

## STUDII ASUPRA PROTEINELOR BAZICE NUCLEARE (HISTONE).

### II. Distribuția cantitativă a fracțiilor de histonă din celulele tumorii ascitice Ehrlich separate pe coloană de CM-celuloză

V. A. Blazsek

Deoarece nu există diferențe în distribuția calitativă a fracțiilor de histonă din diferitele celule (1), într-o lucrare anterioară (2) ne-am pus problema dacă nu cumva distribuția cantitativă a fracțiilor de histonă nu ar putea detecta specificitatea de specie și de rasă din diferitele țesuturi.

În cursul acestor cercetări am urmărit distribuția cantitativă a fracțiilor de histonă dintr-un țesut normal — timusul de vițel — separate pe coloană de CM-celuloză, constatând distribuția lor constantă, în strictă corelație cu rezultatele obținute prin alte metode de separare (2). După cum am arătat, fracțiunile principale ale histonei din timusul de vițel sînt componente reale ai cromosomilor nativi și calitatea lor nu depinde de metoda folosită pentru izolare (2).

Intrucît nu s-a putut evidenția nici o diferență *calitativă* între fracțiunile de histonă din celulele normale și din cele canceroase (3, 4), ne-am propus să cercetăm distribuția *cantitativă* a fracțiunilor principale ale histonei din celulele tumorii ascitice Ehrlich, separate prin cromatografie pe CM-celuloză. Am încercat, în același timp, să comparăm rezultatele cu cele obținute cu histonă din timusul de vițel, pentru a vedea dacă se pot pune în evidență diferențe în distribuția fracțiunilor din histonele studiate, deoarece diferențierile dintre cele două tipuri de celule provin nu numai din deosebirile de specie, ci și din caracterul de cancerizare a celulelor.

#### Material și metodă

**Isolarea histonelor totale (histone crude).** Histonele totale din celulele tumorii ascitice Ehrlich și cele din timusul de vițel au fost izolate prin metodele arătate în lucrările anterioare (2, 5).

**Purificarea histonelor crude.** Purificarea histonelor crude pe CM-celuloză am efectuat-o folosind o coloană de 1,7×10,0 cm, echilibrată cu tampon borat 0,01 M, pH 9,0 (6). Cantitatea de proteină aplicată în coloană a fost de 50,0 mg, dizolvată în același tampon. Frațiunea cu impurificări de proteină nehistonică s-a eluat cu tampon borat 0,01 M + NaCl 0,25 M, pH 9,0, iar fracțiunea cu histonele purificate cu HCl 0,1 M. Histona totală purificată a fost izolată prin precipitare cu 5 vol. acetonă, fiind spălată tot cu acetonă și uscată în exsicator.

**Cromatografia analitică pe coloană cu CM-celuloză.** Am utilizat metoda descrisă într-o lucrare anterioară (2). Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic.

#### Rezultate și discuții

Distribuția cantitativă a fracțiunilor de histonă crudă din celulele tumorii ascitice Ehrlich, în comparație cu cele de histonă crudă din timusul de vițel, este prezentată în tabelul nr. 1.

Tabelul nr. 1

Distribuția fracțiunilor de histonă crudă din celulele canceroase și normale în %

Histona	Fracțiuni de histonă							
	F1		F2		F3a		F3b	
	$\bar{x}$	E.S.	$\bar{x}$	E.S.	$\bar{x}$	E.S.	$\bar{x}$	E.S.
Histona crudă din celulele tumorii ascitice Ehrlich n = 7	21,5 ± 13,6		37,0 ± 10,2		18,9 ± 6,3		22,2 ± 3,0	
Histona crudă din timusul de vițel n = 11	17,2 ± 2,5		57,5 ± 4,6		14,8 ± 3,0		10,2 ± 2,6	
	P > 0,2		P < 0,01		P > 0,05		P < 0,01	

Din rezultate reiese că fracțiunea F2 reprezintă partea principală a celor patru fracțiuni histonice, în timp ce raporturile dintre celelalte trei fracțiuni (F1, F3a și F3b) sînt aproximativ egale. Raporturile relative ale fracțiunilor

nilor din celulele canceroase reprezintă valori mai mari față de cele din timusul de vițel, cu excepția valorii fracțiunii F2, care este mai scăzută. Diferențele sînt semnificative din punct de vedere statistic în cazul fracțiunilor F2 ( $P < 0,01$ , și F3b ( $P < 0,01$ ) și ne semnificative la fracțiunile F1 ( $P > 0,2$ ) și F3a ( $P > 0,05$ ).

Se știe că celulele normale au un conținut constant de ADN (7), în timp ce în diverse tumori există o mare variație de concentrație a ADN-ului (8). Constatarea noastră că distribuția fracțiunilor histonice din celulele ascitice Ehrlich diferă de cea a celulelor normale și totodată variația accentuată a E.S. (tabelul nr. 1) la celulele canceroase, față de cele normale, ne sugerează o corelație a acestora cu variația concentrației ADN-ului din celulele canceroase. Variația E.S. însă nu poate fi atribuită unor variații reale ale raporturilor fracțiunilor histonice, după cum se constată din tabelul nr. 2.

