

Г. А. ПАНОСЯН

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ ГИСТОНОВ НОРМАЛЬНОЙ И РАКОВОЙ КЛЕТКИ

Преобразование нормальной клетки в опухолевую является результатом нарушения регуляторных механизмов клетки. Изучение гистонов, предполагаемых регуляторов генетической активности, выделенных из опухолевых тканей, является задачей первостепенной важности. Нарушение регуляторных механизмов предполагает изменение либо гистонического состава опухолевой клетки, либо изменение тех или иных свойств различных гистоновых фракций.

Впервые гистоны опухолевых клеток были исследованы Стедман и Стедман в 1943 г. [9], которые показали, что в клетках карциномы Уокера крыс и мышью карциномы 2146 содержание гистонов в ядрах значительно понижено. Подобные исследования были ими далее продолжены; в них также было показано, что большинство опухолей дает ненормально низкий выход гистонов. Крафт и др. [5] показали, что ядра из саркомы грудной железы человека дают лишь 4% гистонсульфата от сухого веса по сравнению с 25—30% в нормальных ядрах. С другой стороны, имеются данные, не указывающие на видимые изменения содержания гистонов в опухолевой клетке [6]. А некоторые авторы наблюдали даже увеличение количества гистонов в опухолевых тканях [8].

Имеется также ряд исследований, показывающих изменение не содержания гистона, а соотношения в нем отдельных фракций или вообще фракционного состава и метаболической активности этих фракций [5, 6, 10]. Эти данные указывают на то, что гистоны, действительно, должны либо играть существенную роль в процессах малигнизации, либо вторично подвергаться изменению в ходе этого процесса. И в том и в другом случае исследование роли и свойств гистонов и их отдельных фракций представляется чрезвычайно важным. Любой дополнительный факт обнаружения различий между гистонами нормальной и опухолевой клетки—еще один шаг на пути к выяснению роли гистонов в процессах злокачественной трансформации.

Ранее нами было показано, что спектрофотометрия гистонов, особенно в далекой ультрафиолетовой области, является удобным методом обнаружения различий между отдельными гистоновыми фракциями тимуса теленка, зависящими от их аминокислотного состава (неопубликованные данные).

В настоящем сообщении приводятся данные по спектрофотометрии в далекой ультрафиолетовой области гистонов, выделенных из тимуса теленка и двух линий асцитной саркомы Йошида, чувствительной к азо-

тистому иприту (т. е. обычная линия этой опухоли) и резистентной к нему. Последняя была выведена Уйгази и Винклером [10, 11] из чувствительной линии при обработке ее трис-(хлорэтил)-амин-гидрохлоридом в особых условиях обработки. Эта линия в течение 30 пассажей сохраняла свою резистентность без контакта с указанным веществом; далее резистентность терялась, но после повторной обработки тем же веществом быстро восстанавливалась. Некоторые сравнительные исследования данных двух линий опухоли Йошида были проведены Боллом и др. [1]. Исследование этих линий интересно в том отношении, что, будучи сходными по многим показателям (число хромосом, скорость роста, количество нуклеиновых кислот и белков и др.), они резко отличаются по своей чувствительности к алкилирующим агентам, в том числе к сарколизину [1]. Установление какого-либо различия в гистоновом составе между такими малоотличающимися объектами было бы исключительно важным для исследования роли гистонов в процессах регуляции биосинтеза белка и превращения нормальной клетки в раковую.

**Материал и методика.** Нефракционированный гистон (НФГ) тимуса теленка (ТТ) и резистентной (R-гистон) и чувствительной (S-гистон) к азотистому иприту линий саркомы Йошида экстрагировался обычным путем из тимусной железы и ядер клеток опухолей 0,25 М соляной кислотой после предварительного удаления растворимых в 0,9% NaCl белков многократной экстракцией при гомогенизировании. Электрофоретический анализ на полиакриламидном геле обнаружил лишь незначительную примесь негистонного белка в полученных препаратах гистона. Опухоль Йошида и ее резистентная линия, а также ядра из клеток этих опухолей было получены Т. Коннорсом с сотруд. [1, 10, 11] и любезно предоставлены нам для выделения гистонов.

