MANUEL TROYANO PUEYO

Histonas de glândulas salivares de *rhynchosciara americana*: Caracterização e síntese

Tese de Doutoramento apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo

São Paulo

1976

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco J.S. Lara, oridentador desta tese, por ter-me admitido em seu Laboratório e confiado parte de seu programa de investigação. Sua dedicação e amizade além de altamente construtivas, tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao saudoso Prof. Dr. Paulo C. Ferreira e ao Prof. Dr. Willy Beçak, que me incutiram o entusiasmo pela investigação científica.

Ao Prof. Dr. Hugo A. Armelin pela leitura crítica do manuscrito desta tese.

Aos companheiros de laboratório Carlos E. Winter, Dr. Roberto V. Santelli e Maria de Fátima Bonaldo pela ajuda direta na realização da parte experimental deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório Dr. Antônio G. de Bianchi, Arnaldo Zaha, Benjamin Paz Aliaga, Carlos A. Salles Alvarenga, Christine M. Okretic, Clélia Ferreira, Joaquim dos Santos Penoni, José M. Hierro Quintana, Lucile M. Floeter, Manuel Díaz, Percy N. Ponce, Sonia M. de Toledo e Dr. Walter R. Terra pela amizade.

À Sra. Maria do Carmo P. Nunes, à Srta. Marina Batista e aos Srs. João A. Rocha, José R. Coelho e Martiniano de Jesus pelo auxílio técnico prestado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo que através de seu auxílio financeiro, possibilitou a minha permanência no Laboratório do Prof. Lara.

Esta tese foi realizada com suportes financeiros fornecidos ao Laboratório do Prof. Francisco J.S. Lara pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo através do Projeto BIOQ/FAPESP e pelo Conselho Nacional de Pesquisas através do Plano Integrado de Genética.

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	xi
I. INTRODUÇÃO	1
Parte A	1
1. Nota histórica	1
2. Histonas - Propriedades gerais	2
3. Síntese de histonas	15
4. Modificações químicas de histonas "in vivo"	21
4a. Metilação	22
4b. Acetilação	24
4c. Fosforilação	28
5. RNA mensageiro de histonas	32
6. Histonas e cromatina	35
6a. Interação de histonas com DNA	39
6b. Subunidade fundamental da cromatina: O nucleossomo	46
Parte B	57
1. O sistema politênico	57
II. MATERIAL E MÉTODOS	64
1. Animais	64
2. Administração de precursores radioativos	66
3. Administração de drogas	67
4. Preparação de núcleos de glândulas salivares e extração de histonas	68
5. Preparação de cromatina de glândulas salivares	69

6. Extração de histonas de cromatina purificada 70
7. Eletroforese de histonas em géis de poliacrilamida 72
8. Eletroforese de histonas em géis de poliacrilamida-SDS 72
9. Microdissecção de núcleos e citoplasmas de glândulas salivares 73
10. Preparação de polirribossomos de glândulas salivares 74
11. Sedimentação de polirribossomos em gradientes de sacarose 75
12. Determinação de radioatividade em experiências de dupla marcação com ^{14}C e ^{3}H 76
13. Preparação de amostras para determinação de radioatividade por cintilação líquida 80
14. Determinação de DNA em glândulas salivares 81
15. Reagentes 82
16. Instrumentos 84

III. RESULTADOS 86

1. Local e época da síntese de histonas em glândulas salivares de R. americana 86
2. Caracterização de histonas de glândulas salivares de R. americana por métodos eletroforéticos 94
3. Síntese de histonas em glândulas salivares durante o desenvolvimento larval 117
3a. Medidas densitométricas 117
3b. Incorporação de lisina-^{3}H durante o desenvolvimento larval 121
4. Efeito de ecdisterona na incorporação de lisina-^{3}H e timidina-^{3}H em histonas e DNA de glândulas salivares de larvas de 2º período 134

IV. DISCUSSÃO 140

1. Local e época de síntese de histonas em glândulas salivares 140
2. Caracterização de histonas de glândulas salivares de Rhynchosciara 142
3. Síntese de histonas durante o último ciclo de replicação em glândulas salivares 144
4. Provável modificação química em histonas de glândulas salivares 149
5. Efeito de ecdisterona na incorporação de lisina-^{3}H em histonas extraídas de cromatina de glândulas salivares de larvas de 2º período 152

V. RESUMO 164
SUMMARY 166
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 169

ABREVIATURAS

A - Adenina

ATP - trifosfato de adenosina

cAMP - éster monofosfórico cíclico de adenosina

Ci - Curie ($2.2x10^{12}$ dpm)

CPM - contagens por minuto, como medida de radioatividade

DEP - dietilpirocarbonato

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNP - partícula desoxirribonucleica

$D.O._{260}$, $D.O._{600}$ - densidade óptica de soluções medidas a 260 e 600 nanômetros respectivamente

DTT - ditiotreitol (Reagente de Cleland)

EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético

mA - miliampere

nm - nanômetro

PCA - ácido perclórico

POPOP - 1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)-benzeno

PPO - 2,5-difeniloxazol

Poli-A - ácido poliadenílico

RNA - ácido ribonucleico

HnRNA, RNA heterogêneo nuclear; mRNA, RNA mensageiro; rRNA, RNA ribossômico; tRNA, RNA de transferência

RNase - ribonuclease

S - Svedberg ($1x10^{-13}$ seg.)

SDS - Dodecil sulfato de sódio

T - timidina

TCA - ácido tricloroacético

Tris - tris-(hidroximetil)-aminometano

TBGPL - meio para manutenção de órgãos, de composição baseada na da hemolinfa de larvas de R. americana (Terra et al., 1976)

I. INTRODUÇÃO

PARTE A

1. NOTA HISTÓRICA

Friedrich Miescher (1874), trabalhando no Laboratório de Hoppe-Seyler em Tübingen, isolou pela primeira vez, a partir de glóbulos brancos, um material que diferia de outros de origem biológica até então conhecidos, por possuir alto teor de fósforo. Este material, denominado por Miescher de nucleina, seria mais tarde reconhecido como uma preparação bruta de DNP. Pouco depois em Basiléia, trabalhando com esperma de salmão, então abundante nas águas do alto Reno, Miescher isolou novamente a nucleina, e a partir dela, uma base rica em nitrogênio, de estrutura supostamente simples, cuja análise elementar forneceu a fórmula geral $C_9H_{21}N_5O_3$ e que foi chamada de protamina. Entretanto, ao trabalhar com testículos imaturos de salmão, Miescher isolou um material reconhecido como albuminóide ou proteico, mas diferente da protamina anteriormente isolada. Anos mais tarde, em 1884, Kossel outro discípulo de Hope-Seyler, mostrou que a protamina de Miescher era na realidade uma proteína, e que o material extraído de testículos imaturos de salmão, aparentemente pertencia a uma classe de proteínas básicas à qual Kossel chamou de histonas.

Após a morte de Miescher em 1895, Kossel por recomendação de Hoppe-Seyler, retomou os trabalhos de seu antecessor sobre a química do núcleo celular. Os estudos de Kossel prosseguiram até 1927, quando pouco antes de sua morte em Heidelberg, terminou o manuscrito de sua monografia sobre protaminas e histonas, publicado em 1928 (Kossel, 1928). Mais tarde, Stedman & Stedman (1950, 1951) sugeriram que as proteínas do núcleo, principalmente histonas, teriam papel importante como reguladores da expressão gênica. Desde então um número extremamente elevado de artigos sobre este tipo de proteínas têm sido publicados anualmente, levando à necessidade de constantes revisões de literatura, para a ordenação lógica dos conhecimentos adquiridos sobre este assunto.

2. HISTONAS - PROPRIEDADES GERAIS

O nome genérico de histonas designa uma classe de proteínas de peso molecular variando entre 12000 e 21000 daltons (dados obtidos a partir das respectivas sequências determinadas por DeLange et al., 1969a e Bustin et al., 1969), altamente básicas, (pI ~9) devido ao excesso de aminoácidos básicos, arginina e lisina sobre aminoácidos dicarboxílicos, que são principalmente encontradas associadas à cromatina de células somáticas de eucariotos. Estas proteínas caracteristicamente não possuem triptofano (Hlnica, 1967), e com relação ao conteúdo em lisina e arginina são agrupadas em três classes: ricas em lisina, moderadamente ricas em lisina e ricas em arginina. A nomenclatura

empregada para distinguir as principais frações de histonas, varia na literatura recente, desde aquela proposta por Johns & Butler (1962), até a proposta ultimamente no Ciba Symposium on Structure and Function of Chromatin (Londres, abril de 1974). Nesta tese entretanto, será empregada uma nomenclatura que tende a popularizar-se. Ela se baseia na composição de aminoácidos de histonas individuais e emergiu das discussões de investigadores reunidos na primeira Gordon Research Conference on Nuclear Proteins, Chromatin Structure and Gene Regulation (Beaver Dam, Wisconsin 3-7 de julho de 1972). Assim, o nome de cada histona é dado por um código de três letras que representam em ordem decrescente os aminoácidos mais abundantes ou mais característicos da respectiva molécula. Desde que cada aminoácido é representado por uma letra (lisina = K; alanina = A; arginina = R; prolina = P; leucina = L; ácido glutâmico = E; glicina = G; serina = S), as combinações mais usadas para dar nome às cinco histonas comuns são: KAP, KAS, LAK, ARE & GRK. Deve notar-se entretanto que como a composição de aminoácidos de algumas histonas pode variar em função da fonte de obtenção, haverá códigos diferentes para uma mesma histona a não ser que em uma próxima conferência se resolva dar a cada histona o código da correspondente extraída de uma fonte padrão, timo de bezerro, por exemplo. Na Tabela I (Huberman, 1973), é dada a correspondência entre as várias nomenclaturas em uso na literatura atual.

TABELA I

Correspondência entre as várias nomenclaturas de histonas em uso na literatura atual

Descrição	Rasmussen[1] et al.(1962)	Johns[2] & Butler (1962)	Beaver Dam (1972)	Londres (1974)	Peso Molecular
Rica em lisina	I	f1	KAP (rica em Lis, Ala e Pro)	1	20000
Moderadamente ricas em lisina	IIb2	f2b	KAS (rica em Lis, Ala e Ser)	2B	13774
	IIb1	f2a2	LAK (rica em Leu, Ala e Lis)	2A	15000
Ricas em arginina	III	f3	ARE (rica em Ala, Arg e Glu)	3	15324
	IV	f2a1	GRK (rica em Gli, Arg e Lis)	4	11282

1- A nomenclatura de Rasmussen et al. (1962) usa como critério a ordem de eluição das diversas frações de histonas, de colunas de Amberlite IRC-50

2- A nomenclatura de Johns & Butler (1962) por sua vez emprega critérios de mobilidade eletroforética em géis de amido bem como de solubilidade em processos de fracionamento químico.

Com exceção da histona ARE as outras frações obtidas dos mais variados organismos, não possuem cisteína na molécula. Recentemente porém, detectou-se este aminoácido na molécula da histona GRK de equinoderma; (Senshu, 1971; Johnson et al., 1973a; Wouters-Tyrou, 1974). Até o momento, esta parece ser a única exceção à regra de que só a histona ARE possui cisteína.

A principal interação que associa histonas a DNA na cromatina é de caráter iônico, ou seja, interação entre grupos amidônio e fosfato. Assim, os processos para dissociá-las da cromatina empregam alta força iônica, geralmente com soluções de NaCl (Ohlenbusch et al., 1967) ou soluções diluídas de ácidos fortes, HCl e H_2SO_4. O emprego de ácidos fracos (ácidos acético, fórmico, orto fosfórico, ácido cítrico e outros) não parece conveniente para este propósito já que resulta na extração quase seletiva de uma das frações, a extremamente rica em lisina (histona KAP) (Davidson & Butler, 1954; Daly & Mirsky, 1955; Johns & Butler, 1962; DeNooij & Westenbrink, 1962; Johns, 1954; Murray, 1966; Hnlica, 1967). A extração seletiva da histona KAP por ácidos fracos, bem como em condições de baixa força iônica (0,5-0,6 M NaCl) (Giannoni & Peacocke, 1963; Lucy & Butler, 1955; Commerford et al., 1963), além de sua peculiar solubilidade em TCA 5% ou PCA 5% (Ui,1957; Hnlica et al., 1962) sugerem que esta histona deve associar-se com DNA na cromatina de forma diferente da de outras frações.

Via de regra, os processos de extração de histonas a partir de núcleos ou de preparações de cromatina de várias fontes, se iniciam por uma lavagem exaustiva do material de partida com soluções salinas diluídas, ou bem com soluções tamponadas diluídas, para eliminar eventual contaminação com proteínas não-histonas solúveis em ácidos fracos diluídos (Murray, 1965; Hnlica, 1967; Butler et al., 1968; Stellwagen & Cole, 1969). O material restante é então extraído com HCl ou H_2SO_4. As histonas são então recuperadas por precipitação com acetona ou com TCA 20%, ou ainda por diálise e posterior liofilização. O emprego de HCl ou H_2SO_4, é variável de autor para autor. Soluções de HCl 0,2-0,25 N são muitas vezes preferidas às de H_2SO_4 0,4 N já que sulfatos de histonas mostram tendência a formar agregados (Ui, 1957). Apesar disto soluções de H_2SO_4 solubilizam menos proteínas não-histonas de origem nuclear e fornecem portanto preparações menos contaminadas (Murray, 1966; Hnlica, 1967; Bonner et al., 1968a,b).

Os métodos empregados inicialmente na resolução de histonas levaram a uma série de discrepâncias e de dúvidas sobretudo a respeito da heterogeneidade destas proteínas. Assim, Cruft et al.(1957) detectaram seis bandas de histonas. Neelin & Connel (1959), Neelin & Butler (1961), usando eletroforese zonal em géis de amido, detectaram entre 16 e 18 bandas a partir de várias fontes. Johns et al. (1961), detectaram 22 bandas. O achado de numerosas frações de histonas tornou-se interessante já

que preenchia um requisito importante da hipótese de regulação da expressão do genoma por histonas (Stedman & Stedman, 1950, 1951), ou seja, a existência de histonas em número suficiente para que em combinações, fossem capazes de controlar enorme número de genes no genoma de eucariotos. Mais recentemente, entretanto, este número de bandas pode ser considerado exagerado. Preparações de cromatina vêm muitas vezes contaminadas com proteases (Reid & Cole, 1964; Furlan & Jericijo, 1967; Panyim et al., 1968) às quais as histonas, por não possuirem uma rígida estrutura terciária, são particularmente sensíveis, acrescentando-se a isto o fato de que a própria metodologia de resolução empregada inicialmente não era adequada para a análise de histonas (Panyim et al., 1971). Provavelmente, estas complicações contribuiram para a confusão que existiu durante algum tempo a respeito do número real de classes de histonas que estariam agregadas à cromatina.

Presentemente, a metodologia disponível mostra que o complemento de histonas é resolvido em cinco frações principais, várias das quais mostram heterogeneidade (Panyim et al., 1971). A ordem dessas bandas extraídas de núcleos de mamíferos, quando analisadas em géis de poliacrilamida, migrando do polo positivo ao negativo é: KAP, ARE, KAS, LAK, GRK. Um afastamento na escala evolutiva do filo mamífero revela que a mobilidade eletroforética da histona KAS aumenta e a da histona LAK diminui (Panyim et al., 1971), de forma que em Drosophila por exemplo,a ordem

anterior passa a ser KAP, ARE, LAK, KAS, GRK (Cohen & Gotchel, 1971).

Os problemas antes mencionados a respeito de isolamento e resolução de histonas, levaram a resultados contraditórios quando se tratou de responder à questão de se havia ou não especificidade de bandas com relação a tecidos ou mesmo a espécies. Kinkade & Cole (1966); Purkayastha & Neelin (1966) e Kinkade (1969) sugeriram a existência de histonas específicas de tecido para tecido bem como de espécie para espécie. Contrariando estes resultados, Hnlica (1966); Hnlica et al. (1966a) e McGillivary (1968) mostraram evidências de que histonas são constantes de espécie para espécie.

As estruturas primárias da histona ARE e GRK foram altamente conservadas através da evolução. (DeLange et al., 1969b; Hnlica, 1972; Brandt & Von Holt, 1972; DeLange et al., 1973; Hooper et al., 1973). A estrutura primária da histona GRK de organismos evolutivamente tão afastados quanto feijão e bezerro (timo) difere somente em dois aminoácidos num total de 102 (DeLange et al.,1969b) A determinação da sequência de aminoácidos da histona ARE de timo de bezerro (DeLange et al., 1973), de frango(Brandt & Von Holt, 1972) e de carpa (Hooper et al., 1973), mostra que a de frango e carpa têm sequências idênticas e que diferem da de timo no resíduo Ser 96, que em timo é Cys. A sequência de 50 resíduos a partir de N-terminal da histona ARE de tubarão, de um molusco, de um equinoderma e

de grãos de pólen foram comparadas com a de 50 resíduos correspondentes da histona ARE de timo de bezerro. O resíduo tyr 41 da histona de tubarão, molusco, equinoderma e timo, em grão de pólen é Phe. O restante da sequência é comum à histona ARE de todas essas fontes estudadas(Brandt, et al., 1974).

Especificidade entre espécies e tecidos foram observadas nas histonas KAP, LAK e KAS e isto não parece ser devido a artefatos metodológicos. A histona KAP de Drosofila tem mobilidade eletroforética notavelmente menor que a de timo de bezerro ou a de embrião de ouriço do mar. Isto se deve tanto ao seu maior peso molecular como à sua menor basicidade (Cohen & Gotchel, 1971; Oliver & Chalkley, 1972a). Em embriões de ouriço do mar no estágio de pluteus, foram encontradas duas histonas KAP, que contêm significativamente mais ácido glutâmico que a correspondente de timo de bezerro e são também menos básicas que a histona KAP da cromatina do esperma de ouriço (Johnson et al., 1973a). Em tecidos tumorais e sadios de rato, foi detectada uma histona KAP que é específica de tecidos de rato (Sluyser & Hermes, 1973). A comparação de histona KAP de vários tecidos de bezerro mostra a existência de microheterogeneidade específica nos vários tecidos (Kinkade & Cole, 1966; Kinkade, 1969; Panyim & Chalkley, 1969). Embora na maior parte das vezes as diferenças interespecíficas encontradas nas histonas KAP, LAK e KAS se baseiam unicamente em dados de mobilidade eletroforética (Panyim

et al., 1970; Panyim et al., 1971; Rall & Cole,1971; Bailey & Dixon, 1973) recentemente foram também obtidos dados sobre sequência de aminoácidos. Em gônadas de machos de ouriço do mar foi determinada a sequência parcial de uma nova histona que extraída quimicamente pelo processo de Johns (1967), se comporta como a histona KAS. No entanto a sequência determinada difere da correspondente da histona KAS de timo de bezerro (Strickland et al., 1974). Grande parte das histonas específicas de tecidos estão confinadas a células da linhagem germinativa de machos. Neste sentido, é ilustrativo o que acontece na maturação de espermatozoa em peixes, quando todas as histonas são substituídas por protaminas (Felix, 1960; Hnlica, 1967; Dixon & Smith, 1968) proteínas altamente básicas, com conteúdo de arginina e lisina mais alto que o de histonas e de peso molecular de 3-4 vezes menor. A substituição de histonas por protaminas durante a maturação de esperma parece ser um caso particular de um mecanismo mais geral no qual histonas somáticas são substituídas por protaminas ricas em arginina com composição específica de aminoácidos (Hnlica, 1967; Bloch, 1969). Assim, por exemplo, histonas específicas foram encontradas no esperma de moluscos (Subirana, 1973) e de várias espécies de ouriço do mar (Paoletti & Huang, 1969), mas não em seus tecidos somáticos. O mesmo ocorre durante a formação e maturação de espermatozoa de rato (Marushige & Marushige, 1975).

Um dos mais bem documentados e importantes exemplos de histona específica de tecido é representado

pela histona KSA* (histona rica em lisina, serina e alanina, ou histona F2c ou histona V) de eritrócitos nucleados de aves. A existência desta fração foi primeiramente proposta por Stedman & Stedman (1950, 1951) ao comparar o alto conteúdo de arginina de uma das frações isoladas de eritrócitos de galinha, com frações similares provenientes de timo de bezerro. Posteriormente Neelin & Butler (1961) confirmaram este fato analisando por eletroforese em géis de amido as frações extraídas de eritrócitos de galinha, quando detectaram a existência de uma banda ausente nos demais tecidos desse animal. A composição de aminoácidos desta fração foi determinada por Neelin et al., (1964) como sendo a fração V e por Hnlica (1964) como fração F2c. A fração KSA (V, F2c) ocorre em eritrócitos nucleados de várias espécies de aves, mas não em outros tecidos desses animais (Vidalir & Neelin, 1968; Purkayastha & Neelin, 1966; Neelin, 1968).

A histona KSA é sintetizada durante o processo de maturação do eritrócito, mesmo depois de terminada a síntese de DNA (Appels & Wells, 1972; Seligy et al., 1973; Moss et al., 1973) sendo facilmente detectada em reticulócitos e em eritrócitos maduros mas não na medula óssea ou

* A histona específica de eritrócitos nucleados de aves (F2c ou fração V), não foi discutida na Conferência de Beaver Dam. Os aminoácidos mais abundantes dessa histona em eritrócitos de frango, são em ordem decrescente, lisina, alanina e serina (Wilhelm et al., 1971). Desta forma, a essa histona corresponderia o código KAS. Como este já foi dado na citada Conferência à histona F2b, nesta tese deu-se à histona específica de eritrócitos nucleados, o código KSA para diferenciá-la da homônima.

no baço (Neelin, 1968; Edwards & Hnlica, 1968; Dick & Johns, 1969).

Uma possível e gradual substituição da histona KAP pela histona KSA durante a maturação do eritrócito, foi posta em evidência, não só devido à semelhança entre estas duas histonas, mas principalmente devido a observação de que ocorrem perdas quantitativas da histona KAP durante a diferenciação dessas moléculas (Mazen & Champagne, 1969; Dick & Johns, 1969; Mazen & Champagne, 1972). Este fato foi mais recentemente investigado por Moss(1974). Seus dados sugerem que possa haver populações distintas de histonas em eritrócitos embrionários maduros. As histonas KSA e KAP variam de 15% e 9% respectivamente em células embrionárias para 21% e 6% em células adultas, enquanto as outras histonas permanecem constantes. Desde que a remoção seletiva de histonas KAP e KSA da cromatina de eritrócitos maduros aumenta sensivelmente suas propriedades de "template" (Seligy & Neelin, 1970; Gasaryan & Andreeva,1972; Bolund & Johns, 1973; Seligy & Miyagi, 1974), é possível pensar que o aumento de condensação da cromatina bem como a queda de eficiência para funcionar com "template" que ocorrem durante a diferenciação celular, estejam relacionados com a interação da histona KSA com a cromatina devido a seu acúmulo durante a maturação. Na verdade, a remoção seletiva da histona KSA foi correlacionada com variações na conformação e disponibilidade de grupos fosfato na molécula de DNA (Seligy & Miyagi, 1974; Willyams et al., 1972; Seligy & Lurquin, 1973). Entretanto, os dados de

ativação da função de "template" da cromatina de eritrócito após a remoção da histona KSA, obtidos por medidas de hibridização DNA-RNA e por ligação de corantes intercalantes (Seligy & Miyagi, 1974; Seligy & Lurquin, 1973), mostram que cromatina ativada funciona aproximadamente da mesma forma que cromatinas altamente ativas na função de "template", como a de fígado e a de eritrócitos imaturos, mostrando que o "template" de eritrócito diferenciado não deve sofrer alterações drásticas durante o processo de maturação. Desta forma, o papel proposto para a histona KSA na restrição do papel de "template" da cromatina de eritrócito adulto não deve consistir meramente num aumento da proporção dessa histona no material proteico agregado à cromatina. Uma possibilidade para a qual existem evidências, é que ocorram modificações enzimáticas que possam mediar a ligação da histona KSA ao DNA ou à outras proteínas da cromatina ou ainda a ambos, por redução de cargas básicas chaves, através de fosforilação de resíduos de serina ou por acetilação de ε-amino grupos de lisina (Seligy et al., 1973; Seligy & Neelin, 1973; Williams & Seligy, 1973).

Histonas de composição similar, mas não idêntica à da histona KSA de eritrócito de galinha foram encontradas em eritrócitos de peixes e sapos (Edwards & Hnlica, 1968) e em esperma de ouriço do mar (Hnlica, 1967; Palau, Ruiz-Carrillo & Subirana, 1969; Paoletti & Huang, 1969).Na glândula de seda posterior de Bombix mori, foi também

detectada uma histona similar à histona KSA (Yoshida et al., 1966; Yokotsuka et al., 1968).

Greenaway & Murray (1971), detectaram heterogeneidade e polimorfismo na histona KSA de eritrócitos de galinha. Esta, cromatograficamente é resolvida em dois componentes, um com glutamina e outro com arginina na posição 15 a partir de N-terminal. Um estudo deste tipo numa família de galinhas sugeriu que a heterogeneidade cromatográfica é de origem genética e que devem existir genes alelos para a histona KSA em eritrócitos. A heterogeneidade da histona KSA lembra de várias formas a já comentada da histona KAP de vários organismos. Esta similaridade sugere que as duas histonas possam ter a mesma origem e que o polimorfismo detectado para estas duas proteínas, embora aumentando o número de bandas bioquimicamente detectáveis, deve conferir-lhes um papel menos complexo nas funções biológicas que elas possam desempenhar, o que por sua vez favorece a hipótese de que histonas desempenhem na cromatina um papel estrutural em vez de regulatório (Greenaway & Murray, 1971). Na realidade o exato papel de histonas no que tange à manutenção da estrutura da cromatina ou ao processo de regulação de expressão do genoma durante a diferenciação, está longe de ser claramente elucidado. A variedade de modelos propostos na literatura que tentam explicar a função de histonas na estrutura enormemente complexa que é a cromatina, demonstra, que apesar do grande número de dados levantados estes são poucos para que

seja possível formar uma idéia clara e precisa sobre a real função dessas proteínas.

3. A SÍNTESE DE HISTONAS

Caracteristicamente, histonas são encontradas principalmente no núcleo de células somáticas de eucariotos agregadas a DNA na cromatina. Entretanto, a localização extranuclear de histonas foi descrita em algumas ocasiões, embora em várias delas, as proteínas descritas como sendo histonas, são provavelmente proteínas estruturais do ribossomo,cujo comportamento eletroforético e composição de aminoácidos são semelhantes aos de histonas (Ansley et al., 1969). Lindsay (1966), estudando proteínas básicas extraídas de ribossomos concluiu que as histonas encontradas na cromatina são também encontradas em ribossomos onde exerceriam um papel regulatório. A possibilidade de que as proteínas descritas como histonas por Lindsay(1966), sejam na realidade material de estrutura ribossômica, não pode ser descartada, já que suas inferências têm como base unicamente dados de eletroforese zonal em géis de amido.Entretanto, dados posteriores de Gurley & Hardin(1968)mostraram a existência de um "pool"não cromatínico da histona KAP em células de cultura de hamster. A investigação em ribossomos e polissomos obtidos de citoplasma livre de DNA, mostrou que a histona KAP está ligada a essas partículas sem fazer parte de sua estutura. A histona KAP purificada de ribosomas foi identificada como tal não somente por dados de mobilidade eletroforética mas por análise de aminoácidos

(Gurley et al., 1970). A histona KAP de ribosomas em células de hamster é metabolicamente diversa da extraída de cromatina ou nucleoplasma dessas células, já que em experimentos de pulso com precursores radioativos, mostrou ser mais "velha" que as histonas KAP de nucleoplasma e cromatina. O grau de fosforilação desta histona é muito menor que o da histona KAP de cromatina e parece que ela representa aproximadamente 10% do total de histona KAP da célula total (Gurley et al., 1973a). Até o momento, este parece ser o único caso convenientemente documentado da existência extranuclear de histonas.

Devido à sua localização quase que exclusivamente nuclear, pareceu lógico iniciar a investigação do local de síntese de histonas, nessa organela. Assim, a incorporação de aminoácidos radioativos em núcleos isolados foi observada em células de timo de bezerro (Allfrey & Mirsky, 1957; Reid & Cole (1964); Reid et al., 1968) e em células politênicas de dipteros (Sirlin & Schor, 1962a; Sirlin & Schor, 1962b; Ristow & Arends, 1968; Helmsing, 1970; Cestari & Pavan, 1970). Experimentos sobre a cinética de incorporação de aminoácidos radioativos no núcleo de células íntegras de semente de feijão e de tabaco levaram a Birnstiel & Flamm (1964) a propor o nucléolo como compartimento nuclear onde seriam sintetizadas histonas. Resultados semelhantes obtidos no hepatoma de Novikoff, por Hnlica et al. (1966b) fazem supor o nucléolo como sendo o "locus" de síntese de histonas nesse sistema. Embora várias

críticas possam ser feitas com relação à metodologia empregada para detectar síntese nuclear de proteínas, os dados de Reid & Cole (1964) e Reid et al. (1968) parecem indicar, que, a síntese de pelo menos histonas ricas em lisina, é nuclear em células de timo de bezerro.

Contrastando com os resultados obtidos ao estudar incorporação de aminoácidos radioativos em núcleos, a síntese citoplasmática de histonas foi detectada em uma série de sistemas. Experimentos de Robbins & Borun (1967) e de Nemer & Lindsay (1969) mostraram que em células HeLa e em embriões de ouriço do mar, histonas são sintetizadas no citoplasma numa classe de polirribosomas contendo de 5-6 ribosomas e em épocas definidas do ciclo celular. Helmsing (1971) mostrou evidências de que em células politênicas de glândulas salivares de diptero D. hidey histonas são também sintetizadas no citoplasma. Presentemente os dados da literatura que sugeriram o núcleo como "locus" de síntese de histonas em alguns sistemas, tendem a ser abandonados em favor de resultados mais convincentes obtidos em citoplasma. Apesar disto, não parece que a questão esteja encerrada a este respeito. Os controles experimentais sobre contaminação citoplasmática feitos por Reid et al. (1968) ao investigar síntese de histonas em núcleos de timócitos são bastante cuidadosos, de forma que a tendência atual de restringir a síntese de histonas ao citoplasma, adquire a feição de preconceito.

Estudos em células mitóticas mostram que existe uma estreita relação entre síntese de histonas e

síntese de DNA. Spalding et al. (1966) estudando a biossíntese de proteínas ácido solúveis extraídas de núcleos de células HeLa sincronizadas mostrou que a massa bem como a atividade específica das várias bandas analisadas em géis de poliacrilamida aumentam notavelmente no período de síntese de DNA. O mesmo tipo de associação entre síntese de DNA e histonas foi demonstrado em cultura de células de Tetrahymena piriformis (Lee & Scherbaum, 1966), bem como em uma série de outros sistemas (Robbins & Borun, 1967; Takai et al., 1968; Gallwitz e Mueller, 1969; Gurley et al.,1972; Kemper & Rich, 1973).

Entretanto, paralelamente à verificação da sincronia de síntese de DNA e histonas uma série de dados pôs em evidência que esta relação biossintética pode não ser tão restrita. Umaña et al. (1964) observaram síntese de histonas antes da onda de síntese de DNA em células de fígado de regeneração. Da mesma forma, em células de tumor ascítico de Ehrlich quando infectadas pelo vírus de Maus-Eberfeld, observou-se estimulação da síntese de histonas sem que a de DNA fosse alterada (Holoubek & Rueckert, 1964). Estes dois resultados porém, devem ser encarados com cuidado, já que eles foram obtidos estudando proteínas básicas nucleares ácido solúveis, sem ulterior fracionamento. Uma eventual contaminação por proteínas não histonas durante a extração poderia em parte explicar essa síntese assincrônica. Apesar de ressalva anterior observações mais confiáveis foram realizadas por outros autores.

Chalkley & Maurer (1965), estudando síntese de histonas em tecidos que não sintetizam DNA bem como em células de tabaco em que a sua síntese havia sido inibida por 5-fluordesoxiuridina, observaram ao fracionar histonas por um processo cromatográfico, que nessas condições não eram sintetizadas histonas ricas em lisina mas sim as ricas em arginina. A uma conclusão semelhante chegaram Spalding et al. (1966) ao inibir síntese de DNA com ametopterina ou timidina em células HeLa. Após a inibição, três frações de histonas separadas por eletroforese em poliacrilamida continuavam sendo sintetizadas. Sadgopal & Bonner (1969), também em células HeLa, observaram síntese extensiva de histonas ricas em arginina após o bloqueio da síntese de DNA com timidina. Entretanto, Gurley et al. (1972) estudando a síntese de histonas em células de hamster chinês em cultura, sincronizadas na fase G_1 segundo o método "isoleucina limitante" desenvolvido por Ley & Tobey (1970) e Tobey e Ley (1971), (citados em Gurley et al., 1972) com o qual é possível sincronizar em G_1 100% dessas células durante longos períodos, mostraram que na fase G_1 existe síntese de histonas, mas a velocidade de síntese é somente 2% da da fase S. A explicação que Gurley et al. (1972) oferecem para estes resultados conflitantes é que provavelmente, os processos de sincronização química com drogas que inibem a síntese de DNA, não produzem células que bioquimicamente estejam em G_1, mas sim células em fase S cujo progresso através dela foi bloqueado pela droga empregada para sincronizar a cultura. Isto explicaria a detecção de síntese

exagerada de histonas em células supostamente sincronizadas na fase G_1. Os dados acumulados até o momento, permitem supor que histonas são principalmente sintetizadas na fase de replicação de DNA ou em sua proximidade, e que provavelmente algumas delas possam ser sintetizadas independentemente da síntese de DNA. Não se pode no momento discernir com base nos dados disponíveis, se essas bandas de síntese assíncrona desempenhariam papel diferente do das outras, cuja função deve ser fundamentalmente a de manter a estrutura da cromatina.

Estudos para determinação "turnover"de histonas mostram que este é muito lento quando comparado com o de outras proteínas. Em células de cultura de hamster todas as histonas sofreram "turnover" quando a síntese de DNA foi inibida (Gurley et al., 1968; Gurley et al. 1972). A histona KAP em células sincronizadas na fase G_1 pelo método "isoleucina limitante" parece sofrer "turnover" não acoplado à síntese de DNA; a vida média dessa histona em células sincronizadas em G_1 é de 91 horas quando no mesmo tipo de célula em crescimento exponencial é de 80 horas (Gurley & Hardin, 1970). A histona KAP é a que tem "turnover" mais rápido e o mais lento é o da histona LAK, cuja vida média é de 187 horas em G_1 (Gurley et al., 1972). Em cultura de células sincronizadas de hamster, quando elas são bloqueadas com timidina no início da fase S, não sintetizam DNA, mas são extremamente ativas na síntese de histonas (Gurley & Hardin, 1968); este fato é acompanhado de

um "turnover" mais rápido de histonas (Gurley & Hardin, 1969), o que indica que deve existir intercâmbio de histonas recém sintetizadas com aquelas agregadas à cromatina no momento em que é inibida a síntese de DNA.

4. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE HISTONAS "IN VIVO"

Todas as evidências experimentais indicam que as histonas devem ser removidas, para que o DNA funcione como"template" na síntese de RNA. Desta forma, durante o processo normal de diferenciação celular, deve existir um mecanismo que permita a remoção seletiva e no momento conveniente, de histonas para que regiões determinadas do genoma sejam transcritas. Alguns dos mecanismos propostos para explicar esta remoção se baseiam em experimentos que demonstraram ser possível alterar a ação repressora de histonas "in vitro" ao modificá-las quimicamente em tubo de ensaio. Uma intensa investigação foi iniciada para detectar modificações químicas de histonas "in vivo"desde que Allfrey & Mirsky (1964) observaram que a transformação de histonas em "histonas ricas em arginina" por guanidilação parcial ε-NH_2 livres em resíduos de lisina, podia diminuir significativamente o efeito repressor das proteínas originais na transcrição de RNA. A mais importantes modificações detectadas são a metilação (Allfrey et al., 1964; Kim & Park, 1965); acetilação (Allfrey et al., 1964) e fosforilação (Kleinsmith et al. 1966; Stevely & Stocken, 1966).

4a. METILAÇÃO

Em 1962 foi detectada a existência de um aminoácido não identificado nas histonas ARE, GRK e LAK de timócitos de bezerro (Murray & Luck, 1962). Observou-se mais tarde, que este aminoácido, ε-N-metil lisina, originava-se por metilação a partir de metionina (Allfrey et al., 1964; Murray, 1964) sendo S-adenosil metionina o doador intermediário (Kim & Paik, 1965). Além de resíduos monometilados de lisina, foram detectados resíduos di (Paik & Kim, 1967) e trimetilados (Hempel & Lange, 1968) em timócitos de bezerro e em eritrócitos de galinha. Além de lisina, resíduos de arginina também são metilados em ω-NH_2, em histonas pouco ricas em lisina de fígado de rato e em timócitos de bezerro (Paik & Kim, 1970a; Paik & Kim, 1970b). Resíduos de 3-metil-histidina foram também detectados nas histonas KAP e KSA de eritrócitos imaturos de aves (GERSHEY et al.,1969).

A análise sequencial de diversas frações de histonas, indica que, não só a metilação, como também as outras modificações químicas observadas em histonas, ocorrem em resíduos específicos e sua extensão depende da espécie, tecido e talvez da atividade funcional das células estudadas (Shepherd et al., 1971). Foi também demonstrado que preparações de núcleos e de cromatina incorporam grupos metila "in vitro". Esta incorporação ocorre em presença de S-adenosil metionina sem que seja necessário fornecer ao meio nenhuma outra fonte de energia (Sekeris et al., 1967). A metilação "in vitro" requer Mg^{+2} e seu pH ótimo é 9;

nessas condições parece que todas as histonas são monometiladas em resíduos de lisina, principalmente a histona ARE. Isto, coincide com o que se observa "in vivo", quando histonas ricas em arginina são os sítios primários de metilação (DeLange et al., 1969a; DeLange et al., 1970; Patterson & Davies, 1969). Preparações de metilases (de histonas) foram usadas para metilar resíduos de lisina em proteínas ribosomais e em proteínas da cromatina de células de tumor ascítico de Ehrlich (Comb et al., 1966). Várias das preparações de metilases obtidas são capazes de metilar "in vitro" resíduos de arginina de diversas formas (guanidil metila e N-metil guanidil metila), mas são incapazes, pelo menos nas condições de estudo empregadas, de metilar resíduos de lisina (Paik & Kim, 1968; Paik & Kim, 1969; Paik & Kim, 1970c).

