью роста и значительно повышено в низкодифференцированных, утративших тканевую специфичность опухолях (^{3,4}). А поскольку известно, что имеется некоторая корреляция между скоростью синтеза и скоростью метилирования ДНК (^{5,6}), то сопоставление данных о сравнительном изучении характера метилирования ДНК опухолей может свидетельствовать о нестереотипности взаимодействия опухоли и организма, его зависимости от вида и скорости роста опухоли.

Исходя из вышесказанного при выполнении настоящей работы нас интересовали следующие вопросы: имеются ли отличия в нуклеотидном составе ДНК экспериментальных опухолей, характеризующиеся разными морфологическими и биологическими свойствами (асцитная опухоль Эрлиха, карциносаркома 256 Уокера, саркома М—1, лимфосаркома Плисса, лимфолейкоз Швеца, саркома 45, саркома 180); отличаются ли физико-химическими свойствами ДНК опухолевых и нормальных клеток.

В наших исследованиях особое внимание было уделено изучению уровня метилирования (содержание 5-метилцитозина) в этих ДНК, поскольку он может рассматриваться как один из возможных механизмов регуляции транскрипции (⁷).

Замороженную опухолевую ткань гомогенизировали в стандартном солевом растворе с ЭДТА в присутствии 1%-ного додецилсульфата Na при рН 8 и из гомогената с помощью хлороформной и фенольной депротенизации 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 (⁸); количество белка и РНК в препаратах не превышало 1,5%. Таким образом, в результате были получены довольно высокоочищенные препараты ДНК из опухолевой ткани.

Плавления ДНК проводили в цитратно-солевом буфере, при ионной силе (Na^+)=0,0165 и рН=7,3. Кривые плавления получены на спектрофотометре UNICAMSP—8000, при непрерывном режиме нагрева растворов ДНК. Скорость нагрева—0,25°/мин. Точность определения температуры—0,05 С. T_m С 66,8—67,1, ΔT С 6,5—6,3, а величина гиперхромизма составляла 36—37%, что характерно для более или менее нативных высокополимерных ДНК животного происхождения.

Для определения состава ДНК препараты гидролизовали до оснований (99%-ная муравьиная кислота, 175°, 30 мин), предварительно высушив их при 105°. Основания разделяли с помощью двукратной одномерной восходящей хроматографии на бумаге в растворителе Н-бутанол-вода-25% NH_4 , OH (60:10:0,1) и определяли спектрофотометрически (⁹) на спектрофотометре СФ-4а.

В таблице приведены данные по содержанию канонических оснований и 5-метилцитозина в ДНК исследованных опухолевых штаммов. Эти значения являются средними величинами из 5—9 определений для каждого препарата ДНК. Из таблицы видно, что нуклеотидный состав всех препаратов ДНК соответствует правилам Чаргаффа. Изученные ДНК принадлежат к АТ-типу, количество (Г+Ц+МЦ) в них составляет 44,8—45,9%.

Содержание ГЦ-пар оснований в препаратах ДНК, выделенных из изученных штаммов опухолей, практически одинаково.

Четкое различие между образцами ДНК, полученными из изученных штаммов опухолей, обнаруживается по содержанию 5-метилцитозина.

В настоящее время нет единого мнения относительно изменения нуклеотидного состава ДНК в процессе опухолевого роста. Было найдено, что содержание 5-метилцитозина в ДНК лейкозных лимфоцитов выше, чем в ДНК лимфоцитов здорового человека (¹⁰). Имеются данные о более высокой степени метилирования остатков цитозина ДНК в лейкоцитах больных острым и хроническим лейкозом, а также о том, что вновь синтезированная ДНК лимфоцитов крови больных хроническим лимфолейкозом является гиперметилированной (¹¹). Этому представлению соответствуют данные о том, что ДНК лимфоцитов из крови здоровых и лейкозных коров обладают разной CH_3 -акцепторной способностью в реакции гетерологического метилирования ДНК-метилазной активностью из клеток *E. coli* (¹²).

