

CERCETAREA LEGĂTURII DINTRE RAPORTUL DE TIOL DISULFURĂ DIN NUCLEOZOMI ȘI ACTIVITATEA GENETICĂ CELULARĂ

III. Izolarea subunităților de cromatină din celulele TAE prin cromatografia pe coloană de agaroză.

V. A. Blazsek

În cadrul cercetărilor noastre anterioare (1, 2) s-a urmărit izolarea subunităților de cromatină din ficat de șoareci prin cromatografia pe coloană de agaroză. Datele obținute asupra fracționării cromatinelor degradate cu DNază I au adus argumente în favoarea folosirii metodei de cromatografie pe gel de agaroză pentru purificarea acestor particule genetice. Pe această cale s-a reușit separarea fracțiunii subcromozomiale cu raportul de absorbție specific pentru nucleozomi.

În lucrarea de față ne-am propus să urmărim eficiența metodei elaborate pentru purificarea subunităților de cromatină izolate din celule tumorale ascitice Ehrlich (TAE). Aceste cercetări se încadrează în preocupările noastre referitoare la unele aspecte moleculare ale activității genetice celulare.

Material și metodă

Cromatina tumorală a fost extrasă dintr-o cultură de celule TAE obținută pe șoareci albi purtători de tumoare grefată. Celulele tumorale obținute din șoareci s-au spălat în mod repetat cu ser fiziologic, apoi cu apă deionizată cu un conținut de Na-EDTA 1,0 mM, pH 7,9, prin centrifugare la $1200 \times g$.

Sedimentul celular s-a omogenizat într-o soluție de zaharoză 10^0 „, Tween 80 $1,0^0$ „, Na-EDTA 0,1 mM și Tris 10 mM, pH 7,9, cu Ultra-Turrax la 40 V, timp de 30 min. și s-a centrifugat la $1200 \times g$, timp de 15 min. Sedimentul astfel obținut s-a spălat cu 200 ml soluție de zaharoză 10^0 „, Tween 80 $0,1^0$ „ și Tris 10 mM, pH 7,5, prin omogenizare la 55 V, timp de 15 min. și s-a centrifugat la $1200 \times g$, timp de 10 min. În continuare, sedimentul nuclear a fost spălat din nou de trei

ori cu o soluție de zaharoză 10^{10} „, Tris 10 mM, pH 7,5 și centrifugat de fiecare dată cite 15 min. la $1200 \times g$.

Cromatina crudă s-a preparat din nucleee spălate după metoda descrisă de noi (1). Purificarea cromatinei s-a făcut prin precipitarea ei cu Mg^{2+} de concentrație 10 mM din soluția cromatină crudă, după metoda descrisă într-o lucrare anterioară (2).

Degradarea enzimatică a cromatinei de DNaza I. Cromatina tumorală purificată a fost tratată cu DNaza I după tehnica descrisă (2).

Purificarea subunităților de cromatină. Operațiile de cromatografie pe coloană de agaroză și urmărirea spectrofotometrică a densităților optice a fracțiunilor cromatografice s-a făcut după metoda elaborată de noi (2).

Rezultate și discuții

După cum s-a mai semnalat (2), degradarea cromatinei normale în subunități cu ajutorul DNazei I și separarea acestor subunități prin cromatografiere pe coloană de agaroză constituie un mijloc eficace pentru prepararea nucleozomilor.

Pentru standardizarea condițiilor de degradare enzimatică a preparatelor de cromatină s-au studiat unele aspecte cinetice ale reacției. Astfel, s-a determinat influența concentrațiilor de enzimă asupra gradului de degradare ADN deproteinizat din ficat de șoareci. În cadrul investigațiilor a fost aleasă o concentrație de ADN egală cu cea aflată în preparatele de cromatină. S-a găsit că fragmentarea ADN a atins valoarea de 90% la o concentrație de 40 $\mu g/ml$ de DNaza I după două ore de incubare. DNaza I a fost aleasă pentru degradarea enzimatică a ADN din cromatină, deoarece această enzimă produce fragmente similare cu nucleaza microcociască (3).

Comparând dinamica apariției fragmentelor acido-solubile în cursul hidrolizei ADN cu DNaza I se poate considera că cromatina din celule normale (ficat de șoareci) apare relativ mai rezistentă față de acțiunea DNazei I, decît cromatina obținută din celule tumorale (fig. nr. 1). Deci, lanțul internucleozomal de ADN din celulele canceroase s-a dovedit mai accesibil moleculelor de DNaza I, decît cel din celule normale.

Se știe că ADN internucleozomal este așezat între două corpuri histonice adiacente (3) și este accesibil pentru nucleaze, în timp ce, ADN de pe corpul histonic nu prezintă o asemenea proprietate. S-a găsit că ADN internucleozomal are o conformație mai deschisă și este sărac în histone (3, 4).

În cadrul cercetărilor noastre privind cinetica formării fragmentelor acido-solubile, aceasta a prezentat o diferență distinctă. Astfel, în cursul primei ore de incubare (faza rapidă de activitate enzimatică) s-a degradat o cantitate de 10,4% din cantitatea totală de ADN normal, iar această valoare a fost de 19,6% în cazul ADN din celule tumorale (fig. nr. 1). Valorile obținute de noi se aseamănă cu datele găsite în literatura de specialitate (9). Și cromatina din embrionul de arici de mare prezintă o rezistență redusă față de activitatea nucleazică, iar cromatina din spermatidele aceleiași specii apare mai rezistentă (5).