Em 1970, Turner & Hancock (citado em Wilhelm et al., 1971) mostraram que a atividade de metilação de histonas em tecidos altamente proliferativos (embrião e células tumorais) é maior do que em células adultas normais, o que poderia indicar uma correlação entre metilação, de histonas e o processo de divisão celular. Entretanto, os dados existentes nos diversos sistemas estudados, não parecem mostrar correlações mais evidentes entre metilação de histonas e as propriedades "in vivo" do DNA na cromatina. Sem dúvida, a interação de histonas com os demais componentes da cromatina, deve ser modificada quando da metilação de resíduos específicos e certamente esta modificação deve

ter um papel determinado no controle da transcrição. Parece entretanto prematuro, em vista do pequeno número de dados disponíveis, inferir uma função concreta para a metilação no processo de diferenciação celular.

4b. ACETILAÇÃO

Este tipo de modificação química ocorre primariamente de duas formas, ou seja, a acetilação N-terminal nas histonas KAP, LAK e GRK (Hnlica, 1967) e a acetilação em ϵ-NH_2 de resíduos de lisina nas histonas ARE, GRK e LAK (Vidali et al., 1968; Gershey et al., 1968; DeLange et al., 1969a; DeLange et al., 1969b). A histona KAP não é praticamente acetilada quando comparada com as outras frações. Isto ocorre em mamíferos (Hnlica, 1967; Liew et al., 1970)bem como em todos os estágios do início de desenvolvimento embrionário de ouriço do mar (Johnson et al., 1973b). Este fato é importante já que a acetilação de histonas ocorre no núcleo (Gershey et al., 1968) e a atividade acetil transferásica de histonas foi detectada associada à cromatina em experimentos "in vitro" em timócitos de bezerro (Miller et al., 1973). Sendo assim, é bem provável que a acetilação unicamente no resíduo terminal detectada na histona KAP se deva à localização ou à forma como esta proteína interage com o DNA na cromatina. É bastante significativo, o fato de que a histona KAP dissociada da cromatina seja acetilada quando incubada com preparações de acetil transferase de histonas, em ϵ-NH_2 de resíduos de lisina da forma como ocorre

com as outras frações de histonas "in vivo" (Bondy et al., 1970; Gallwitz & Sures, 1972). Sem dúvida este tipo de resultado sugere fortemente que a interação da histona KAP com os componentes da cromatina é diferente daquela que deve ocorrer com as demais frações.

A acetilação de histonas nucleares foi detectada em vários tecidos de mamíferos (Marzluff & McCarty, 1970; Takaku et al., 1969; Pogo et al., 1968; Vidali et al., 1968) bem como em embriões de ouriço do mar. A comparação dos padrões de acetilação de histonas nestes dois sistemas, mostra uma extrema semelhança, sugerindo que este processo é evolutivamente bastante conservado e provavelmente relacionado com uma função cromossômica comum (Johnson et al., 1973b).

Correlações temporais entre a acetilação de histonas e atividade gênica foram observadas numa série de casos. Assim, a acetilação de histonas é muito mais intensa em frações da cromatina que são mais ativas na síntese de RNA (Allfrey & Mirsky, 1963). Da mesma forma, observou-se que durante a ativação gênica, a mudança da capacidade de "template" da cromatina é precedida por uma enérgica acetilação de histona ricas em arginina (Allfrey, 1971). Outra observação neste sentido mostra que a acetilação parcial de histonas era capaz de restringir sua atividade repressora na transcrição de RNA "in vitro", e que esse efeito era proporcional à extensão da acetilação (Allfrey et al., 1964). Apesar destas evidências, vários autores não

conseguiram encontrar correlação entre acetilação de histonas e desrrepressão da cromatina na síntese de RNA(Ellgaard, 1967; Gallwitz & Sekeris, 1969; Clever & Ellgaard, 1970).Particularmente importante neste sentido é a observação de que cromossomos politênicos de glândulas salivares de dipteros são acetilados "in vivo" (Allfrey et al., 1968; Clever & Ellgaard, 1970), mas que essa incorporação de acetato não se localiza sobre os "puffs" de RNA existentes no cromossomo nem sobre os induzidos por ação hormonal, sugerindo que o mecanismo de abertura dos "puffs" e a subsequente síntese de RNA, independem da acetilação de histonas (Clever & Ellgaard, 1970).

Estudos sobre a acetilação da histona GRK, mostram que este tipo de modificação é um evento pós-sintético (Allfrey, 1966) que parece ocorrer imediatamente após a biossíntese do polipetídio na mesma fase S em que ele é sintetizado (Shepherd, 1973). O incremento na acetilação de histonas na fase S não parece ser acompanhado por alterações importantes na atividade de acetiltransferases (Noland et al., 1971) o que sugere que este efeito se deva a maior disponibilidade de substrato (histonas recém sintetizadas) durante a fase S (Shepherd, 1973).

A acetilação de histonas é uma modificação reversível no sentido de que os grupos acetila não permanecem indefinidamente ligados ao polipeptídio, mas podem ser removidos e substituídos sem que aquele se degrade (Allfrey et al., 1964; Allfrey, 1971). Os mecanismos que controlam

este "turnover", são pouco conhecidos, mas enzimas que catalisam a acetilação (Bondy et al., 1970; Pestaña et al., 1971; Gallwitz & Sures, 1972; Horiuchi & Fujimoto, 1972) e a deacetilação (Boffa et al., 1971; Vidali et al., 1972 ; Inoue & Fujimoto, 1972) foram descritas e parcialmente caracterizadas. A deacetilação, ou seja a velocidade com que os grupos acetila são liberados dos correspondentes resíduos, parece estar sob um controle fisiológico que tem como base a atividade transcripcional da cromatina, da mesma forma que o observado em alguns sistemas para a acetilação. A deacetilação de histonas é ativada quando cessa a atividade de transcrição em granulócitos de equino tratados com fitohemaglutinina (Pogo et al., 1967), em eritrócitos de aves (Allfrey, 1970) e em esperma de equinodermas (Wangh et al., 1972); inversamente, ela é suprimida nos primeiros estágios da ativação gênica em células de fígado em regeneração (Pogo et al., 1968). Estas observações junto com as citadas antes sobre a acetilação, indicam fortemente que pelo menos em alguns sistemas, o "turnover" de grupos acetila em histonas está estreitamente relacionado ao processo de síntese de RNA.

As histonas de ratos tratados com um potente carcinogênico, a fração B_1 da aflatoxina, a qual inibe rapidamente a atividade de RNA polimerase DNA-dependente (LeFarge et al., 1965), sofrem uma rápida deacetilação principalmente as frações ARE e GRK, provavelmente porque a droga modifica subitamente os sistemas que controlam as

enzimas deacetilantes ou talvez a disponibilidade do substrato histona (Edwards & Allfrey, 1973). Analogamente, N--metilnitrosouréia, inibe potentemente a tomada de acetato por histonas de células HeLa (Chilina et al., 1972). É provável, embora esta idéia necessite comprovação, que exista alguma relação entre o rápido efeito sobre a deacetilação de histonas induzido por drogas carcinogênicas, e os padrões anormais de "turnover" de grupos acetila observados em linhagens de células tumorais (Byvoet & Morris, 1971, citado em Edwards & Allfrey, 1973).

Concluindo, a acetilação de histonas, similarmente com o que acontece com outras modificações que ocorrem nestas proteínas, pode refletir somente um aumento de atividade inespecífica na interação de histonas com os vários componentes da cromatina os quais podem funcionar sob a influência de estímulos externos (hormônios por exemplo), para efetuar modificações específicas na transcrição de "templates" ou na alteração da conformação da cromatina.

4c. FOSFORILAÇÃO

Outro mecanismo que pode diminuir a interação entre histonas e DNA, é a fosforilação enzimática dessas proteínas. Ord & Stocken (1966) e Kleinsmith et al. (1966), observaram a incorporação de fosfato-^{32}P em histonas de fígado de rato "in vivo" e em núcleos de células de timo "in vitro". Fosforilação de histonas foi também

observada em células de ovário de hamster chinês (Shepherd, 1970), em vários tecidos de rato, incluindo tumores (Georgatsos et al., 1968) e em eritrócitos de ganso (Adams et al., 1970), para citar alguns exemplos. A fosforilação ocorre por esterificação de resíduos de serina (Langan, 1968a) e em menor quantidade em resíduos de treonina (Ord & Stocken, 1966), sendo esta modificação efetuada por uma quinase específica; fosforilação em outros resíduos foi detectada recentemente, e este fato será comentado mais adiante. Das frações de histonas, a mais fosforilada é a histona KAP (Ord & Stocken, 1968; Stevely & Stocken, 1968), o que contribui parcialmente para a heterogeneidade química observada tanto nesta fração (Sherod et al., 1970) como na histona KSA específica de eritrócitos (Adams et al., 1970) e em outras frações de histonas (Hnlica, 1967; Langan, 1968a).

Smith et al. (1973); Formith et al. (1974) e Chen et al. (1974), mostraram evidências da existência de pelo menos duas histona-quinases em núcleos de vários tecidos normais de ratos e no carcinosarcoma de Walker-256. Todos os tecidos estudados continham uma ou duas dessas quinases. Estas enzimas são únicas no sentido de que elas catalisam reações de fosforilação de histonas de forma diferente das histona-quinases inicialmente estudadas por Walsh et al. (1968) e Langan (1968b). As quinases detectadas por estes autores formam ligações fosfomonoéster em resíduos de serina e de treonina principalmente da histona KAP e da histona

KSA sendo essas ligações ácido-estáveis. Em contrapartida, as quinases observadas por Smith et al. (1973), fosfori - lam histonas nos dois resíduos de histidina (formando 3-fosfohistidina) existentes na histona GRK e em resíduos de lisina da histona KAP; a fosforilação em histidina é efetuada por uma histona-quinase de pH ótimo 9,5 e em lisina por uma quinase de pH ótimo 6,5. Estas enzimas, embora tenham algumas características comuns, são diferentes. Não são estimuladas por cAMP, ao contrário das quinases que fosforilam serina e treonina (Langan, 1968b). Ambas utilizam ATP como doador de grupos fosfatos e são Mg^{+2} dependentes (Smith et al., 1974). A fosforilação em resíduos de histidina da histona GRK e de lisina da histona KAP ocorre "in vivo", e seu aumento de atividade em épocas de ativa síntese de DNA em alguns sistemas estudados (células de fígado de rato após hepatectomia parcial e em tecidos tumorais), bem como sua inatividade em tecidos não proliferativos, sugerem que estas quinases possam ter alguma função na replicação de DNA (Chen et al., 1974).

Considerável número de evidências têm sido acumuladas recentemente a respeito da possível função que teria a introdução de grupos fosfatos em moléculas de histonas. Estas suportam a noção de que a fosforilação de histonas e divisão celular, são processos altamente correlacionados (Balhorn et al., 1971, 1972c). Assim, a maior parte da fosforilação em histonas de células HTC ocorre durante a fase S do ciclo celular, sugerindo que a replicação

cromosômica e a fosforilação de histonas estão interligadas de alguma forma (Balhorn et al., 1972b). A velocidade de hidrólise de fosfatos nessas células é bastante lenta parecendo que a baixa fosforilação em fases do ciclo celular diferentes da fase S se deva à pouca disponibilidade de sítios de fosforilação. A extensiva fosforilação que se observa na fase S pode muito bem ser consequência direta da disponibilidade de novos sítios devido à síntese de histonas que ocorre nessa época. Resultados de Balhorn et al. (1973), mostram que em células HTC tratadas com cicloheximida, quando a síntese de histonas é inibida também o é a de DNA, como observou anteriormente Weintraub (1972). Isto sugere que a síntese dessas proteínas é um pré-requisito para a replicação de DNA. Os resultados desses autores indicam também que a fosforilação de histonas não depende diretamente da síntese de DNA, já que a velocidade de fosforilação decai levemente mesmo várias horas após o bloqueio da síntese de DNA por hidroxiuréia. Em Physarum polycephalum (Bradbury et al., 1973; Bradbury et al., 1974a) e em mamíferos (Gurley et al., 1973b) porém, mostrou-se que o conteúdo da histona KAP bem como seu grau de fosforilação são máximos ao fim da fase G_2, exatamente na época em que a condensação cromossômica antes da mitose se torna visível ao microscópio de fase, sugerindo estreita correlação entre esses eventos.

No estudo do controle da fosforilação da histona KAP, condensação cromossômica e mitose, é necessário saber se o incremento de fosforilação é causado por modificação

na atividade enzimática ou na disponibilidade do substrato. Esta última pode ocorrer devido a variações na estrutura da cromatina, e se esta for o fator de controle, a fosforilação da histona KAP pode ser uma consequência trivial da condensação cromossômica. Em contrapartida, modificação na atividade enzimática, pode sugerir que a fosforilação da histona KAP é uma importante etapa preliminar no processo de condensação cromossômica. Langan (1971, citado em Bradbury, 1974b) mostrou que variações no conteúdo de fosfato de histonas se devem à atividade de histona-quinases; da mesma forma Bradbury et al. (1974) concluiram que a fosforilação da histona KAP de P. polycephalum é controlada pela atividade da enzima fosforilante e que essa histona inicia a condensação cromossômica. Estes dois processos representariam as duas principais etapas no início da divisão mitótica da célula.

O conteúdo de fosfato da histona KAP também é correlacionado positivamente com a velocidade de replicação celular em timo de bezerro (Panyim & Chalkley, 1969b), e em células de fígado normal e em regeneração (Balhorn et al., 1971), sugerindo que essa correlação é universal, parecendo ser até o momento a única modificação química de histonas com função mais precisamente definida.

5. RNA MENSAGEIRO DE HISTONAS

Desde a verificação por Robbins e Borun (1967) que em células HeLa a síntese de histonas é síncrona com a

de DNA na fase S, e que aquela ocorre numa classe discreta de polirribosomas, experimentos foram iniciados com o objetivo de isolar o mRNA (s) dessas proteínas. Borun et al., (1967) isolaram desses polisomas um RNA de baixo peso molecular, com coeficiente de sedimentação em sacarose de 8-9S que podia ser isolado de polisomas (100-200S) de células na fase S mas não a partir de células da fase G. Quando a síntese de DNA era inibida por citosina arabinosídio, era impossível isolar tal RNA. Este, era rapidamente marcado e de vida média curta, aproximadamente igual a 1 hora. Por outro lado, Nemer & Lindsay (1969), estudando embriões de ouriço do mar no estágio de blástula (16-32 células), detectaram síntese de histonas em pequenos polirribosomas. Como a fase S em embriões de ouriço do mar dura em torno de 15 minutos a 15°C (Hinegardiner et al., 1964) a produção de histonas nessa época do desenvolvimento deveria ser extremamente pronunciada, e desta forma seria possível isolar seus mRNAs em quantidades apreciáveis. Na verdade, nessa época metade das proteínas sintetizadas no citoplasma se cumulam no núcleo sobre os cromosomas (Kedes et al., 1969). As facilidades oferecidas por este sistema levaram Kedes & Gross (1969) a isolar de polirribosomas leves de embriões de ouriço do mar no início da blástula, um RNA com características de mRNA de histonas, o qual em géis de policarilamida foi fracionado em três componentes. A prova conclusiva de que este RNA era realmente mensageiro de histonas, foi mais tarde obtida ao analisar seus produtos de transcrição "in vitro" em sistemas

heterólogos (Jacobs-Lorena et al., 1972, 1973; Breindl & Gallwitz, 1973) e caracterizá-los como histonas típicas. RNA com características de mRNA de histonas foi também identificado em cultura de células L de rato (Schochetman & Perry, 1972) e em células de mieloma de rato (Kemper & Rich, 1973).

O mRNA de histonas é transcrito de sequências repetidas do genoma. Sequências que codificam para mRNA de histonas em embriões de ouriço do mar estão repetidas 1000 vezes (Kedes & Birnstiel, 1971; Weinberg et al., 1972). Além de ouriço do mar, existem evidências obtidas de experimentos de hibridização cruzada de que em sequências complementares ao mRNA de histonas no genoma de Drosofila (Birnstiel et al. 1973) e de Xenopus (Kedes & Birnstiel, 1971) são também reiterados. É interessante o fato de que em células HeLa o grau de reiteração de sequências que codificam para histonas é muito menor que o determinado em ouriço do mar: somente 10-20 cópias de cada sequência que codifica para histonas, foram detectadas no genoma daquelas células (Wilson et al., 1974).

Um fato marcante observado quando se estudou a entrada de mRNA de histonas em polirribosomas, é que, ao contrário do que acontece com a maior parte dos outros mensageiros, os quais exibem um significativo "lag" antes de agregar-se a polisomas devido a processamento e/ou a transporte do núcleo ao citoplasma, os mensageiros de histonas chegam aos polisomas imediatamente após sua

transcrição (Schochteman & Perry, 1972). Adesnik & Darnell (1972), observaram que o mRNA de histonas não está associado a sequências de ácido poliadenílico, como acontece com a maior parte dos mRNAs estudados em cultura de células de mamíferos (Kates, 1970; Darnell et al., 1971; Edmonds et al., 1971; Lee et al., 1971). Provavelmente o mRNA de histonas chegaria aos polirribosomas imediatamente após o processamento de precursores do tipo HnRNA, já que prescindiria da etapa pós-transcripcional de adição de poli-(A), a qual dura de 10 a 30 minutos (Adesnik & Darnell, 1972).

6. HISTONAS E CROMATINA

DNA, histonas e proteínas ácidas e, em menor quantidade, RNA (Huang & Bonner, 1965; Bonner et al., 1968a) são os principais componentes da cromatina. A função e propriedades do DNA da cromatina estão detalhadamente descritas em uma série de revisões (vide por exemplo, Hearst & Botchan, 1970). RNA, outro componente desta estrutura e que corresponderia a 1% delas (Bonner et al., 1968a), teve sua existência postulada nos modelos de Frenster (1965) e de Britten & Davidson (1969). Segundo estes autores, tal RNA teria função direta na regulação da transcrição ao funcionar como adaptador da ligação de repressores específicos ao DNA. Entretanto, os resultados experimentais obtidos até recentemente, são discrepantes quanto à real existência de um RNA regulador na cromatina.

Sivolap & Bonner (1971) e Mayfield & Bonner (1972) reconhecem a existência deste RNA e mostram que suas características são similares às de HnRNA. Outros investigadores porém, foram incapazes de distinguí-lo de produtos de degradação de outros RNAs celulares. Por exemplo, Von Heyden & Zachau (1971) detectaram tRNA degradado em preparações de cromatina e Artman & Roth (1971) se referem a produtos de degradação de precursores de rRNA em suas preparações. Provavelmente a diferença de resultados se deve ao uso de diferentes sistemas bem como aos diversos métodos de preparação de cromatina empregados pelos vários laboratórios que estudam o assunto. Desta forma, as discrepâncias surgidas em seus resultados não são interpretáveis.

A existência de um RNA cromossômico que tenha a função de adaptador de proteínas ao DNA e participe no mecanismo de regulação da transcrição, não pode ser rigorosamente excluída no presente momento, se bem que os dados experimentais não mostrem nenhuma prova convincente de sua existência. Se levarmos em conta que as proteínas que controlam a expressão do operon lac em bactérias, se ligam ao DNA diretamente sem ajuda de nenhum RNA adaptador (Muller-Hill et al., 1971; von Hipel & McGhee, 1972), pode-se aceitar que não existe necessidade lógica para a existência deste DNA na cromatina de eucariotos. Os restantes componentes principais da cromatina, são de nanatureza proteica: proteínas ácidas e histonas. Estas últimas perfazem metade da massa cromossômica e devido à sua abundância bem como a facilidade com que são extraídas de cromatina, foram as primeiras a ser estudadas.

As duas hipóteses principais formuladas sobre a função de histonas na cromatina de eucariotos já foram mencionadas anteriormente:

- estão diretamente envolvidas nos mecanismos específicos de controle de regulação genética (Stedman & Stedman, 1950).
- controlam a estrutura do DNA sendo responsáveis por exemplo pelas contrações do DNA durante a mitose e pelas mudanças conformacionais que podem regular seu funcionamento detalhado em tempos diferentes do ciclo celular (Bradbury & Rattle, 1972).

A hipótese de Stedman & Stedman (1950) que confere a histonas o papel de reguladores específicos do genoma durante a diferenciação, não parece ser a mais correta à luz dos conhecimentos adquiridos sobre estas proteínas nas duas últimas décadas. As evidências acumuladas nos últimos anos indicam fortemente que a regulação específica do genoma estaria reservada ao complemento ácido das proteínas não-histonas da cromatina, todas as proteínas cromossômicas que não sejam histonas (sobre proteínas não-histonas, convém consultar os artigos de Stellwagen & Cole, 1969; de Elgin & Weintraub, 1975 e de Stein et al., 1975). Certamente, o tamanho do genoma de eucariotos deve requerer um alto grau de compactação para manter o DNA restrito ao relativamente pequeno volume ocupado pelos cromossomos dentro do núcleo, fato que não ocorre em células de procariotos onde o material genético não possui tais restrições topológicas. A comparação entre o tamanho de dois genomas, sua distribuição

dentro da célula e a observação de que os cromossomos de procariotos não contêm histonas, fazem supor que uma das funções destas proteínas seja justamente a de manter a rigidez do material genético em organismos superiores. Contudo, as histonas perfazem metade da massa cromossômica e parece pouco provável que sua única função seja a de manter a identidade do cromossomo. Mais lógico seria se essa enorme massa de material proteico tivesse, dentro das limitações impostas talvez por sua estrutura, o maior número possível de funções. Em outras palavras, seria um desperdício natural o gasto de tal massa de proteínas unicamente para recobrir uma molécula a qual para poder transmitir corretamente todas as informações que armazena necessita de um complexo sistema de controle.

Talvez em apoio desta idéia venham as observações de alguns investigadores os quais tentaram obter provas de uma origem comum para as cinco frações de histonas (Temussi, 1975). Provavelmente no início da evolução a função de histonas era muito mais simples e unicamente estrutural. Com o aumento de complexidade do genoma a função destas proteínas teve que diversificar-se e modificações tiveram que ser introduzidas na proteína original para atender às novas necessidades de controle da expressão de genomas cada vez mais complexos. A análise de sequências efetuada por Temussi (1975), indica que a grande similaridade entre as sequências de aminoácidos das histonas GRK, LAK e KAS pode significar uma primeira diferenciação

de uma histona ancestral em três proteínas e especialização em cinco proteínas em um estágio posterior.

6a. INTERAÇÃO DE HISTONAS COM DNA

O estudo da interação de histonas com DNA tem sido levado a cabo por vários laboratórios de forma bastante intensa nestes últimos anos. As técnicas empregadas bem como a maneira de atacar o problema têm fornecido dados iniciais de extrema importância. Estes dados começam a permitir a elaboração de modelos de estrutura de cromatina muito mais consistentes do que os propostos em outras ocasiões.

A interação de histonas com DNA foi estudada empregando modelos menos complicados, tais como polipeptídios básicos-DNA (Leibowitz, 1970; Leibowitz & Soffer 1970) ou mais simples ainda, como nucleotídios-polipeptídios básicos (Wagner & Arat, 1968; Rifkind & Eichhorn, 1970). Embora este tipo de estudo não forneça resultados que necessariamente reflitam a interação entre histonas e DNA "in vivo", algumas das conclusões obtidas a partir destas investigações mostraram-se bastante úteis. Assim por exemplo, observou-se que existe grande afinidade de poli-(L-lisina) por ácidos nucleicos ricos em A e T (Leng & Felsenfeld, 1966; Olins et al., 1968) bem como que poli-(L-lisina) e poli-(L-arginina) formam complexos estequiométricos com polinucleotídios de alto conteúdo de hélice (Shih & Bonner, 1970).

A cromatina é composta de uma série de componentes macromoleculares. Assim, é impossível no presente momento estudá-la com vistas a determinar sua estrutura "total". Devido à importância e aos detalhados conhecimentos obtidos sobre a estrutura primária e secundária do DNA, a macromolécula central e organizadora da cromatina, a maior parte das discussões a respeito de se sua estrutura tem sido centrada sobre a conformação do DNA na cromatina. Estudos de difração de raios X (Pardon et al., 1967; Pardon & Wilkins, 1972) e de espectroscopia de atividade óptica (Tuan & Bonner, 1969; Shih & Fasman, 1970), indicam claramente que a geometria da molécula de DNA na cromatina é marcadamente diferente da do DNA purificado. Desta forma, um dos objetivos principais dos estudos sobre estrutura de cromatina realizados até o momento, é determinar o tipo de proteínas responsáveis pela manutenção da conformação característica do DNA na cromatina. Como todas as variações conformacionais observadas na cromatina, foram associadas à remoção de histonas, assumiu-se como verdadeiro que uma ou mais delas seriam responsáveis por essa conformação característica.

Usando processos de extração seletiva por aumento de concentração salina, Ohlenbusch et al. (1967), removeram sequencialmente as cinco frações de histonas. Os efeitos desta remoção seletiva sobre a conformação do DNA foram controlados por difração de raios X (Garret, 1968; Skidmore et al., 1973), espectroscopia de dicroismo circular (CD) (Simpson & Sober, 1970; Henson & Walker, 1970a;

Wagner & Spelberg, 1971) e por medidas hidrodinâmicas (Henson & Walker, 1970b; Wilhelm et al., 1970). Embora a transição de conformação do DNA na cromatina para DNA purificado seja discreta e detectável por todos os métodos empregados, existem controvérsias sobre a natureza da histona ou histonas que são dissociadas da cromatina no momento em que ocorre a transição. Assim, Simpson & Sober (1970) e Henson & Walker (1970a) empregando espectroscopia de CD, Garret (1968) empregando técnicas de difração de raios X e Henson & Walker (1970b) por medidas hidrodinâmicas, observaram que a transição conformacional do DNA na cromatina ocorre durante a retirada de histonas moderadamente ricas em lisina (LAK e KAS). Entretanto, Wagner & Spelberg (1971), Skidmore et al. (1973) e Fredericq & Housier (1967) empregando a mesma variedade de métodos, concluiram que a transição de conformação ocorre durante a remoção da histona GRK. Uma explicação possível para esta discordância é sugerida pelos resultados de Clark & Felsenfeld (1971) (citado em Clark & Felsenfeld, 1972), os quais demonstraram que aproximadamente 40% das proteínas da cromatina são intercambiadas a concentrações salinas relativamente baixas, como NaCl 0,6 M. Evidentemente, esta redistribuição de histonas ao longo do DNA durante a remoção seletiva, diminui o significado dos resultados obtidos pelos autores referidos. Mais recentemente, Vandegrift et al. (1974) empregando técnicas de remoção seletiva de histonas em baixa concentração salina e em presença de tRNA, processo que não permite a redistribuição dessas proteínas

em sítios diferentes ao longo do DNA, (Ilyin et al., 1971), sugerem a partir de dados de espectroscopia de CD, que a histona GRK em presença de Ca^{+2} seria responsável pela estabilização das regiões de super-hélice de DNA em cromatina. Por outro lado, Smart & Bonner (1971) observaram que desoxicolato de sódio remove também seletivamente histonas da cromatina numa ordem de extração diferente da obtida por aumento de concentração salina. Por este processo, as histonas KAS + LAK, depois ARE + GRK e finalmente a histona KAP são sequencialmente removidas sem que haja redistribuição. Com este método é possível comparar as propriedades de dois tipos de cromatina, ou seja, a dehistonizada por NaCl e por desoxicolato e consequentemente obter dados adicionais sobre a natureza da histona ou histonas envolvidas na manutenção da conformação de DNA na cromatina. Os dados de Smart & Bonner (1971), indicam que as transições observadas em curvas de denaturação térmica, espectros de CD e em valores de sedimentação, não dependem do tipo de histona removida, mas da quantidade total de cargas positivas extraídas da cromatina, o que equivale a dizer que todas as histonas estariam envolvidas em manter a conformação do DNA cromossômico. Evidências obtidas posteriormente por vários laboratórios,indicam fortemente que quatro histonas ARE, KAS, LAK e GRK, estariam envolvidas na estabilização de regiões superhelicoidais da molécula de DNA na cromatina. A interação entre histona-DNA nessas regiões, naturalmente dependeria da histona considerada em vista das amplas diferenças estruturais exibidas pelas várias frações. Com

relação a este fato, uma série de modelos de interação foram propostos para frações de sequência de aminoácidos melhor conhecida. A validade destes modelos não pode no momento ser aceita sem as consequentes restrições, baseadas principalmente na carência de maiores informes experimentais. Apesar disto a contribuição potencial que estes modelos podem trazer para elucidar a estrutura detalhada da cromatina justifica que eles sejam comentados aqui.

A sequência de aminoácidos da histona GRK, mostra que sua molécula pode ser dividida em duas metades (DeLange et al., 1969a). A metade que contém NH_2-terminal, contém uma grande proporção de aminoácidos básicos enquanto a outra tem composição de aminoácidos muito similar à de outras proteínas globulares. A partir de estudos de ressonância magnética protônica, concluiu-se que ao aumentar a força iônica, aumenta o conteúdo de hélice da metade carboxiterminal da histona GRK. Este fato é seguido de agregação entre moléculas dessa proteína na qual a metade hidrófoba está envolvida em interação específica (Boublic et al., 1970; Smerdon & Isemberg, 1974). Similarmente, as observações de Ziccardi & Schumaker (1973) indicam que histona GRK forma agregados em NaCl 0,1 M mas não em NaCl 0,005 M onde a repulsão entre resíduos básicos é forte o bastante para impedir agregação. Quando se remove por tratamento com BrCN, um peptídio carboxiterminal com 18 aminoácidos, não se observa agregação da histona GRK em NaCl 0,1 M. Este resultado confirma os citados

antes e indica fortemente que a região hidrófoba da histona GRK toma parte em interação entre moléculas de histona e provavelmente não interage com DNA. Smythies et al. (1972) estudando a conformação da histona GRK com base em modelos de Corey-Pauling-Kaltum, concluiram que a interação desta proteína com DNA, não é inespecífica em termos de sequência de bases. A otimização de acoplamento desta histona com a molécula de DNA se daria em regiões de sequência de bases tentativamente sugerida como sendo CTTCCPCCCC??PCCT (em que P é uma base púrica). Ziccardi & Schumaker (1973), estudando a interação da histona GRK com DNA de bacteriófago T7, propõem um mecanismo "telha-telhado", segundo o qual esta histona se ligaria ao DNA de forma cooperativa; a ligação se iniciaria na extremidade da molécula de DNA (não poderia iniciar-se no meio de uma dupla hélice devido à interação desfavorável entre grupos fosfatos e a metade hidrófoba da histona) de forma tal, que a região hidrófoba de cada histona cobriria a região básica da histona seguinte. Essa região básica se ligaria ao DNA por interação coulombiana. A remoção do peptídio de 18 aminoácidos da região carboxiterminal, resulta na ligação não ordenada da histona ao DNA do fago, o que mostra a importância da integridade molecular para que ocorra interação correta entre os dois componentes da cromatina; além do mais, este resultado indica que pelo menos para histona GRK, a interação com DNA não se resume numa simples interação iônica inespecífica. Smythies et al. (1972) propõe a hipótese de que a histona GRK permitiria

que a rígida estrutura de dupla hélice de DNA (Sutton, 1972) se dobrasse sobre si mesma ao agir como uma "tala" sobre a hélice relaxada. Isto permitiria a compressão da molécula de DNA no relativamente pequeno espaço ocupado pelo cromossomo.

Com relação à histona KAP, dados de Cvetkovič & Savič (1969) mostram que ela se liga mais eficientemente a DNA de dupla hélice do que a DNA denaturado; essa ligação provavelmente ocorre na alça maior da dupla hélice em conformação relaxada (Olins, 1969). Smythies et al. (1974), propõe de forma similar que a histona KAP estabilizaria duas hélices paralelas de DNA, ao agir como suporte por formação de ligações cruzadas entre elas. Para exercer esta função a histona KAP se valeria das peculiaridades de sua estrutura. Esta é dividida em três secções: primeira, constituída pela região de alfa-hélice na parte central da molécula, a qual seria a principal responsável pela rigidez da estrutura. As regiões 2 e 3 das extremidades fariam o papel de articulações com regiões distintas da dupla hélice. A extremidade N-terminal tem sequência de aminoácidos conhecida, de forma que é possível sugerir que nessa articulação estejam envolvidas 10 ligações iônicas, três pontes de hidrogênio, e um número específico de interações lipófilas e outras interações fracas. A sequência da extremidade C-terminal da histona KAP não é conhecida, mas é provável que sua junção com a dupla hélice seja feita de forma similar à da extremidade N-terminal.

A histona ARE de timo de bezerro tem sequência de aminoácidos conhecida (DeLange et al., 1972). Inspecionando-a é possível notar que sua molécula, ao contrário da histona KAP, é conformacionalmente assimétrica. O segmento 1-87 contém aminoácidos básicos espaçados de forma pouco regular, sendo provável aqui, a existência de regiões de alfa e de beta-hélice. Desta forma a histona ARE também seria capaz de formar ligações cruzadas entre duas hélices paralelas de DNA. As ligações iônicas com os fosfatos e a compressão da alça maior da dupla hélice seriam determinadas pelas características do braço maior da histona ARE (aminoácidos 1-87), pela região de alfa-hélice do segmento 88-114 e pelo segmento 115-135, o qual repete aproximadamente a estrutura do primeiro (Smythies et al., 1974).

6b- SUBUNIDADE FUNDAMENTAL DA CROMATINA: O NUCLEOSSOMO

Dados de Johnson et al. (1972) indicam que a distribuição de proteínas ao longo do DNA da cromatina de timo de bezerro, não é uniforme. Os pares de bases na estrutura de dupla hélice existiriam em duas conformações, B e C diferentes quanto a seu grau de compactação. Três regiões de conformação B se alternariam com duas de conformação C. Das regiões B, apenas uma estaria parcialmente associada a histona, provavelmente à histona KAP (Smart & Bonner, 1971), sendo as outras portanto, passíveis de ataque de solventes e nuclease. As regiões de conformação C

estariam recobertas principalmente por histonas de alto conteúdo de hélice (Hanlon et al., 1974) e a interação com o DNA nessas regiões seria mediada por íons divalentes, de tal forma que a interação com a dupla hélice formaria estruturas altamente compactas, resistentes à ação de solventes e de nucleases. A estabilização dessas regiões de conformação C não seria determinada por todo o complemento de histonas. Provavelmente estariam envolvidas as histonas LAK, KAS, ARE e GRK (Hanlon et al. 1974) sem contribuição da histona KAP.

Os estudos sobre a denaturação térmica de nucleohistonas, mostram que nas regiões de DNA que estão ligadas as histonas, a estequiometria da associação é de 7 resíduos de aminoácidos por par de bases (Li et al., 1973). Então, a histona KAS com 125 resíduos (Iwai et al., 1970) deve ligar-se a 18 pares de bases; a histona GRK com 102 resíduos (DeLange et al., 1969a; Ogawa et al., 1969) a 15 pares de bases e a histona KAP com 216 resíduos (Bustin et al., 1969) e 31 pares de bases; a histona ARE, com 136 resíduos (Brand & Von Holt, 1972) a 20 pares de bases. É interessante comentar as propriedades de associação de histonas em solução bem como as evidências de sua associação na cromatina nativa. As observações sugerem em conjunto a associação de histonas em regiões discretas da molécula de DNA numa estrutura compacta interligadas entre si por fibras de DNA. Skandrani et al. (1972) observaram que as histonas LAK e KAS interagem

durante a eluição com cloreto de guanidina de colunas de Amberlite e que provavelmente formam um complexo equimolecular, fato também observado por Kelley (1973) ao estudar frações cromatográficas de misturas de histonas. Evidências mais concretas sobre a formação de complexos histona-histona, provêm dos estudos de D'Anna & Isenberg (1974). Estes investigadores, estudando espectros de CD e de fluorescência, mostraram que "in vitro", ocorre associação de histonas em um dímero KAS - LAK com aumento do conteúdo de alfa-hélice em 15 resíduos ao formar-se o complexo. As histonas KAS e GRK da mesma forma se associam em solução para formar um dímero KAS-GRK cujo conteúdo de alfa-hélice aumenta em 8 resíduos (D'Anna & Isenberg, 1974). Os complexos LAK-KAS e KAS-GRK tem constante de associação altíssima ($K_A = 10^6\ M^{-1}$) e se formam unicamente na presença de sal. As histonas LAK e GRK também se associam, mas a constante de associação deste último complexo é de aproximadamente duas ordens de grandeza menor que as constantes respectivas de LAK-KAS ou de KAS-GRK. Similarmente, as histonas ARE e GRK interagem em solução para formar um forte complexo equimolar de constante de associação $K_A=0,7.10^{21}\ M^{-3}$.

Todas as histonas, menos a histona KAP, reagem entre si em solução para formar dímeros equimolares, sendo extremamente fortes as interações LAK-KAS, KAS-GRK e GRK-ARE. As interações LAK-ARE, LAK-GRK e ARE-KAS são fracas. Quando os complexos de alta constante de associação

se formam, existe uma variação significativa de estrutura secundária, ou seja no conteúdo de alfa-hélice das histonas que passam a formar o dímero. Este fato sugere que deve existir um encaixe induzido entre os componentes do dímero para formar uma estrutura altamente compacta. O padrão de formação de complexos de histonas em solução sugere fortemente que essas quatro histonas possam agir juntas na formação de unidades funcionais na cromatina (D'Anna & Isenberg, 1974).