Спектрофотометрия полученных гистонов проводилась регистрирующим спектрофотометром Perkin-Elmer модели UV 137 в области 190—240 мкм. Спектры поглощения гистонов были получены в дистиллированной воде, 0,01 М HCl, 0,01 М NaOH, 0,9% NaCl и 0,1 М ацетатном буфере pH 4,5 (АБ). Работа проведена в Институте по исследованию рака им. Честер Битти Лондонского университета.

**Результаты.** Для сравнения на рис. 1 приведены спектры поглощения в далекой ультрафиолетовой области нефракционированного гистона тимуса теленка (НФГ ТТ) в различных средах. Они показывают, что условия среды, в которых проводятся измерения, сильно влияют на оптическую плотность и положение максимума. Спектры поглощения НФГ ТТ, R-гистона и S-гистона в тех же средах приведены на рис. 2 и 3, а цифровой материал для  $\lambda_{\max}$  и  $E_{1\text{ см}}^{0,01\%}$  приведен в табл. 1.

Как показывают полученные результаты, в водном растворе опухолевые гистоны отличаются, хотя и незначительно, по расположению максимума от НФГ ТТ. Так, например, если  $\lambda_{\max}$  для гистона ТТ находится при 1935 Å, то для R-гистона он находится при 1925 Å, а для S-гистона — при 1920 Å. В 0,01 М HCl все гистоны имеют один и тот же  $\lambda_{\max}$  — 2115 Å. В 0,01 М NaOH соотношение  $\lambda_{\max}$  у этих трех гистонов обратное водному

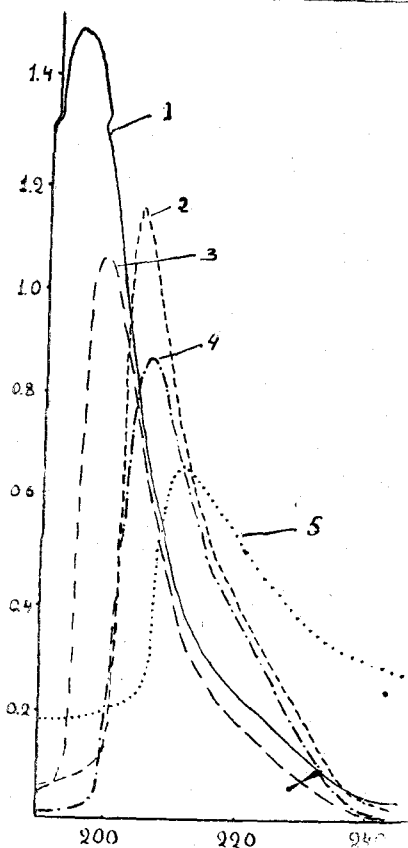


Рис. 1. Спектр поглощения нефракционированного гистона тимуса телят в далекой ультрафиолетовой области в разных средах. По оси абсцисс — длина волны в мкм, по оси ординат — оптическая плотность. 1 —  $H_2O$ , 2 — 0,9% NaCl, 3 — 0,01 M HCl, 4 — 0,1 M ацетатный буфер pH 4,5, 5 — 0,01 M NaOH, Концентрация: 1 и 3 — 25 мкг/мл, 2, 4 и 5 — 50 мкг/мл.

Таблица 1

$\lambda_{\max}$  и  $E_{1\text{ см}}^{0,01\%}$  для нефракционированного гистона тимуса телят и двух линий (R и S) саркомы Йошида в разных средах

| Гистон   | $H_2O$           |       | HCl              |       | NaOH             |       | NaCl             |       | АБ               |       |
|----------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|
|          | $\lambda_{\max}$ | E     | $\lambda_{\max}$ | E     | $\lambda_{\max}$ | E     | $\lambda_{\max}$ | E     | $\lambda_{\max}$ | E     |
| НФГ ТТ   | 1935Å            | 5,940 | 1990Å            | 4,240 | 2110Å            | 1,340 | 1995Å            | 2,320 | 2015Å            | 1,760 |
| R-гистон | 1925Å            | 7,712 | 1990Å            | 4,600 | 2115Å            | 1,150 | 2015Å            | 2,610 | 2015Å            | 1,880 |
| S-гистон | 1920Å            | 7,472 | 1990Å            | 4,080 | 2125Å            | 1,060 | 2015Å            | 2,610 | 2015Å            | 1,820 |

раствору: для гистона ТТ—2110Å, для R-гистона—2115Å и для S-гистона—2125Å. В 0,9% NaCl  $\lambda_{\max}$  гистона ТТ отличается от R- и S-гистонов, у которых они одинаковы (1995Å—для гистона ТТ и 2015Å для R- и S-гистонов). В 0,1 M ацетатном буфере pH 4,5 максимум поглощения для всех трех гистонов находится при 2015Å.