Нуклеотидный состав ДНК различных экспериментальных опухолей

Источник ДНК	Содержание оснований			ДНК, мол %		
	Г	Ц	МЦ	А	Т	Г+Ц+ +МЦ
Асцитная опухоль Эрлиха	22.6	21.5	0.94±0.010	27.6	27.0	45.0
Карциносаркома 256 Уокера	22.9	21.9	1.14±0.038	27.0	26.1	45.9
Саркома М-1	22.2	20.8	1.81±0.015	27.8	27.8	44.8
Лимфосаркома Плясса	22.6	21.2	1.59±0.031	27.6	27.0	45.3
Лимфолейкоз Швеца	22.7	21.0	1.44±0.026	27.7	27.1	45.2
Саркома 45	22.5	21.1	1.45±0.060	28.3	27.8	45.0
Саркома 180	22.9	21.7	1.29±0.032	27.6	26.6	45.8

В перевиваемых опухолях существует корреляция между степенью биохимической и морфологической дедифференцировки и скоростью роста опухоли. Так, в быстрорастущей гепатоме один из изозимов медленно растущей гепатомы Морриса 7316А заменяется другим, характерным именно для данной опухоли, т. е. появляются упорядоченные изменения, повторяющиеся, как правило, в разных опухолях и коррелирующие со скоростью роста опухоли (¹³). И если раковый фенотип, как считают японские исследователи (¹³), рассматривать как ненормальную дифференцировку (а имеются данные, указывающие на связь метилирования ДНК с дифференцировкой и функциональной активностью клеток (¹⁴)), то не исключено, что выявленные нами изменения степени метилирования на разных штаммах опухолей могут лежать в основе индуцированного искажения клеточной дифференцировки и быть одной из главных причин трансформации клеток при разных формах опухолей. При рассмотрении изменений в уровне метилирования разных штаммов опухолей привлекает внимание тот факт, что опухоли, отличающиеся более высокой степенью дифференцировки, характеризуются увеличением содержания 5-метилцитозина (таблица). Отмеченное увеличение метилирования ДНК может быть связано с изменением хроматина и доступности в нем ДНК для соответствующих

метилаз и с активацией этих метилаз, т. е. в более дифференцированных опухолях с относительно медленным ростом метилазы включают гораздо больше метильных групп в ДНК, чем в малодифференцированных опухолях. Таким образом, скорее всего речь может идти о энзиматическом метилировании опухолевой ДНК.

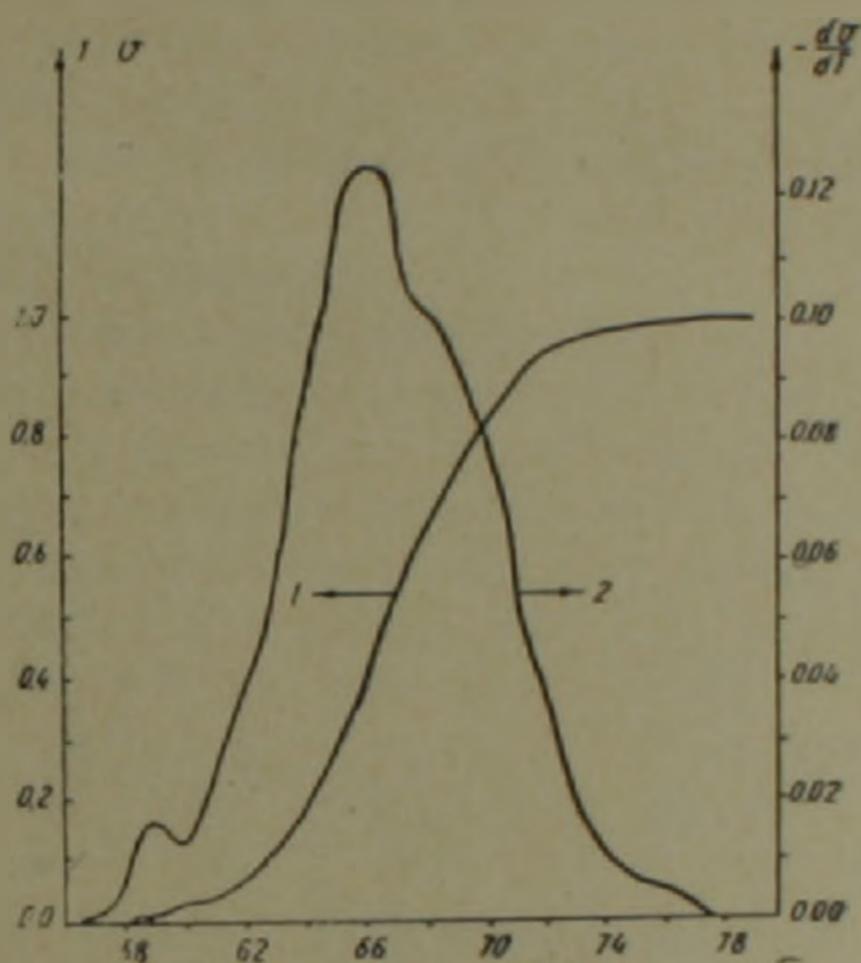


Рис 1 Кривая плавления (1) и дифференциальная кривая плавления (2) ДНК лимфосаркомы Плисса при ионной силе $[Na^+] = 0.0165$ M — доля спиральных звеньев в ДНК