Evidências de que em soluções aquosas neutras existe associação estequiométricas de histonas, foram também obtidas por outros grupos de investigadores. Geoghegan et al. (1974) mostraram que em solução as histonas GRK e ARE formam um complexo de composição $(GRK)_2-(ARE)_2$. Este tipo de tetrâmero foi também detectado em solução por Kornberg & Thomas (1974), empregando técnicas de "cross linking" e posterior análise dos produtos formados por eletroforese em poliacrilamida-SDS. Estes autores também detectaram a formação em solução do par LAK-KAS. Quando o tetrâmero $(GRK)_2-(ARE)_2$ e o dímero (LAK-KAS) são misturados com DNA, a nucleohistona formada exibe padrão de difração de raios X extremamente parecido com o da cromatina nativa. A adição ao DNA do tetrâmero ou do dímero separadamente fornece padrões de difração bastante diferentes do obtido de cromatina (Kornberg & Thomas, 1974).

A estas elegantes experiências de associação realizadas em solução, seguiram-se outras efetuadas por

outros grupos na tentativa de detectar tais complexos em cromatinas nativas. Estas tentativas aparentemente tiveram êxito ao usar agentes apropriados para formar ligações cruzadas entre proteínas vizinhas. Os complexos entre proteínas são isolados e em seguida se identificam as proteínas associadas pelo agente ligante. Este procedimento foi usado com êxito em proteínas ribossômicas e em algumas proteínas oligoméricas (Carpenter & Harrington,1972; Sun et al., 1974). Assim, Bonner & Pollard (1975) usando 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, mostraram que certa proporção das histonas ARE e GRK existe no núcleo e na cromatina sob a forma de um dímero ARE-GRK. Ao mesmo tempo seus resultados sugerem a a existência na cromatina de grandes oligômeros da histona KAP. Similarmente, Wintraub (citado por Bonner & Pollard, 1975), empregando formaldeído, identificou em cromatina os pares LAK-KAS e KAS-GRK. McCarthy & Martinson (1975) usando tetranitometano como agente "cross linking" mostraram evidências de que na cromatina de células HeLa, existe interação específica entre as histonas GRK, LAK e KAS. Provavelmente as histonas GRK e KAS formam um dímero KAS-GRK. São interessantes também os resultados de D'Anna & Isemberg (1974);estes sugerem que histonas devem formar seus complexos específicos primeiramente em solução para em seguida agregar-se especificamente ao DNA. Esta idéia é fortemente apoiada pelos resultados de McCarty & Martinson (1975), os quais ao adicionar sequencialmente histonas a DNA purificado, não conseguiram detectar na nucleohistona tratada com

tetranitrometano, a existência de dímero KAS-GRK, que era obtido da cromatina nativa. A aparente fidelidade com que essas histonas se agregam a DNA por um processo tão simples como o de misturá-las, sugere que não deve existir nenhum mecanismo especial, tal como as modificações químicas propostas por Louis et al. (1973) para que essas proteínas se depositem corretamente sobre a molécula de DNA.

Com base neste conjunto de observações,Kornberg (1974) sugeriu um modelo de cromatina,que parece ser o mais simples e consistente dos modelos apresentados até o momento. Nele a estrutura básica é formada pela interação DNA com tetrâmero $(GRK)_2$-$(ARE)_2$ e com dois dímeros (LAK-KAS)sem a participação da histona LAP nem de proteínas não-histonas. Esta unidade fundamental se repetiria ao longo do DNA. Segundo Kornberg (1974) estas proteínas estariam agregadas a 200 pares de bases de DNA. Considerando-se os dados de CD de Johnson et al. (1972) mencionados antes, sobre a estequiometria da associação histona-DNA, o número de pares de bases a que o tetrâmero e os dímeros estariam associados é de aproximadamente 150 pares. Dados de Senior et al.(1975), indicam que a parte de DNA dessa unidade fundamental tem peso molecular 140000 (correspondente a 210 pares de bases), que o da parte proteica é de 160-170000 e que a partícula inteira tem peso molecular total de 310000. De acordo com com estes dados, aparentemente faltam proteínas no modelo de Kornberg (1974), já que dados os pesos moleculares das histonas ARE = 140000 (Panyim & Bhalkley, 1971), KAS = 12500 (Panyim & Chalkley, 1971), LAK = 13700 (Iwai et

al., 1970) e GRK = 11200 (DeLange et al., 1969a), o peso molecular do tetrâmero somado ao dos dois dímeros é de 102800, significativamente diferente do peso molecular da parte proteica da partícula fornecido por Senior et al. (1975). Neste caso dizer que é significativamente diferente, pode querer dizer, em vista dessas diferenças, que existam por exemplo outros dois dímeros KAS-LAK além dos que propos Kornberg (1974) com base em padrões de difração de raios X, isto tendo sempre em vista os dados de Senior et al. (1975).

Suportes para o modelo de Kornberg (1974), são também fornecidos por uma série de dados obtidos de técnicas diversas. Assim, resultados provenientes da digestão de cromatina nativa por nucleases, mostram que estas quebram a cromatina em regiões regularmente espaçadas, provavelmente em sítios colocados entre partículas adjacentes. Hewish & Burgoyne (1973), mostraram que nuclease endógena de fígado de rato digere a cromatina e que quando os fragmentos de DNA resultantes são analisados em eletroforese em poliacrilamida, uma série de bandas que sugerem sítios de ataque enzimático regularmente espaçados, são detectados nos géis. Similares são os resultados de Clark & Felsenfeld (1974), os quais ao tratar cromatina com nuclease estafilocócica, observaram que esta era capaz de digerir aproximadamente a metade do DNA de cromatina a fragmentos de tamanho médio compreendido entre 100-110 pares de bases. Observações mais detalhadas

sobre produtos de digestão nucleásica de cromatinas foram obtidas por Axel et al. (1974) ao digerir cromatina de reticulócitos de pato ou de timo de bezerro. Os fragmentos de DNA produzidos pelo tratamento enzimático se distribuem principalmente em três classes: 45-60 pares de bases, 100-130 pares e fragmentos de mais de 200 pares de bases. Estudos sobre partículas obtidas após tratamento de cromatina com nuclease sem a subsequente purificação de DNA, mostram que em condições brandas de digestão, a cromatina pode ser transformada em partículas compactas de coeficiente de sedimentação em torno de 12S (Sahasrabuddhe & Van Holde, 1974), de tamanho aproximado de 400 Å e 125 pares de bases (Oosterhof et al., 1975), sendo o tamanho dos fragmentos produzidos em função do tempo de digestão com a enzima. Partículas 11S obtidas de cromatina de fígado de rato, possuem 1,45 $g.cm^{-3}$ em CsCl, densidade correspondente a uma relação proteína:DNA = 0,77 e contem fragmentos de DNA de 205 pares de bases. Também neste sistema, menores tempos de exposição a nuclease produzem maiores fragmentos de DNA: de 405 e de 605 pares de bases, provavelmente múltiplos da unidade fundamental (Noll, 1974). Apesar de algumas diferenças encontradas no tamanho dos fragmentos de DNA obtidos por digestão nucleásica de cromatinas, os dados resultantes destas investigações sugerem a existência de uma unidade fundamental na cromatina constituída de uma partícula que provavelmente possui um fragmento de DNA de dimensões definidas.

Outros métodos de estudo também confirmam os achados comentados até aqui sobre a estrutura básica da cromatina de eucariotos. Assim, resultados de microscopia eletrônica fornecem indicações mais didáticas ao mostrar imagens das conclusões a que diversos grupos de investigadores chegaram partindo de técnicas bioquímicas ou físico-químicas de análise de cromatinas. Oudet et al. (1975), removendo da cromatina de eritrócitos de galinha a histona KAP por tratamento salino, a separaram em dois componentes de densidades distintas. A visualização ao microscópio eletrônico de ambos os componentes, mostrou partículas de diâmetro de 128 Å compactas e altamente definidas unidas entre si por filamentos de 15-18 Å, sensíveis a DNase. A diferença de densidade entre as duas frações separadas se devia ao grau de compactação das partículas que esses autores chamaram de "nucleossomos". A extração salina das histonas restantes resulta no desaparecimento das partículas e a análise eletroforética das proteínas extraídas mostra que existem quantidades iguais das histonas KAS, LAK, ARE e GRK. Nos nucleossomos o DNA deve estar altamente compactado (DNA superhelicoidal) já que nessas estruturas suas dimensões são cinco vezes menores do que em conformação estendida de dupla hélice (Oudet et al., 1975). A natureza desta compactação pode ser estudada pela associação de histonas a moléculas de DNA circular, desde que a alteração da conformação do DNA no nucleossomo ("supercoiling" ou "unwinding") alterará a conformação superhelicoidal do restante da molécula (Vinograd et al., 1968). Além

disto, conhecidas as propriedades termodinâmicas de DNAs superhelicoidais (Vinograd et al., 1968; Davidson, 1972; Schmir et al., 1974) e a influência do grau de superhélice na formação de nucleossomos, obter informações sobre se a formação de nucleossomo equivale a "winding" ou "unwinding" da estrutura de dupla hélice.

Germond et al. (1975), trabalhando "in vitro" com moléculas de DNA circulares relaxadas (obtidas por tratamento de DNA superhelicoidal com "untwisting extracts" de vírus SV 40, mostraram que 4 frações de histonas presentes nos virions se associam ao DNA viral para formar estruturas que ao microscópio eletrônico são iguais às vistas por Oudet et al. (1975). Ao remover histonas desses complexos, o DNA resultante possuia conformação superhelicoidal, na qual o número de volta era igual ao número de nucleossomos por molécula pré-existentes no complexo. Estes resultados indicam que a conformação de DNA circular covalentemente fechado é amplamente inflenciada por histonas; estas atuam "in vitro" reduzindo a superhelicidade do complexo em uma volta, de forma análoga ao que ocorre na denaturação térmica ou alcalina (em condições determinadas) quando esta ocorre às custas da redução em uma volta na estrutura de DNA de dupla hélice (Vinograd et al., 1968).

Evidências que sugerem a existência de uma estrutura repetitiva básica na cromatina de eucariotos foram obtidas também a partir de padrões de difração de

raios X em cromatinas nativas e reconstituídas, por vários investigadores (Pardon & Wilkins, 1972; Bradbury et al., 1972; Baldwin et al., 1975), os quais detectaram arranjos lineares de estruturas de 7 nm interligadas por segmentos de DNA de 1,5 nm de comprimento. Estes arranjos foram detectados unicamente em cromatinas e não em DNA ou em histonas totais. Empregando técnicas de espalhamento de neutrons em ângulos pequenos, Baldwin et al. (1975) confirmaram as observações já comentadas sobre a estrutura do nucleossomo. Estes autores sugerem que parte do DNA estaria envolvido em ligações dentro da subunidade e que do tamanho dessas ligações dependeria o diâmetro da super hélice. No interior dessa superhélice estariam agrupadas as histonas LAK, KAS, ARE e GRK interagindo entre si através de suas regiões hidrófobas e com o DNA por suas regiões polares. A histona KAP não faria parte da estrutura da subunidade e poderia ter o papel de interligar nucleossomos dentro da mesma cadeia ou entre cadeias diferentes.

O que foi comentado até aqui mostra que o intenso trabalho de investigação que é levado a cabo com vistas à resolução total da estrutura da cromatina, está longe de ser concluído. O número de dados disponíveis na literatura tem crescido progressivamente, embora boa parte deles não possa no momento contribuir para a elucidação de questões de importância neste assunto. Alguns destes dados permanecem sem ligação aparente, são contraditórios e

por vezes não interpretáveis. Ao mesmo tempo, parte da metodologia disponível exauriu suas possibilidades.

A introdução de técnicas novas, notadamente instrumentais, bem como o desenvolvimento das já existentes, produziu nos últimos cinco anos mais resultados consistentes, do que os que se obtiveram até então desde a época de Miescher e Kossel. O objetivo final, ou seja o entendimento da expressão gênica em termos de estrutura de cromatina, pode ser atingido, embora muito reste a ser feito para conseguí-lo.

PARTE B

1. O SISTEMA POLITÊNICO

Progressos em biologia tem sido muito facilitados pela escolha de sistemas modelos em que o processo que se deseja estudar apresenta alguma peculiaridade, que torna possível certos ataques experimentais; o conhecimento assim ganho pode então ser aplicado nos casos mais gerais. Neste sentido os cromossomos politênicos têm atraído a atenção como sistemas apropriados para o estudo da ação gênica em organismos superiores.

Cromossomos politênicos ocorrem em insetos, plantas e protozoários (ver Berendes (1973), para revisão). Aqueles existentes nas glândulas salivares de

Diptera tem sido contudo os mais intensamente estudados,

A característica notável dos cromossomos politênicos é seu aspecto bandeado. Isto é devido ao fato de que regiões ricas em DNA se alternam ao longo do cromossomo com regiões pobres em DNA (as interbandas). É amplamente aceito que este aspecto é devido ao pareamento das regiões enoveladas (os cromômeros) e esticadas (regiões intercromoméricas) que existem ao nível das cromatides (ver revisões de Swift, 1962 e Beermann, 1972).

Há um número considerável de evidências genéticas indicando que em Drosophila, o número de bandas é aproximadamente igual ao número de genes que pode ser calculado para este organismo (Judd & Young, 1973).

Uma fase importante no estudo dos cromossomos politênicos de dipteros foi iniciada na década de 50 graças aos estudos de Beermann (1952) e de Breuer e Pavan (1955), que trabalharam respectivamente com glândulas salivares de Chironomus na Alemanha, e com glângulas salivares de Rhynchosciara no Brasil.

As principais observações destes dois grupos de investigação foram as seguintes: 1. o padrão de bandas é essencialmente o mesmo para os diferentes tecidos; 2. certas bandas, em períodos bem determinados da vida larval, podem expandir-se dando origem aos chamados "puffs" e 3) cada tecido apresenta um padrão de puffs característico. Baseados em tais observações eles chegaram a

conclusão de que o padrão de puffs de um determinado tecido consistia na manifestação morfológica da ação gênica.

As observações acima tornaram cromossomos politênicos especialmente atrativos como objetos para o estudo da ação gênica. O tamanho destes cromossomos oferecia a possibilidade de estudar a natureza do RNA ou DNA de uma banda e assim obter evidências químicas diretas sobre sua função. Os anéis de Balbiani que existem no cromossomo IV de Chironomus são especialmente adequados para este tipo de estudo. Tais anéis são "puffs" gigantes que foram correlacionados por Beermann (1961) e Grossbach (1969) com a síntese de proteínas componentes da secreção salivar das larvas desse diptero. Edström e colaboradores (vide revisões de Edström, 1974 e Daneholt, 1974 e 1975) concentraram então sua atenção no anel de Balbiani II, cujo RNA acha-se hoje relativamente bem caracterizado.

As pesquisas brasileiras sobre cromossomos politênicos têm sido feitas principalmente com moscas do gênero Rhynchosciara. O grande atrativo da glândula deste organismo consiste no fato de que além dela apresentar os puffs de RNA, que são os que ocorrem em Chironomus e Drosophila, existem também aqui os "puffs" de DNA. Tais puffs são peculiares às glândulas salivares de Sciaridae. Um número apreciável de investigações indica que há amplificação gênica nos "puffs" de DNA. É importante salientar que este é o único caso bem documentado de amplificação gênica em tecidos somáticos.

Este sistema tem sido explorado com a finalidade principal de caracterizar o fenômeno da amplificação, determinar seu papel biológico no caso específico de Rhynchosciara e seu possível significado biológico geral. No momento as investigações estão sendo conduzidas principalmente com o objetivo de caracterizar o DNA e RNA produzido nos puffs de DNA.

Este sistema está também sendo explorado com relação aos fenômenos que conduzem à abertura e fechamento dos "puffs" de DNA. Para o desenvolvimento adequado das etapas futuras desta investigação, será necessário adquirir conhecimentos sobre a cromatina dos cromossomos politênicos, principalmente no que se refere as suas proteínas. Neste sentido as histonas, assumem grande importância devido a vários fatores que foram discutidos anteriormente. Além disto os "puffs" devem ser peculiares alterações estruturais da cromatina que ocorrem em certos "loci" cromossômicos para que o genoma seja corretamente expresso, e não é improvável que histonas estejam relacionas com esta alteração, de vez que em outros organismos se acharam evidências de que a modificação química de histonas pode alterar sua interação com o DNA e induzir consequentemente variações estruturais na cromatina que teriam função na divisão celular e na transcrição (Bradbury et al., 1974b; Allfrey, 1971). Acrescente-se ainda o fato de que as histonas do sistema politênico em particular e de insetos em geral são pouco estudadas.

Em células politênicas de dipteros as dificuldades experimentais na obtenção de quantidades suficientes de material, aliadas à atração indiscutível que exercem as técnicas de autorradiografia, provavelmente contribuiram para que o estudo das histonas deste sistema não atingisse a profundidade que atingiu por exemplo em mamíferos. Para dar idéia do estado atual do problema, basta dizer que até o presente, estas proteínas foram seguramente caracterizadas somente em dois dipteros que possuem células politênicas, Drosophila (Cohen & Cotchel, 1971; Oliver & Chalkley, 1972a) e em Ceratitis (Franco et al., 1974), sendo estudadas com menores detalhes em Calliphora erythrocephala (Lindh & Brantmark, 1965) e em Calliphora stygia (Sin, 1973).

Nestas condições, os dados sobre a síntese de histonas nestes e em outros dipteros, dados esses que foram obtidos antes de uma caracterização adequada dessas proteínas, podem não ser totalmente conclusivos. O mesmo pode ser dito com relação a resultados autorradiográficos obtidos de preparações cromossômicas fixadas com um dos melhores solventes de histonas, o ácido acético.

Se estas críticas forem consideradas válidas, pode perceber-se que o estudo das histonas de sistemas politênicos é no presente momento um tanto incompleto, o que não deixa de ser surpreendente, dadas as características favoráveis deste sistema para alguns aspectos importantes desse estudo. Assim por exemplo, chama a atenção

em glândulas salivares de Rhynchosciara, a enorme duração do último ciclo de replicação, o qual se estende desde a época em que os animais começam a confeccionar o casulo coletivo até pouco antes da histólise da glândula, num total de seis dias (Cordeiro & Meneghini, 1973; Machado-Santelli & Basile, 1975). Este ciclo, é inclusive altamente sincronizado com relação à síntese de DNA (Machado-Santelli & Basile, 1975). Pode-se notar melhor a longa duração dessa "fase S" ao compará-la com as de células HeLa e de embriões de ouriço do mar, as quais são completadas em 7-9 horas (Defendi & Manson, 1963) e 15 minutos a 15°C (Hinegardiner et al., 1964) respectivamente. Acrescente-se a isto o fato de que a velocidade de síntese de DNA na glândula salivar (0,025 U/min.; Cordeiro & Meneghini, 1973) é de 20 a 100 vezes menor que a de mamíferos (0,52-2,0 uDNA/min.; Cairns, 1966; Huberman & Riggs, 1968). Admitindo que em Rhynchosciara a síntese de histonas e a de DNA sejam sincronizadas como ocorre em células HeLa (Borun & Robbins, 1967) conclui-se que a síntese de histonas na glândula salivar deverá ser de 20 a 100 vezes mais lenta que naquelas células. Então, desde que se consiga um adequado processo de análise e de marcação isotópica de histonas, será possível seguir sua síntese durante a de DNA de forma bem mais acurada do que a que seria possível em sistemas de fase S rápida. Neste caso as experiências poderiam fornecer dados mais confiáveis a respeito de uma possível síntese diferencial de histonas durante a replicação, fato que em última análise

poderia indicar que as histonas assim sintetizadas teriam além da função estrutural já vista, outras funções de tipo regulador no qual elas seriam especificamente requeridas.

Além de dípteros, outros insetos foram também estudados com vistas à caracterização de histonas: Acheta domestica (Pallota & Berlowitz, 1970; McMaster-Kays & Kaye, 1973), Planococcus citri (Pallota & Berlowitz, 1970), Oncopeltus fasciatus (Harris & Forrest, 1970) e Ephestia kühniella (Imberski & Gertson, 1974). Infelizmente porém, em alguns dos insetos estudados a identificação de histonas se torna difícil devido à complexidade dos padrões eletroforéticos obtidos, de forma que dados seguros a respeito do complemento de histonas desta classe de animais se reduzem a 2 ou 3 deles, entre os quais se incluem os obtidos em Drosophila. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivos a caracterização de histonas e o estabelecimento de uma metodologia adequada para o estudo de sua síntese durante a replicação de DNA, em glândulas salivares de Rhynchosciara americana. Se alcançados, estes objetivos podem fornecer as bases para o estudo da cromatina das regiões amplificadas no cromossomo politênico. Além disto, os resultados obtidos poderiam contribuir para o conhecimento das pouco estudadas histonas deste sistema, e verificar se em insetos os dados se adaptam ao que ocorre com as histonas de vertebrados, organismos estes que forneceram maior parte do que se sabe sobre as proteínas básicas da cromatina de eucariotos.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Larvas do diptero Rhynchosciara americana foram obtidas no laboratório nas condições previamente descritas por Lara et al. (1965). Nas ocasiões em que não foi possível utilizar os animais de cultura, estes foram coletados na natureza quase sempre em regiões do litoral do Estado de São Paulo.

Todas as experiências descritas no presente estudo foram levadas a cabo usando larvas do 4º estádio. Este estádio é extremamente longo e compreende a maior parte da vida larval. Nele se verificam importantes eventos com relação à fisiologia bem como a morfologia e comportamento dos animais. Estes eventos foram usados como critérios para a subdivisão do quarto estádio em períodos, primeiramente por Guaraciaba & Toledo (1967) e mais recentemente por Terra et al. (1973). A subdivisão sugerida por estes últimos autores é a utilizada neste trabalho ao datar os animais estudados, e é apresentada na Tabela II.

Nas experiências que serão descritas na presente tese foram usadas sempre larvas fêmeas, não somente com o intuito de minimizar as variáveis experimentais, mas porque sendo elas maiores que os machos, possibilitam maiores rendimentos nos processos extrativos.

TABELA II

Subdivisões do 4º estádio larval de R. americana segundo Terra et al. (1973)

Idade cronológica aproximada (dias)	Eventos fisiológicos ou aparência da larva	Corresponde ao início do período
21	3ª ecdise larval. Larvas claras	1º
32	Larvas começam a se tornar avermelhadas	2º
49	Larvas iniciam a confecção do casulo	3º
54	Início da formação do "puff" B2 na glândula salivar. Casulo consistente	4º
57	Máximo do "puff" B2. Larvas quietas em posição curva	5º
58	Máximo desenvolvimento do "puff" C3. Larvas curvas, mas já envolvidas por células individuais do casulo	6º
59	Última apólise larval. Túbulos de Malpighi livres de $CaCO_3$	Prépupal (pupa farata)
61-64	Ecdise pupal	

2. ADMINISTRAÇÃO DE PRECURSORES RADIOATIVOS

A administração de precursores marcados com emissores beta fracos ^{3}H e ^{14}C foi executada de duas formas distintas.

a) "In vivo" - os animais, levemente anestesiados com éter sulfúrico, foram injetados diretamente na hemocele com a ajuda de agulhas feitas a partir de microcapilares de 15 ou 25 λ (Drummond Scientific Co. Broomal Pa. U.S.A.) previamente calibradas. As larvas em uma injeção receberam sempre 2 µl da solução de precursor radioativo. Não é aconselhável a injeção de volumes maiores devido principalmente aos efeitos que a súbita variação da pressão osmótica pode causar na absorção do marcador usado. Decorrido o tempo de incorporação desejado, esta era interrompida ao colocar as larvas sobre gelo moido. Imediatamente os animais tinham suas glândulas salivares dissecadas em uma solução fisiológica gelada para Rhynchosciara (Armelin et al., 1969), na qual eram mantidas até o ulterior processamento.

b) "In vitro" - para este propósito usou-se o meio de manutenção TBGPL (Terra et al., 1976) cuja composição se baseia na da hemolinfa de larvas de 5º período. Nas experiências em que seriam incorporados aminoácidos radioativos, teve-se o cuidado de omitir no momento de preparar o meio os correspondentes aminoácidos não radioativos, corrigindo-se as osmolaridades respectivas com sacarose. Isto foi feito para anular os efeitos de diluição isotópica

na incorporação dos precursores. As glândulas eram colocadas em volumes apropriados de meio TBPGL previamente suplementado com os marcadores, permitindo-se sua incorporação pelos tempos convenientes e sempre à temperatura de 18°C. Após a incubação, as glândulas eram retiradas do meio e lavadas com a solução gelada na qual seriam em seguida processadas.

3. ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS

a) Hidroxiuréia: larvas do 5º período foram injetadas diretamente na hemocele com 2 µl de uma solução de hidroxiuréia 0,5 M e então mantidas durante 12 horas a 18°C para inibição de síntese de DNA nas glândulas salivares (Machado-Satelli & Basile, 1973). Após esse tempo, as glândulas salivares foram dissecadas e colocadas em meio suplementado com lisina-^{14}C e triptofano-^{3}H para o estudo da síntese de histonas em polirribossomos.

b) Ecdisterona: larvas do 2º período foram injetadas diretamente na hemocele com 2 µl de uma solução de ecdisterona 2 mg/ml feita em solução fisiológica para Rhynchosciara, contendo etanol a 2% para facilitar a dissolução do hormônio. As larvas foram então mantidas em ambiente a 18°C durante 34 ou 44 horas, após as quais suas glândulas salivares foram dessecadas e incubadas em meios suplementados com timidina-^{3}H ou lisina-^{3}H, para o estudo da síntese de DNA ou histonas.

4. PREPARAÇÃO DE NÚCLEOS DE GLÂNDULAS SALIVARES E EXTRAÇÃO DE HISTONAS

O processo utilizado para a obtenção de núcleos de glândulas salivares de R. americana foi objeto de publicação anterior (Santelli et al., 1976).

Aproximadamente 200 glândulas foram obtidas por dissecção de larvas mergulhadas em solução fisiológica de Rhynchosciara (Armelin et al., 1969). Imediatamente, após, foram transferidas para um tampão feito em Tris 10 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 4 mM, DTT 2 mM, sacarose 0,25 M pH 7,4 contendo Nonidet P-40 0,4%, e mantidas nele durante 15 minutos. Após este tempo, as glândulas foram transferidas para um homogeneizador de Dounce onde foram brandamente homogeneizadas. Na realidade o propósito desta operação é o de agitar as glândulas no tampão contendo detergente, para que com o auxílio deste os núcleos sejam liberados, com um mínimo de rompimento celular. Em seguida a esta etapa, a suspensão foi filtrada em uma rede de nylon com malhas de 180 μ^2 e refiltrada em outra de 90 μ^2 a fim de eliminar debris. Os núcleos foram então recuperados por decantação durante uns 20 minutos, lavados uma vez com o tampão de homogeneização e outra com o mesmo tampão sem detergente, sendo sempre recuperados por decantação. Terminadas as lavagens o sedimento de núcleos foi seco de tampão, ressuspenso em uma solução de H_2SO_4 0,4 N contendo $NaHSO_3$ 50 mM e transferido para um Dounce, onde os núcleos foram vigorosamente homogeneizados e em seguida agitados durante 1 hora

a 0-4°C para extração de histonas. Terminada a extração, a suspensão foi centrifugada a 12000 rpm durante 20 minutos em um rotor Sorvall SS 34. O sobrenadante foi então precipitado com 4 volumes de etanol 90% durante 24 horas a -10°C. As proteínas que sedimentam após este tempo foram recuperadas por centrifugação a 10000 rpm durante 15 minutos em rotor Sorvall SS 34, lavadas uma vez com etanol 90% e secas a vácuo para análise posterior em géis de poliacrilamida.

5. PREPARAÇÃO DE CROMATINA DE GLÂNDULAS SALIVARES

O processo usado é em essência aquele descrito por Elgin & Hood (1973) para purificação de cromatina de ovos de Drosophila, que foi adaptado para purificar cromatina de glândulas salivares de Rhynchosciara da qual seriam extraídas histonas. 40 glândulas salivares de larvas em diversos estágios do desenvolvimento, foram homogeneizadas em um mini-Dounce (capacidade para 2 ml) em 1 ml de Tris-HCl 10 mM; NaCl 100 mM; $MgCl_2$ 10 mM; sacarose 250 mM, pH 7,6. O homogeneizado foi então centrifugado a 3000 xg e o material que sedimenta no fundo do tubo considerado cromatina bruta. Êste sedimento foi lavado duas vezes com o mesmo tampão e em seguida duas vezes com Tris-HCl 5 mM pH 8,0 e uma vez com Tris-HCl 1 mM pH 8,0. Nestas lavagens recuperou-se a cromatina por centrifugação a 12000 xg. Em seguida à última lavagem a cromatina foi ressuspendida em 1 ml de Tris-HCl 5 mM contendo alfa-amilase

cristalina de B. subtilis a 100 µg/ml e incubada a 37°C durante 20-30 minutos. Este tratamento enzimático se revelou conveniente porque conseguiu melhorar a pureza das preparações de histonas, provavelmente ao digerir parte da secreção glandular que se agrega à cromatina durante o processo de preparação.

Após o tratamento enzimático a cromatina foi diluída em grande volume de Tris-HCl 5 mM pH 8,0, recuperada por centrifugação a 12000 xg e imediatamente ressuspendida em 1,5 ml do mesmo tampão sendo então colocada no topo de uma solução de sacarose 1,7 M em Tris-HCl 5 mM pH 8m0 e centrifugada a 35000 rpm em um rotor SW 65K a 4°C durante 105 minutos. A cromatina sedimentada no fundo do tubo foi ressuspendida em Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e lavada três vezes com esse tampão. O material obtido por este processo foi imediatamente usado para a extração de histonas.

6. EXTRAÇÃO DE HISTONAS DE CROMATINA PURIFICADA

Preparações de cromatina de glândulas salivares, obtida pelo processo descrito, foram imediatamente transferidas para um mini-Dounce com o auxílio de 0,5 ml de H_2SO_4 0,4 N + $NaHSO_3$ 50 mM. O volume foi completado para 1 ml e o material homogeneizado durante 1 hora a 4°C para extração das proteínas básicas da cromatina. Após a extração a suspensão foi tranferida para pequeno tubo de centrífuga com a ajuda de 1 ml da solução de extração e

centrifugada 12000 xg durante 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado e a ele se adicionou como carregador 100 µl de uma solução de sulfato de protamina 1 mg/ml em H_2SO_4 0,4 N. Em algumas ocasiões usou-se como carregador 50 µl de uma solução de alfa-amilase cristalina 1 mg/ml em CH_3COOH 0,9 N. As proteínas foram então precipitadas pela adição de 0,2 volumes de TCA 1 g/ml* durante 20 minutos a 0-4°C, sendo recuperadas por centrifugação a 12000 xg durante 10 minutos. O precipitado foi então lavado duas vezes com CH_3COCH_3 : HCl 99:1 e uma vez com CH_3COCH_3 e em seguida seco a vácuo e assim mantido a -10°C até seu uso.

Alfa-amilase e sulfato de protamina foram empregadas como carregadores somente quando o número de glândulas de que se preparou cromatina, não era suficiente para fornecer massa de histonas precipitáveis por TCA nas condições mencionadas. Isto ocorreu durante a preparação de histonas marcadas com lisina-^3H, a partir de 40 glândulas. Em outras preparações porém ao obter cromatina de 200 glândulas o uso de carregador foi omitido.

* Convém mencionar que a recuperação de histonas por precipitação com TCA 18% foi efetuada por Franco et al. (1974) ao estudar essas proteínas na mosca Ceratitis capitata. A análise eletroforética e de aminoácidos dessas histonas não revelou diferenças com relação à obtida por precipitação com acetona a baixas temperaturas, procedimento comumente usado para o isolamento de histonas de várias fontes.

7. ELETROFORESE DE HISTONAS EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA

Géis de poliacrilamida a 15% foram preparados segundo Panyim & Chalkley (1969). Antes de carregá-los com as proteínas em estudo, os géis foram percorridos até ser alcançada voltagem constante para eliminar restos de polimerização. Usualmente esta etapa dura de 5 a 6 horas. Em seguida a ela os géis foram carregados com amostras de histonas de glândulas salivares previamente dissolvidas em CH_3COOH a 0,9 N + sacarose contendo ou não, sulfato de protamina ou alfa-amilase como carregadores. As eletroforeses foram feitas em CH_3COOH 0,9 N a 2,5 mA/gel, 160 volts durante 5 horas em refrigerador. Terminada a eletroforese os géis foram retirados dos tubos com o auxílio de água gelada injetada com uma seringa entre o gel e a parede do tubo e corados durante 2 horas em uma solução aquosa contendo amido black 0,1%, CH_3CH_2OH 20% e CH_3COOH 7%. Os géis eram então descorados em ácido acético 7% durante 30 a 40 horas e a densidade óptica das bandas reveladas pelo corante ao longo dos géis, determinada a 600 nm.

8. ELETROFORESE DE HISTONAS EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA-SDS

Proteínas de peso molecular conhecido e histonas extraídas de cromatina purificada segundo o procedimento descrito, foram inicialmente tratadas segundo Papermaster e Dreyer (1974), o que consiste em dissolvê-las em uma solução de Tris-HCl 10 mM; EDTA 0,5 M; SDS 2,5%,

beta-mercaptoetanol 2,5%; sacarose 5% pH 8,0 e em seguida denaturá-las por aquecimento a 50°C durante 1 hora. Nestas condições se assegura a análise de monômeros nos géis de poliacrilamida-SDS.

A eletroforese da solução de histonas concomitantemente com proteínas de peso molecular conhecido, em géis descontínuos de poliacrilamida-SDS, foi realizada segundo Laemmli (1970 e Studier (1973). Após a eletroforese, os géis foram corados por 3 horas em solução de Coomasie Blue B 0,1%, etanol 95% e ácido acético 10%, fixados em ácido sulfosalicílico 20% durante 16 horas e em TCA 10% durante 15 minutos, e em seguida descorados em solução de etanol 25% e ácido acético 10%.

9. MICRODISSECÇÃO DE NÚCLEOS E CITOPLASMAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

Terminado o período de incubação "in vitro", glândulas foram retiradas do meio e fixadas em etanol:clorofórmio 3:1 durante 20 minutos. A fixação usual com etanol: ácido acético 3:1 não é recomendável em nosso caso, já que remove quantidades enormes de proteínas básicas (aproximadamente 60% delas). Entretanto, o fixador usado, além de evitar esse problema, deixa as glândulas com excelente consistência para fins de microdissecção. Fixadas as glândulas estas foram processadas essencialmente de acordo com o método de Daneholt (1972), que consiste em lavá-las 4 vezes com etanol 70% contendo excesso dos mesmos

precursores incorporados não marcados, para remover radioatividade inespecífica e então mantê-las durante 1 hora em solução de etanol:glicerol 1:1. Terminado este tratamento, a microdissecção foi executada segundo Edström (1964). Unicamente 25 células da região proximal das glândulas foram microdissecadas. Os núcleos e citoplasmas foram cuidadosamente coletados em gotas separadas, na câmara de óleo mineral e transferidos para frascos de cintilação para determinação de radioatividade.

10. PREPARAÇÃO DE POLIRRIBOSSOMOS DE GLÂNDULAS SALIVARES

A técnica de preparação de polirribossomos de glândulas salivares de Rhynchosciara americana já foi objeto de publicação (Aliaga et al., 1975). Entretanto, ela será descrita aqui nos seus aspectos essenciais. Glândulas salivares de larvas no estágio de desenvolvimento apropriado, foram dessecadas e incubadas "in vitro" durante 10 minutos a 18°C e 750 µl de meio TBGPL previamente suplementado com 5 µCi de ^{14}C-lisina e 50 µCi de ^{3}H-triptofano. Finda a incorporação, as glândulas são retiradas do meio de incubação e lavadas com um tampão gelado feito em Tris-HCl 10 mM; KCl 50 mM; $Mg(CH_3CO_2)_2$ 10 mM e DTT 5 mM a pH 7,4 (Tampão TKM) e imediatamente transferidas para uma rede de nylon de malhas de 180 μ^2 mergulhada em aproximadamente 0,8 ml de tampão anterior contendo sacarose 250 mM para tornar o meio isotônico e o detergente Nonidet P-40 a 0,5% (v/v) (Tampão TKD). Nesta solução as glândulas são deixadas de 10 a 15 minutos tempo

suficiente para que os núcleos se despreendam íntegros (Santelli et al., 1976) e as próprias glândulas adquiram consistência apropriada para a etapa seguinte do processo, que consiste em esmagá-las cuidadosamente com a extremidade achatada de um bastão de vidro, contra a rede de nylon sempre mergulhada no tampão com detergente. Desta forma, o envelope glandular bem como traquéias quitinosas e alguns debris mais volumosos são retidos pela rede, enquanto núcleos e o material citoplasmático a atravessam e são recolhidos no tampão. A suspensão assim obtida é então centrifugada a 10000 xg em rotor Sorvall HS 229 a 0-4°C durante 10 minutos. O sedimento obtido é rico em núcleos e mitocôndrias principalmente. O sobrenadante pós mitocondrial (SPM) resultante, contém polirribossomos solúveis bem como os ligados às membranas removidos por ação do detergente. O SPM assim preparado deve ser imediatamente analisado em gradientes de sacarose.

11. SEDIMENTAÇÃO DE POLIRRIBOSSOMOS EM GRADIENTES DE SACAROSE

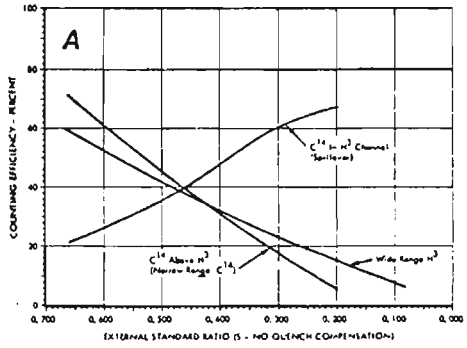
0,3 ml do SPM obtido como foi descrito antes são colocados no topo de um gradiente de 4,5 ml de sacarose 15-30% feito no tampão TKM. O gradiente é então coletado por punção do fundo do tubo em aproximadamente 30 frações contendo 8 gotas cada uma. As frações são diluídas com 1 ml de água destilada e sua densidade óptica determinada a 260 nm.

12. DETERMINAÇÃO DE RADIOATIVIDADE EM EXPERIÊNCIAS DE DUPLA MARCAÇÃO COM ^{14}C E ^{3}H

O problema básico da contagem simultânea de ^{14}C e ^{3}H em um sistema de cintilação líquida, reside no deslocamento, aparente do espectro de emissão beta de ^{14}C para regiões energéticas mais baixas, correspondentes ao espectro de emissão beta de ^{3}H(spillover). Esse deslocamento é função de "quenching" no sistema de cintilação que contém ^{14}C.