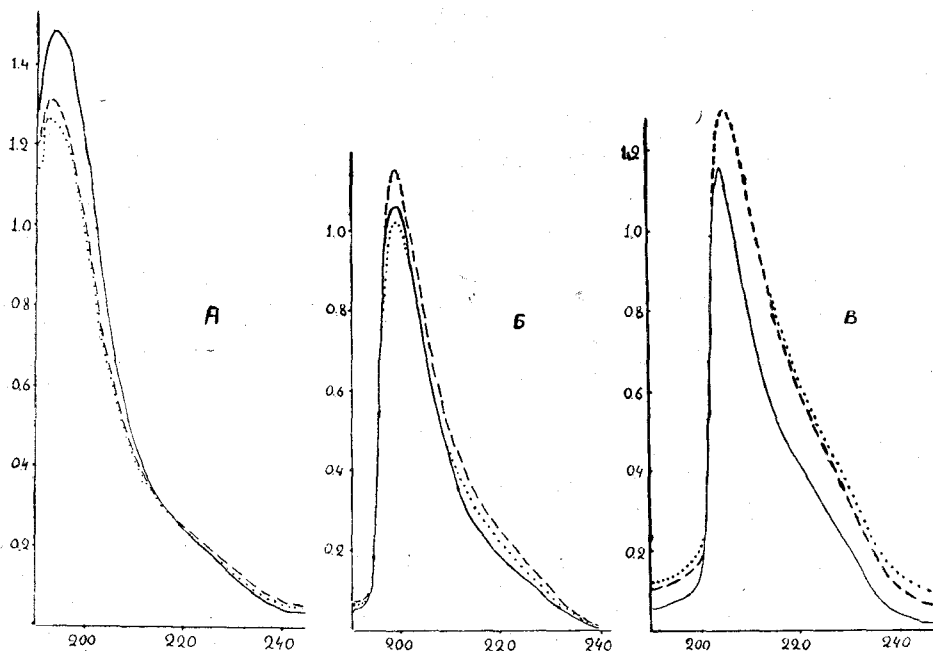


Рис. 2. Спектр поглощения нефракционированного гистона тимуса теленка, R-гистона и S-гистона в далекой ультрафиолетовой области в воде, 0,01 М HCl и 0,9% NaCl. По оси абсцисс — длина волны в мкм, по оси ординат — оптическая плотность. — — — Т, — — — — R-гистон, . . . . . S-гистон. А — H<sub>2</sub>O; концентрация: ТТ — 25 — мкг/мл. R- и S-гистон — по 17 мкг/мл, Б — 0,01 М HCl; концентрация 25 мкг/мл. В — 0,9% NaCl; концентрация 50 мкг/мл.

По величине оптической плотности ( $E_{1\text{ см}}^{0,01\%}$ ) гистоны различного происхождения также отличаются друг от друга. В водном растворе  $E_{1\text{ см}}^{0,01\%}$  разных гистонов значительно отличаются друг от друга, в особенности  $E_{1\text{ см}}^{0,01\%}$  опухолевых гистонов от  $E_{1\text{ см}}^{0,01\%}$  НФГ ТТ. Во всех остальных случаях эти различия гораздо меньше. В исследованных средах  $E_{1\text{ см}}^{0,01\%}$  R-гистона больше, чем  $E_{1\text{ см}}^{0,01\%}$  S-гистона и НФГ ТТ. Исключением является 0,01 М NaOH, где НФГ ТТ имеет большую оптическую плотность, чем R-гистон. S-гистон поглощает в далекой ультрафиолетовой области больше, чем гистон ТТ в водном растворе, в 0,9% NaCl и в 0,1 М АБ, но меньше в 0,01 М HCl и в 0,01 М NaOH. Наибольшая разница между  $E_{1\text{ см}}^{0,01\%}$  R- и S-гистонов имеется в 0,01 М HCl; эта разница отсутствует в 0,9% NaCl.