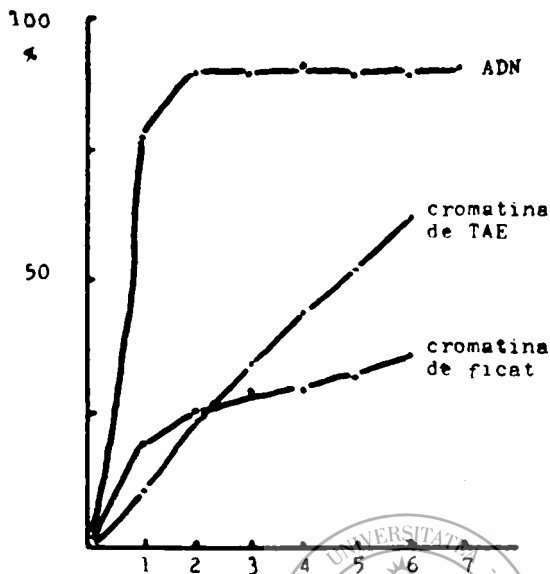


Fig. nr. 1: Cinetica de hidroliză a diferitelor cromatine și a ADN deproteinizat în prezența DNazei I. Substratul conține ADN 800 $\mu\text{g/ml}$ și DNază I 40 $\mu\text{g/ml}$ în soluție de glicină 10 mM cu un conținut de Mg^{2+} 5 mM, pH 7.2, la 37°C

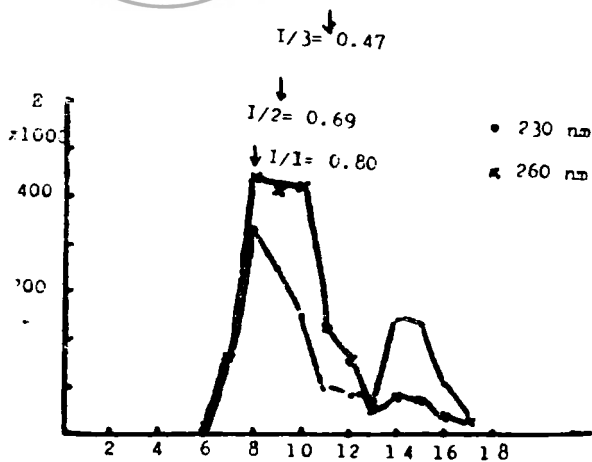


Fig. nr. 2: Cromatografia cromatinei tumorale ascitice Ehrlich pe gel de agaroză. Concentrația cromatinei 340 μg ADN coloană în soluție de glicină, pH 7.2, 10 mM.

Este posibil ca inversiunea ratei de fragmentare DNazică I a diferitelor cromatine, după două ore de incubație (fig. nr. 1), să fie în legătură cu diferența repartiției ADN internucleozomal în cele două cromatine studiate de noi, precum și cu unele diferențe în structura terțiară a acestor cromatine.

După cum reiese din figura nr. 2, primul pisc în profilul cromatografic al cromatinei tumorale se află între probele nr. 7 și 11 (cu un maxim la nr. 8) și conține trei subfracțiuni, similar cu cel obținut în cazul cromatinei celulelor normale (ficat de șoareci), publicat în lucrarea anterioară citată (2). Din valorile raporturilor de absorbție ale acestor subfracțiuni ($I_1 = 0,80$, $I_2 = 0,69$, $I_3 = 0,47$) se deduce un conținut scăzut de histone față de valorile găsite la cromatina normală, ceea ce indică o degradare mai pronunțată a cromatinei tumorale. Acest fapt este în concordanță cu cele observate la studierea cineticii hidrolizei în cromatina tumorală (fig. nr. 1). Piscul II este identic cu cel apărut la cromatina normală (2).

Datele noastre asupra fracționării de cromatină degradată din celulele de TAE aduc argumente în favoarea folosirii metodei de cromatografie pe gel de agaroză pentru purificarea acestor particule genetice. Pe această cale se pot separa, foarte rapid, fracțiuni subcromozomiale din celulele normale, precum și din cele tumorale, cu un raport de absorbție specific pentru nucleozomi. Rezultatele dozărilor chimice privind compoziția fracțiunilor cromatografice obținute, vor fi prezentate într-o lucrare ulterioară.



Bibliografie

1. Blazsek V. A.: Rev. med. (1981), 27, 209;
2. Blazsek V. A.: Rev. med. (1982), 28, 67;
3. Simpson R. T., Whithlock J. P. jr.: Nucl. Acids Res. (1976), 3, 117;
4. Cremisi Ch., Pignatti P. F., Croisant O., Yaniv M.: J. Virol. (1976), 17, 204;
5. Spadafora C., Noviello L., Geraci G.: Cell Different. (1976), 5, 225.

Sosit la redacție : 20 decembrie 1982.

V. A. Blazsek

RESEARCHES ON THE CONNECTION BETWEEN THE THIOL DISULPHIDE RATIO IN NUCLEOSOMES AND THE CELLULAR GENETIC ACTIVITY.

III ISOLATION OF CHROMATIN SUBUNITS FROM TAE CELLS BY AGAROSE COLUMN CHROMATOGRAPHY

Our present study aimed at evaluating the efficiency of our own method in purifying the chromatin subunits from ascitic tumoural Ehrlich's cells. Comparing the dynamics of the occurrence of acid-soluble fragments during DNA hydrolysis with DNase I, it may be considered that the chromatin of normal cells (liver of mice) is relatively more resistant to the action of DNase I than the chromatin from tumoural cells. From the values of the absorption ratios of the isolated subfractions, we deduced a low content of histone, as compared with the values found in normal chromatin, which also indicates a more marked degradation of the tumoural chromatin.