O espectrômetro de cintilação líquida Beckman LS-250 empregado nestas determinações de radioatividade permite contornar este problema de forma satisfatória. Este instrumento vem provido de um sistema que permite comparar automaticamente o ganho de calibração para amostras de "quanching" alto e variável, de forma que o "spillover" se torne aproximadamente constante em função desse "quenching". Nestas condições, conhecidas as eficiências de contagens para os dois isótopos é possível determinar o "spillover" de ^{14}C na janela de trítio e corrigir convenientemente as duas medidas.

Para exemplificar, é mostrada a Figura 1A, transcrita do manual de instruções que acompanha o instrumento. Nela é dada a variação de eficiência de contagem de ^{14}C e ^{3}H em função do "quenching" (dado pela razão do padrão externo), quando esses isótopos são medidos nas respectivas janelas, bem como a fração das contagens de ^{14}C que são detectados na janela de trítio.Para situações



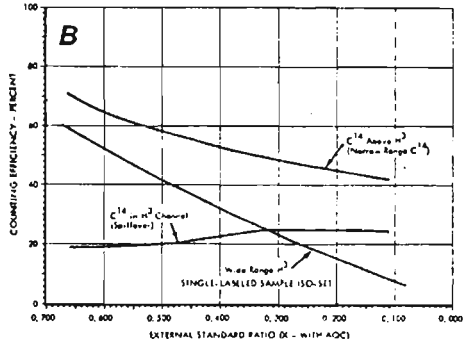


FIGURA 1 - (A) Curvas que mostram a separação de ^{3}H-^{14}C em função do aumento do "quenching" sem o uso do circuito "automatic quench compensation". Em eficiência de 40% para trítio (pouco "quenching") a quantidade de ^{14}C que penetra a janela de ^{3}H é praticamente a mesma detectada em sua própria janela. A medida que o "quenching" aumenta, cresce a fração de ^{14}C detectada na janela de ^{3}H. (B) Curvas que mostram o aumento de separação ^{3}H-^{14}C com o emprego do circuito "automatic quench compensation". Note-se que em situações de "quenching" crescente, consegue-se manter a penetração de ^{14}C na janela de ^{3}H em valores relativamente mais baixos e aproximadamente constantes com o aumento do "quenching".

de "quenching" elevado, praticamente toda a radiação beta de ^{14}C é contada no canal de ^{3}H (curva de "spillover"), enquanto as eficiências de contagem dos dois isótopos nos respectivos canais diminuem de forma aproximadamente linear com a queda da razão do padrão externo (ou aumento do "quenching"). Esta situação pode ser remediada quando se utiliza o circuito de "automatic quenching control" (AQC), com que vem provido este instrumento.

A Figura 1B é idêntica a que foi construída a partir de dados obtidos com duas séries "quenched" de ^{14}C e ^{3}H adquiridas da Beckman Instruments. Nestas séries o primeiro termo é essencialmente "unquenched" e consiste do solvente tolueno marcado com ^{14}C ou ^{3}H, do cintilador primário 2,5 difeniloxazol a 4,0 g/l e do cintilador secundário dimetil POPOP a 0,2 g/l. Os tubos são saturados com argônio e fechados hermeticamente para eliminar o "quenching" produzido pelo oxigênio. Com estes sistemas de cintilação foi calibrado o instrumento para a determinação desses dois isótopos admitindo-se, que as eficiências de contagens obtidas com eles são máximas. Os restantes termos das duas séries contêm os mesmos componentes do primeiro além de quantidades crescentes de clorofórmio para simular os vários tipos de "quenching" químico.

Como se depreende da Figura 1B, o uso de circuito de AQC minimiza o "spillover" de ^{14}C no canal de trítio e este se mantém aproximadamente constante durante

apreciável intervalo de "quenching". Além das curvas construídas a partir das séries padrões de ^{14}C e ^{3}H fornecidas pelo fabricante, foram construídas outras a partir de proteínas de glândulas salivares de Rhynchosciara, marcadas com leucina-^{14}C e leucina-^{3}H e que foram preparadas exatamente da mesma forma em que se trabalhou usualmente para contagem de radioatividade em polirribossomos ou em proteínas analisadas em géis de poliacrilamida. As curvas obtidas ao simular as condições experimentais são bastante semelhantes, dentro das condições de "quenching" em que comumente se trabalhou, às obtidas com padrões de fábrica. Desta forma foi possível montar um sistema de equações:

$$CPM\ ^{14}C = (C_1 - Bkg_1) \cdot 1{,}31$$

$$CPM\ ^{3}H = (C_2 - Bkg_2) - CPM\ ^{14}C\ 0{,}27$$

onde: C_1 = contagens por minuto observadas no canal de ^{14}C

C_2 = contagens por minuto observadas no canal de ^{3}H

Bkg_1 e Bkg_2 = radiação de fundo dos canais de ^{14}C e ^{3}H respectivamente.

Estas relações permitem corrigir as contagens de ^{14}C e ^{3}H de forma conveniente tendo em vista o "spillover" de ^{14}C sobre trítio.

Informações detalhadas sobre a aplicação do processo de cintilação líquida a amostras biológicas podem ser obtidas no artigo de Kobayashi & Mandsley (1969).

13. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE RADIOATIVIDADE POR CINTILAÇÃO LÍQUIDA

a) Radioatividade incorporada em histonas analisadas em géis de poliacrilamida - géis de poliacrilamida após seu descoramento em ácido acético 10%, foram congelados em CO_2 sólido e cortados em 90-100 fatias de 1 mm de espessura. Cada uma delas foi transferida para o respectivo frasco de cintilação ao qual se adicionou 0,5 ml de H_2O_2 30%. Os frascos foram mantidos a 50°C até a despolimerização completa das fatias. Em seguida, nos resíduos de oxidação foram dissolvidos em 0,2 ml de ácido acético 5% e então se adicionaram a cada frasco, 5 ml de uma solução de cintilação contendo 5 mg de PPO, 0,5 mg de POPOP e 100 mg de naftaleno por ml de dioxano 1,4.

b) Radioatividade incorporada em núcleos e citoplasmas microdissecados - núcleos e citoplasmas microdissecados foram colocados separadamente em frascos de cintilação e tratados a 50°C até sua total solubilização com 0,5 ml de NCS ou Protosol. Em seguida a cada frasco se adicionaram 5 ml de solução contendo 5 mg de PPO;0,5 mg de POPOP por ml de tolueno.

c) Radioatividade incorporada em polirribossomos - As frações de gradientes nos quais foram centrifugados polissomos de glândulas salivares se adicionou 1 ou 2 gotas de solução de RNA de levedura 1 mg/ml e igual volume de TCA 10%. Após mantê-las a 0-4°C durante meia hora, cada fração foi filtrada em filtros de nitrocelulose e

extensivamente lavadas com TCA 5%. Os filtros foram secos e então colocados em frascos de cintilação contendo 5 ml de PPO 5 mg de PPO; 0,5 mg de POPOP por ml de tolueno e a radioatividade retida determinada com os cuidados requeridos para marcação simultânea com ^{14}C e ^{3}H.

d) Radioatividade incorporada em DNA de glândulas salivares - Terminada a hidrólise a 75°C durante 20 minutos, tomaram-se 20 µl do hidrolisado em frascos de cintilação. A estes se adicionou então 0,2 ml de água destilada e em seguida 10 ml de solução de cintilação composta de 5 g de PPO; 0,5 g de POPOP; 100 g de naftaleno e 5 ml de protosol por litro de dioxano 1,4.

14. DETERMINAÇÃO DE DNA EM GLÂNDULAS SALIVARES

Após a incorporação de timidina-^{3}H, aproximadamente 40 glândulas salivares foram homogeneizados em 2 ml de NaOH 0,1 N, adicionando-se ao homogenato 1 ml de $HClO_4$ 1,2 N contendo timidina fria a 1 mg/ml. O precipitado formado é recuperado por centrifugação a 10000 xg durante 10 minutos, ressuspenso em 2,5 ml de $HClO_4$ 0,2 N + 0,5 ml de $HClO_4$ 0,2 N contendo timidina fria 1 mg/ml, lavado com 3 ml de $HClO_4$ 0,2 N e recuperado por centrifugação nas condições anteriores. Ressuspenso em 1 ml de KOH 0,3 N, o material foi mantido a 37°C durante 1 hora para hidrólise de RNA. Ao fim desta etapa, adicionou-se 0,5 ml de $HClO_4$ 1,5 N, permitindo-se formação de precipitado

durante 10 minutos. Este foi recuperado por centrifugação como antes, novamente lavado com 2,5 ml de $HClO_4$ 0,2 N e finalmente ressuspenso em 0,7 ml de $HClO_4$ 1,2 N e hidrazida a 75°C durante 20 minutos. O hidrolisado é novamente centrifugado a 10000 xg durante 10 minutos. Do sobrenadante retiraram-se 0,5 ml para leituras de densidade óptica a 260 nm após as quais, essa fração do sobrenadante foi tratado com difenilamina segundo o método de Burton (1956) modificado por Giles & Myers (1965) para determinação de DNA. Paralelamente o mesmo método foi aplicado a quantidades conhecidas de DNA de timo de bezerro hidrolisado nas condições anteriores, para a construção de uma curva padrão.

15. REAGENTES

A preparação de soluções comuns e de tampões, foi feita com reagentes de grau analítico fornecidos por diversos fabricantes.

Foram usados principalmente produtos"Britsh Drug Houses" (BDH) de Poole, Inglaterra, da "E. Merck" de Darmstadt, Alemanha bem como da "J.T. Baker Chemical Co." reembalados pela subsidiária brasileira em São Paulo. SDS, Triton X-100 (grau de cintilação) e Nonidet P-40 foram obtidos da BDH sem ulterior purificação.

Para o preparo de gradientes usou-se sacarose especial para este fim, obtida da BDH. Suas soluções foram sempre tratadas com DEP durante 1 hora a 80°C

com o fim de inibir ribonucleases eventualmente contaminantes (Solymosy et al., 1968).

DTT, outro inibidor de RNase (Boshes, 1970) foi adquirido da Sigma Chemical Co. ou da Calbiochem.

Pronase foi adquirida da Calbiochem. Suas soluções foram sempre incubadas antes de seu uso, a 37°C durante 30 minutos para eliminar possíveis nucleases contaminantes.

α-Amilase cristalina de B. subtilis provinha também da Calbiochem.

Os reagentes para eletroforese em acrilamida, N,N,-metilenbisacrilamida, N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamina foram adquiridos da Eastman Kodak Co. de Rochester N.Y. E.U.A.

Ecdisterona, (22-R)-2, 3, 14, 20, 22, 25-pentahidroxi-5, 14-colest-7-en-6-ona, foi adquirida doa Rhoto Pharmaceutical Co. Ltd. de Osaka, Japão.

Filtros de nitrocelulose dos tipos HAWP (45 micra de diâmetro de poro) e GSWP (22 micra de diâmetro de poro) foram fornecidos pela Millipore Corporation de Bedford, Massachussets E.U.A.

Cintiladores primario e secundário, PPO e POPOP respectivamente fabricados pela Pilot Chemicals, foram adquiridos da New England Nuclear de Boston, Mass.,EUA.

As soluções solubilizadoras de tecidos apropriadas para cintilação líquida foram obtidas da New England Nuclear (Protosol) ou da Amersham/Searle (NCS).1,4-dioxano (grau de cintilação) provinha da BDH e o tolueno,

fornecido pela Reagen (R.J.) foi sempre destilado antes de seu uso em misturas de cincilação líquida.

Precursores radioativos: lisina-^{14}C (312 mCi/mMol, 100 μCi/ml), triptofano-^{3}H (5,3 Ci/mMol, 1 mCi/ml) e timidina-^{3}H (50 Ci/mMol, 5 Ci/5 ml) foram adquiridos da New England Nuclear; lisina-^{3}H (8,7 Ci/mMol, 5 Ci/5 ml) foi fornecida pela Amersham/Searle.

Todas as soluções foram preparadas em água destilada e a seguir filtradas em filtros de nitrocelulose. Todo o material de vidro foi esterilizado a seco antes de seu uso e quando o experimento o requeria, esse material foi previamente tratado com DEP para inibir RNases eventualmente contaminantes.

16. INSTRUMENTOS

As ultracentrifugações em gradientes de sacarose bém como de preparações de cromatina foram feitas em ultracentrífugas Beckman modelos L ou L3-50 usando-se tubos de nitrocelulose e rotores apropriados fornecidos por subsidiárias da mesma companhia, enquanto as centrifugações a baixa rotação foram efetuadas em centrífuga Sorvall RC2-B.

Para medidas de densidade óptica usou-se um espectrofotômetro modelo PMQ II da Carl Zeiss, de Jena, Alemanha. A distribuição de densidade óptica ao longo de géis de acrilamida corados com amido black foi determinada em um espectrofotômetro Beckman modelo Acta III provido de acessórios convenientes.

Os géis de acrilamida foram cortados em fatias com o emprego de um dispositivo de corte fabricado por The Mickle Laboratory Engeneering Co. de Survey, Inglaterra para a Joyce-Loebl.

Eletroforeses foram feitas em uma cuba de plástico construída no laboratório usando eletrodos de Pt e de Ni-Cr ligados a uma fonte operando a corrente constante, fabricada pela Canalco, de Roksville, Maryland, EUA.

A microdissecção de glândulas salivares foi efetuada em um micromanipulador fabricado pela casa Leitz de Wetzlar, Alemanha.

As fotografias que reproduzem alguns eletroferogramas foram feitas com uma Asahi Pentax Spotmatic SP II, utilizando-se filme Copex Pan, 16 ASA da Agfa.

As medidas de radioatividade foram sempre efetuadas em um espectrômetro de cintilação líquida da Beckman Instruments, modelo LS-250, operando com eficiências aproximadas de 40% para ^{3}H e 94% para ^{14}C.

III. RESULTADOS

1. LOCAL E ÊPOCA DA SÍNTESE DE HISTONAS EM GLÂNDULAS SALIVARES DE R. AMERICANA

Na Tabela III são mostrados os resultados de um experimento de pulso e caça no qual as glândulas de larvas no 5º período foram marcadas simultaneamente com lisina-^{14}C e triptofano-^{3}H. Como pode ser visto, tanto o núcleo como o citoplasma incorporam mais eficientemente lisina que triptofano. A quantidade de lisina que se acumula no núcleo durante o período de caça, é maior que a de triptofano, o que sugere passagem preferencial de proteínas básicas sintetizadas no citoplasma, para o núcleo durante o período de caça.

Com o objetivo de determinar a classe de polirribossomos responsáveis pela síntese de proteínas com alta relação lisina/triptofano, bem como a época em que esta síntese tem lugar, glândulas de larvas no 3º e 5º períodos foram marcadas simultaneamente com lisina-^{14}C e triptofano-^{3}H, seus polissomos extraídos e analisados em gradientes de sacarose como descrito por Aliaga et al. (1975). Os resultados estão sumarizados na Figura 2 A e B. As radioatividades devidas a ^{14}C e ^{3}H na região de polissomos foram normalizadas com relação ao pico de máxima radioatividade nessa região a fim de detectar divergências na

TABELA III

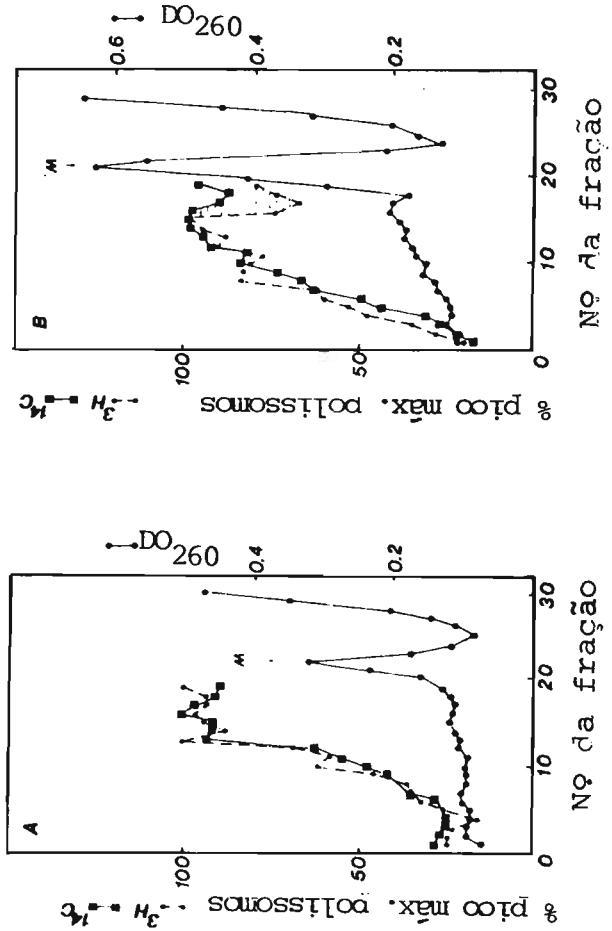
Incorporação de triptofano-^{3}H e de lisina-^{14}C em proteínas nucleares e citoplasmáticas de glânculas salivares sob condições de pulso e caça

	Tri-^{3}H (CPM)		Lis-^{14}C (CPM)	
	Pulso (15 min.)	Pulso (45 min.)	Pulso (15 min.)	Pulso (45 min.)
Núcleo	119	152	136	251
Citopl.[1]	1822	1671	3199	3115
Cél. total[2]	1931	1823	3335	3366

Quatro glândulas de larvas do 5º período foram incubadas em 50 µl de meio TBGPL deficiente em lisina e triptofano, mas suplementado previamente com 5 µCi de lisina-^{14}C e 50 µCi de triptofano-^{3}H. Após a incorporação durante 15 minutos a 18ºC, duas glândulas foram removidas e processadas para a microdissecção como foi descrito em Métodos; as outras duas glândulas foram transferidas para outros 50 µl de meio TBGPL novo contendo excesso de triptofano e lisina frios, onde foi feita caça durante 45 minutos, a 18ºC. Depois deste tempo as glândulas foram removidas e tratadas com as outras duas para microdissecção. Os resultados foram obtidos com 25 células microdissecadas da região proximal das glândulas. A radioatividade incorporada em núcleos e citoplasmas foi determinada como se descreveu em Métodos e corrigida de forma a descontar o "spillover" de ^{14}C na janela de ^{3}H.

1- Considerou-se citoplasma o material restante após a microdissecção dos núcleos. Este material conpreende envelope glândular, membranas celulares, etc.
2- Estes dados correspondem à soma de radioatividade de núcleo e citoplasma na mesma experiência.

FIGURA 2 - Marcação simultânea de polipeptídios nascentes com triptofano-^{3}H e lisina-^{14}C, em glândulas salivares de Rhynchosciara em dois diferentes estágios do desenvolvimento. 50 larvas do 3º e 5º períodos do 4º estádios foram dissecadas e suas glândulas salivares incubadas separadamente em 750 µl de meio TBGPL isento de lisina e triptofano, mas suplementado com 5 µCi de lisina-^{14}C e com 50 µCi de triptofano-^{3}H. Permitiu-se a incorporação dos precursores radioativos durante 10 minutos a 18°C. Após este período, as glândulas foram processadas de forma a obter o sobrenadante pós-mitocondrial (SPM). 0,3 ml de SPM foram colocados no topo de gradientes lineares de sacarose 15-30% feitos em Tris-HCl 10 mM; KCl 50 mM; $Mg(CH_3CO_2)_2$ 10 mM e DTT 5 mM em pH 7,4. Os gradientes foram centrifugados a 65000 xg no rotor SW 50L de uma ultracentrífuga Spinco, durante 2 horas a 4°C. Os gradientes foram coletados por punção do fundo do tubo e sua densidade óptica bem como a radioatividade, determinadas como se descreveu em Métodos. Os dados de radioatividade foram corrigidos de forma a descontar o "spillover" de ^{14}C no canal de ^{3}H e finalmente normalizados com relação a pico máximo na região de polirribossomos de cada gradiente, com o objetivo de poder comparar diferenças de incorporação de lisina e triptofano ao longo de perfis de polissomos de glândulas de larvas de 3º (A) e 5º (B) períodos. Em 3º período, os picos máximos na região de polissomos dos perfis de lisina-^{14}C e triptofano-^{3}H são respectivamente 940 e 425 CMP, em 5º período esses valores, para os perfis de lisina-^{14}C e triptofano-^{3}H são 3560 e 2110 CPM respectivamente. M = posição do pido de monossomos; ●——● = densidade óptica a 260 nm; ●-·-● = CPM de triptofano-^{3}H normalizados; ■——■ = CPM de lisina-^{14}C normalizados. A área sombreada indica a região do perfil em que a incorporação de lisina é maior que a de triptofano.



relação lisina/triptofano ao longo do perfil. Em 3º período, a curva de lisina coincide com a de triptofano, praticamente ao longo de todo o perfil (Figura 2A). Entretanto, em 5º período a curva de lisina permanece levemente abaixo da de triptofano, exceto na região do gradiente que corresponde a polirribossomos contendo 3-4 ribossomos; aqui a situação se inverte, como é indicado pela área sombreada da Figura 2B. Esta divergência mostra que os peptídios nascentes ligados a esses polissomos, são marcados preferencialmente com lisina em glândulas de larvas de 5º período.

É importante notar que em 5º período, a síntese de DNA é máxima, como se observa na Figura 3, a qual foi construída a partir das atividades específicas (CPM/ µg DNA) de DNA de glândulas salivares de um mesmo grupo de larvas durante a parte final do seu desenvolvimento. Este resultado mostra que a época de máxima síntese de DNA ocorre por ocasião da abertura máxima do "puff" 2B no cromossomo B e está de acordo com dados obtidos anteriormente em R. americana por Lara & Hollander (1967), Meneghini & Cordeiro (1972) e Machado-Santelli & Basile (1975). A observação importante obtida das experiências resumidas nas Figuras 2 e 3, é que a época de máxima síntese de DNA na glândula coincide justamente com a que permite detectar marcação preferencial com lisina-^{14}C em polirribossomos de pequeno coeficiente de sedimentação (110-130S).

Portanto, se a marcação preferencial com lisina equivale a síntese de histonas, isto pode indicar

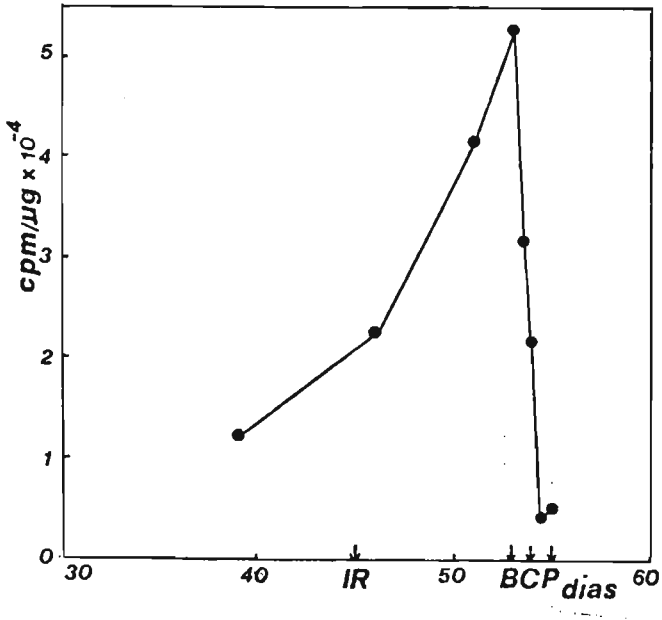
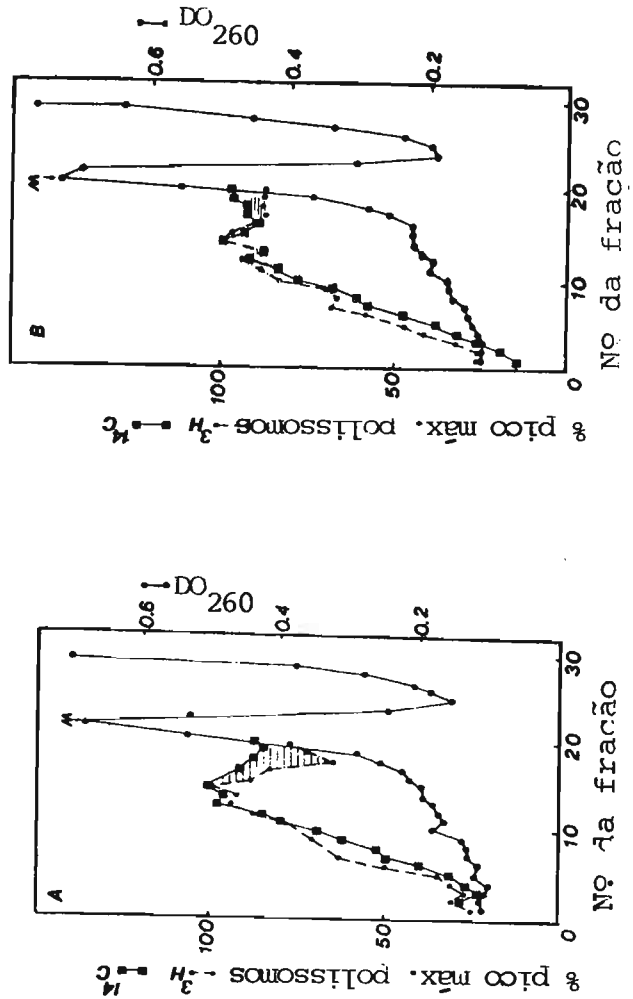


FIGURA 3 - Variação da atividade específica (CPM/µg) de DNA de glândulas salivares ao longo do desenvolvimento larval dado em dias. Para cada ponto da curva, 40 glândulas salivares foram incubadas em 50 µl de meio TBGPL (Terra et al. 1976), suplementado com 50 µCi de timidina-^{3}H (New England Nuclear, 51,5 Ci/mMol) durante duas horas a 18°C. Após a incubação, as glândulas foram fixadas durante 30 minutos em solução de etanol e ácido acético 3:1. Em seguida o material foi lavado quatro vezes com etanol 70% contendo excesso de timidina e então estocado até seu uso em solução de etanol-glicerol 1:1. Os processos para determinação da massa de DNA nas glândulas, bem como a radioatividade de timidina-^{3}H incorporada nela, estão descritos em detalhe na secção de Métodos. IR = início de rede; B = época de abertura máxima do "puff" B no cromossomo B; C = época de abertura do "puff" C no cromossomo C; P = época da pupa larval.

FIGURA 4 - Efeito de hidroxiuréia na incorporação simultânea de triptofano-^{3}H e lisina-^{14}C em polipeptídios nascentes de glândulas salivares de larvas de 5º período. 50 larvas de 5º período foram injetadas com água destilada (grupo controle) enquanto outras 50 larvas do mesmo estágio foram injetadas com 2 µl de uma solução 0,5 M de hidroxiuréia com o objetivo de inibir a síntese de DNA. Os dois grupos de animais foram mantidos durante 12 horas a 18ºC. Após este tempo, suas glândulas salivares foram dissecadas e separadamente incubadas durante 10 minutos em 750 µl de meio TBGPL isento de lisina e triptofano mas suplementado com 5 µCi de lisina-^{14}C e 50 µCi de triptofano-^{3}H. Após a incorporação dos precursores, as glândulas foram processadas como se descreveu antes com o objetivo de obter os SPM. Os polirribossomos tanto do grupo controle (A) como do tratado com hidroxiuréia (B) foram analisados em gradientes de sacarose da forma descrita na Figura 2 e os dados de radioatividade corrigidos e normalizados da mesma maneira. Na figura A (controle) os picos máximos na região de polissomos dos perfis de lisina-^{14}C e triptofano-^{3}H são respectivamente 2685 e 1297 CPM. Na figura B (hidroxiuréia) esses valores para os perfis de lisina-^{14}C e triptofano-^{3}H são 3600 e 1430 CPM respectivamente. M = posição do pico de monossomos; ●——● = densidade óptica a 260 nm; ●-·-● = CPM de triptofano normalizados; ■——■ =CPM de lisina normalizadas. A área sombreada indica a região do perfil em que a incorporação de lisina é maior que a de triptofano.



correlação entre síntese de histonas e DNA em glândulas salivares de Rhynchosciara, da mesma forma como ocorre em outros sistemas não politênicos(Robbins & Borun, 1967; Kedes et al., 1969).

Com o objetivo de corroborar a conclusão obtidas das experiências acima descritas, efetuou-se uma nova experiência em que a síntese de DNA foi inibida com hidroxiuréia (Machado-Santelli, 1973). Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4 A e B. Nela pode ser visto que as curvas de lisina e triptofano de larvas tratadas com a droga, correm paralelamente ao longo do perfil de polissomos, e que a divergência na região de polissomos leves diminui quando comparada com a existente no perfil controle, obtido de larvas do 5º período injetadas com água destilada. Este fato indica um acoplamento entre a síntese de DNA e a de proteínas básicas de polirribossomos contendo de 3-4 ribossomos. Além disto, estes resultados sugerem fortemente que essas proteínas são histonas.

2. CARACTERIZAÇÃO DE HISTONAS DE GLÂNDULAS SALIVARES DE R. AMERICANA POR MÉTODOS ELETROFORÉTICOS

Idealmente, a identificação de histonas envolve seu isolamento e a determinação de várias de suas propriedades, entre as quais assume especial importância a análise de aminoácidos. Esta última entretanto, não pode ser facilmente executada em glândulas salivares de Rhynchosciara devido à pequena quantidade de material disponí-

vel. Este problema poderia ter sido contornado ao preparar histonas da larva inteira. Contudo, tentativas neste sentido não foram bem sucedidas: as proteínas eram amplamente degradas durante as preparações, provavelmente por proteases existentes em outros tecidos larvais.* Assim sendo, as histonas de glândulas foram identificadas com base em outros critérios que são amplamente empregados para este fim na literatura corrente. Estes são: origem, comportamento eletroforético, propriedades tintoriais e peso molecular.

a) Origem - em todas as experiências as proteínas foram extraídas com H_2SO_4 0,4 N a partir de núcleos preparados pelo procedimento de Santelli et al. (1976) ou de cromatina purificada pelo método de Elgin & Hood (1973). Assim, desde que as preparações de partida não estejam contaminadas por material citoplasmático, deve esperar-se que as proteínas extraídas sejam principalmente histonas. A pureza das preparações pode ser testada ao comparar a mobilidade eletroforética das bandas principais com as das histonas correspondentes de um padrão (timo por exemplo), como será feito a seguir.

b) Comportamento eletroforético - a técnica empregada para a análise das proteínas básicas extraídas da

* Proteases extremamente ativas em pH básico foram recentemente detectadas no tubo digestivo de larvas de R. americana (Dr. W.R. Terra, comunicação pessoal). Estas poderiam ser responsáveis pela extensiva degradação observada nas preparações de histonas de animais inteiros, já que a cromatina de onde se extrairam histonas havia sido preparada a pH 8.

cromatina ou de núcleos de glândulas salivares, é a de Panyim & Chalkley (1969), que permite de maneira simples e com alta reprodutibilidade, a resolução do complemento de histonas de vários organismos em cinco bandas principais (Panyim et al., 1971). O resultado obtido ao aplicar esta técnica a histonas de timo e a proteínas básicas extraídas de cromatina ou núcleos de glândulas salivares de R. americana está ilustrado nas Figuras 5 e 6, onde respectivamente são comparados os eletroferogramas e densitogramas obtidos para os dois tipos de preparação. O eletroferograma da Figura 5A se refere a histonas de timo de bezerro, e é comparável aos existentes na literatura para histonas desse tecido (Panyim & Chalkley, 1970; Panyim & Chalkley, 1971). A banda G assinalada nessa figura não foi identificada. Ela pode corresponder a uma impureza da preparação comercial empregada como padrão, ou à proteólise de uma das histonas de menor mobilidade eletroforética. As várias bandas assinaladas na Figura 5A, correspondem em ordem crescente de mobilidade às histonas AREox1, AREox2, KAP, ARE, KAS, LAK, G e GRK. As bandas AREox1 e AREox2 equivalem aos dois dímeros obtidos por oxidação (parcial nestas experiências) da histona ARE, que em timo possui dois resíduos de cisteína (Fambrough & Bonner, 1969). A mobilidade destas bandas é aproximadamente igual à metade daquela do monômero (Panyim & Chalkley, 1970), fato que se observa na Figura 5A.

Na Figura 5B são apresentados os resultados obtidos com a análise das proteínas básicas extraídas de cromatina de glândulas salivares de R. americana. Neste

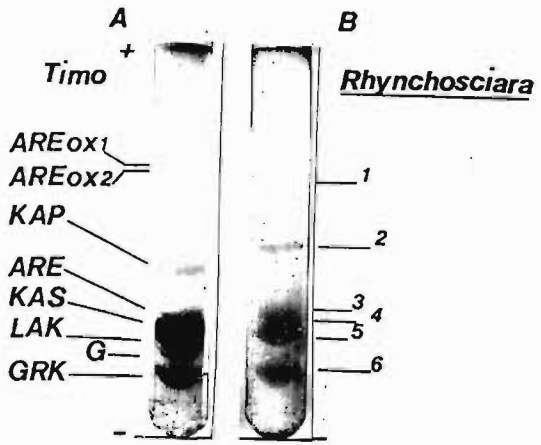


FIGURA 5 - Eletroferograma de histonas de timo de bezerro e de proteínas básicas da cromatina de glândulas salivares de larvas de R. americana. (A) 30 µg de histonas totais de timo de bezerro, dissolvidas em ácido acético 0,9 N contendo sacarose 20%, foram colocados no topo de um gel de 7,5x0,6 cm^2, de poliacrilamida a 15% e contendo uréia 6,5 M e preparado segundo Panyim & Chalkley (1969). Condições de eletroforese - solução de eletroforese: ácido acético 0,9 N; voltagem entre eletrodos: 160 volt; amperagem por gel: 2,5 mA; duração da eletroforese: 5 horas; temperatura (solução de eletroforese): 6-10°C; sentido de migração: do anodo (+) para o catodo (-); coloração do gel: 2 horas à temperatura ambiente em solução aquosa contendo 20% de etanol, 7% de ácido acético e 0,1% de negro de amido; descoramento de gel: de 30 a 40 horas em ácido acético 10% à temperatura ambiente e sob agitação constante. (B) Dissecaram-se 200 glândulas de larvas do 6º período e preparou-se cromatina pelo procedimento de Elgin & Hood (1973). As proteínas básicas foram extraídas dessa cromatina com o emprego de H_2SO_4 0,4 N contendo $NaHSO_3$ 50 mM, durante 1 hora a 0°-4°C. Em seguida as proteínas básicas foram recuperadas por precipitação com 0,2 volumes de uma solução de TCA mg/ml, durante 20 minutos a 0°-4°C. O material precipitado foi recuperado por centrifugação, lavado duas vezes com acetona:HCl 99:1, uma vez com acetona e seco a vácuo. A análise eletroforética destas proteínas foi efetuada como se descreveu em (A).

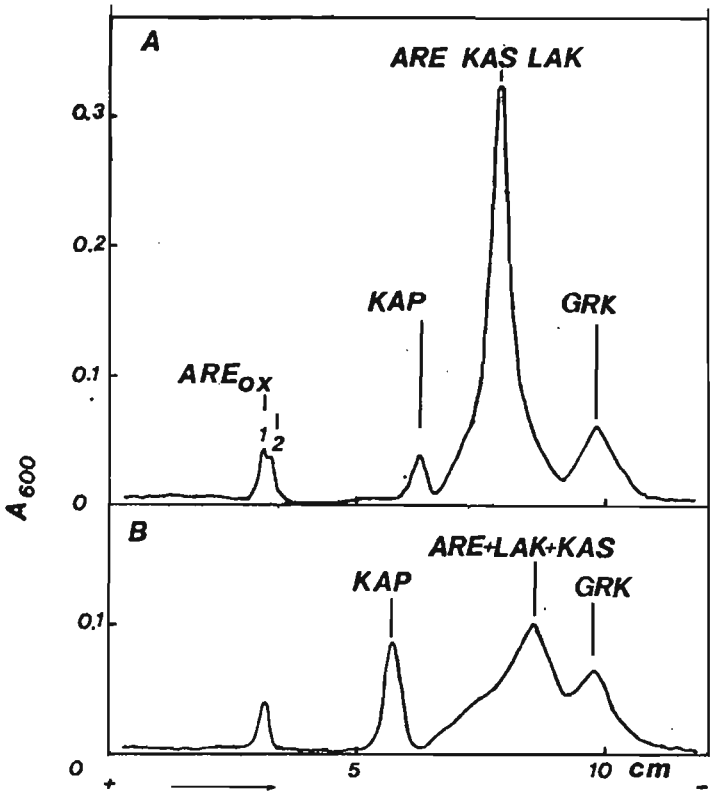


FIGURA 6 - Exatamente como na figura 5. (A) Histonas de timo de bezerro; (B) histonas de glândulas salivares de R. americana (6º período). Varredura de densidade óptica a 600 nm em um espectrofotômetro Beckman Acta III. As abscissas dos gráficos desta figura se referem à dimensões da carta registradora do espectrofotômetro.

eletroferograma se distinguem seis bandas principais enumeradas de 1 a 6 que podem ser identificadas comparando suas mobilidades com aquelas das histonas de timo apresentadas na Figura 5A, como se fará a seguir.

Bandas 1, 3 e 6 - as mobilidades eletoforéticas das histonas ARE e GRK independem de sua origem devido à extrema conservação das estruturas primárias no decorrer da evolução (Panyim et al., 1971). Este critério permite identificar as bandas 3 e 6 de Rhynchosciara como sendo respectivamente as histonas ARE e GRK. A histona ARE quando oxidada, deve fornecer dímeros cuja mobilidade será aproximadamente igual à metade da do monômero, independentemente da origem dessa proteína (Panyim et al., 1970). Esta histona em Drosophila, ao ser oxidada fornece uma única banda de mobilidade aproximadamente igual à dos dímeros da histona ARE de timo, o que deve refletir a presença de um único resíduo de cisteína no monômero dessa histona no diptero (Oliver & Chalkley, 1972a). Isto é o que parece ocorrer também com a banda 1 na Figura 5B. Portanto, esta banda foi identificada como sendo o dímero da histona ARE de R. americana.