Tabelul nr. 2

Distribuția fracțiunilor de histonă purificată din celulele canceroase și normale în %

Histona	Fracțiuni de histonă							
	F1		F2		F3a		F3b	
	$\bar{x}$	E.S.	$\bar{x}$	E.S.	$\bar{x}$	E.S.	$\bar{x}$	E.S.
Histona purificată din celulele tumorii ascitice Ehrlich n = 6	17,1 ± 6,1		50,8 ± 4,9		18,2 ± 2,1		13,6 ± 2,3	
Histona purificată din timusul de vițel n = 6	16,3 ± 2,3		59,3 ± 3,6		12,2 ± 2,3		11,8 ± 2,1	
	P > 0,5		0,02 > P > 0,01		P < 0,01		P > 0,1	

Din datele obținute se observă o micșorare accentuată a valorilor E. S. și o normalizare a distribuțiilor raporturilor relative ale fracțiunilor histonice izolate din histonele purificate. Se poate presupune însă că prin cromatografierea histonei totale s-a îndepărtat proteina nehistonică, care prin prezența ei influențează distribuția normală a fracțiunilor histonice din celulele canceroase. De asemenea s-au constatat tulburări ale histonei din celulele tumorii ascitice Ehrlich în cursul separării cromatografice (9, 10). Dimpotrivă se constată că cromatografierea histonei totale din timusul de vițel nu a modificat în mod semnificativ valorile de distribuție relativă ale fracțiunilor histonice.

Analizînd rezultatele prezentate în tabelul nr. 2, privind fracțiunile izolate din histona purificată, reiese că nu există o diferență statistic semnificativă a valorii raporturilor relative între fracțiunile F1 și F3b izolate din celulele canceroase și cele izolate din celulele normale ( $P > 0,5$  resp.  $P > 0,1$ ). S-au găsit însă diferențe semnificative între valorile raporturilor relative ale fracțiunilor F2 și F3a ( $P < 0,02$  resp.  $P < 0,01$ ).

Este de remarcat faptul că, rezultatele pe care le-am obținut pe CM-celuloză sînt în strictă corelație cu cele obținute de Hnilica (11) pe gel de

amidon, care a observat o scădere semnificativă a valorii raportului relativ a fracțiunii F2 a histonei din celulele hepatomului Novikoff și o creștere a acestei valori la fracțiunea F3.

În concluzie constatăm că distribuția cantitativă a fracțiunilor de histonă din tumoarea ascitică Ehrlich prezintă o diferență semnificativă față de fracțiunilor histonice din timusul de vițel — un țesut normal —, deci se poate detecta o *specificitate cantitativă* la cele două histone studiate.

Cercetările noastre preconizează ideea că, modificările observate s-ar putea datora unui proces alterat al represării genelor.

Se știe că fracțiunile de histonă au un rol preponderent, poate chiar exclusiv în acest proces. Cauzele care determină aceste alterări sînt greu de apreciat, în cercetările viitoare ne propunem să elucidăm dacă distribuția cantitativă a fracțiunilor histonice este specifică la diferitele celule sau o asemenea alterare este caracteristică numai celulelor canceroase. În ultimul caz, va fi necesară studierea problemei dacă modificările constatate sînt provocate de procesele metabolice nucleare alterate în urma cancerizării celulei sau ele reprezintă un fenomen primar de cancerizare în celule.\*

Sosit la redacție: 23 mai 1972.

#### Bibliografie

1. SMITH F. L., DeLANGE R. J., BONNER J.: *Physiol. Rev.* (1970), 50, 158;
2. BLAZSEK V. A.: *Rev. Med.* (1972), 18, 50;
3. HNILICA L., JOHNS E. W., BUTLER J. A. V.: *Biochem. J.* (1962), 82, 123;
4. DESAI L. S., FOLEY G. F.: *Biochem. J.* (1970), 119, 165;
5. BLAZSEK V. A.: *Rev. Roum. Biochem.* (1972), 9, 95;
6. BLAZSEK V. A., BUKARESTI L.: *Anal. Biochem.* (1967), 18, 572;
7. DOUNCE A. L.: în CHARGAFF E., DAVIDSON J. N.: *The Nucleic Acids*, vol. II., Academic Press, New York, 1955, 124;
8. KIT S. cit.: BUSCH H.: *An Introduction to the Biochemistry of the Cancer Cell*, Academic Press, New York, 1962, 63;
9. JOHNS F. W., BUTLER J. A. V.: *Biochem. J.* (1962), 82, 15;
10. OHLY K. W., MEHTA N. G., MOURKIDES G. A., ALIVISATOS S. G. A.: *Arch. Biochem. Biophys.* (1967), 118, 631;
11. HNILICA L. S., EDWAEDS L. J., HEY A. E.: *Biochem. Biophys. Acta* (1966), 124, 109.