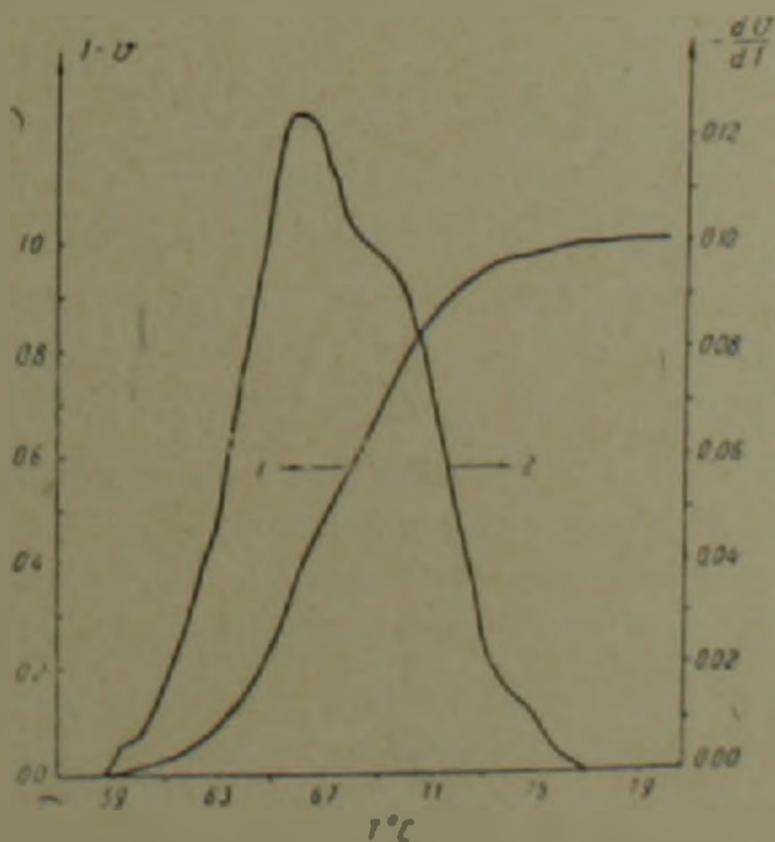


Рис. 2 Кривая плавления (1) и дифференциальная кривая плавления (2) ДНК лимфолейкоза Швец: при ионной силе $[Na^+] = 0.0165$ M — доля спиральных звеньев в ДНК

Анализ работ по сравнению физико-химических свойств ДНК опухолей с ДНК нормы (рис. 1, 2) показывает, что в опухолевых ДНК возможны изменения во вторичной структуре, которые в основном можно свести к образованию локально денатурированных или дестабилизированных (дефектных) участков (^{15,16}) (1–4 дефект на 10⁴ пар нуклеотидов) (¹⁶). Образование дефектных участков приводит к уменьшению температуры (T_m) и увеличению интервала (ΔT) перехода спираль—клубок (плавление) ДНК (¹⁷). Так как у животных при злокачественном росте метилируется в основном цитозин в пятом положении (¹⁸), то введение метильных групп не изменяет числа комплементарных водородных связей и заметно стабилизирует ДНК (¹⁸). Поэтому, чтобы выяснить изменения во вторичной структуре опухолевых ДНК, имеет смысл исследовать кривые плавления ДНК, выделенных из разных опухолей. Для выяснения особенностей в характере поведения кривых плавления был осуществлен переход к дифференциальным кривым плавления (ДКП). Для избежания случайных ошибок кривые плавления сглаживали многочленом третьего порядка по 5 точкам, потом проводили дифференцирование на ЭВМ ЕС. ДКП* вместе с кривыми плавления приведены на рис. 1 и 2. При сравнении ДКП ДНК 2 штаммов опухолей (лимфолейкоз Швеца и лимфосаркома Плисса) видно, что при температурах 58–60°C имеется пик, который не наблюдается для интактных ДНК. Пик хорошо выражен для ДНК лимфосаркомы Плисса, а для ДНК лимфолейкоза Швеца имеет вид плеча. Аналогичные результаты для опухолей получены в работе грузинских авторов (¹⁹) микрокалориметрическим способом. Появление пика, по-видимому, свидетельствует о наличии в ДНК легкоплавких дефектных участков, содержащих в основном АТ нуклеотидные пары. Так как величина пика зависит от вида опухоли, то приходим к заключению, что содержание дефектных участков в ДНК зависит от вида опухоли. Увеличение содержания легкоплавких участков приводит к увеличению ΔT и уменьшению T_m . Данные по ΔT и T_m , приведенные в настоящей работе, подтверждают сказанное. Но на температуру плавления влияют дефекты и метилирование цитозина: дефекты уменьшают, а метилирование увеличивает T_m . Так как содержание 5-метилцитозина в ДНК лимфосаркомы Плисса больше, чем в ДНК лимфолейкоза Швеца, а T_m —соответственно меньше, то можно заключить, что дефектные участки в ДНК лимфосаркомы Плисса оказывают большее влияние на T_m , чем метилирование. Эти данные согласуются с соответствующими ДКП опухолевых ДНК (появление плеча и пика; рис. 1 и 2). Дефекты такого типа (¹⁹) не влияют на изменение поглощения ДНК при плавлении (гиперхромный эффект), поэтому изменение гиперхромного эффекта для разных опухолевых ДНК, возможно, связано с метилированием цитозина.