Banda 2 - esta banda, na Figura 5B, é identificada como a histona KAP de Rhynchosciara, porque excluída a banda correspondente ao dímero da histona ARE, é ela a de menor mobilidade entre as demais bandas do eletroferograma. Esta identificação se justifica, porque a histona KAP é a de menor mobilidade em todos os organismos estudados até o momento.

O fato de que a histona KAP tenha mobilidade menor que a correspondente de timo, como se observa na Figura 5B, é esperado, pois esta característica já havia sido observada antes para a histona KAP de outros insetos (Cohen & Gotchel, 1971; Oliver & Chalkley, 1972a; McMaster-Kaye & Kaye, 1973; Franco et al., 1974). Além disto, verificou-se (resultados não apresentados) que o tratamento prévio da preparação de proteínas com DTT, não altera a posição da banda 2, o que exclui a possibilidade de que essa banda seja o dímero da histona ARE.

Bandas 4 e 5 - estas bandas na Figura 5B, são tentativamente identificadas como as histonas LAK e KAS respectivamente, em vista da região onde migram. Esta identificação que corresponde a uma inversão das posições dessas bandas com relação às observadas no caso de histonas de timo (Figura 5A), se deve à observação de Panyim et al. (1971) de que o afastamento na escala evolutiva do filo mamífero conduz a uma inversão da ordem KAS, LAK observada em timo, de forma que em Drosophila, a ordem crescente de mobilidade em géis de poliacrilamida passa a ser KAP, ARE, LAK, KAS, GRK (Cohen & Gotchel, 1971). A comparação de mobilidades eletroforéticas das proteínas básicas de Rhynchosciara, com as das histonas de outros insetos, permite da mesma forma obter elementos de identificação, como é mostrado na Tabela IV.

c) Propriedades tintoriais - outro critério que ajuda a identificar as histonas de R. americana, se baseia no fato de que histonas diferentes se coram diferentemente com negro de amido. Assim, as histonas KAP e KAS

TABELA IV

Mobilidades eletroforéticas relativas de histonas de várias fontes

Fonte	KAP	ARE	LAK	KAS	GRK	Referência
Drosophila (gl. sal)	62	81	86	92	100	Oliver & Chalkley (1972)
Grilo (ceco)	62	78	83	88	100	McMaster-Kaye & Kaye (1973)
C. capitata	67	82	89	93	100	Franco et al. (1974)
R. americana*	61±2	76±6	80±6	86±6	100	Esta tese
Timo**	66±2	77±2	85±2	80±2	100	Esta tese
Útero de rato	65	82	88	85	100	Barker (1971)

* - Medidas tomadas em 12 géis
** - Medidas tomadas em 4 géis
Todas as mobilidades são dadas como porcentagem da mobilidade da histona GRK que se considera igual a 100%.

se coram em púrpura, enquanto as outras bandas se coram em azul. Esta propriedade pode ser estudada obtendo-se as densidades ópticas das respectivas bandas a 450 e 700 nm, da mesma forma como fizeram Cohen & Gotchel (1971) para identificar histonas de glândulas salivares de Drosophila. Segundo estes autores, as bandas correspondentes às histonas KAP e KAS devem exibir absorbância, menor em comprimentos de onda próximos do vermelho (700 nm) do que em comprimentos de onda próximos do azul (450 nm). O inverso deve ocorrer com as histonas ARE e LAK. A Figura 7 mostra que estas características variações de absorbância ocorrem justamente com as bandas identificadas como sendo as histonas KAP e KAS e ARE e LAK de R. americana. Nesta figura é mostrado também o eletroferograma de histonas extraídas de núcleos preparados pelo método de Santelli et al. (1976), do qual se obtiveram os densitogramas comentados.

d) Peso molecular - para a determinação do peso molecular de histonas de R. americana, estas foram analisadas juntamente com cinco proteína de peso moleculares conhecidos, em géis de acrilamida-SDS preparados segundo Laemmli (1970). O eletroferograma resultante está mostrado na Figura 8A. Neste sistema as histonas de Rhynchosciara são resolvidas em somente quatro bandas. Este padrão, no entanto, está de acordo com os obtidos para as histonas de outros organismos em sistemas de eletroforese semelhantes (Panyim & Chalkley, 1971; Panyim et al.,

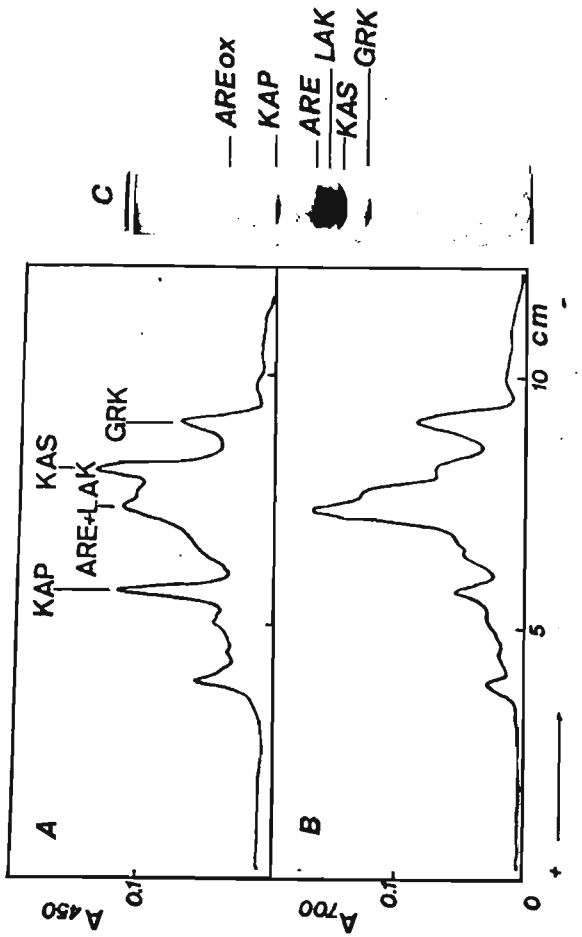
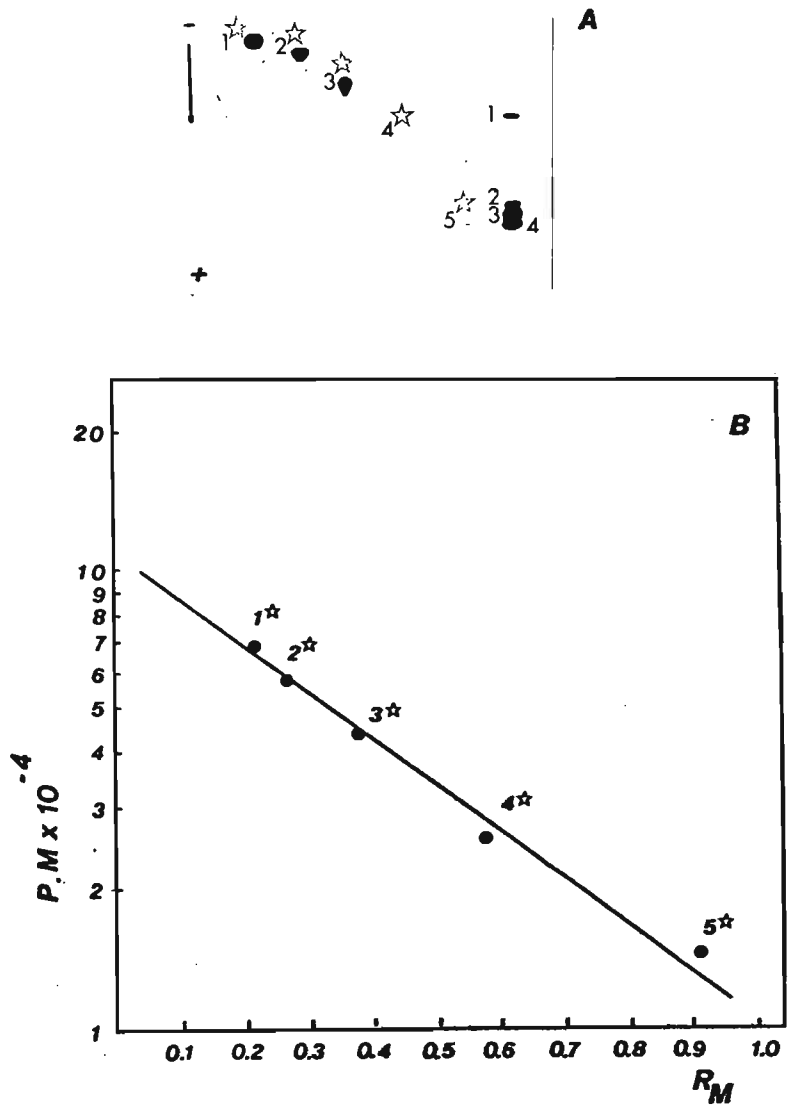


FIGURA 7 - Densitogramas e eletroferograma de histonas de glândulas salivares de larvas de R. americana (3º período) extraídas de núcleos preparados segundo Santelli et al. (1976). Condições de eletroforese como na figura 5 exceto o tempo de migração, que neste caso foi 3,5 horas. (A) Densitograma obtido por varredura de densidade óptica a 450 nm; (B) densitograma obtido por varredura de densidade óptica a 700 nm. As abscissas se referem a dimensões da carta registradora do espectrofotômetro; (C) eletroferograma da mesma preparação.

FIGURA 8 - (A) Eletroferograma de proteínas analisadas em gel descontínuo de acrilamida-SDS. Proteínas de peso molecular conhecido foram tratadas separadamente durante 1 hora a 50°C em um tampão feito em Tris-HCl 62 mM; EDTA 5 mM; pH 6,8 contendo SDS 2,5%; beta-mercaptoetanol 2,5% e sacarose 5% (Papermaster & Preyer, 1974), até sua dissolução total. Proteínas básicas de Rhynchosciara foram extraídas da cromatina de 200 glândulas salivares de larvas do 5º período, da forma descrita na figura 5 e dissolvidas como as proteínas padrões. Tomaram-se alíquotas de 5 µg de cada solução de proteínas padrões que foram colocadas no topo de uma placa de gel de acrilamida-SDS preparada segundo Laemmli (1970) e Studier (1973). O mesmo foi feito com a totalidade das proteínas básicas de Rhynchosciara. A eletroforese destas proteínas foi efetuada nas seguintes condições: tampão de eletrodos: Tris 0,025 M; glicina 0,192 M; SDS 0,1%, pH 8,3 (Laemmli, 1970). Voltagem entre eletrodos: 90 volt ou 6,6 volt/cm; duração da eletroforese: 4 horas à temperatura ambiente. Após a eletroforese, a placa foi corada durante 3 horas em uma solução composta de Coomasie Blue B 0,1%; etanol 45% e ácido acético 10%. Em seguida o gel foi fixado em soluções de ácido sulfosalicílico 20% (durante 16 horas) e de TCA 10% (durante 15 minutos). Após a fixação, o gel foi descorado em uma solução composta de etanol 25% e ácido acético 8% e fotografado com máquina Asahi Pentax (Spotmatic II) usando filme Copex-pan (Agfa, 16ASA). Os pesos moleculares das proteínas usadas como padrões são dados de Weber et al. (1972); 1^+: 68000 (soroalbumina), 2^+:57000 (piruvatoquinase), 3^+:43000 (ovoalbumina), 4^+:25700 (quimotripsinogênio) e 5^+:14300 (lisozima). As proteínas básicas de Rhynchosciara estão assinaladas do polo - ao polo + como 1, 2, 3, 4. (B) Gráfico de Weber & Osborn (1969), peso molecular contra mobilidade relativa, construído a partir dos pesos moleculares e das mobilidades eletroforéticas das proteínas padrões consideradas no eletroferograma acima.



1971; Hayashi et al., 1974). Para interpretar este padrão, assume-se que todas as proteínas devem estar sob a forma de monômeros, já que a amostra de proteínas é pre - tratada com mercaptoetanol e SDS a 2,5 e 2,0% respectivamente durante 1 hora a 50°C.

Com as mobilidades observadas para as pro - teínas padrões na Figura 8A, foi construído um gráfico, segundo Weber & Osborn (1969) (logPM versus R_M) que é apresentado na Figura 8B. Este foi usado para a estimativa dos pesos moleculares das bandas de proteínas de R. americana, a partir de seus respectivos R_M na Figura 8A. Os valores encontrados para as bandas 1, 2, 3, 4, dessa figura, são respectivamente, 33000, 15000, 14000 e 12000 daltons (ver Tabela V). Alguns destes valores contudo, são levemente maiores que os descritos para histonas de outros organismos, as quais têm pesos moleculares variá - veis entre 12000 (histona GRK; DeLange et al., 1969a) e 21000 daltons (histona KAP; Bustin et al., 1969). A banda 1, que segundo o critério de mobilidade neste tipo de géis deve corresponder à histona KAP, tem peso molecular menor que o encontrado para a mesma histona de Drosophila por Cohen & Gotchel (1971).

Estes últimos autores determinaram em géis preparados segundo Weber & Osborn (1969), um peso molecular de 37000 daltons para a histona KAP de glândulas salivares de larvas de D. hidey, valor que seria 75% maior que o da histona correspondente de timo de bezerro.

TABELA V

Determinação de pesos moleculares de histonas glândulas salivares em géis de acrilamida-SDS, empregando gráficos de Weber & Osborn (1969)

Proteína	R_M (acrilamida 10%)	PM (daldon)x10^{-3}
Soroalbumina	0,216[a]	68,0[b]
Piruvatoquinase	0,270[a]	57,0[b]
Ovalbumina	0,380[a]	43,0[b]
Quimotripsinogênio	0,580[a]	25,0[b]
Lisozima	0,910[a]	14,3[b]
Proteína 1	0,510[a]	33,0[c]
Proteína 2	0,850[a]	15,0[c]
Proteína 3	0,890[a]	14,0[c]
Proteína 4	0,940[a]	12,0[c]

a- Mobilidades relativas (com relação ao corante azul de bromofenol) em géis de acrilamida 10% tomadas do eletroferograma da figura 8.
b- Dados de Weber & Osborn (1969)
c- Pesos moleculares de histonas de Rhynchosciara calculados graficamente a partir da figura 8.

Entretanto, este resultado é criticado por Oliver & Chalkley (1972a), os quais determinaram para a histona KAP do mesmo diptero um valor que é somente 500 a 100 daltons maior que o da mesma proteína em timo. É provável que o peso molecular da histona KAP de Drosophila tenha sido superestimado por Cohen & Gotchel (1971) já que histonas possuem comportamento anômalo em géis de acrilamida-SDS (Panyim & Chalkley, 1971; Hayashi et al., 1974). Estes últimos autores sugerem inclusive que gráficos de Weber & Orborn como o da Figura 8B, não são adequados para o cálculo de peso molecular de histonas, porque os R_M obtidos em acrilamida-SDS são anormais e levam consequentemente à superestimação de seus pesos moleculares. Desta forma os valores antes mencionados para as bandas 1, 2, 3, 4, da Figura 8A devem estar superestimados.

Hayashi et al. (1974), propuseram a introdução de correções no cálculo de peso molecular de histonas que levariam a valores mais próximos dos reais. Basicamente estas consistem em empregar valores de R_{MO} (mobilidade relativa em solução) e de K'_R (constante de retardamento da proteína no gel) para o cálculo de peso molecular. Os valores do primeiro parâmetro para histonas seriam obtidos a partir de gráficos de Ferguson (1964) (citado em Neville, 1971) (mobilidade relativa em função da concentração de acrilamida nos géis), usando proteínas padrões de comportamento normal em acrilamida-SDS e extrapolando para concentração nula.

O valor de R_{MO} encontrado para proteínas normais no sistema de eletroforese empregado seria igual aos R_{MO} de histonas neste sistema. Isto ocorreria, porque em solução contendo concentração suficiente de SDS, proteínas monoméricas se ligariam ao detergente em altas e constantes relações de peso, sempre que pontes -S-S- tivessem sido convenientemente reduzidas (Pitt-Rivers & Impiombato, 1968; Reynolds & Tanford, 1970a). Como consequência desta interação, seriam induzidas sensíveis variações de conformação e resultariam moléculas em forma de bastão, nas quais o diâmetro seria sempre constante e o comprimento proporcional ao peso molecular da proteína (Reynolds & Tanford, 1970b). Consequentemente, a densidade de carga de superfície seria constante, já que as cargas presentes na proteína original seriam amplamente excedidas pelas cargas somadas das moléculas do detergente ligadas a ela. Este efeito do SDS permitiria predizer que a mobilidade eletroforética de complexos proteína-SDS em solução, seriam constantes independentemente da natureza da proteína complexada (Hayashi et al., 1974). A Figura 9 é um gráfico de Ferguson construído a partir do comportamento das proteínas padrões da Figura 8, em quatro concentrações diferentes de acrilamida-SDS. Por extrapolação, obtiveram-se valores dispersos de R_{MO} no eixo de ordenadas. Esta dispersão de mobilidades relativas em solução, em vista das considerações feitas antes, deve ser causada por artefatos de eletroforese, de forma que para o propósito de reavaliar os PM de histonas em Rhynchosciara, tomou-se um

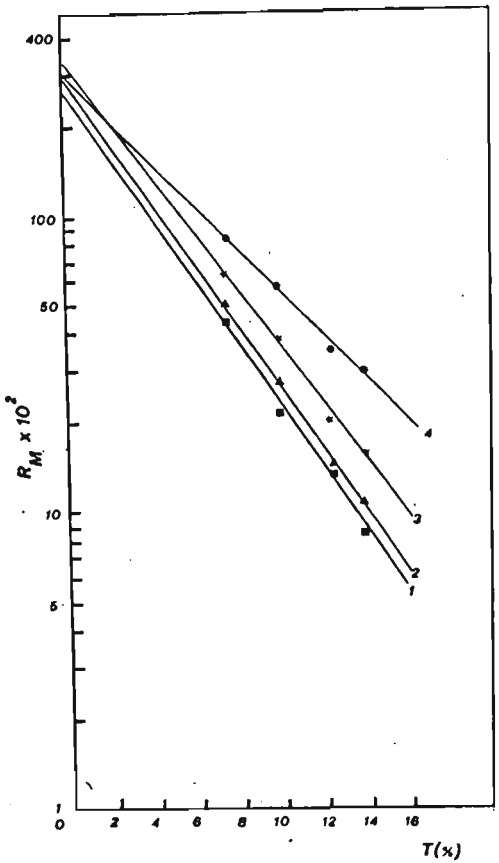


FIGURA 9 - Gráfico de Ferguson (1969) (citado em Neville, 1971), mobilidade eletroforética contra concentração percentual de acrilamida. O gráfico foi construído a partir do comportamento das proteínas padrões mencionadas na figura 8 em géis de concentração crescente de acrilamida: 6%, 10%, 12% e 14%. Soluções, preparo de gel e condições de eletroforese como na figura 8A.

R_{Mo} médio calculado a partir da Figura 9 que foi considerado constante para as bandas 1, 2, 3, 4.

O segundo parâmetro, ou seja a constante de retardamento K'_R para as proteínas padrões e para as histonas 1, 2, 3, 4, foi calculado a partir da relação $\log R_{Mo} - \log R_M = -K'_R \cdot T$(1) (Hayashi et al., 1974), em que R_M é a mobilidade relativa da proteína considerada em um gel de concentração percentual T de acrilamida. Segundo Hayashi et al. (1974) histonas se comportam como proteínas normais em gráficos de K'_R versus PM, de forma que construindo curvas que incluam o peso molecular de histonas e conhecendo seu R_{Mo} no sistema eletroforético considerado será possível obter valores mais próximos dos reais para seus pesos moleculares. A Figura 10 foi construída com este propósito, a partir dos pesos moleculares das proteínas padrões, do R_{Mo} médio calculado para elas a partir da Figura 9 e dos valores de R_M na Figura 8A. Para o cálculo dos pesos moleculares de histonas não se empregou entretanto, a Figura 10 mas sim a equação de regressão linear entre os dois parâmetros, P_M e K'_R, tendo sido as constantes de retardamento das bandas 1, 2, 3, 4 calculadas pela relação (1) com R_{Mo} médio obtido da Figura 9 e R_M obtidos do eletroferograma da Figura 9B. Os valores de pesos moleculares corrigidos para essas bandas estão apresentados na Tabela VI. Segundo estes cálculos, as bandas 2, 3 e 4 passam a ter PM respectivos de 10200, 12300 e 14100 daltons, valores bastante próximos

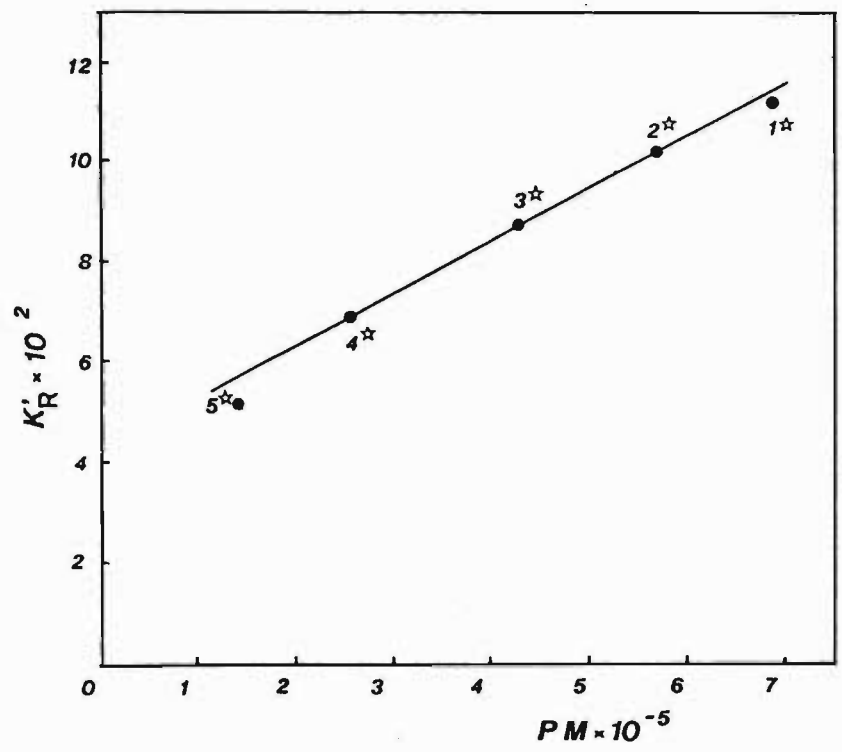


FIGURA 10 - Gráfico de Hayashi et al. (1974), constante de retardamento versus peso molecular para as proteínas da figura 4. Para maiores detalhes vide texto.

TABELA VI

Determinação de pesos moleculares de histonas de glândulas salivares a partir de gráficos de Hayashi et al. (1974)

Proteína	R_M (acrilamida 10%)	R_{Mo}	$K'_R x10^3$	PM(dalton)x10^{-3}
Soroalbumina	0,210[a]	2,84[b]	118,8[c]	68[d]
Piruvatoquinase	0,270[a]	2,84[b]	102,2[c]	57[d]
Ovalbumina	0,380[a]	2,84[b]	87,2[c]	43[d]
Quimotripsinogênio	0,580[a]	2,84[b]	69,0[c]	25,7[d]
Lisozima	0,910[a]	2,84[b]	49,0[c]	14,3[d]
Proteína 1	0,510[a]	2,84[b]	74,30[c]	33,2[e]
Proteína 2	0,850[a]	2,84[b]	52,40[c]	14,1[e]
Proteína 3	0,890[a]	2,84[b]	50,40[c]	12,3[e]
Proteína 4	0,940[a]	2,84[b]	48,02[c]	10,2[e]

a- Mobilidades relativas (com relação ao corante azul de bromo fenol) em géis de acrilamida 10% tomadas do eletroferograma da figura 8
b- Mobilidades relativas em solução obtidas por extrapolação na figura 9
c- Constantes de retardamento em géis de acrilamida 10% calculados pela relação $\log R_{Mo} - \log R_M = -K'_R T$
d- Dados de Weber & Osborn (1969)
c- Pesos moleculares de histonas de Rhynchosciara calculados a partir da equação de correlação linear $K'_R = 1,14 \times PM + 36,25$ cujo r = 0,993.

dos encontrados por Panyim & Chalkley (1971) para as histonas GRK (11000), LAK (12500) e ARE + KAS (14000). Estas considerações permitem identificar no eletroferograma da Figura 8A, as bandas 2, 3 e 4 como sendo histonas ARE + KAS, LAK e GRK respectivamente em Rhynchosciara. Entretanto, ao introduzir a correção de Hayashi et al. (1974), não se observa variação no peso molecular calculado para a histona KAP de Rhynchosciara. Como pode ser observado na Tabela VI, este é novamente avaliado em 33000 daltons, valor maior que o descrito para a mesma histona de outros organismos, inclusive Drosophila.

É interessante observar que os valores evidentemente superestimados por Cohen & Gotchel (1971) para histona KAP de timo e ouriço do mar e provavelmente para a mesma histona de Drosophila, podem ser corrigidos a partir de gráficos de Hayashi et al. (1974). Como os dois grupos de autores empregaram o sistema de eletroforese de Weber & Osborn (1969) para a determinação de pesos moleculares pode admitir-se que os R_{MO} das histonas de Cohen & Gotchel (1971) sejam iguais aos das de Hayashi et al. (1974). Então, a partir dos R_M dados pelos primeiros autores para a histona KAP de timo, ouriço do mar e Drosophila, calcularam-se os respectivos K'_R e com eles estimou-se o peso molecular das três proteínas diretamente no gráfico de PM versus K'_R do artigo de Hayashi et al. (1974). Desta forma, o peso molecular de 34000 para a histona KAP de timo determinado por Cohen & Gotchel(1971), passa a ser de aproximadamente 25000 após a correção mencionada;o da histona KAP de ouriço (31000) a aproximadamente 21000 e o da de Drosophila (37000) a aproximadamente 27000.

Os dois primeiros valores corrigidos, são perfeitamente compatíveis com alguns dados da literatura (Butler et al., 1968; Teller et al., 1965), sendo aquele recalculado para a histona de Drosophila, levemente maior. Na realidade o maior peso molecular da histona KAP de Drosophila foi também confirmado por Oliver & Chalkley (1972a) sem a distorção encontrada por Cohen & Gotchel (1971). Presentemente, o consenso geral é que a histona KAP de dipteros tem realmente peso molecular maior que a correspondente de vertebrados.

Estes comentários se justificam, porque como já foi dito, a correção de Hayashi et al. (1974), não alterou o peso molecular encontrado para a histona KAP de Rhynchosciara, inicialmente estimado em 33000 por gráficos comuns de logPM versus R_M. Este fato pode indicar, se a correção foi corretamente empregada aqui, que o peso molecular de 33000 daltons encontrado para a histona KAP de R. americana pelos dois tipos de tratamento, é real.

O comportamento anormal de histonas em géis de acrilamida-SDS, sobretudo a histona KAP, pode ser provocado pelo seu alto conteúdo de lisina e de prolina (a histona KAP de timo possui 25,7 moles de lisina e 9,7 moles de prolina por 100 moles de aminoácidos;(Kinkade & Cole, 1966). O excesso do primeiro aminoácido pode retardar a

mobilidade eletroforética, pois devido ao excesso de resíduos básicos o SDS do gel poderia não cobrí-los completamente; quantidade excessiva do segundo poderia reduzir a flexibilidade da molécula reduzindo a sua mobilidade anódica (Phillips & Clarke, 1970). Como consequência o peso molecular calculado pelos processos aplicáveis a proteínas comuns, seriam superestimado, como ocorreu no caso de Cohen & Gotchel (1971).

Assim sendo, a coincidência de peso molecular da histona KAP de Rhynchosciara quando calculado por dois processos, um dos quais é aplicável a proteínas comuns, pode indicar que esta histona se comporte como uma proteína de composição de aminoácidos próxima da comum, ou seja, que seu conteúdo de lisina e de prolina seja menor que o da histona correspondente de vertebrados. Isto estaria de acordo com as observações de Cohen & Gotchel (1971) e de Oliver & Chalkley (1972a) obtidas a partir de análise de aminoácidos na histona KAP de Drosophila.

Para resumir o que foi dito nesta secção: as histonas ARE e GRK de Rhynchosciara possuem em géis de acrilamida as mesmas mobilidades das correspondentes de timo; as histonas KAP, LAK e KAS têm mobilidades diferentes, fato já observado entre histonas de diversas fontes por Panyim et al. (1971).

A histona KAP de Rhynchosciara, como ocorre com a de outros insetos, tem mobilidade menor que a de timo (Cohen & Gotchel, 1971; Oliver & Chalkley, 1972a;

McMaster-Kaye & Kaye, 1973); além disto é provável que seu peso molecular seja maior que o da de timo e o da de Drosophila. É possível também que seu conteúdo de lisina e de prolina seja menor que o da histona KAP de timo, como ocorre com a histona KAP de Drosophila.

3. SÍNTESE DE HISTONAS EM GLÂNDULAS SALIVARES DURANTE O DESENVOLVIMENTO LARVAL

3a. MEDIDAS DENSITOMÉTRICAS

A Figura 11 mostra densitogramas a 600 nm obtidos de géis nos quais foram analisadas histonas extraídas de cromatina de glândulas salivares, provenientes de animais em diferentes épocas do desenvolvimento larval, ou seja, de 2º (Figura 11A), 4º (Figura 11B), 5º (Figura 11C) e 6º (Figura 11D) períodos. As duas primeiras figuras se referem a histonas extraídas da cromatina de 200 glândulas e as duas últimas a histonas extraídas da cromatina de 40 glândulas. Nas preparações a que se referem estas duas últimas figuras usaram-se sulfato de protamina (Figura 11C) e alfa-amilase de B. subtilis (Figura 11D) como carregadores, com o objetivo de recuperar a pequena quantidade de histonas que é possível extrair dessas 40 glândulas.

Comparando-se as áreas sob os picos assinalados como sendo as histonas KAP, ARE + LAK + KAS e GRK nos diferentes densitogramas da Figura 11 observou-se que as relações entre eles não se alteraram em função dos

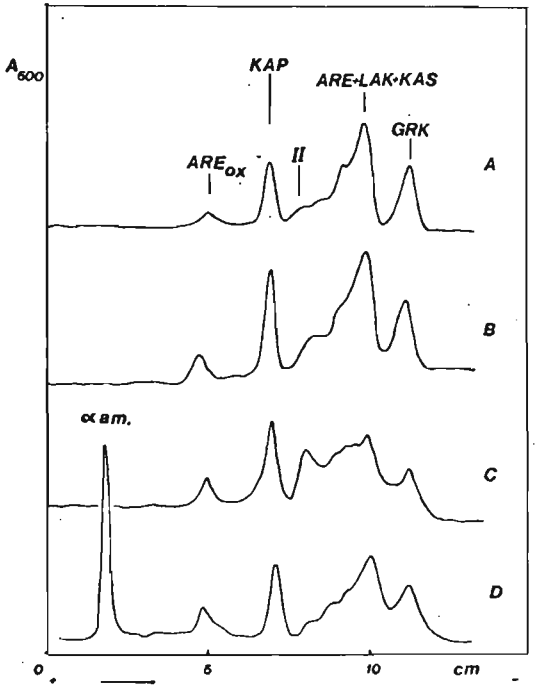


FIGURA 11 - Densitogramas a 600 nm de histonas extraídas de glândulas salivares de larvas de R. americana. Condições de eletroforese e extração de histonas exatamente como na figura 5. (A) histonas extraídas de cromatina purificada de 200 glândulas de larvas de 2º período; (B) como em A, mas de larvas de 4º período; (C) histonas extraídas da cromatina purificada de 40 glândulas de larvas de 5º período e recuperadas por precipitação com TCA 20% usando sulfato de protamina como carregador; (D) histonas extraídas da cromatina purificada de 40 glândulas de larvas de 6º período e recuperadas por precipitação com TCA 20% usando alfa-amilase como carregador. A abscissa se refere a dimensões da carta registradora do espectrofotômetro.

carregadores usados nos processos de precipitação. O uso destes tornou-se necessário nas experiências de incorporação de lisina-^{3}H, que serão comentadas mais adiante. A alfa-amilase devido ao seu alto peso molecular permanece no topo do gel como uma banda discreta não associada a radioatividade, e a protamina, cujo peso molecular é menor que o de qualquer histona, sai do gel após as cinco horas de eletroforese em que as histonas são separadas. Em nenhum dos casos (Figura 11C e D) se percebe alteração de mobilidade eletroforética nas bandas de histonas assinaladas.

Com o objetivo de confirmar o que foi observado nos perfís de histonas de 2º e 4º períodos (Figura 11A e 11B), analisaram-se preparações de histonas extraídas de cromatina ou de preparações de núcleos de glândulas salivares de larvas em vários estágios de desenvolvimento. Nos respectivos densitogramas mediram-se as áreas sob os picos correspondentes às histonas KAP, ARE + LAK + KAS, GRK e em cada caso, estas áreas foram colocadas em gráfico como porcentagem da área total de histonas em cada gel. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 12. Estes resultados indicam, que dentro dos limites de resolução da técnica empregada, não se observam variações apreciáveis nas proporções relativas das diferentes histonas ao longo do desenvolvimento larval.

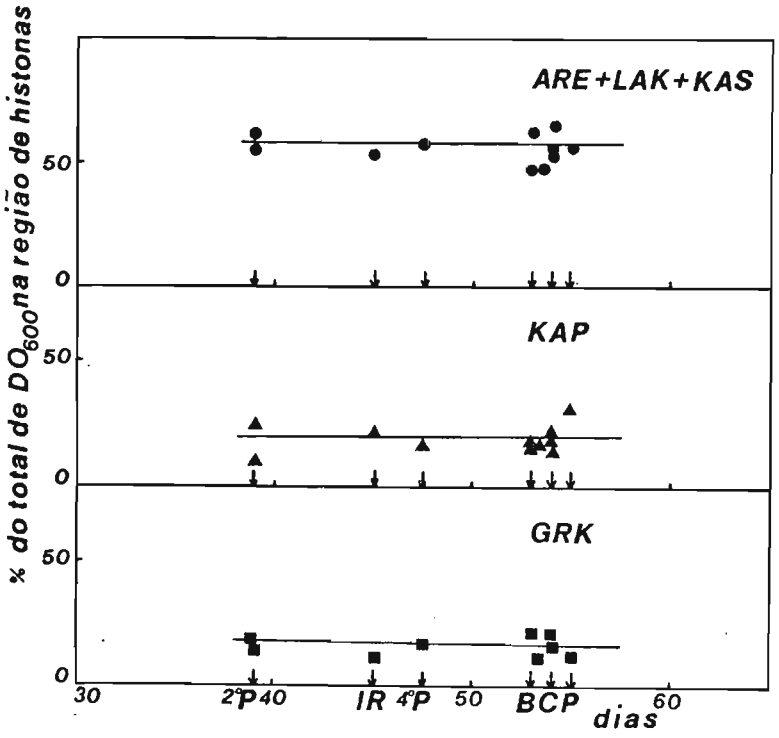


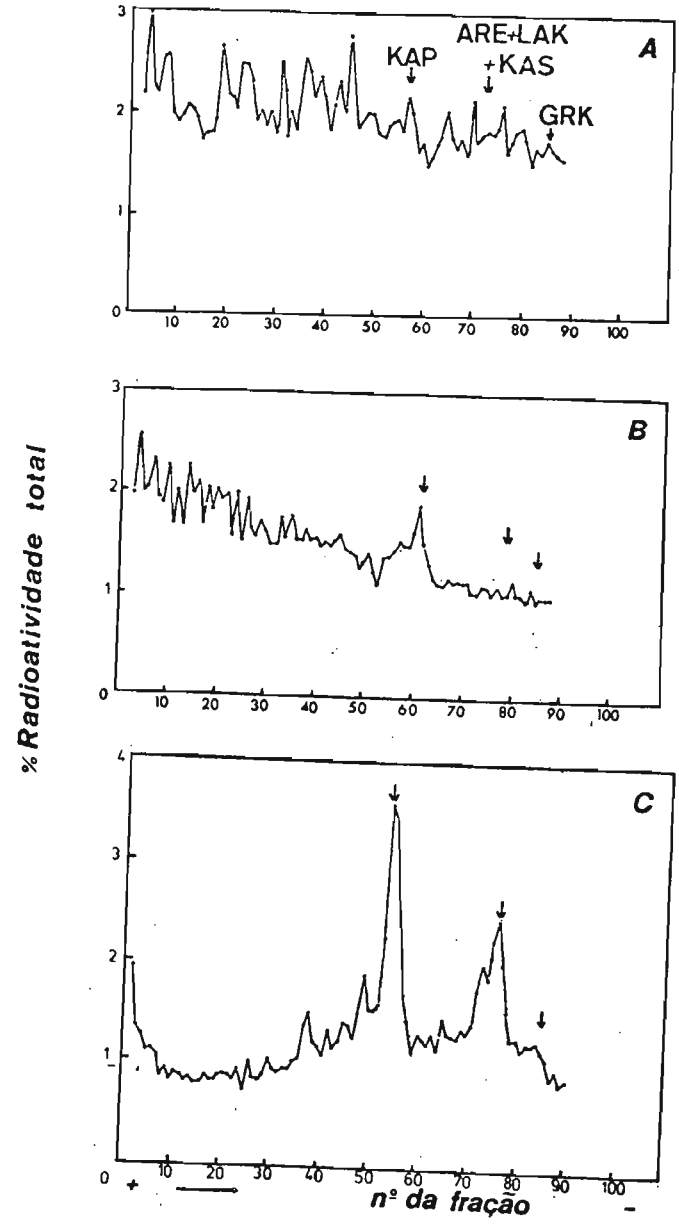
FIGURA 12 - Variação da quantidade relativa das bandas de densidade óptica a 600 nm das histonas ARE + LAK + KAS (●——●), KAP (▲——▲) e GRK (■——■) ao longo do desenvolvimento larval dado em dias. Nos densitogramas correspondentes a cada ponto da figura, tomou-se a área total na região de histonas e expressaram-se as áreas dos picos individuais como porcentagem da área total. As histonas foram extraídas de cromatina ou de núcleos e analisadas por eletroforese em géis de acrilamida como na figura 5. 2ºP = 2º período; 4ºP = 4º período; IR = início de rede; B = época de abertura máxima do "puff" 2B no cromossomo B; C = época de abertura do "puff" 3C no cromossomo C; P = época da pupa larval.