Ранее нами было показано, что разные фракции гистона ТТ имеют характерные спектры поглощения в тех же условиях среды, что и в настоящей работе и что характер поглощения каждой отдельной фракции зависит от ее аминокислотного состава (неопубликованные данные). Если принять поглощение при  $\lambda_{\text{max}}$  для НФГ ТТ в воде за единицу, то поглощение всех гистоновых фракций в разных средах можно будет сравнить друг с другом, и характер зависимости поглощения от условий среды укажет на принадлежность данного гистона к той или иной фракции. Эти относительные числа приведены в табл. 2.

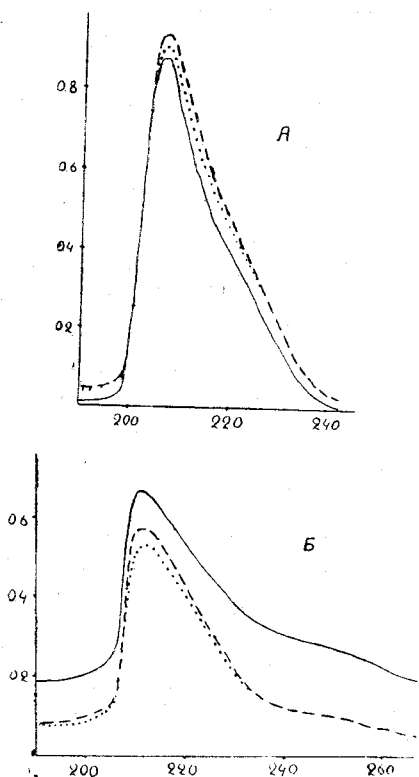


Рис. 3. Спектр поглощения нефракционированного гистона тимуса телят, R-гистона и S-гистона в далекой ультрафиолетовой области в 0,1 М ацетатном буфере pH 4,5 и 0,01 М NaOH. Обозначения те же, что и на рис. 2. Концентрация 50 мкг/мл. А — ацетатный буфер, Б — 0,01 М NaOH.

Таблица 2

Относительная оптическая плотность в далекой ультрафиолетовой области разных гистонов ТТ в разных средах (оптическая плотность НФГ ТТ в воде принята за единицу)

| Гистон           | H <sub>2</sub> O | HCl   | NaOH  | NaCl  | АБ    |
|------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|
| НФГ ТТ           | 1,000            | 0,712 | 0,225 | 0,386 | 0,295 |
| F <sub>1</sub>   | 0,886            | 0,617 | 0,117 | 0,345 | 0,265 |
| F <sub>2a1</sub> | 1,349            | 0,772 | 0,205 | 0,400 | 0,272 |
| F <sub>2a2</sub> | 0,805            | 0,499 | 0,100 | 0,318 | 0,191 |
| F <sub>2b</sub>  | 1,013            | 0,670 | 0,148 | 0,345 | 0,265 |
| F <sub>3</sub>   | 1,027            | 0,676 | 0,168 | 0,358 | 0,258 |

Поскольку нами не проведено фракционирования R- и S-гистонов, и состав этих нефракционированных опухолевых гистонов неизвестен, мы сравнили относительные оптические плотности опухолевых гистонов с относительными оптическими плотностями разных фракций гистонов. Относительная оптическая плотность НФГ ТТ, R-гистона и S-гистона приведена в табл. 3. Сравнивая данные, приведенные в табл. 2 и 3, можно:

Таблица 3

Относительная оптическая плотность нефракционированных гистонов ТТ и опухолей в разных растворах (за единицу принята оптическая плотность гистона ТТ в воде)

| Гистон   | H <sub>2</sub> O | HCl  | NaOH | NaCl | АБ   |
|----------|------------------|------|------|------|------|
| НФГ ТТ   | 1,00             | 0,71 | 0,23 | 0,39 | 0,30 |
| R-гистон | 1,30             | 0,77 | 0,19 | 0,44 | 0,32 |
| S-гистон | 1,26             | 0,68 | 0,18 | 0,44 | 0,31 |

заметить удивительное совпадение значений, полученных для R-гистона и F<sub>2a1</sub>-фракции. S-гистон и F<sub>2a1</sub>-фракция отличаются по своему поведению в 0,01 М HCl.