Следовательно, изменение характера метилирования генома и

* Авторы благодарны Д. Ю. Ландо (ИБОХ АН БССР) за расчет ДКП.

дефекты во вторичной структуре могут лежать в основе нарушения регуляции транскрипции генома и трансформации клеток в различных опухолях. Поэтому можно заключить, что рост опухолевых клеток сопровождается увеличением метилирования генома и изменением во вторичной структуре ДНК, а так как ДНК действительно является мишенью при действии различных противоопухолевых препаратов (20) и в значительной степени эффект связывается со способностью их влиять на синтез белка, НК и модифицировать азотистые основания (21), то это позволяет предположить, что изучение первичной и вторичной структуры ДНК различных штампов опухолей может привести к более целенаправленному применению противоопухолевых препаратов.

ИТОХ Академии наук Армянской ССР

Ереванский государственный университет

Ջ. Վ. ՂԱՐԻԲՅԱՆ, Ն. Մ. ՈՍՏՈՒՄՅԱՆ, Ի. Ս. ԴԱՆԻՆՅԱՆ, ՅՈՒ. Ս. ԲԱՐԱՅԱՆ,
Բ. Տ. ՂԱՐԻԲՉԱԿՅԱՆ, Վ. Մ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ

ԴՆԹ-ի հատկությունների և կառուցվածի համեմատական ուսումնասիրությունը որոշ փորձնական ուռուցքներում

Հայտնի է, որ ԴՆԹ-ի սինթեզի և մեթիլացման արագություն միջև գոյություն ունի որոշ կարգավորում, ինչպես նաև, ուռուցքների ԴՆԹ-ի մեթիլացման ընդհանուր համեմատական ուսումնասիրության տվյալների համադրումը կարող է վկայել ուռուցքի և օրգանիզմի որոշ փոխազդեցության մասին, որը իր հերթին կախված է ուռուցքի տեսակից և նրա աճման արագությունից:

Իլնհիով վերը նշվածից, ներկա աշխատանքի կատարման ժամանակ մեզ հետաքրքրել են հետևյալ հարցերը. կա արդյոք տարբերություն ոչ միանման մորֆոլոգիական և կենսաբանական հատկություն ունեցող փորձնական ուռուցքների ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային կազմի մեջ, տարբերվում են արդյոք նորմալ և ուռուցքային բջիջների ԴՆԹ-ները իրենց ֆիզիկա-քիմիական հատկություններով:

Մեր հետազոտությունների ընթացքում հատուկ ուշադրություն է դարձվել նշված ԴՆԹ-ների մեթիլացման մակարդակի վրա (5-մեթիլցիտոզինի պարունակությունը), քանի որ դա կարող է դիտվել որպես տրանսկրիպցիայի կարգավորման հնարավոր մեխանիզմներից մեկը:

Ստուգված ուռուցքային հյուսվածքը հոմոգենիզացվել և քլորոֆորմային ու ֆենոլային սպիտակուցազրկման օգնությամբ անջատվել է ԴՆԹ, ԴՆԹ-ի հալեցումը կատարվել է ցիտրատ-աղային բուֆերում, նուկլեոտիդային կազմը որոշելու համար ԴՆԹ-ի պրեպարատները հիդրոլիզվել են մինչև հիմքերի (99% միջնաթթու, 175°, 30 րոպ.), նախապես նրանց շորացնելով 105°-ում: Հիմքերը բաժանվել են կրկնակի, միաշափ. վերընթաց քրոմատոգրաֆիայի օգնությամբ (թղթի վրա):

Հաստատվել է, որ ԴՆԹ-ի բոլոր պրեպարատների նուկլեոտիդային կազմը համապատասխանում է Չարգաֆի կանոնին: Ուռուցքային տարբեր շտամների

րից անջատված ԴՆԹ-ի պրեպարատներում պարունակվող հիմքերի ԳՑ-գույ-
գերը գործնականորեն միատեսակ են, իսկ 5-մեթիլցիտոզինի պարունակու-
թյան տեսակետից, նրանց միջև գոյություն ունի հստակ տարբերություն: Նոր-
մալ և ուռուցքային ԴՆԹ-ների ֆիզիկա-քիմիական հատկությունների անալի-
զը ցույց է տալիս, որ ուռուցքային ԴՆԹ-ում հնարավոր են երկրորդային կա-
ռուցվածքի փոփոխություններ:

Այսպիսով կարելի է եզրակացնել, որ ուռուցքային քիչինի աճը ուղեկ-
ցվում է գենոմի մեթիլացման ավելացմամբ և ԴՆԹ-ի երկրորդային կառուց-
վածքի փոփոխմամբ:

ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ E. Scarano, Iaccarino M. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 1957, 1394 (1967). ² E. Borek, Srinivasan P. Annual. Rev. Biochem., 35, 275 (1966). ³ M. Lea, H. Morris, G. Weber, Cancer Res., 26, 465 (1966). ⁴ T. Shirasaka, S. Fujii, Cancer Res., 35, 517 (1975). ⁵ J. W. Kappler, J. Cell. Physiol., 75, 21 (1970). ⁶ D. Druhovsky, A. Wacker, Naturwissenschaften, 62, 189 (1975). ⁷ B. E. Vanyushin, L. E. Nemirovsky, V. V. Klimentko, V. K. Vasiliev et al., Gerontologia, 19, 138 (1973). ⁸ O. H. Lowry, N. I. Rosenbro-ugh, A. L. Farr, R. I. Randall, J. Biol. Chem., 193, 265 (1951). ⁹ B. F. Vanyushin, A. L. Masin, V. K. Vasiliev, A. N. Belosersky, Biochim. et biophys. acta, 299, 397 (1973). ¹⁰ L. S. Desai, U. C. Wulf, G. E. Folley, Exptl. Cell. Res., 65, 260 (1971). ¹¹ Т. В. Боровкова, Н. А. Федоров, Материалы симпозиума „Структура и функции НК и нуклеопротеидов“, М., 1974. ¹² Н. Н. Бурцева, И. П. Демидкина, Ю. М. Ази-зов, В. Ф. Ванюшин, Биохимия, 42, 1690 (1977). ¹³ N. Kurota, T. Matsushima, T. Sugimura, Biochem. and Biophys. Res Commun., 48, 473 (1972). ¹⁴ L. Tosi, A. Gra-neri, E. Scarano, Exptl. Cell. Res., 72, 257 (1972). ¹⁵ Г. П. Жижина, С. И. Бабович, К. А. Авакян, О. Е. Петров, ДАН АН СССР, 235, 703 (1977). ¹⁶ С. В. Кузьмина, Н. Б. Стржевская, Биофизика, 15, 1133 (1970). ¹⁷ Н. В. Берестецкая, К. И. Ко-ганов, К. С. Лазуркин, Э. Н. Трифионов, М. Д. Франк-Камеицкий, Мол. биол., 4, 137 (1970). ¹⁸ M. Ehrlich, K. Ehrlich, J. Mayo, Biochim. et biophys. acta, 395, 109 (1975). ¹⁹ З. Н. Чакчалишвили, Г. В. Маджагаладзе, Г. Н. Мгелაძე, Д. Р. Мона-селидзе, в сб. „Конформационные изменения биополимеров в растворах“, Тбилиси, 1975. ²⁰ P. F. Swann, P. N. Magee, J. Biochem., 110, 39 (1968). ²¹ A. Loreles, C. Hampton, Mutation Res. 7, 1, 1 (1969).