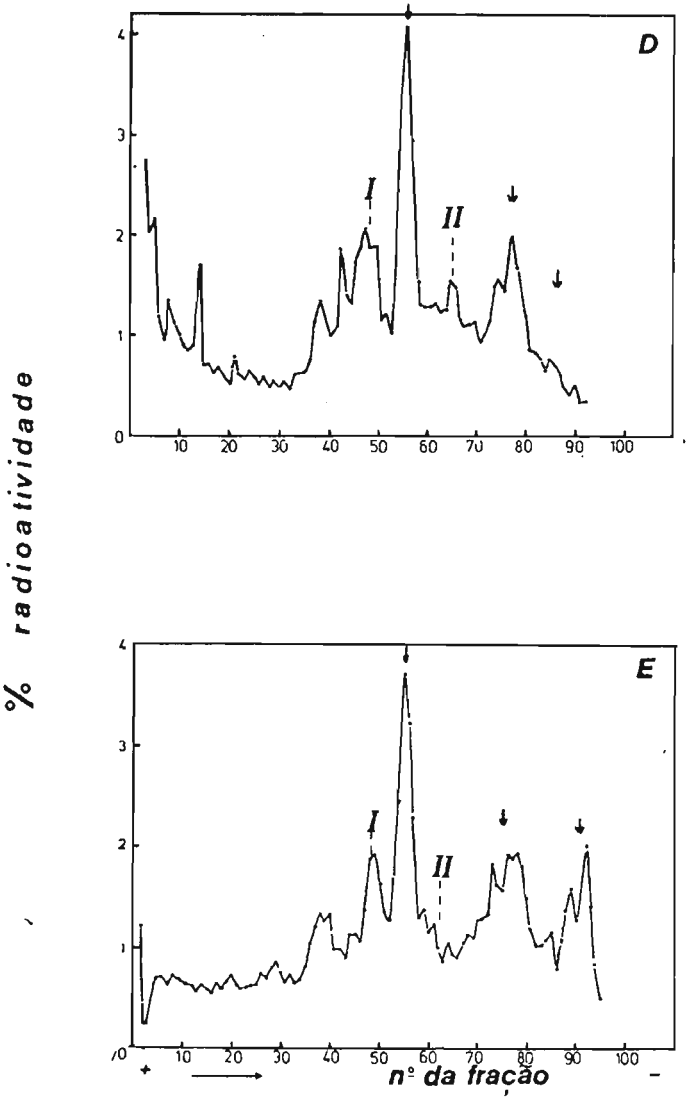
3b. INCORPORAÇÃO DE LISINA-^{3}H DURANTE O DESENVOLVIMENTO LARVAL

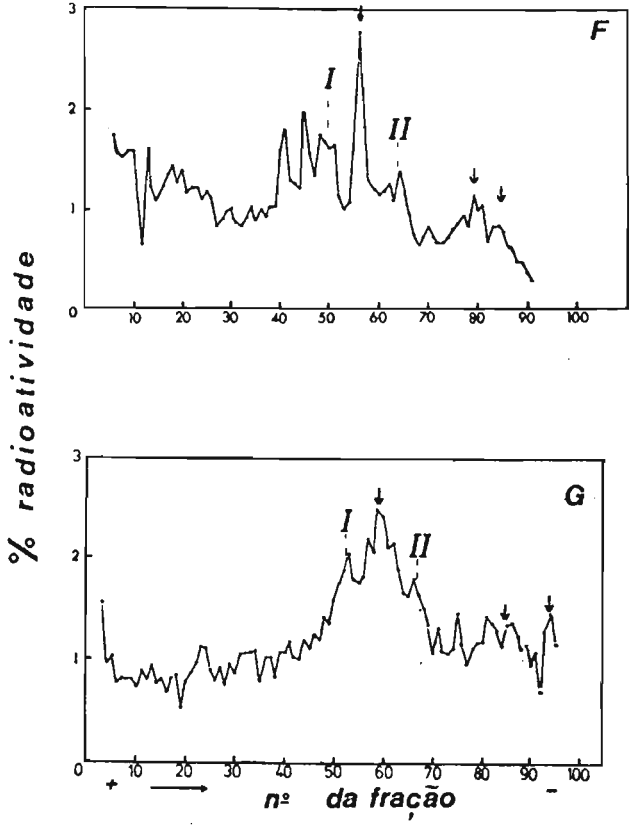
Experiências preliminares mostraram que a quantidade de lisina-^{3}H necessária para marcar "in vitro" as histonas de 200 glândulas (o que dispensa o uso de carregador), é inviável. Entretanto, empregando alfa-amilase ou sulfato de protamina no momento de precipitar histonas com TCA 20%, é possível recuperá-las da cromatina de um número bem menor de glândulas (aproximadamente 40 glândulas), como se demonstrou na Figura 11C e D. Além disto, trabalhando com volumes de incubação de 100 µl e com quantidades de lisina-^{3}H de 200 µCi conseguem-se concentrações do isótopo suficientemente altas (2 mCi/ml) para marcar convenientemente as proteínas em estudo.

Os resultados das experiências de incorporação de lisina-^{3}H em histonas de proteínas básicas extraídas de cromatina de glândulas salivares, são mostrados na Figura 13. Glândulas de larvas em estágios de desenvolvimento compreendido entre 2º período e pupa, foram incubadas em meio suplementado com lisina-^{3}H. Paralelamente, cada incorporação do aminoácido foi acompanhada de incubação de igual número de glândulas do mesmo grupo de larvas, em meio suplementado com timidina-^{3}H, com o objetivo de investigar a síntese de DNA durante a parte do desenvolvimento estudado. Os perfis de radioatividade obtidos nos géis de acrilamida em que foram analisadas as proteínas básicas da cromatina, foram normalizados com

FIGURA 13 - Incorporação de lisina-^{3}H em histonas de glândulas salivares durante o desenvolvimento larval. Na época apropriada de desenvolvimento, glândulas de 20 larvas foram dissecadas em Ringer de Rhynchosciara e transferidas para 100 µl de meio de incubação TBGPL (Terra et al., 1975) sem lisina, e previamente suplementado com 200 µCi de lisina-^{3}H (New England Nuclear, 8,7 Ci/mMol) onde foram mantidas durante 4 horas a 18°C. Terminada a incorporação, as glândulas foram transferidas para 10 ml de tampão Tris 10 mM; NaCl 100 mM; $Mg(CH_3CO_2)_2$ 1 mM; sacarose 250 mM pH 7,4 onde foram vigorosamente homogeneizadas para a obtenção de cromatina e subsequente recuperação de histonas empregando sulfato de protamina como carregador, e os processos descritos na secção de Métodos. As condições de eletroforese são exatamente as descritas na figura 5. Os géis foram cortados em 90-100 fatias de 1 mm, as quais foram transferidas para frascos de cintilação e tratadas como se descreve em Métodos para determinação de radioatividade por cintilação líquida. Os gráficos desta figura estão normalizados com relação ao total de radioatividade no respectivo gel. As setas, da esquerda para a direita, assinalam em todas as figuras, a posição das bandas KAP, ARE + LAK + KAS e GRK. (A) histonas de 2º período; (B) histonas de início de rede; (C) histonas de 4º período (dois dias antes da abertura máxima do "puff" 2B no cromossomo B); (D) histonas de 5º período (máxima abertura do"puff" 2B); (E) histonas de um dia após a abertura máxima do"puff" 2B; (F) histonas de "puff" C (abertura do "puff" 3C no cromossomo C); (G) histonas da pupa larval (um ou dois dias antes da histólise da glândula).




D
E
I
II
% radioatividade
n° da fração
+
-


F
G
I
II
% radioatividade
nº da fração
+
-

relação ao total de radioatividade no respectivo gel, de forma que esses perfis são comparáveis em todos os estágios estudados. Na Figura 13 se observam picos de radioatividade que correspondem a picos de densidade óptica previamente identificados como histonas; além destes se destacam dois outros picos de radioatividade, assinalados como I e II que não migram em regiões correspondentes a histonas. Serão analisados primeiramente os picos de radioatividade que correspondem a histonas.

Os dados da Figura 13 indicam que a incorporação de lisina-^{3}H em proteínas básicas de 2º período (Figura 13A, seis dias antes do início de rede), é dispersa. Seis dias após, quando as larvas iniciaram a confecção do casulo coletivo e começa o último ciclo de replicação de DNA na glândula (Figura 13B, início de rede), a radioatividade se concentra na região onde migra a histona KAP. Em um estágio posterior, dois antes da abertura do "puff" 2B no cromossomo B (Figura 13C, 4º período), prossegue a incorporação na região da histona KAP e se observa um aumento de incorporação nas regiões onde migram as histonas ARE + LAK + KAS e GRK. Uma situação semelhante se observa pouco depois, quando a abertura do "puff" 2B e a síntese de DNA são máximas (Figura 13D, época de abertura máxima do "puff" 2B no cromossomo B). Um dia após o "puff" B (Figura 13E, época imediatamente posterior à da abertura máxima do "puff" 2B) a radioatividade nas regiões correspondentes às histonas KAP e ARE + LAK + KAS decresce, enquanto se observa um incremento

de incorporação do aminoácido na região onde migra a histona GRK. No estágio posterior, quando se abre o "puff" 3C no cromossomo C (Figura 13F, época da abertura do "puff" 3C no cromossomo C), todas as bandas passam a marcar-se menos com o isótopo. Finalmente, no estágio de pupa, pouco antes da histólise de glândula (Figura 13G, época da pupa larval, pouco antes da histólise da glândula salivar) existe uma sensível regressão de incorporação em todas as bandas, embora a correspondente à histona KAP continue ainda com apreciável marcação.

A Figura 13 mostra que a banda onde há incorporação mais eficiente de lisina-^{3}H durante o desenvolvimento, é a que corresponde à histona KAP. A incorporação do isótopo na região desta histona aumenta progressivamente até a época de máxima abertura do "puff" 2B, quando atinge um máximo (Figura 13D) para depois decair até a época de pupa. O mesmo comportamento se observa com relação à radioatividade na região onde migram as histonas ARE, LAK, KAS. O fato de que nesta experiência não se tenha detectado incorporação na região dessas três histonas no início de rede (Figura 13B), não indica necessariamente que exista defasagem de síntese entre a histona KAP e as histonas ARE, LAK, KAS. É possível que a histona KAP tenha sido detectada antes das outras nessa experiência, devido ao seu maior conteúdo de lisina, e consequentemente maior atividade específica ao ser marcada com lisina-^{3}H. Neste sentido o mesmo argumento se aplica também à histona GRK. Esta por sua vez, segue

aproximadamente o mesmo comportamento das outras com relação à incorporação de lisina-^{3}H, com um máximo de incorporação pouco depois da época de abertura máxima do "puff"B (Figura 13E).

Em resumo, os resultados expressos na Figura 13, sugerem que as bandas que migram nas posições correspondentes às histonas KAP, ARE + LAK + KAS e GRK, se comportam de forma semelhante quanto à incorporação de lisina-^{3}H durante o período do desenvolvimento larval estudado. Além disto, este comportamento sugere que o aumento de incorporação de lisina-^{3}H nessas três bandas acompanha o aumento de síntese de DNA que ocorre na glândula durante essa parte do desenvolvimento larval (Figura 3). Estas impressões parecem ser confirmadas pelo tratamento dos dados de incorporação de lisina-^{3}H (Figura 13),que são apresentados na Figura 14A e 14B, na Figura 15 e na Tabela VII. A Figura 14 e 14B, mostra respectivamente o acúmulo de histonas (área dos picos individuais de densidade óptica a 600 nm) e a deposição de histonas recém sintetizadas (radioatividade dos picos individuais) sobre a cromatina das glândulas durante o período estudado; a Figura 15 mostra a variação durante esse período, da atividade específica (CPM/área do pico de densidade óptica a 600 nm) das bandas KAP e ARE + LAK + KAS. Na Tabela VII é dada a radioatividade de lisina-^{3}H (CPM) incorporada em histonas em cada estágio do desenvolvimento. Ao lado é mostrada a atividade específica de DNA (CPM/µg DNA) das

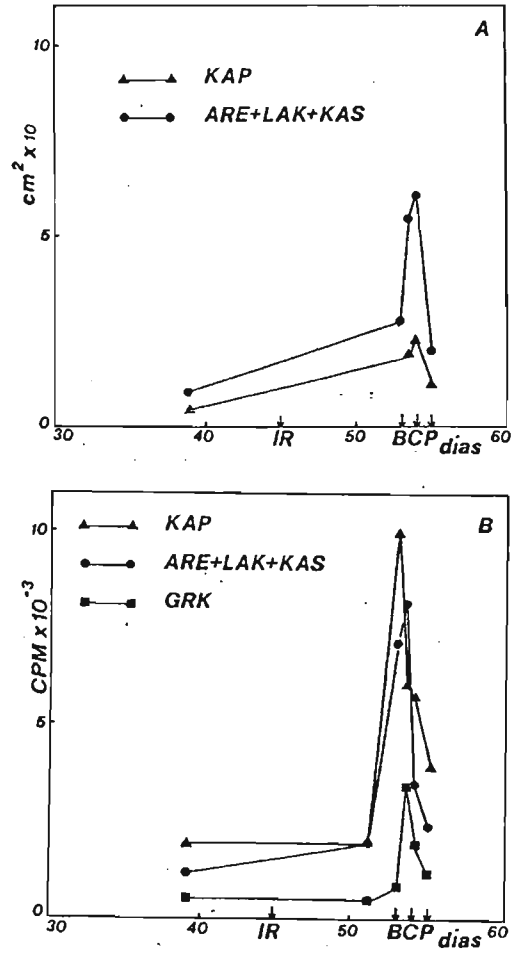


FIGURA 14 - (A) Variação da área (cm^2) sob os picos de densidade óptica a 600 nm das bandas correspondentes às histonas KAP (▲——▲) e ARE + LAK + KAS (●——●) de glândulas salivares,ao longo do desenvolvimento larval dado em dias. (B) Variação de radioatividade (CPM) sobre os picos de densidade óptica a 600 nm correspondentes às histonas KAP (▲——▲), ARE + LAK + KAS (●——●) e GRK (■——■). IR = início da confecção do casulo coletivo; B = época de abertura máxima do "puff" 2B no cromossomo B; C = época de abertura do "puff" 3C no cromossomo C; P = época da pupa larval.

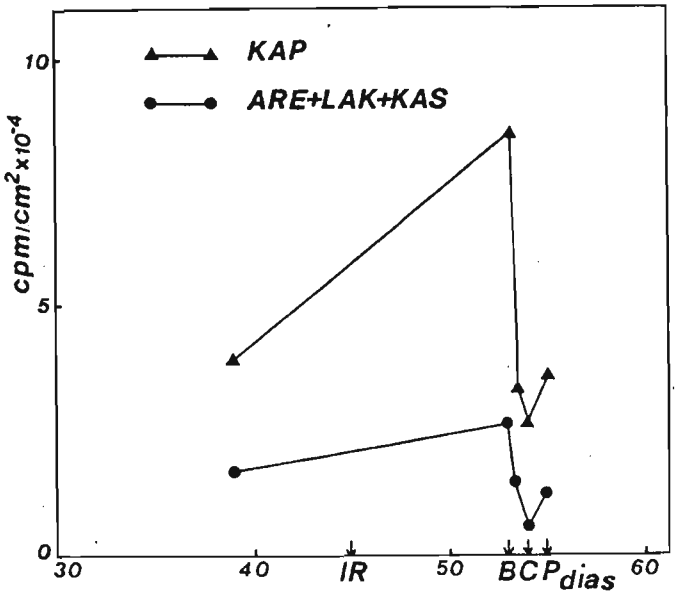


FIGURA 15 - Variação de atividade específica (CPM/área do respectivo pico de densidade óptica a 600 nm) das histonas KAP (▲——▲) e ARE + LAK + KAS (●——●) ao longo do desenvolvimento, larval dado em dias. As condições de incubação, extração de histonas, bem como sua eletroforese em poliacrilamida e a determinação de densidade óptica e de radioatividade ao longo dos géis, são as descritas na figura 13, da qual foram obtidas estas curvas. IR = início de rede; B = época de abertura máxima do "puff" 2B no cromossomo B; C = época de abertura do "puff" 3C no cromossomo C; P = época da pupa larval.

TABELA VII

Correlação entre radioatividade (CPM) detectada na região onde migram histonas em géis de acrilamida, e a atividade específica de DNA (CPM/µg DNA)

Estágio do desenvolvimento larval	Radioatividade na região de histonas (CPM)	Atividade específica de DNA (CPM/µg)
2º Período	389	12413
Início de rede (IR)	372	22753
4º Período	7059	41967
Puff B	35886	52725
Após puff B	29903	31883
Puff C	29272	21855
Pupa	13347	4054
Larvas de 2º Período injetadas com Ecdisona		
Controle 1	4805	38306
Ecdisona 34 horas	3488	105000
Controle 2	4092	37700
Ecdisona 44 horas	4895	117687

glândulas no estágio correspondente.

Como se observou anteriormente, não foram identificados os picos de radioatividade assinalados por I e II na Figura 13 (D, E, F e G). Estes podem ser resultantes de contaminação por proteínas citoplasmáticas ou mesmo por outras proteínas não histonas de origem nuclear, ou são produtos de modificação química de histonas. Estas modificações tendem a produzir moléculas de menor mobilidade eletroforética no sistema empregado, seja por aumento do número de resíduos ácidos (fosforilação), ou por redução do número de resíduos básicos (metilação, acetilação). Se este fosse o caso, o pico I corresponderia possivelmente a uma dessas alterações na histona KAP e o pico II à alteração de uma das histonas que migram na posição da banda ARE + LAK + KAS.

Para discernir entre modificação química e contaminação, determinou-se na experiência ilustrada na Figura 13, a variação de atividade específica desses dois picos durante o desenvolvimento, da mesma forma como foi feito para histonas normais na Figura 15. O resultado obtido está ilustrado na Figura 16. Nesta se observa que a variação de atividade específica que ocorre no caso do pico I, difere da encontrada para histonas normais (Figura 15); com o pico II, entretanto essa variação é muito semelhante àquela observada com histonas normais. Esta última observação sugere que o pico II da Figura 16 seja uma das histonas da banda ARE + LAK + KAS modificada quimicamente.

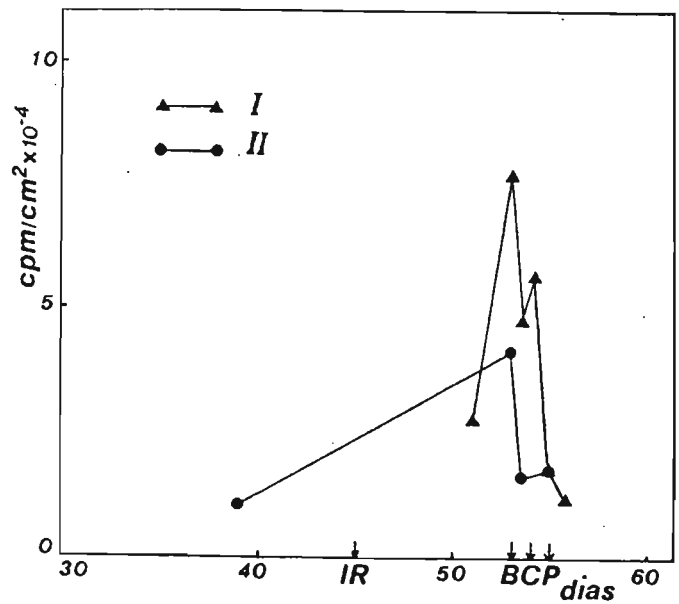


FIGURA 16 - Variação de atividade específica (CPM/área do respectivo pico de densidade óptica a 600 nm) dos picos I e II da figura 13.(▲——▲) pico I e (●——● pico II. IR = início de rede; B = época de abertura máxima do "puff" 2B no cromossomo B; C = época de abertura do "puff" 3C no cromossomo C; P = época da pupa larval.

A possibilidade de que o pico I seja a histona KAP modificada, não deve ser descartada completamente; a fosforilação, principalmente da histona KAP, ocorre em outros organismos na época de ativa síntese de DNA que precede a mitose (Bradbury et al., 1973; Bradbury et al., 1974a; Gurley et al., 1973b). Contudo, em vista do resultado da Figura 16, deve aceitar-se como mais provável que esse pico corresponda a contaminação.

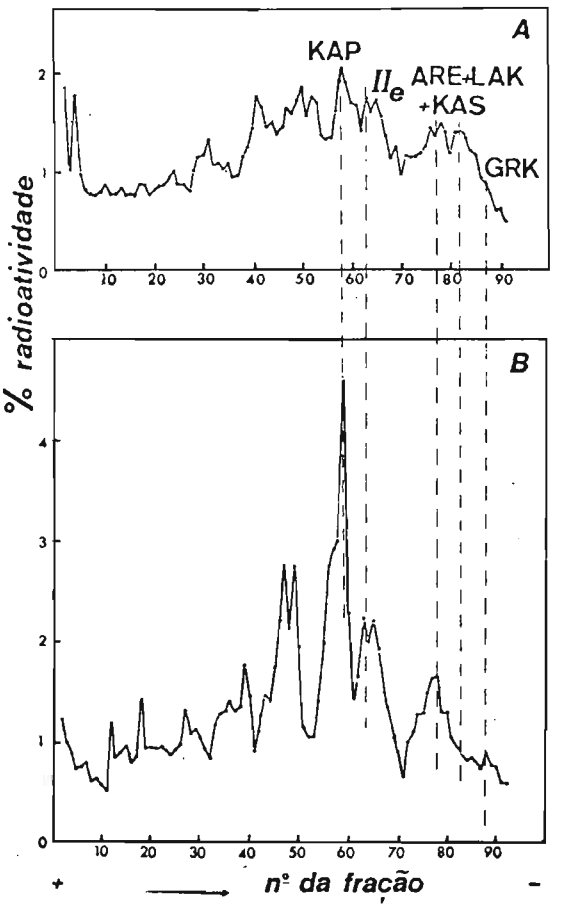
4. EFEITO DE ECDISTERONA NA INCORPORAÇÃO DE LISINA-^{3}H E TIMIDINA-^{3}H EM HISTONAS E DNA DE GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DE 2º PERÍODO

Dois lotes de larvas de 2º período foram injetados diretamente na hemocele com ecdisterona e sacrificados após 34 a 44 horas respectivamente. Ao mesmo tempo, grupos controles foram injetados com solução de Ringer de Rhynchosciara e etanol a 2% (solução empregada para dissolver o hormônio) e sacrificados após 34 e 44 horas. Após estes tempos, dissecaram-se as glândulas salivares dos animais injetados. Em cada caso, as glândulas foram divididas em dois lotes, dos quais um foi colocado em meio de incubação suplementado com lisina-^{3}H e o outro em meio contendo timidina-^{3}H, para controle da síntese de DNA. O efeito do hormônio foi controlado ao microscópio ao comparar a abertura do "puff" 2B no cromossomo B em animais tratados em animais controles do mesmo grupo. Nas experiências efetuadas, a abertura máxima desse "puff" foi observada

após 44 horas de tratamento hormonal. Os efeitos de ecdisterona sobre a incorporação de lisina-^{3}H em histonas extraídas da cromatina, estão mostrados nas Figuras 17 e 18. Estes perfis estão também normalizados com relação ao total de radioatividade no gel, de forma que possam ser comparados entre si e com os perfis do desenvolvimento normal.

A Tabela VII mostra a radioatividade de lisina-^{3}H (CPM) incorporada em histonas de glândulas dos lotes experimentais e controles, bem como as atividades específicas de DNA (CPM/μg DNA) correspondentes. A comparação entre os dois perfis da figura 17, mostra que o tratamento com ecdisona por 34 horas, aumentou a proporção de lisina-^{3}H incorporada na região da histona KAP, embora não se notem alterações apreciáveis nas outras bandas. Este perfil (Figura 17B) é inclusive semelhante ao obtido na época de máxima abertura do "puff" 2B no desenvolvimento normal (Figura 13D). Por outro lado, o perfil da Figura 18B (tratamento com ecdisona por 44 horas), não possui equivalente no desenvolvimento normal. É notável neste perfil o acúmulo de radioatividade que se observa na região do pico II_e, o qual neste caso ultrapassa a altura do pico da histona KAP, a mais marcada nos perfis do desenvolvimento normal. A queda concomitante da radioatividade em uma parte da banda que engloba as histonas ARE, LAK e KAS, sugere que em vista do que foi comentado na secção anterior sobre o pico II, que o pico II_e, resulte de modificação química de uma dessas proteínas, prova -

FIGURA 17 - Incorporação de lisina-^{3}H em histonas de glândulas salivares de larvas de 2º período injetadas com ecdisterona durante 34 horas. Dois lotes de 20 larvas de 2º período (seis dias antes do início de rede) foram separadamente injetados, um com 2 µl de solução fisiológica de Rhynchosciara contendo etanol 2% (A) e o outro com 2 µl da mesma solução contendo ecdisterona (Rhoto Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japão) 1 mg/ml (B). Ambos os grupos de larvas foram mantidos após as injeções, durante 34 a 18°C. Em seguida as glândulas de cada lote foram dissecadas e separadamente transferidas para 100 µl de meios de incubação previamente suplementados com 200 µCi de lisina-^{3}H (New England Nuclear, 8,7 Ci/mMol) permitindo-se a incorporação do precursor durante 4 horas a 18°C. Após a incubação procedeu-se para extração de histonas, bem como sua eletroforese e determinação de radioatividade nos géis, da forma descrita na figura 13. Os gráficos estão normalizados com relação ao total de radioatividade no respectivo gel.



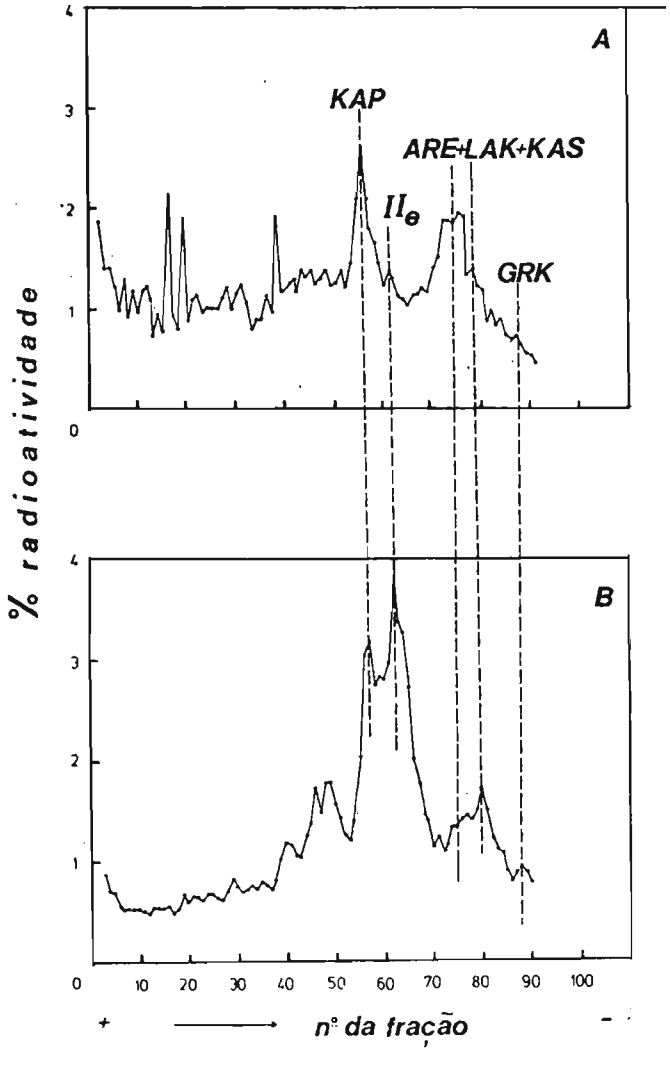


FIGURA 18 - Incorporação de lisina-^{3}H em histonas de glândulas salivares de larvas de 2º período injetadas com ecdisterona durante 44 horas. Exatamente como na figura 13, exceto que em (A) larvas injetadas com a solução fisiológica contendo etanol 2% e em (B) as larvas injetadas com a mesma solução contendo ecdisterona 1 mg/ml, sendo ambos os grupos mantidos durante 44 horas a 18°C antes da incorpora -

velmente da histona ARE, a qual tem mobilidade eletroforética coincidente com a banda cuja radioatividade diminuiu no perfil B da Figura 18. A observação dos dados referentes a ecdisterona na Tabela VII mostra que a síntese de DNA foi enormemente estimulada nas glândulas, nos dois tempos de tratamento com o hormônio. A atividade específica de DNA após a injeção do hormônio é da ordem de 3-4 vezes maior do que nos controles e ultrapassa inclusive a atividade específica máxima no desenvolvimento normal. Apesar disto, a radioatividade de lisina-^{3}H que é detectada nos géis de histonas extraídas de animais tratados com ecdisterona não difere sensivelmente daquela dos controles, e é muito menor que a detectada no desenvolvimento normal na época em que a síntese de DNA é máxima. Este resultado sugere que o tratamento hormonal, apesar de ter estimulado a síntese de DNA, não induziu síntese de histonas. Assim, estas duas sínteses não estariam sincronizadas após tratamento com ecdisterona nas condições em que foram realizadas as experiências, ao contrário do que parece ocorrer durante o desenvolvimento normal das larvas. Esta hipótese será contudo discutida mais adiante junto com outras que poderiam também explicar os resultados comentados acima.

IV. DISCUSSÃO

1. LOCAL E ÉPOCA DE SÍNTESE DE HISTONAS EM GLÂNDULAS SALIVARES

Está firmemente estabelecido que em células HeLa (Robbins & Borun, 1967) e nos estágios iniciais do desenvolvimento do embrião de ouriço do mar, a síntese de histonas ocorre no citoplasma durante o ciclo de replicação celular. Em contraste com estes dados, existem evidências de que a síntese de histonas é nuclear em células de timo de bezerro (Reid & Cole, 1964; Reid et al., 1968). Quando se toma em consideração as peculiaridades de estrutura e replicação de núcleos politênicos, quando comparados com núcleos diplóides normais, é razoável esperar diferenças entre as características de síntese de histonas nos dois sistemas. De fato, incorporação de aminoácidos radioativos por núcleos politênicos foi detectada por uma série de investigadores (Sirlin & Schor, 1962a; Sirlin & Schor, 1962b; Ristow & Arends, 1968; Helmsing, 1970; Cestari & Pavan, 1970). Este achado pode significar que tais núcleos são ativos na síntese de proteínas a qual pode incluir histonas, embora seu significado não tenha ainda sido elucidado. Helmsing (1971), entretanto, inferiu de seus dados que a síntese de histonas em células politênicas de glândulas salivares de larvas de D. hydei deve ser citoplasmática.

Os resultados resumidos na Tabela III bem como nas Figuras 2, 3 e 4 indicam que similarmente com o que ocorre em células normais, a síntese de histonas em células politênicas, ocorre no citoplasma, e que pelo menos na sua maior parte, essa síntese deve estar acoplada à de DNA. Isto é demonstrado tanto no caso do desenvolvimento normal bem como quando do tratamento com hidroxiuréia a qual bloqueia ambas as sínteses. Foi determinado aqui que em células de glândulas salivares de Rhynchosciara americana, histonas são sintetizadas em polissomos contendo 3-4 ribossomos (110-130S). Tais polissomos são levemente menores que os descritos como sendo ativos na síntese de histonas em células diplóides normais (Nemer & Lindsay, 1969). Entretanto, os experimentos mostrados aqui não oferecem nenhuma indicação sobre a natureza dessa diferença.

Por outro lado, experimentos não mostrados nesta tese, permitiram isolar destes polirribossomos um RNA de coeficiente de sedimentação em sacarose, compreendido entre 8 e 10S, que não é detectado em polissomos maiores. A determinação de sequências de ácido poliadenílico (poli(A)), pelo procedimento de Lara & Okretic (1975), em RNAs de baixo peso molecular, rapidamente marcados e extraídos da fração microssomal de glândulas de larvas de 5º período, indica que nos géis de agarose, a região de peso molecular correspondente a coeficientes de sedimentação 8-10S em sacarose, é particularmente deficiente em

poli(A), o que coincide com o achado de Adesnik & Darnell (1972) para mRNA de histonas. Estes dados adicionais confirmam a função em 5º período dos polirribossomos leves de glândulas salivares.

2. CARACTERIZAÇÃO DE HISTONAS DE GLÂNDULAS SALIVARES DE RHYNCHOSCIARA

As mobilidades relativas das cinco bandas principais de proteínas básicas extraídas de núcleos ou de cromatina de glândulas salivares de Rhynchosciara são semelhantes às de histonas de timo de bezerro, bem como às de outros insetos (vide Tabela IV). A origem dessas proteínas, seu comportamento eletroforético e propriedades tintoriais dos respectivos complexos com negro de amido, bem como seus pesos moleculares, permitiram identificar estas proteínas como sendo histonas.

As proteínas básicas de Rhynchosciara cuja mobilidade eletroforética é igual à das histonas ARE e GRK de timo, foram identificadas como as correspondentes do diptero em vista da conhecida estabilidade de estrutura primária que essas proteínas apresentam ao longo da evolução (DeLange et al., 1969b; Hooper et al., 1973); as outras proteínas de Rhynchosciara foram identificadas por comparação com os padrões eletroforéticos obtidos por outros autores em dipteros e outros insetos (Cohen & Gotchel, 1971; Oliver & Chalkley, 1972a; McMaster-Kaye, 1973; Franco et al., 1974) bem como por suas propriedades tintoriais

com negro de amido a 450 e 700 nm. A impossibilidade de fracionar quimicamente as histonas de Rhynchosciara por processos baseados nas diferenças de solubilidade de várias frações em solventes diferentes (Johns, 1964; Oliver et al., 1972), impediram a análise de aminoácidos destas proteínas.

As pequenas diferenças observadas entre as mobilidades eletroforéticas das histonas KAP, LAK e KAS e as correspondentes de outros organismos inclusive insetos, são esperadas em vista do que se conhece sobre a variação de mobilidades destas proteínas ao longo da escala evolutiva (Panyim et al., 1971).

A histona KAP de Rhynchosciara possui mobilidade eletroforética menor que a de timo de bezerro, como ocorre com essa histona em outros insetos (vide Tabela IV), apoiando a idéia de que esta seria uma característica da histona KAP dessa classe de animais. A razão deste retardamento parece ser devida tanto a um peso molecular levemente maior, como também a um menor conteúdo de resíduos básicos, características estas que também foram observadas na mesma histona de Drosophila (Cohen & Gotchel,1971; Oliver & Chalkley, 1972a). Provavelmente estas características da histona KAP de insetos, não estão relacionadas com peculiaridades da estrutura cromossômica, já que não foram notadas diferenças entre a histona KAP obtida de células politênicas ou de células diplóides normais de Drosophila (Cohen & Gotchel, 1971).

3. SÍNTESE DE HISTONAS DURANTE O ÚLTIMO CICLO DE REPLICAÇÃO EM GLÂNDULAS SALIVARES

Os resultados obtidos do estudo de incorporação de lisina-^{3}H durante o último ciclo de replicação em glândulas salivares de R. americana está sumarizado nas Figuras 12 a 16. Chama a atenção nestas figuras o aspecto monótono da relação entre síntese de DNA e a de histonas. A variação de histonas na cromatina das glândulas durante o desenvolvimento (Figuras 14 e 15) ocorre de forma a que a relação entre as várias histonas se mantenha constante (Figura 12).

O acúmulo de massa (Figura 14A) e de radioatividade (Figura 14B) (histonas recém sintetizadas) das bandas de histonas estudadas parece ocorrer de forma a que as proporções relativas não se alterem durante o desenvolvimento (Figura 12). As curvas obtidas para a variação de atividade específica (Figura 15) indicam que seu máximo de síntese coincide com a de DNA, e com a época de abertura máxima do "puff" 2B no cromossomo B, concordando com os resultados obtidos em polirribossomos (Figuras 2, 3 e 4). De maneira geral as curvas de atividade específica de histonas seguem a de DNA (Figura 3), apesar de que podem estar afetadas de erros quantitativos; não foram feitas medidas da variação do "pool" de lisina no intervalo em que se realizou a experiência, bem como não foram feitas correções que levassem em conta a variação do conteúdo de lisina das bandas estudadas. De qualquer forma, como a

experiência foi realizada sem a intenção de medir velocidades absolutas de síntese, mas sim para observar o comportamento relativo da síntese de algumas bandas durante o desenvolvimento, as curvas da Figura 15 podem ser aceitas como indicadoras de que a síntese das histonas estudadas varia da mesma forma.

As experiências descritas foram efetuadas já que a potencial função regulatória de histonas poderia ser revelada por variações na relação entre atividades específicas, bem como nas proporções relativas das bandas de histonas estudadas. Este estudo pode ser realizado em condições muito favoráveis dada a extensão do último ciclo de replicação de DNA nas glândulas salivares de R. americana. Dados bioquímicos (Cordeiro & Meneghini, 1973) e citológicos (Machado-Santelli & Basile, 1975), mostram que a síntese de DNA durante esse ciclo dura seis dias e é extremamente lenta. Tendo em vista a duração da fase S em outros sistemas, como por exemplo células HeLa (7 a 9 horas; Defendi & Manson, 1963) e ouriço do mar (15 minutos a 15°C; Hinegardiner et al., 1964), percebe-se que o sistema empregado permite acompanhar com mais detalhes as possíveis alterações nos padrões de histonas a medida que ocorre a síntese de DNA. Os resultados obtidos nesta experiências indicam que todas as frações de histonas estudadas se comportam de forma aproximadamente igual durante as notáveis variações fisiológicas que ocorrem na glândula salivar no último ciclo de replicação.