Из этих данных можно прийти к весьма интересному выводу о том, что нефракционированный гистон резистентной и чувствительной к азотистому иприту линий опухоли Йошида отличаются по составу фракций и что в R-гистоне количество F<sub>2a1</sub>-фракции должно быть резко увеличенным по сравнению с количеством этой фракции в нефракционированном гистоне тимуса телянка.

В связи с этим возникает чрезвычайно интересный вопрос о зависимости резистентности опухоли к азотистому иприту от гистонового состава и роли в этом процессе фракции гистона опухоли, соответствующей F<sub>2a1</sub>-фракции гистона тимуса телянка.

**Выводы.** Проведено спектрофотометрическое исследование гистонов, выделенных из тимуса телянка и двух линий асцитной саркомы Йошида крыс, отличающихся чувствительностью к азотистому иприту и сарколизину (резистентная и чувствительная). Спектры поглощения полученных препаратов нефракционированных гистонов в далекой ультрафиолетовой области отличаются друг от друга, и это различие зависит от среды, в которой проводится измерение. R- и S-гистоны отличаются по своим спектрофотометрическим характеристикам от гистона тимуса телянка и друг от друга. Сравнение характера кривой поглощения в далекой ультрафиолетовой области R-гистона с кривыми поглощения различных фракций гистона тимуса телянка привело к предположению, что в R-гистоне имеется повышенное содержание фракции, соответствующей фракции F<sub>2a1</sub> гистона тимуса телянка.

Ереванский государственный университет,  
кафедра биофизики

Поступило 10.I 1968 г.

## Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

## ՆՈՐՄԱԼ ԵՎ ՔԱՂՅԿԵՂԱՅԻՆ ԲԶՋԻ ՀԻՍՏՈՆՆԵՐԻ ՍՊԵԿՏՐԱՖՈՏՈՄԵՏՐԻԱՆ

## Ա մ փ ո փ ու մ

Կատարված է հորթի խպիպային գեղձից և Իոշիդի ասցիտային սարկոմայի երկու ազոտային հիպրիտի ու սարկոլիզինի նկատմամբ զգայունությամբ տարբերվող գծերից անջատած հիստոնների սպեկտրաֆոտոմետրիկ հետազոտությունը:

Ստացված ամբողջական հիստոնային պրեպարատների կլանման սպեկտրները ուտրամանուշակագույն ճառագայթների տիրույթում տարբերվում են միմյանցից, և այդ տարբերությունը կախված է այն միջավայրից, որտեղ կատարվում է չափումը: Ռեզիստենտ (R) և զգայուն (S) գծերից ստացված հիստոնները իրենց սպեկտրաֆոտոմետրիկ հատկանիշներով տարբերվում են և՛ հորթի խպիպային գեղձի հիստոնից, և՛ միմյանցից:

Հեռավոր ուտրամանուշակագույն տիրույթում R-հիստոնի կլանման սպեկտրի բնույթի համեմատությունը խպիպային գեղձի հիստոնների տարբեր ֆրակցիաների կլանման սպեկտրների հետ՝ բերել է այն ենթադրությանը, որ R-հիստոնում կա այնպիսի ֆրակցիայի ավելացած քանակություն, որը համապատասխանում է հորթի խպիպային գեղձի  $F_{2a1}$  ֆրակցիային:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ball C. R., Connors T. A., Double J. A., Ujhazy V., Whisson M. E. Int. J. Cancer, 1, 1966.
2. Busch H., Bijvoet P., Adams H. R. Exptl. Cell Res., Suppl. 9, 1963.
3. Busch H., Hnilica L. Su-Chen Chien, Davis J., Taylor C. W. Cancer Res., 22, 1962.
4. Butler J. A. V. Exptl Cell Res., Suppl. 9, 1963.
5. Cruft H. J., Mauritzen C. M., Stedman E. Nature, 174, 1954.
6. Laurence D. J. R., Simson P., Butler J. A. V. Biochem. J., 87, 1963.
7. MacGillivrey A. J., Greenwood F. C. Biochem. J. 85, 39 (P), 1962.
8. Perugini S. Cancro 15, 2, 1962.
9. Stedman E., Stedman E. Nature 166, 780, 1950.
10. Ujhazy V., Winkler A. Neoplasma 12, 1965.
11. Ujhazy V., Winkler A. Folia biologica (Praha) 11, 1965.