Estes resultados aparentemente coincidem com vários dados obtidos em outros sistemas. Assim por exemplo, sabe-se que na maior parte dos organismos superiores, o DNA se complexa com uma quantidade aproximadamente igual de histonas, embora as proporções dos outros componentes cromossômicos possam variar de organismo para organismo (Zubay, 1964). Além disto, as proporções relativas de histonas não se alteram durante o ciclo celular de mamíferos (Gurley & Hardin, 1968) nem durante o desenvolvimento do embrião de Xenopus (Destrês et al., 1973). Resultados semelhantes foram obtidos em Drosophila por Cohen & Gotchel (1971) que não encontraram diferenças entre os padrões de histonas de células diplóides normais (discos imaginais) e de células politênicas (glândulas salivares). Oliver & Chalkley (1972b) tampouco detectaram alterações nas proporções relativas entre as histonas de larvas e de animais adultos do mesmo diptero. Além disto, o estudo da síntese de histonas de fígado em regeneração, mostra que a maior parte das frações varia suas velocidades de síntese aproximadamente ao mesmo tempo. Durante o desenvolvimento de glândula mamária ao final da gravidez e início da lactação, existem somente pequenas diferenças nos padrões de síntese de uma histona para outra. Também após a infecção viral de células HeLa, tanto as histonas ricas em lisina, como as ricas em arginina, exibem aumento similares em suas velocidades de síntese (res. citados em Stellwagen & Cole,1969).

Este comportamento monótono das frações de histonas observado ao longo do ciclo celular de vários

organismos, bem como a extrema conservação das suas sequências de aminoácidos ao longo da evolução, sugerem que o papel dessas proteínas possa estar relacionado com uma função primária, tal como a de manter a estrutura cromossômica. Entretanto, não pode ser descartada a hipótese, cada vez mais apoiada por dados experimentais, de que a modificação química de histonas ao alterar sua interação com o DNA na cromatina, exerça papel regulatório mais sofisticado na expressão do genoma de eucariotos.

A observação de que parte do aumento geral de síntese de DNA que ocorre na época do aparecimento dos "puffs" nos cromossomos das glândulas salivares de R. americana, se deve a amplificação de regiões determinadas do genoma* (Rudkin & Corlette, 1957; Fick & Pavan, 1957; Meneghini et al., 1971), permite supor que se alguma das histonas identificadas pelos critérios expostos na secção anterior tivesse função especial na formação de "puffs" de DNA, ter-se-ia detectado alguma diferença em seus padrões de acúmulo ou síntese quando comparados com os das outras histonas. Isto entretanto, não ocorreu nos experimentos realizados e pode significar que o complemento de histonas, bem como as proporções relativas dessas proteínas nas regiões amplificadas, são iguais à daquelas que se replicam normalmente. Além disto, a igualdade de comportamento das frações de histonas estudadas durante o último ciclo de replicação em glândulas salivares, sugere que o mecanismo

* Amplificação não implica necessariamente em formação de "puffs" (Berendes & Lara, 1975).

que controla sua síntese seja igual para todas elas. Provavelmente esse processo de controle seria exercido ao nível transcripcional, já que evidências recentes mostram que em células de cultura nas quais foi inibida a síntese de DNA, existe no citoplasma a maquinária necessária para permitir que mRNA exógeno de histonas seja traduzido com a eficiência da mesma célula na fase S normal (Jacobs-Lorena et al., 1973); Breindl & Gallwitz, 1974).

A observação de Birnstiel et al. (1973) de que o mRNA total de histonas de ouriço do mar hibridiza em uma região restrita do cromossomo 2 de glândula salivar de D. melanogaster (região 2L 39 D-E), aliada à de Pardue (citado em Elgin & Weintraub, 1975) de que frações individuais de mRNA de histonas hibridizam nessa mesma região, sugere que os cistrons para as várias histonas estariam distribuídos em regiões contíguas do genoma, de forma análoga com o que ocorre com os cistrons de rRNA (Elgin & Weintraub, 1975). Recentemente esta idéia foi confirmada através de técnicas que empregam enzimas de restrição, por Weinberg et al. (1975). Estes autores mostraram que no genoma do ouriço do mar Stronguocentrotus purpuratus, os cinco genes que codificam para histonas estão sequencialmente distribuídos em um segmento repetitivo de 3,95 x 10^6 daltons. Esta disposição topológica dos genes de histonas poderia explicar o comportamento uniforme das bandas de histonas estudadas em Rhynchosciara.

4. PROVÁVEL MODIFICAÇÃO QUÍMICA EM HISTONAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

As bandas I e II assinaladas nos géis da Figura 13 foram analisadas separadamente. Essas bandas podem corresponder ou a uma contaminação por proteínas básicas não histonas, ou bem podem ser produtos de modificação química de histonas que ocorram na glândula durante o período em que as larvas foram estudadas. Para discernir entre uma ou outra possibilidade, determinou-se a variação de atividades específicas ao longo do desenvolvimento. Se alguma dessas bandas é produto de modificação química da histona original, espera-se que a única consequência desta alteração seja uma correspondente alteração de mobilidade eletroforética, já que essas modificações químicas são eventos pós-sintéticos (Allfrey, 1966). As variações de velocidade de síntese ao longo do período estudado devem ser portanto as mesmas da histona (ou histonas) original (ou originais). A Figura 16 mostra a variação de atividades específicas das bandas I (as suas duas sub bandas de I e II foram analisadas juntas porque não se resolveram os respectivos picos de densidade óptica) e II. A figura mostra claramente que enquanto a variação de atividade específica da proteína I difere da das histonas, a da banda II varia de forma extremamente parecida à das histonas ARE+ LAK + KAS (ver Figura 15). Este fato sugere que a proteína II seja uma histona cuja mobilidade eletroforética tenha sido alterada por alguma das modificações químicas que

foram descritas para histonas: fosforilação, acetilação ou metilação. Estas modificações químicas tendem a reduzir a mobilidade eletroforética de histonas em sistemas de eletroforese como o empregado nestas experiências. Assim, a fosforilação ocorre por esterificação de resíduos de serina (Langan, 1968a; Langan, 1968b), de treonina (Ord & Stocken, 1966) e de histidina (Smith et al., 1973). Percebe-se que a introdução de grupos de caráter ácido como fosfato, deve diminuir a carga positiva resultante da molécula modificada, reduzindo su mobilidade catódica. Por outro lado, a metilação (Allfrey et al., 1964; Murray, 1964; DeLange et al., 1969b) e acetilação (Vidali et al., 1968; Gershey et al., 1968; DeLange et al., 1969a; DeLange et al., 1969b), que ocorrem em $-NH_2$ de resíduos de lisina, tendem a destruir o caráter básico deste resíduo (DeLange et al., 1969a). Nos dois casos, o grupo substituinte impede a ionização do nitrogênio a nitrogênio quaternário no baixo pH dos sistemas de eletroforese em que são analisadas histonas; como consequência disto, a carga positiva total da histona modificada bem como sua mobilidade catódica decrescem. Estas considerações, aliadas ao fato de que a fosforilação ocorre quase que exclusivamente na histona KAP (Ord & Stocken, 1968; Stevely & Stocken, 1968), permitem concluir que se o pico II detectado em glândulas salivares durante a parte final do desenvolvimento de larvas de R. americana (Figura 13) for uma histona modificada, esta deve corresponder a uma das histonas que migram na banda ARE + LAK + KAS modificada por metilação ou acetilação. Não foram realizados experimentos para determinar a natureza da histona

modificada ou a classe de modificação nela efetuada. Entretanto, a correlação encontrada entre o pico II (Figura 13) e o aumento de síntese de DNA que ocorre nas glândulas salivares, ao final da vida larval, permitem sugerir que esse pico possa corresponder a uma das histonas da banda ARE + LAK + KAS modificada por acetilação. Esta sugestão se apoia na observação de que formas acetiladas da histona ARE aumentam a medida que aumenta a síntese de novos núcleos em embriões de Xenopus (Adamson & Woodland, 1974), em embriões de ouriço do mar (Hill et al., 1971) e em tecidos de vertebrados (Panyim et al., 1971; Noland et al., 1971; Shepherd, 1973), assim como nos resultados de Allfrey (1971), os quais associam a acetilação de histonas ricas em arginina com a ativação gênica e mudança na capacidade de "template" na cromatina.

Contrastando com os resultados de Allfrey (1971) que associa a acetilação de histonas ricas em arginina com a ativação gênica e mudança na capacidade de "template" da cromatina, Clever & Ellgaard (1970), trabalhando com células politênicas não detectaram incorporação de acetato-^3H em "puffs" de RNA normais ou induzidos por calor ou ecdisona nem Chironomus nem em Drosophila. Esses autores concluem em vista desses resultados, que o estímulo de loci previamente reprimidos não envolve acetilação anterior de histonas.

Os resultados mostrados aqui indicam que a banda II pode ser correlacionada principalmente com a época

dos grandes "puffs" da glândula salivar e com a pupa larval de Rhynchosciara. Se a banda II for uma histona acetilada, este resultado pode indicar, em vista daquele de Clever & Ellgaard (1970), que os processos que levaria à abertura dos "puffs" de DNA e RNA seriam diferentes.

5. EFEITO DE ECDISTERONA NA INCORPORAÇÃO DE LISINA-^{3}H EM HISTONAS EXTRAÍDAS DE CROMATINA DE GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DE 2º PERÍODO

Ecdisona e seu derivado hidroxilado, a 20-hidroxiecdisona ou ecdisterona, são substâncias ativas como hormônios na muda larval de insetos. Em Diptera, as outras respostas observadas por efeito desses compostos são a formação de pupário e a indução de "puffs". A indução de "puffs" em Drosophila e Chironomus vem acompanhada de um aumento na síntese de RNA e estes efeitos são detectáveis 15 minutos apos o tratamento hormonal (Clever, 1966; Berendes, 1967; Ashburner, 1973). Em Sciara coprophila (Crouse, 1968), Rhynchosciara hollanderi (Stocker & Pavan, 1974) e em Rhynchosciara americana (Berendes & Lara 1975) o tratamento de larvas na metade do 4º estádio com o hormônio da muda, é seguido de um aumento do número de núcleos em replicação muitos dos quais mostram amplificação de DNA em alguns "loci" cromossômicos ("puffs" de DNA). Este feito é relativamente tardio, já que se ele se torna evidente aproximadamente 24 horas após a injeção do hormônio. As modificações cromossômicas que se observam por

tratamento com ecdisona e análogos, são similares às que ocorrem durante o último ciclo de replicação durante o desenvolvimento normal das larvas, embora existam diferenças aparentes na quantidade de DNA sintetizado nas regiões amplificadas bem como na relação temporal entre os "puffs" que se desenvolvem nas diferentes regiões dos cromossomos (Stocker & Pavan, 1974; Berendes & Lara, 1975).

A amplificação induzida por ecdisona, parece ser dependente de síntese "de novo" de RNA e ser precedida de um acúmulo de proteínas não histonas nos "loci" de amplificação nos cromossomos de glândulas salivares de R. americana (Berendes & Lara, 1975). Swift (citado em Rudkin, 1964) mostrou evidências de que existe também acúmulo de histonas em "puffs" de DNA em um sciarídeo relacionado com R. americana, durante o desenvolvimento normal. Este acúmulo se deve provavelmente ao real aumento da síntese de histonas que se verifica na época em que ocorre amplificação nas glândulas salivares desse diptero.

As considerações feitas a respeito do papel de ecdisona na indução de replicação e amplificação, bem como a respeito da correlação entre estes dois fenômenos e o aumento da síntese de histonas no desenvolvimento normal, sugerem que o tratamento hormonal de larvas na metade do 4º estádio provoque da mesma forma aumento da síntese de histonas. Para testar esta idéia, foram efetuadas as experiências preliminares que estão resumidas nas Figuras 17, 18 e na Tabela VII. Os resultados obtidos mostram que

o hormônio ecdisterona provocou enorme aumento na síntese de DNA tal como esperado (Tabela VII). Apesar disto, a radioatividade de lisina-^{3}H incorporada em histonas não difere significativamente daquela dos controles dessas experiências e é muito menor que a incorporada em histonas de 5º período no desenvolvimento normal, época em que a atividade específica do DNA das glândulas é da ordem de duas vezes menor que a observada após tratamentos prolongados com ecdisterona. Como estes experimentos são preliminares não é possível discernir no momento as causas do efeito hormonal observado. Tentativamente contudo, podem se imaginadas algumas explicações:

a) A síntese de DNA foi induzida sem que houvesse indução concomitante da síntese de histonas, ou seja, o hormônio provocou defasagem de duas sínteses que eram acopladas na última fase de replicação do desenvolvimento normal. Os efeitos de ecdisonas e análogos na síntese de proteínas em tecidos de insetos, consistem em estímulo dessa síntese, efeito este que entretanto, é de curta duração (Neufeld et al., 1968), já que o nível de síntese retorna ao dos animais controles antes de que a produção de proteínas específicas, tais como DOPA descarboxilase (7 a 10 horas após a administração de ecdisona; Karlson & Sekeris, 1966), seja significativa.

Por ocasião da indução de "puffs" com ecdisona em glândulas salivares de dipteros, o aumento da ligação de corantes tais como "fast green" ácido, amarelo naftol S e azul de toluidina nos "loci" de presumíveis"puffs", não se deve a um aumento de síntese de proteínas ácidas,mas provavelmente a uma redistribuição dessas proteínas para regiões ativadas (Berendes, 1973). Em glândulas salivares de larvas de 2º período de Rhynchosciara , a síntese geral de proteínas 48 horas após a injeção de ecdisterona não difere significativamente da observada nos controles, embora algumas proteínas não identificadas tenham sido induzidas (Winter, C.E., resultados não publicados). Em resumo, o hormônio da muda larval, deve ter duas fases distintas de influência na síntese de proteínas. Um efeito envolve em certos estágios suscetíveis do desenvolvimento, o estímulo geral, não seletivo e transitório da síntese de proteínas. Provavelmente este efeito não requer participação gênica. O outro efeito é específico para determinados tecidos e estágios do desenvolvimento e envolve a síntese de proteínas específicas por tempos prolongados (Thomson, 1974).

A julgar por estas considerações, é provável que a síntese de histonas em glândulas salivares de Rhynchosciara, possa não ter sido alterada por efeito hormonal, provocando desacoplamento entre sua síntese e a de DNA.

b) A ecdisterona teria induzido síntese de histonas concomitantemente com a de DNA, mas além deste efeito, o hormônio teria também alterado a interação dessas

proteínas com DNA, de forma a que elas fossem mais facilmente removíveis durante os processos de isolamento e purificação da cromatina. Esta idéia pode apoiar-se na observação de que durante o ciclo celular normal, a retenção de histonas pela cromatina é variável em células de cultura (Gurley & Hardin, 1970; Krause et al., 1974) e que esta retenção é menor durante a fase S do que durante a mitose (Stein et al., 1975). Se isto tiver ocorrido em Rhynchosciara por ação de ecdisterona, provavelmente este efeito não se deve à interação direta entre o hormônio e histonas, já que as evidências recentes obtidas em outros sistemas sugerem que histonas não são as candidatas mais indicadas para a interação (específica de tecidos) entre hormônios esteróides e cromatina (Hnlica et al., 1974), sendo possível que a remoção de histonas durante a fase S fosse mediada por proteínas não histonas fosforiladas (Stein et al., 1975).

c) O transporte de histonas recém sintetizadas para o núcleo tivesse sido alterado por um provável efeito de ecdisterona sobre a permeabilidade de membranas (Kroeger & Lezzi, 1966). Além destas hipóteses para explicar a relativamente baixa recuperação de radioatividade da cromatina de animais tratados com o hormônio, seria possível argumentar que este resultado poderia ter sido provocado pela indução de proteases por efeito de ecdisterona. Ou seja, a síntese de histonas e sua deposição sobre a cromatina teria acompanhado a síntese induzida de DNA, mas este efeito não seria perceptível devido à ação de proteases

também induzidas que teriam agido durante a preparação da cromatina. Esta idéia porém, não parece ser a mais provável. Resultados obtidos neste Laboratório (Winter, C.E. resultados não publicados) ao estudar a síntese de proteínas de glândulas salivares de larvas de 2º período após tratamentos prolongados com ecdisterona, mostram que embora tenha havido indução de algumas proteínas não identificadas, os eletroferogramas obtidos de animais controles e dos tratados com o hormônio, não mostram diferenças qualitativas ou quantitativas significantes. Assim, se os resultados obtidos na incorporação de lisina-^{3}H após tratamento com ecdisterona podem ser explicados por alguma das três hipóteses discutidas acima, é possível sugerir então que a cromatina produzida por efeito hormonal em glândulas salivares de larvas de 2º período seja deficiente em histonas recém sintetizadas, analogamente ao que ocorre em glândulas salivares de Chironomus (Darrow & Clever, 1970) em Chlorella (Wanka et al., 1972) e em células HeLa (Weintraub, 1972 e 1973; Seale & Simpson, 1975) quando se inibe a síntese de histonas com cicloheximida. Se a interpretação dos dados obtidos em Rhynchosciara for correta, então ter-se-á encontrado um ótimo sistema para o estudo da síntese de DNA na ausência de histonas. Experiências com tal sistema poderiam fornecer dados bastante valiosos a respeito do papel destas proteínas nos processos de replicação e amplificação de DNA em células politênicas.

Outro efeito verificado ao induzir a síntese de DNA com ecdisterona em glândulas salivares de larvas

do 2º período, pode ser observado nos perfís de radioatividade das Figuras 17 e 18. Estas se referem à incorporação de lisina-^{3}H em histonas extraídas da cromatina de glândulas salivares, após tratamento com o hormônio durante 34 e 44 horas respectivamente. Na Figura 17B nota-se um acúmulo prerencial de radioatividade na região correspondente à histona KAP e desaparecimento de um pico na região onde migram as histonas ARE, LAK e KAS. O perfil resultante do tratamento com ecdisterona, se assemelha contudo, a um dos obtidos durante o desenvolvimento normal (Figura 13D), onde o pico de radioatividade mais proeminente é o que corresponde à histona KAP. O fato de que a radioatividade sobre o pico dessa histona na Figura 17B, seja aproximadamente igual à da região correspondente no perfil controle (Figura 17A) e que a radioatividade total na região de histonas dos perfis, também seja semelhante (vide Tabela VII), dificultam a interpretação deste resultado. Com relação à Figura 18, observa-se que no perfil resultante de tratamento hormonal durante 44 horas, a radioatividade da região correspondente às histonas ARE + LAK + KAS diminui apreciavelmente no gel de histonas obtidas de animais tratados com ecdisterona, mas cresce consideravelmente na região do pico assinalado como II_e, cuja mobilidade é coincidente com a do pico II do desenvolvimento normal (Figura 13E). O perfil de radioatividade observado na Figura 18B, não possui equivalente no desenvolvimento normal das larvas. Este tipo de experiência não oferece nenhuma indicação a respeito da natureza desta banda de radioatividade. Entretanto, a observação

de que o pico II_e possui a mesma mobilidade eletroforética que o pico II (Figura 13) o qual foi tentativamente identificado como uma das histonas da banda ARE + LAK + KAS modificada, e o fato que a radioatividade desse pico (II_e) aumente ao mesmo tempo em que ocorre queda de radioatividade na região em que migram as histonas ARE, LAK e KAS (Figura 18B) parecem reforçar a idéia de que a ecdisterona induziu modificação química de uma das histonas ricas em arginina dando lugar ao pico II_e; a modificação mais provável, em vista do que foi comentado para o pico II, seria a acetilação.

A discussão de um resultado deste tipo em função dos resultados disponíveis na literatura recente, se torna complicada em vista da escassez de informações sobre o assunto. O problema se complica no que se refere a sistemas politênicos, quando as poucas informações sobre o efeito do hormônio da muda larval em histonas, ou são contraditórias ou devem ser encaradas com cautela. Assim, por exemplo, Cohen & Gotchel (1969) obtiveram ao estudar a incorporação de leucina-^{3}H em histonas de glândulas salivares de Drosophila após incubação com ecdisona, um resultado análogo ao obtido em Rhynchosciara, ou seja, desaparecimento de radioatividade numa banda principal e concomitante aumento de incorporação em outra banda não correspondente a histonas. Este resultado porém, não foi confirmado por Helmsing & van Eupen (citado em Berendes, 1972) os quais estudaram também o efeito do mesmo hormônio em histonas de glândulas

salivares de Drosophila hydei. Da mesma forma, Elgin & Boyd (1975) ao estudar os perfis de densidade óptica de proteínas da cromatina em glândulas salivares de Drosophila tratadas com ecdisona durante 30 minutos, relatam que não ocorrem variações de nenhum tipo nos perfis correspondentes a histonas. Este resultado além de óbvio não contribui para aclarar o problema, de vez que seria extremamente difícil detectar qualquer variação de massa após esse curto tempo de tratamento hormonal.

Outros resultados obtidos em Chironomus não conseguem relacionar o fenômeno da formação de "puffs" em glândulas salivares, com a acetilação de histonas após tratamento com o hormônio da muda larval (Clever & Ellgaard, 1970). Estas observações provêm de dados autorradiográficos e o fato de que não se tenha detectado acúmulo preferencial de grãos de acetato-^{3}H sobre os "puffs" de RNA induzidos por ecdisona, não significa necessariamente que o mecanismo de abertura desses "puffs" seja independente da acetilação de histonas ou de qualquer outra proteína cromossômica.

Os processos de fixação inicialmente empregados nas preparações de cromossomos politênicos, para tentar correlacionar acetilação e formação de "puffs" por técnicas autorradiográficas, se baseavam no uso de soluções fixadoras compostas de ácido acético e etanol (Clever, 1967; Ellgaard, 1967). Certamente, os resultados assim obtidos não são inteiramente confiáveis devido à

extrema solubilidade de histonas em ácido acético (Allfrey et al., 1968). Por outro lado, a substituição do fixador mencionado, por outros que empregam ácido pícrico ou formaldeído no estudo da provável correlação entre acetilação de histonas e formação de "puffs" induzidos ou não em Drosophila e Chironomus (Clever & Ellgaard, 1970), pode igualmente conduzir a interpretações não de todo corretas. Embora o uso de ácido pícrico ou formaldeído minimize as perdas de radioatividade de acetato-^{3}H nas preparações de cromossomos, Clever & Ellgaard (1970) não efetuaram controles sobre uma possível redistribuição de histonas ao longo dos "loci" cromossômicos por efeito desses fixadores. Sabe-se por exemplo, que essa redistribuição ocorre em forças iônicas relativamente baixas de NaCl (Clark & Felsenfeld, 1971, citado em Clark & Felsenfeld, 1972). Este efeito introduziu certas ambiguidades quando se tratou de determinar a histona ou histonas responsáveis pela conformação característica do DNA na cromatina (vide INTRODUÇÃO), e não é improvável que os resultados autorradiográficos discutidos antes, possam estar afetados por ele. Em Rhynchosciara entretanto, os dados obtidos por tratamento com ecdisterona, parecem concordar com o que se conhece sobre acetilação de histonas e síntese de RNA em sistemas não politênicos. O tratamento com este hormônio durante 44 horas, além de induzir "puffs" de DNA, aumenta apreciavelmente a incorporação de uridina-^{3}H em todas as classes de RNA extraído da região proximal das glândulas salivares de larvas em inídio de rede (Alvarenga, C.A.S. resultados não

publicados), o que sugere um aumento geral da síntese de RNA induzida por ecdisterona. Assim, se o pico II_e da Figura 18B corresponder à acetilação de uma das histonas de banda ARE + LAK + KAS, então ter-se-á encontrado em Rhynchosciara a mesma relação determinada em outros sistemas para essa modificação química de histonas e a síntese de RNA (Allfrey & Mirsky, 1963; Allfrey et al., 1964; Allfrey, 1968), relação esta provocada inclusive por estímulos tais como hepatectomia parcial (Pogo et al., 1968) e tratamento com fitohemaglutinina (Pogo et al., 1967).

O fato de que a provável relação entre acetilação de histonas e formação de "puffs" sugerida em R. americana, não tenha sido observada em Drosophila ou Chironomus, poderia por outro lado ser atribuída a prováveis diferenças nos mecanismos de formação de "puffs de DNA e RNA.Se ecdisterona induz realmente a acetilação de histonas ricas em arginina em R. americana, seria interessante obter informações a respeito da influência deste hormônio na atividade das respectivas acetiltransferases.

O aumento do grau de acetilação de histonas em células de cultura, não se deve a um aumento na atividade dessas enzimas (Noland et al., 1971), mas provavelmente à maior disponibilidade de substrato (histonas recém sintetizadas)durante a fase S (Shepherd, 1973). Então na hipótese já comentada, de que ecdisterona não induzisse síntese de histonas em Rhynchosciara, o possível aumento de acetilação verificado sob influência hormonal poderia ser

atribuído à variação de atividade de acetiltransferase, de forma análoga ao que ocorre com as fosforilases da histona KAP em células de cultura (Langan, 1971) e em P. polycephalum antes da divisão celular.

O conjunto dos dados apresentados nas Figuras 17 e 18 mostram um efeito diferencial após 34 e 44 horas de tratamento com ecdisterona. Este se traduz em um acúmulo preferencial da histona KAP e no aparecimento posterior de uma banda de radioatividade que foi tentativamente identificada como uma histona modificada por acetilação. Estes resultados obtidos após os prolongados tempos de exposição ao hormônio, sugerem uma sequência de eventos que podem ser correlacionados com o aparecimento dos "puffs" de DNA. Na realidade os dois eventos mencionados aparentemente também foram observados durante o desenvolvimento normal, o que confere aos resultados obtidos com ecdisterona uma maior credibilidade.

Para finalizar, deve afirmar-se que os resultados obtidos com ecdisterona merecem no futuro um enfoque experimental mais detalhado. A metodologia empregada aqui, bem como as características favoráveis do sistema Rhynchosciara, permitem prever a obtenção de resultados conclusivos que poderão contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de ação do hormônio da muda larval ao nível de histonas, bem como a relação destes processos na formação dos"puffs" de DNA em cromossomos politênicos.

V. RESUMO

Histonas de glândulas salivares de larvas de Rhynchosciara americana foram extraídas de preparações de núcleos e de cromatina purificada e analisadas por eletroforese em géis de acrilamida. As mobilidades eletroforéticas das histonas ARE e GRK são idênticas e as das histonas KAP, LAK e KAS são levemente diferentes das histonas correspondentes encontradas em vertebrados. É particularmente interessante o comportamento da histona KAP de R. americana, que possui em géis de poliacrilamida mobilidade menor que a histona correspondente do timo de bezerro. Verificou-se, por análise em géis de poliacrilamida-SDS que o peso molecular desta histona é igual a 33.000 daltons, valor maior que o da histona correspondente de timo de bezerro e de outros vertebrados (21.000 a 25.000 daltons). Este resultado coincide com dados obtidos por outros investigadores em Drosophila e Acheta. Isto sugere que o maior peso molecular da histona KAP possa ser uma característica geral dos insetos.

Verificou-se, por experimentos da dupla marcação com lisina-^{14}C e triptofano-^{3}H, que a síntese de histonas em glândulas salivares de larvas de R. americana, ocorre no citoplasma em pequenos polirribossomos contendo 3-4 ribossomos. Estes polirribissomos são particularmente ativos na síntese de histonas por ocasião da abertura

máxima do puff B-2 na extremidade proximal da glândula, quando é máxima a síntese de DNA. O estudo da síntese das várias frações de histonas durante os 6-7 dias finais do período larval mostra um estreito acoplamento entre a síntese dessas frações e a do DNA. Não foram detectadas variações relativas na síntese de nenhuma das frações de histonas durante este período. Os resultados deste estudo sugerem também que algumas das frações de histonas são modificadas durante o desenvolvimento. Estas modificações podem ser correlacionadas com o aparecimento dos "puffs de DNA" nos cromossomos das células glandulares. Foi também estudada a síntese de histonas em larvas jovens (fim do segundo período do 4º estádio) injetadas com ecdisterona. Observou-se, conforme esperado de resultados anteriores, que a injeção do hormônio causou grande estímulo na síntese de DNA. Contudo, não houve estímulo apreciável na síntese de histonas. Estes resultados sugerem que a cromatina formada nestas condições é deficiente em histonas.

Nestas experiências notou-se também, que após tratamentos com hormônio durante 44 horas ocorre uma profunda modificação nos perfis de radioatividade de histonas recém sintetizadas analisadas em géis de poliacrilamida. Sugere-se que a alteração desses perfis se deva à modificação química de alguma histona induzida pelo hormônio.

SUMMARY

The histones of the salivary gland of Rhynchosciara americana larvae were extracted from both nuclear and purified chromatin preparations and then analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. The electrophoretic mobilities of the ARE and GRK histones are identical and those from the KAP, LAK and KAS histones are slightly different from the corresponding calf thymus histones.

The behavior of the Rhynchosciara KAP histone is particularly interesting. In normal polyacrylamide gels it has a smaller mobility than that observed for the same protein from calf thymus. It was found by analysis in SDS-polyacrylamide gels that the molecular weight for this histone is approximately 33000 dalton, a value which is higher than that found for the same histone obtained from calf thymus and other vertebrates (21-25000 dalton). This result is in agreement with those observed in Drosophila and Acheta, and suggests that the molecular weight of the KAP histone could be a characteristic feature for insects.

Double label experiments with ^{14}C-lysine and ^{3}H-tryptophan show that histone synthesis in Rhynchoschiara salivary glands occurs in the cytoplasm in small polyribosomes containing 3-4 ribosomes. These polysomes

are particularly active in the synthesis of these proteins at the time when the degree of opening of the 2B puff is maximal in the proximal cells of the gland, i.e. when the DNA synthesis in the gland reach a maximum.

The study of the synthesis of the different histone fractions during the last 6-7 days of the larval period shows a tight coupling between the synthesis of these fractions and that of DNA. However, variations in the relative proportions of those proteins during this period of larval development was not detected.

The results of this study also suggest that a histone or histones are chemically modified during the development. These modifications can be correlated with the appearance of DNA puffs in the salivary gland.

The study of histone synthesis was also carried out with younger larvae (end of the 2nd period of the 4th instar) treated with ecdysterone. It was found, as expected from previous results, that the hormone caused a great increase in the rate of DNA synthesis in the gland. Despite this, there was not an appreciable increase in the amount of newly synthesized histones which can be extracted from gland chromatin. These results indicate that the chromatin formed in the gland under these conditions might be deficient in histones.

In these experiments it was observed a great modification in the radioactivity profile of newly

synthesized histones as analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. This change occurs 44 hours after ecdysterone treatment. Tentatively it is suggested that this alteration in the radioactivity profiles would be a result of a chemical modification of some histone fraction which was induced by the hormone.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, G.H.M.; Vidali, G. & Neelin, J.M. - Phosphate content of goose erythrocyte histones. Canad. J. Biochem. (1970), 48: 33-37.

Adamson, E.D. & Woodland, H.R. - Histone sysnthesis in early amphibian developemnt: Histone and DNA synthesis are not co-ordinated. J. Mol. Biol. (1974), 88: 263-285.

Adesnik, M. & Darnell, J.E. - Biogenesis and characterization of histone messenger RNA in HeLa cells. J. Mol. Biol. (1972), 67: 397-406.

Aliaga, B.P.; Pueyo, M.T.; Ponce, P.N. & Lara, F.J.S. - Isolation and characterization of polyribosomes from the salivary glands of Rhynchosciara americana. Cell Differentiation (1975), 4: 243-255.

Allfrey, V.G. & Mirsky, A.E. - Protein synthesis in isolated cell nuclei. J. Gen. Physiol. (1957), 40: 451-490.

Allfrey, V.G. & Mirsky, A.E. - Mechanisms of synthesis and control of protein and ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. (1963), 28: 247-262.

Allfrey, V.G.; Faulkner, R. & Mirsky, A.E. - The acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (1964), 51: 786-794.

Allfrey, V.G. & Mirsky, A.E. - Role of histone in nuclear function,in The Nucleohistones (Bonner, J. & Ts'o P. eds.) Holden-Day, San Francisco (1964),pp. 267-288.

Allfrey, V.G. - Proceedings of the 6th Canadian Cancer Research Confference. (Begg, R.W.; Le Blond, C.P.; Noble, R.L.; Rossiter, R.J.; Taylor, R.M. & Wallace, A.C., eds.). Pergamon Press, London (1966), 6: 313-335.

Allfrey, V.G.; Pogo, G.B.T.; Littau, V.C.; Gershey, E.L. & Mirsky, A.E. - Histone acetylation in insect chromosomes. Science (1968),159: 314-316.

Allfrey, V.G. - Changes in chromosomal proteins at times of gene activation. Fed. Proc. (1970), 29: 1447-1460.

Allfrey, V.G. - Histones and nucleohistones. (Phillips, D.M.P.,ed.) Plenum Press, London (1971), pp. 241-294.

Ansley, S.B.; Campbell, L.L. & Sypherd, P.S. - Isolation and amino acids composition of ribosomal proteins from Bacillus stearothermophilus. J. Bact. (1969), 98: 568-572.

Appels, R. & Well, J.R.E. - Synthesis and turnover of DNA-bound histones during maturation of avian red blood cells. J. Mol. Biol. (1972), 70: 425-434.

Armelin, H.A.; Meneghini, R. & Lara, F.J.S. - Extraction and characterization of newly synthesized RNA from whole cells and cellular fractions of Rhynchosciara angelae salivary glands. Biochim. Biophys. Acta(1969), 190: 358-367.

Artman, M. & Roth, J.S. - Chromosomal RNA: An artifact of preparation? J. Mol. Biol. (1971), 60: 291-301.

Ashburner, M. - Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. I. Dependence upon ecdysone concentration. Develop. Biol. (1973), 35: 47-61.

Axel, R.; Melchior, W., Jr.; Soolner-Webb, B. & Felsenfeld, G. - Specific sites of interaction between histones and DNA in chromatin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA(1974), 71: 4101-4105.

Bailey, G.S. & Dixon, G.H. - Histone IIb1 from rainbow trout. Comparison in amino acid sequence with calf thymus IIB1. J. Biol. Chem. (1973), 248: 5463-5472.

Baldwin, J.P.; Boseley, P.G. & Bradbury, E.M. - The subunit structure of the eukaryotic chromosome. Nature (1975), 253: 245-249.

Balhorn, R.; Riecke, W.O. & Chalkley, R. - Rapid electrophoretic analysis for histone phosphorylation. A reinvestigation of phosphorylation of lysine-rich histone during rat liver regeneration. Biochemistry (1971), 10: 3952-3959.

Balhorn, R.; Chalkley, R. & Granner, D. - Lysine-rich histone phosphorylation. A positive correlation with cell replication. Biochemistry (1972a), 11: 1094-1098.

Balhorn, R.; Bordwell, J.; Sellers, L.; Granner, D. & Chalkley, R. - Histone phosphorylation and DNA synthesis are linked in synchronous cultures of HTC cells. Biochem.Biophys.Res. Comm. (1972b),46: 1326-1333.

Balhorn, R.; Tamphaichitr, M.; Chalkley, R. & Granner, D.- The effect of inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis on histone phosphorylation. Biochemistry (1973), 12: 5146-5150.

Barker, K.L. - Estrogen-induced synthesis of histones and a specific nonhistone protein in the uterus. Biochemistry (1971), 10: 284-291.

Beermann, W. - Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von Chironomus tentans. Chromosoma (Berl.) (1952), 5: 139-198.

Beerman, W. - Ein Balbiani-Ring Cells Locus Einer Speicheldrüsenmutation. Chromosoma (Berl.) (1961), 12: 1-25.

Beerman, W. - Chromomeres and genes, in Results and Problems in Cell Differentiation (Beermann, W. ed.) Springer-Verlag, N.Y. (1974), 4: 1-33.

Berendes, H.D. - The hormone ecdysone as effector of specific changes in the pattern of gene activities of Drosophila hydei. Chromosoma (Berl.) (1967), 22: 274-293.

Berendes, H.D. - Synthetic activity of polytene chromosomes. Int. Rev. Cytol. (1973), 35: 61-116.

Berendes, H.D. & Lara, F.J.S. - RNA synthesis: A requirement for hormone-induced DNA amplification in Rhynchosciara americana. Chromsoma (Berl.) (1975), 50: 259-274.

Birnstiel, M.L. & FLAMM, W.G. - Intranuclear site of histone synthesis. Science (1964), 145: 1435-1437.

Birnstiel, M.L.; Weinberg, E.S. & Pardue, M.L. - Evolution of 9S mRNA Sequences in Symposium on Molecular Cytogenetics (Hamkalo, B. & Papaconstantinou, J. eds.). Plenum Press, New York (1973), pp. 75,93.

Bloch, D. - A catalog of sperm histones. Genetics Suppl. (1969), 61: 93-111.

Boffa, L.C.; Gershey, C.L. & Vidali, G. - Changes of the histone deacetylase activity during chick embryo muscle development. Biochim. Biophys. Acta (1971), 254: 135-143.

Bolund, L. & Johns, E.V. - Chick erythrocyte chromatin as a template for RNA synthesis in vitro. Eur. J. Biochem. (1973), 40: 591-598.

Bondy, S.C.; Roberts, S. & Morelos, B.S. - Histone--acetylating enzyme of brain. Biochem. J. (1970), 119: 665-672.

Bonner, J.; Dahmus, M.E.; Fambrough, D.; Huang, R.C.C.; Marushige, K. & Tuan, T.Y.H. - The biology of isolated chromatin. Science (1968a), 159: 47-56.

Bonner, J.; Chalkley, G.R.; Dahmus, M.E.; Fambrough, D.; Fujimura, F.; Huang, R.C.C.; Huberman, J.; Jensen, R.; Marushige, K.; Ohlembrusch, H.; Olivera, B. & Widholm, J. - Isolation and purification of nuclear proteins. In: Methods of Enzymology (Grossman, L. & Moldaye, eds.). Academic Press, New York (1968b), 12B: 3-65.

Bonner, W.M. & Pollard, H.B. - The presence of F3-F2a1 dimers and F1 oligomers in chromatin. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1975), 64: 282-288.

Borun, T.W.; Scharff, M.D. & Robbins, E. - Rapidly labeled polyribosome-associated RNA having the properties of histone messenger. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1967), 58: 1977-1983.

Boshes, R.A. - Drosophila polyribosomes - The characterization of two populations by cell fractionation and isotopic labeling with nucleic acid and protein precursors. J. Cell Biol. (1970), 46: 477-490.

Boublik, M.; Bradbury, M.E. & Crane-Robinson, C. - An investigation of the conformational changes of histones F1 and $F2a_1$ by proton magnetic resonance spectrocopy. Eur. J. Biochem. (1970), 14: 486-497.

Bradbury, M.E. & Rattle, H.W.E. - Simple computer-aided approach for the analysis of the nuclear magnetic--resonance spectra of histones. Fractions F1, $F2a_1$, F2b, cleaved halves of F2B and F2b.DNA. Eur. J. Biochem. (1972), 27: 270-281.

Bradbury, M.E.; Inglis, R.J.; Matthews, H.R. & Sarner, N. - Phosphorylation of very-lysine-rich histone in Physarum polycephalum. Eur. J. Biochem. (1973), 33: 131-139.

Bradbury, E.M.; Inglis, R.J.; Matthews, H.R. & Langan, T.A. - Molecular basis of control of mitotic cell division in eukaryotes. Nature (1974a), 249: 553-556.

Bradbury, E.M.; Inglis, R.J. & Matthews, H.R. - Control of cell division by very lysine-rich-histone (F1) phosphorylation. Nature (1974b), 247: 257-261.

Brandt, W.F. & Von Holt, C. - The complete amino acids sequence of histone F_3 from chicken erythrocytes. FEBS lett. (1972), 23: 357-360.

Brandt, W.F.; Strickland, W.N.; Morgan, M. & Von Holt, C.- Comparison of the N-terminal amino acid sequences of histone F3 from a mammal, a bird, a shark and echinoderm, a mollusc and a plant. FEBS lett. (1974), 40: 167-172.

Breindl , M. & Gallwitz, D. - Identification of histone messenger RNA from HeLa cells. Appearance of histone mRNA in the cytoplasm and its translation in a rabbit--reticulocyte cell free system. Eur. J. Biochem. (1973), 32: 381-391.

Breindl, M. & Gallwitz, D. - On the translational control of histone synthesis.Quantitation of biologically active histone mRNA from synchronized HeLa cells and its translation in different cell-free systems. Eur. J. Biochem. (1974), 45: 91-97.

Breuer, M.E. & Pavan, C. - Behavior of polytene chromosomes of Rhynchosciara angelae at different stages of larval development. Chromosoma (Berl.) (1955), 7: 371-386.

Britten, R.J. & Davidson, E.H. - Gene regulation for higher cells: A theory. Science (1969), 165: 349-357.

Burton, K. - A study for the condition and mechanism of diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. (1956), 162: 315-323.

Bustin, M.; Rall, S.C.; Stellwagen, R.H. & Cole, R.D. - Histone structure: Asymetric distribution of lysine residues in lysine-rich histone. Science (1969), 163: 391-393.

Butler, J.A.V.; Johns, E.W. & Phillips, D.M.P. - Recent investigation on histones and their functions. In: Progr. Biophys. Mol. Biol. (Butler, J.A.V. & Noble, D. eds.). Pergamon Press (London)(1968), 18: 209-244.

Carpenter, F.H. & Harrington, K.T. - Intermolecular cross-linking of monomeric proteins and cross-linking of oligomeric proteins as a probe of quaternary structure. Application to leucine amino peptidase (bovine lens). J. Biol. Chem. (1972), 247: 5580-5586.

Cestari, A.N. & Pavan, C. - DNA, RNA and protein synthesis in isolated nuclei and chromosomes of Rhynchosciara. J. Cell Biol. (1970), 47: 32a.

Chalkley, R. & Maurer, H.R. - Turnover of template-bound histone. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1965), 54: 498-505.

Chen, C.C.; Smith, D.L.; Bruegger, B.B.; Halpern, R.M. & Smith, R.A. - Occurrence and distribution of acid-labile histone phosphates in regenerating rat liver. Biochemistry (1974), 13: 3785-3789.

Chilina, A.R.; Ives, D.H. & Koestner, A. - Methylation of HeLa cell histones by N-methyl nitrosourea (NMU) and the effect of this carcinogen on histone methylation and acetylation. Fed. Proc. (1972), 31: 848.

Clark, R.J. & Felsenfeld, G. - Association of arginine--rich histones with GC-rich regions of DNA in chromatin. Nature New Biol. (1972), 240: 226-229.

Clark, R.J. Felsenfeld, G. - Chemical probes of chromatin structure. Biochemistry (1974), 13: 3622-3628.

Clever, U. - Induction and repression of a puff in Chironomus tentans. Develop. Biol. (1966), 14: 421-438.

Clever, U. - Control of chromosome puffing,in Control of Nuclear Activity (Goldstein, L., ed.). Prentice-Hall, New York (1967),pp. 161-186.

Clever, U. & Ellgaard, E.G. - Puffing and histone acetylation in polytene chromosomes. Science (1970), 169: 373-374.

Cohen, L.H. & Gotchel, B.V. - Histones and other protein of Drosophila polytene nuclei. Fed. Proc. (1969), 28: 600.

Cohen, L.H. & Gotchel, B.V. - Histones of polytene and nonpolytene nuclei of Drosophila melanogaster. J. Biol. Chem. (1971), 246: 1841-1848.

Comb, D.G.; Sarkar, N. & Pinzino, C.J. - The methylation of lysine residues in protein. J. Biol. Chem. (1966), 241: 1857-1862.

Commerford, S.L.; Hunter, M.J. & Oncley, J.L. - The preparation and properties of liver deoxyribonucleo protein. J.Biol. Chem. (1963),238: 2123-2134.

Cordeiro, M. & Meneghini, R. - The rate of DNA replication in the polytene chromosomes of Rhynchosciara angelae. J. Mol. Biol. (1973), 78: 261-274.

Crouse, H.V. - The role of ecdysone in DNA-puff formation and DNA synthesis in the polytene chromosomes of Sciara coprophila. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1968), 61: 971-978.

Cruft, H.J.; Hindley, J.; Mauritzen, C.M. & Stedman, E. - Amino acid composition of the six histones of calf thymocytes. Nature (1957), 180: 1107-1109.

Cvetković,M.D. & Savić, R.M. - Effect of heating and cooling on interaction of lysine-rich histones with deoxyribonucleic acid. Biochem. J. (1969), 112: 801-802.

Daly, M.M. and Mirsky, A.E. - Histones with high lysine content. J. Gen. Physiol. (1955), 38: 405-413.

Daneholt, B. - Transfer of genetic information in polytene cells. Int. Rev. Citol. (1974) Suppl.4: 417-462.

Daneholt, B. - Giant RNA transcript in a Balbiani ring. Nat. New Biol. (1972), 240: 229-232.

Daneholt, B. - Transcription in polytene chromosomes. Cell (1975), 4: 1-9.

D'Anna, J.A., Jr. & Isemberg, I. - A histone cross--complexing pattern. Biochemistry (1974), 13: 4997-4997.

Darnell, J.E.; Wall, R. & Tushinski, R.J. - An adenylic acid-rich sequence in messenger RNA of HeLa cells and its possible relationship to reiterated sites in DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1971),68: 1321-1325.

Darrow, J.M. & Clever, U. Chromosome activity and cell function in polytenic cells. III. Growth and replication. Develop. Biol. (1970), 21: 331-348.

Davidson, P.F. & Butler, J.A.V. - The fractionation and composition of histones from thymus chromatin. Biochim. Biophys. Acta (1954), 15: 439-440.

Davidson, N. - Effect of DNA length on the free energy of binding of an unwinding ligand to a supercoiled DNA. J. Mol. Biol. (1972), 66: 307-309.

Defendi, V. & Manson, L.A.-Analysis of the life-cycle in mammalian cells. Nature (1963), 198: 359-361.

DeLange, R.J.; Fambrough, D.M. & Smith, E.L. & Bonner, J. - Calf and pea histone IV. II. The complete amino acid sequence of calf thymus histone IV; Presence of ε-N-acetyllysine. J. Biol. Chem. (1969a), 244: 319-334.

DeLange, R.J.; Fambrough, D.M. ; Smith, E.L. & Bonner, J.- Calf and pea histone IV. III. Complete amino acid sequence of pea seedling histone IV; Comparison with the homologous calf thymus histone. J. Biol. Chem. (1969b), 244: 5669-5679.

DeLange, R.J.; Smith, E.L. & Bonner, J. - Calf thymus histone III: Sequences of the amino- and carboxy--terminal regions and of the regions containing lysil residues modified by acetylation and methylation. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1970), 40: 989-993.

DeLange, R.J.; Hooper, J.A. & Smith, E.L. - The complete amino acid sequence of calf thymus histone III. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1972), 69: 882-884.

DeLange, R.J.; Hooper, J.A. & Smith, E.L. - Histone III. III- Sequence studies on the cyanogen bromide peptides; complete amino acid sequence of calf thymus histone III. J. Biol. Chem. (1973), 248: 3261-3274.

DeNooij, E.H. & Westenbrink, H.G.K. - Isolation of a homogeneous lysine-rich histone from calf thymus. Biochim. Biophys. Acta (1962), 62: 608-609.

Destrée, O.H.J.; d'Adelhart Toorop,H.A. & Charles, R. - Analysis of histones from different tissues and embryos of Xenopus laevis (Dandin). II. Qualitative and quantitative aspects of nuclear histones during early stages of development. Cell Differentiation (1973), 2: 229-242.

Dick, C. & Johns, E.W. - A quantitative comparison of histones from inmature and mature erythroid cells of the duck. Biochim. Biophys. Acta (1969), 175: 414-418.

Dixon, G.H. & Smith, M. - Nucleic acids and protamine in salmon testes in Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology (Davidson, J.N. & Cohn,W.E. eds.). Academic Press, London (1968), 8: 9-34.

Edmonds, M.; Vaughan, M.H., Jr. & Nakazato, H. - Polyadenylic acid sequences in the heterogeneous nuclear RNA and rapdly labeled polyribosomal RNA of HeLa cells: Possible evidence for a precursor relationship. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1971), 68: 1336-1340.

Edström, J.-E.- Microextraction and microelectrophoresis for determination and analysis of nucleic acids in isolated cellular units, in Methods in Cell Physiology (Prescott, D., ed.). Academic Press, N.Y. (1964) pp. 417-447.

Edström, J.-E. - Polytene chromosomes in studies of gene expression, in The Cell Nucleus (Busch, H., ed.). Academic Press, N.Y. (1974), pp. 293-332.

Edwards, L.J. & Hnlica, L.S. - The specificity of histones in nucleated erythrocytes. Experientia(1968), 24:228-229.

Edwards, G.S. & Allfrey, V.G. - Aflatoxin B1 and actinomycin D effects on histone acetylation and deacetylation in the liver. Biochim. Biophys. Acta(1973), 299: 354-366.

Ellgaard, E.G. - Gene activation without histone acetylation in Drosophila melanogaster. Science (1967),157:1070-1072.

Elgin, S.R.C. & Hood, L.E. - Chromosomal proteins of Drosophila embryos. Biochemistry (1973),12: 4984-4991

Elgin, S.R. & Boyd,J.B. - The proteins of polytene chromosomal of Drosophila hydei. Chromosoma (Berl.)(1975),51: 135-145.

Elgin, S.C.R. & Wintraub, H. - Chromosomal proteins and chromatin structure, in Ann. Rev. Biochem. (Snell, E.E., ed.) (1975), 44: 725-774.

Fambrough, D.M. & Bonner, J. - Sequence homology and role of cysteine in plant and animal argine-rich histones. J. Biol. Chem. (1968), 243: 4434-4439.

Felix, K. - Protamines. In Advances in Protein Chemistry (Anfinsen, C.G., Jr.; Anson, M.L.; Bailey, K. & Edsall, J.T., eds.). Academic Press, London (1960), 15: 1-56.

Ficq, A. & Pavan, C. - Autoradiography of polytene chromosomes of Rhynchosciara angelae at different stages of development. Nature (London) (1957), 180: 983-984.

Franco, L.; Monteiro, F.; Navlet, J.M.; Perera, J. & Rojo, M.C. - Histones from the fruit fly Ceratitis capitata. Isolation and characterization. Eur. J. Biochem. (1974), 48: 53-61.

Fredericq, E. & Houssier, C. - Physico-chemical properties of native and recombined calf thymus nucleohistones. Eur. J. Biochem. (1967), 1: 51-60.

Frenster, J.H. - A model of specific de-repression within interphase chromatin. Nature (London) (1965), 206: 1269-1270.

Furlan, M. & Jericijo, M. - Protein catabolism in thymus nuclei. I- Hydrolysis of nucleoproteins by proteases present in calf-thymus nuclei. Biochim. Biophys. Acta (1967), 147: 135-144.

Gallwitz, D. & Mueller, G.C. - Histone synthesis "in vitro" on HeLa cell microsomes. The nature of the coupling to deoxyribonucleic acid synthesis. J. Biol. Chem. (1969), 244: 5947-5952.

Gallwitz, D. & Sekeris, C.E. - Stimulation of RNA polymerase activity of rat liver nuclei by cortisol in vitro independent of effects on the acetylation and methylation of histones. FEBS lett. (1969), 3: 99-102.

Gallwitz, D. & Sures, I. - Histone acetylation, purification and properties of three histone-specific acetyltransferases from rat thymus nuclei. Biochim. Biophys. Acta (1972), 263: 315-328.

Garret, R.A. - Reconstitution of nucleohistone from homologous and heterologous components. J. Mol. Biol. (1968), 38: 249-250.

Gasaryan, K.G. & Andreeva, N.B. - Changes in the template activity of chromatin from pigeon erythrocytes and erythrobasts induced by partial salt deproteinization. FEBS lett. (1972), 27: 263-266.

Geoghegan, T.E.; Keller, G.H. & Roark, D.E. - Properties of calf-thymus histones isolated by non-denaturating methods. Fed. Proc. (1974), 33: 1598.

Germond, J.E.; Hirt, B.; Oudet, P.; Gross-Bellard, M. & Chambon, P. - Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1975), 72: 1843-1847.

Gershey, E.L.; Vidali, G. & Allfrey, V.G. - Chemical studies of histone acetylation. The occurrence of ε-N-acetyllysine in the f2a1 histone. J. Biol. Chem. (1968), 243: 5018-5022.

Gershey, E.L.; Haslett, G.W.; Vidali, G. & Allfrey, V.G.- Chemical studies of histone methylation. Evidence for the occurrence of 3-methylhistidine in avian erythrocyte histone. J. Biol. Chem. (1969), 244: 4871-4877.

Giannoni, G. & Peacocke, A.R. - Thymus deoxyribonucleoprotein. III- Sedimentation behaviour. Biochim. Biophys. Acta (1963), 68: 157-166.

Giles, K.W. & Myers, A. - An improved diphenylamine method for the estimation of DNA. Nature (1965), 206: 93.

Greenaway, P.J. & Murray, K. - Heterogeneity and polymorphism in chicken erythrocyte histone fraction V. Nature New Biol. (1971), 229: 233-238.

Grossbach, O. - Chromosomen-Aktivität und biochemische Zelldiferenzierung in den Speicheldrüsen von Captochironomus. Chromosoma (Berl.) (1969), 28: 136-187.

Guaraciaba, H.L. & Toledo, L.F.A. - Age determination of Rhynchosciara angelae larvae. Rev. Bras. Biol. (1967), 27: 321-332.

Gurley, L.R. & Hardin, J.M. - The metabolism of histone fractions. I- Synthesis of histone fractions during the life cycle of mammalian cells. Archs. Biochem. Biophys (1968), 128: 285-292.

Gurley, L.R. & Hardin, J.M. - Metabolism of histone fractions. II- Conservation and turnover of histone fractions in mammalian cells. Archs. Biochem.Biophys. (1969), 130: 1-6.

Gurley, L.R.; Walters, R.A. & Enger, M.D. - Isolation and characterization of histone fl in ribosomes. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1970), 40: 428-436.

Gurley, L.R.; Walters, R.A. & Tobey, R.A. - The metabolism of histone fractions. IV. Synthesis of histones during the Gl-phase of the mammalian life cycle. Archs. Biochem. Biophys. (1972), 148: 633-641.

Gurley, L.R.; Enger, M.D. & Walters, R.A. - The nature of the histone Fl isolated from polysomes. Biochemistry (1973a), 12: 237-245.

Gurley, L.R.; Walters, R.A. & Tobey, R.A. - Histone phosphorylation in the late interphase and mitosis. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1973b), 50: 744-750.

Hanlon, S.; Johnson, R.S. & Chan, A. - Relationship between protein and DNA structure in calf thymus chromatin. I- Compositional aspects. Biochemistry (1974), 13: 3963-3971.

Harris, S.E. & Forrest, H.S. - Template properties of embryo chromatin from eggs of the milkweed bug, Oncopeltus fasciatus. Develop. Biol. (1970), 16: 324-343.

Hayashi, K.; Matsutera, E. & Ohba, Y. - A theoretical consideration of the abnormal behavior of histones in sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis. Biochim. Biophys. Acta (1974), 342: 185-194.

Hearst, J.E. & Botchan, M. - The eukaryotic chromosome in Annual Rev. Biochem. (Snell, E.E., ed.) (1970), 39: 151-182.

Helmsing, P.J. - Protein synthesis of polytene nuclei in vitro. Biochim. Biophys. Acta (1970), 224: 579-587.

Helmsing, P.J. - Isolation and partial characterization of the labeled product from polytene nuclei incubated in vitro with amino acids. Biochim. Biophys. Acta (1971), 232: 733-735.

Hempel, K. & DeLange, H.W. - ε-N-trimethyllysin, eine neue Amino Säure in Histonen. Die Naturwissenschaften (1968), 55: 37.

Henson, P. & Walker, I.O. - The partial dissociation of nucleohistone by salts. Circular dichroism and denaturation studies. Eur. J. Biochem. (1970a), 16: 524-531.

Henson, P. & Walker, I.O. - The partial dissociation of nucleohistone by salts. Hydrodinamic and denaturation studies. Eur. J. Biochem. (1970b), 14: 345-350.

Hewish, D.R. & Burgoyne, L.A. - Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1973), 52: 504-510.

Hill, R.J.; Pocciq, D.L. & Doty, P. - Towards a total macromolecular analysis of sea urchin embryo chromatin. J. Mol. Biol. (1971), 61: 445-462.

Hinegardner, R.T.; Rao, B. & Feldman, D.E. - The DNA synthetic period during early development of the sea urchin egg. Exp. Cell Res. (1964), 36: 53-61.

Hnlica, L.S. - The specificity of histones in chicken erythrocytes. Experientia (1964), 20: 13-14.

Hnlica, L.S. - Studies nuclear proteins. I- Observations on the tissue and species specificity of the moderately lysine-rich histone fraction 2b. Biochim. Biophys. Acta (1966), 117: 163-175.

Hnlica, L.S. - The proteins of the cell nucleus. In Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology (Davidson, J.N. & Cohn, W.E., eds.), Adacemic Press, N.Y. (1967), 7: 25-106.

Hnlica, L.S.; Johns, E.W. & Butler, J.A.V. - Observations on the species and tissue specificity of histones. Biochem. J. (1962), 82: 123-129.

Hnlica, L.S.; Edwards, L.J. & Hey, A.E. - Studies on nuclear proteins. II. Quantitative distribution of histone fractions in various tissues. Biochim. Biophys. Acta (1966a), 124: 109-117.

Hnlica, L.S.; Liau, M.C. & Hurlbert, R.B. - Biosynthesis and composition of histones, in Novikoff Hepatoma nuclei and nucleoli. Science (1966b), 152: 521-523.

Hnlica, L.S.; Tsai, Y.H. & Spelsberg, T.C. - Hormones and transcriptional activity of chromatin, in Invertebrate Endocrinology and Hormonal Heterophylly (Burdette, W.J., ed.). Springer-Verlag, New York (1974), pp. 241-269.

Holoubek, V. & Rueckert, R.R. - Studies on nuclear protein metabolism after infection of Ehrlich ascites cells with Maus-Eberfeld (ME) virus. Biochem.Biophys. Res. Comm. (1964), 15: 166-171.

Hooper, J.A.; Smith, E.L.; Sommer, K.R. & Chalkley, R. - Histone III. IV. Amino acid sequence of histone III of the testes of the carp, Letiobus bubaus. J. Biol. Chem. (1973), 248: 3275-3279.

Horiuchi, K. & Fujimoto, D. - Acetylation of histones by a calf thymus enzyme. Studies on the sites of acetylation. J. Biochem. (Tokyo) (1972), 72: 433-438.

Huang, R.C.C. & Bonner, J. - Histone-bound RNA, a component of native nucleohistone. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1965), 54: 960-967.

Huberman, J.A. - Structure of chromosome fiber and chromosomes. Ann. Rev. Biochem. (1973), 42: 355-378.

Ilyin, Yu.V.; Varshavsky, A.Ya.; Mickelsaar, U.N. & Georgiev, G.P. - Studies on deoxyribonucleoprotein structure. Redistribution of protein in mixtures of deoxyribonucleoproteins, DNA and RNA. Eur. J. Biochem. (1971), 22: 235-245.

Imberski, R.B. & Gertson, P.N. - Changes in basic proteins during metamorphosis of the moth Ephestia kühniella. Insect Biochem. (1974), 4: 341-344.

Inoue, A. & Fujimoto, D. - Substrate specificity of histone deacetylase from calf thymus. J. Biochem. (Tokyo) (1972), 72: 427-431.

Iwai, K.; Ishikawa, K. & Hayashi, H. - Amino acid sequence of slightly lysine-rich histone. Nature (1970), 226: 1056-1058.

Jacobs-Lorena, M.; Baglioni, C. & Borun, T.W. - Translation of messenger RNA for histones from HeLa cells by a cell-free extract from mouse ascites tumor. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1972), 69: 2095-2099.

Jacobs-Lorena, M.; Gabrielli, F.; Borun, T.W. & Baglioni, C. - Studies on the translational control of histone synthesis. I. Translation of histone messenger RNA by heterologous cell-free system prepared from cells inactive in DNA synthesis. Biochim. Biophys. Acta (1973), 324: 275-281.

Johns, E.W.; Phillips, D.M.P.; Simson, P. & Butler, J.A.V.- The electrophoresis of histones and histone fractions on starch gel. Biochem. J. (1961), 80: 189-193.

Johns, E.W. & Butler, J.A.V. - Further fractionation of histones from calf thymus. Biochem. J. (1962), 82: 15-18.

Johns, E.W. - Studies on histones. 7. Preparative methods for histone fractions from calf thymus. Biochem. J. (1964), 92: 55-59.

Johns, E.W. - A method for the selective extraction of histone fractions $f2(a)_1$ and $f2(a)_2$ from calf thymus deoxyribonucleoprotein at pH 7. Biochem. J. (1967), 105: 611-614.

Johnson, R.S.; Chan, A. & Hanlon, S. - Mixed conformation of deoxyribonucleic acid in intact chromatin isolated by various preparative methods. Biochemistry (1972), 11: 4347-4358.

Johnson, A.W.; Wilhelm, J.A.; Ward, D.N. & Hnlica, L.S. - The composition of sea urchin sperm and embryo histones. Biochim. Biophys. Acta (1973a), 295: 140-149.

Johnson, A.W.; Wilhelm, J.A. & Hnlica, L.S. - Nuclear basic protein acetylation during early sea urchin development. Biochim. Biophys. Acta (1973b), 295: 150-158.

Judd, B.H. & Young, M.W. - An examination of the one cistron: One chromomer concept. Cold Spring Harb. Symp. Quant. biol. (1973), 38: 573-579.

Karlson, P. & Sekeris, C.E. - Ecdysone, an insect steroid hormone and its mode of action. Rec. Progr. Hormone Res. (1966), 22: 473-502.

Kates, J. - Transcription of the vaccinia virus genome and the occurrence of polyriboadenylic acid sequences in messenger RNA. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. (1970), 35: 743-752.

Kedes, L.H. & Gross, P.R. - Identification in cleaving embryos of three RNA species serving as templates for the synthesis of nuclear proteins. Nature (1969), 223: 1335-1339.

Kedes, L.H.; Gross, P.R.; Cognetti, G. & Hunter, A.L. - Synthesis of nuclear and chromosomal proteins on light polyribosomes during cleavage in the sea urchin embryo. J. Mol. Biol. (1969) 45: 337-351.

Kedes, L.H. & Birnstiel, M.L. - Reiteration and clustering of DNA sequences complementary to histone messenger RNA. Nature New Biol. (1971), 230: 165-169.

Kelley, R.I. - Isolation of a histone IIb1-IIb2 complex. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1973), 54: 1588-1594.

Kemper, B. & Rich, A. - Identification of presumptive histone messenger RNA in rapidly labelled polysomal RNA of mouse myelomas. Biochim. Biophys. Acta (1973), 319: 364-372.

Kim, S. & Paik, W.K. - Studies on the origin of ε-N-methyl--L-lysine in protein. J. Biol. Chem. (1965), 240: 4629-4634.

Kinkade, J.M., Jr. - Quantitative species differences and quantitative tissue differences in the distribution of lysine-rich histones. J. Biol. Chem. (1969), 244: 3375-3386.

Kinkade, J.M., Jr.; & Cole, R.D. - A structural comparison of different lysine-rich histones of calf thymus. J. Biol. Chem. (1966), 241: 5798-5805.

Kleinsmith, L.J.; Allfrey, V.G. & Mirsky, A.E. - Phosphoprotein metabolism in isolated lymphocyte nuclei. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1966), 55: 1182-1189.

Kobayashi, Y. & Maudsley, D.V. - Practical aspects of liquid scintillation counting n Methods of Biochemical Analysis (Glick, D., ed.). Interscience Publishers, N.Y. (1969), 17: 55-133.

Kornberg, R.D. - Chromatin structure: Unit of histones and DNA chromatin structure is bases on a repeating unit of eight histone molecules and about 200 DNA base pairs. Science (1974), 184: 868-871.

Kornberg, R.D. & Thomas, J.L. - Chromatin structure: Oligomers of the histones. The histones comprise an $(F2a1)_2$ $(F3)_2$ tetramer, a different oligomer of F2a2 and F2b, and monomer of F1. Science (1974), 184: 865-868.

Kossel, A. - The Promines and Histones. Longmans-Green, London (1928).

Krause, M.O.; Yoo, B.Y. & Macbeath, L. - Histones from exponential and stationary L-cells. Evidence for differential binding of lysine-rich and arginine-rich fractions in chromatin. Archs. Biochem. Biophys. (1974), 164: 172-178.

Kroeger, H. & Lezzi, U. - Regulation of gene action in insect development. Ann. Rev. Entomol. (1966), 11: 1-22.

Laemmli, U.K. - Cleavage of structural proteins in the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (1970), 227: 680-685.

Lafarge, C.; Frayssinet, C. & de Recondo, A.M. - Inhibition par l'aflatoxine de la synthèse de RNA hépatique chez le rat. Bull. Soc. Chim. Biol. (1965), 47: 1724-1725.

Langan, T.A. - In Regulatory Mechanisms for Protein Synthesis in Mammalian Cells (San Pietro, A.; Lamborg, M.R. & Kenney, F.T., eds.). Academic Press New York (1968a), pp. 101-118.

Langan, T.A. - Histones phosphorylation: Stimulation by adenosine 3',5'-monophosphate. Science (1968b), 162: 579-580.

Lara, F.J.S.; Tamaki, H. & Pavan, C. - Laboratory culture of R.angelae. Amer. Natur. (1965), 99: 189-191.

Lara, F.J.S. & Hollander, F.M. - Changes in RNA metabolism during the development of Rhynchosciara angelae. Nat. Cancer. Inst. Monogr. (1967), 27: 235-242.

Lara, F.J.S. & Okretic, M.C. - A micro-method for the assay of polyadenylate-containing ribonucleic acid by gel electrophoresis. Biochem. J. (1975), 151: 575-580.

Lee, Y.C. & Scherbaum, O.H. - Nucleohistone composition in stationary and division syncrhonized Tetrahymena cultures. Biochemistry (1966), 5: 2067-2075.

Lee, S.Y.; Mendecki, J. & Brawerman, G. - A polynucleotide segment rich in adenylic acid and the rapidly-labeled polyribosomal RNA component of mouse sarcoma 180 ascites cells. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1971), 68: 1331-1335.

Leibowitz, M.J. - Enzymatic modification of proteins; the leucyl, phenylalanyl-tRNA-protein transferase in Escherichia coli. Fed. Proc. (1970), 29: 899.

Leibowitz, M.J. & Soffer, R.L. - Enzymatic modification of proteins. III. Purification and properties of a leucyl, phenylalanyl transfer ribonucleic acid-protein transferase from Escherichia coli. J. Biol. Chem. (1970) 245: 2066-2073.

Leng, M. & Felsenfeld, G. - The preferential interactions of polylysine and polyarginine with specific base sequences in DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1966), 56: 1325-1332.

Li, H.J.; Chang, C. & Weiskopf, M. - Helix-coil transition in nucleoprotein chromatin structure. Biochemistry (1973), 12: 1763-1772.

Liew, C.C.; Haslett, G.W. & Allfrey, V.G. - N-acetyl-seryl--tRNA and polypeptide chain initiation during histone biosynthesis. Nature (London) (1970), 226: 414-417.

Lindh, N.O. & Brantmark, B.L. - Preparations of histones by the use of reinecke salt. Analytical Biochemistry (1965), 10: 415-420.

Lindsay, D.T. - Electrophoretically identical histones from ribosomes and chromosomes of chicken liver . Archs. Biochem. Biophys. (1966), 113: 687-694.

Louie, A.J.; Candido, E.P.M. & Dixon, G.H. - Enzymatic modifications and their possible roles in regulating the binding of basic proteins to DNA and in controlling chromosomal structure. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. (1973), 38: 803-819.

Lucy, J.A. & Butler, J.A.V. - Fractionation of deoxyribonucleoprotein. Biochim. Biophys. Acta (1955), 16: 431-432.

Machado-Santelli, G.M. - Aspectos da fisiologia de cromossomos politênicos de glândula salivar de Rhynchosciara angelae no fim do 4º estádio larval. Tese de Doutoramento (1973) Instituto de Biociências, U.S.P.

Machado-Santelli, G.M. & Basile, R. - DNA replication and DNA puffs in salivary chromosomes of Rhynchosciara. Ciência e Cultura (1975), 27: 167-174.

Marushige, Y. & Marushige, K. - Transformation of sperm histone during formation and maturation of rat spermatozoa. J. Biol. Chem. (1975), 250: 39-45.

Marzluff, W.F., Jr. & McCarty, K. - Two classes of histone acetylation in developing mouse mammary gland, J. Biol. Chem. (1970), 245: 5635-5642.

Mayfield, J.E. & Bonner, J. - A partial sequence of nuclear events in regenerating rat liver. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1972), 69: 7-10.

Mazen, A. & Champagne, M. - Variation quantitative de la fraction d'histone specifique aux érythrocytes, au cours du developpement du poulet. FEBS lett. (1969), 2: 248-250.

Mazen, A. & Champagne, M. - Histones d'erythrocytes de poulets. IV. Étude quantitative des histones au cours de la maturation des érythocytes. Biochimie (Paris) (1972), 54: 1273-1279.

McCarthy, B.J. & Martinson, H.G. - Histone-histone associations within chromatin. Cross-linking studies using tetranitromethane. Biochemistry (1975), 14: 1073-1078.

McGillivray, A.J. - The histones of some human tissues. Biochem. J. (1968), 110: 181-185.

McMaster-Kaye, R. & Kaye, J.S. - An electrophoretic analysis of the histones of the house cricket. Archs. Biochem. Biophys. (1973), 156: 426-436.

Meneghini, R.; Armelin, H.A.; Balsamo, J. & Lara, F.J.S. - Indication of gene amplification in Rhynchosciara by RNA-DNA hybridization. J. Cell Biol. (1971), 49: 913-916.

Meneghini, R. & Cordeiro, M. - DNA replication on polytene chromosomes of Rhynchosciara angelae. Cell Differentiation (1972), 1: 167-177.

Miescher, F. - Das Protamin, Eine neue Organische Base aus den samenfäden das Rheinlachses. Ber. deut. Chem. Ges. (1874), 7: 376-380.

Miller, D.M.; Williams, R. & McCarty, K.S. - Localization and "in vitro" specificity of histone acetylation Biochim. Biophys. Acta (1973), 317: 437-446.

Miyamoto, E.; Kuo, J.F. & Greengaard, P. - Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. III. Purification and properties of adenosine-3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine brain. J. Biol. Chem. (1969), 244: 6395-6402.

Moss, B.A.; Joyce, W.G. & Ingram, V.M. - Histones in chick embryonic erythropoiesis. J. Biol. Chem. (1973), 248: 1025-1031.

Moss, B.A. - Eletrophoresis of avian erythroid histones. Biochim. Biophys. Acta (1974), 359: 205-209.

Müller-Hill, B.; Beyreuther, K. & Gilbert, W. - Lac repressor from Escherichia coli. Methods in Enzymology (1971), 21:483-487.

Murray, K. & Murray-Luck, J. - An unidentified component of hydrosilates of certain fraction of calf thymus histone. Fed. Proc. (1962), 21: 410.

Murray, K. - The occurrence of ε-N-methyllysine in histones. Biochemistry (1964), 3: 10-15.

Murray, K. - The Basic protein of cell nuclei. In Ann. Rev. Biochem. (Luck, J.M. & Boyer, P.D., eds.) (1965), 34: 209-246.

Murray, K. - The acid extraction of histones from calf thymus deoxyribonucleoprotein. J. Mol. Biol. (1966), 15: 409-419.

Neelin, J.M. & Connell, G.E. - Zone electrophoresis of chicken-erythrocyte histone in starch gel. Biochim. Biophys. Acta (1959), 31: 539-541.

Neelin, J.M. & Butler, G.C. - A comparison of histones from chicken tissues by zone electrophoresis in starch gel. Can. J. Biochem. Physiol. (1961), 39: 485-491.

Neelin, J.M.; Callahan,P.X.; Lamb, D.C. & Murray, K. - The histones of chicken erythrocyte nuclei. Can J. Biochem. (1964), 42:1743-1752.

Neelin, J.M. - Variability in cell-specific and common histones of avian erythrocytes. Can. J. Biochem.(1968), 46: 241-247.

Nemer, M. & Linsday, D.T. - Evidence that the S-polysomes of early sea urchin embryos may be responsible for the synthesis of chromosomal histones. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1969), 35: 156-160.

Neufeld, G.J.; Thomson, J.A. & Horn, D.H.S. - Short-term effects of crustecdysone (20-hidroxycdysone) on protein and RNA synthesis in third-instar larvae of Calliphora. J. Insect Physiol. (1968), 14: 789-804.

Neville, D.M., Jr. - Molecular weight determination of protein-dodecyl sulphate complexes by gel electrophoresis in a descontinuous system. J. Biol. Chem. (1971), 246: 6328-6334.

Noland, B.J.; Hardin, J.M. & Shepherd, G.R. - Histone acetyltransferase activity in synchronized mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta (1971), 246: 263-268.

Noll, M. - Subunit structure of chromatin. Nature (1974), 251: 249-251.

Ogawa, Y.; Quagliarotti, G.; Jordan, J.; Taylor, C.W.; Starbuck, W.C. & Busch, H. - Structural analysis of the glycine-rich, arginine-rich histone. III. Sequence of the amino-terminal half of the molecule containing the modified lysine residues and the total sequence. J. Biol. Chem. (1969), 244: 4387-4392.

Ohlenbusch, H.H.; Olivera, B.M.; Tuan, D. & Davidson, N. - Selective dissociation of histones from calf thymus nucleoprotein. J. Mol. Biol. (1967), 25: 299-315.

Olins, D.E. - Interaction of lysine-rich histones and DNA. J. Mol. Biol. (1969), 43: 439-460.

Olins, D.E.; Olins, A.L. & von Hippel, P.H. - On the structure and stability of DNA-protamine and DNA-polypeptide complexes. J. Mol. Biol. (1968), 33: 265-281.

Oliver, D.; Balhorn, R.; Granner, D. & Chalkley, R. - Molecular nature of F1 histone phosphorylation in cultured hepatoma cells. Biochemistry (1972), 11: 3921-3925.

Oliver, D. & Chalkley - An electrophoretic analysis of Drosophila histones. I. Isolation and identification. Exptl. Cell Res. (1972a), 73: 295-302.

Oliver, D.R. & Chalkley, R. - An electrophoretic analysis of Drosophila histones. II. Comparison of larval and adult histone patterns in two species of Drosophila.Exp. Cell Res. (1972b), 73: 303-310.

Oliver, D.; Sommer, K.R.; Panyim, S. Spiker, S. & Chalkley, R. - A modified procedure for fractionating histones. Biochem. J. (1972), 129: 349-353.

Oosterhof, D.K.; Hozier, J.C. & Rill, R.L. - Nuclease action on chromatin: Evidence for discrete, repeated nucleoprotein units along chromatin filbrils. Proc. Nat. Acad. Sci. (1975), 72: 633-637.

Ord, M.G. & Stocken, L.A. - Metabolic properties of histones from rat liver and thymus gland. Biochem. J. (1966), 98: 888-897.

Ord, M.G. & Stocken, L.A. - Variations in the phosphate content and thiol/disulphide ratio of histones during the cell cycle. Studies with regenerating rat liver and sea urchins. Biochem. J. (1968), 107: 403-410.

Paik, W.K. & Kim, S. - ε-N-dimethyllysine in histones. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1967), 27: 479-483.

Paik, W.K. & Kim, S. - Protein methylase. I. Purification and properties of the enzyme. J. Biol. Chem. (1968), 243: 2108-2114.

Paik, W.K. & Kim, S. - Enzymatic methylation of histones. Archs. Biochem. Biophys. (1969), 134: 632-637.

Paik, W.K. & Kim, S. - ω-N-methylarginine in protein. J. Biol. Chem. (1970a), 245: 88-92.

Paik, W.K. & Kim, S. - ω-N-methylarginine in histones. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1970b), 40: 224-229.

Paik, W.K. & Kim, S. - Solubilization and partial purification of protein methyalse III from calf thymus nuclei. J. Biol. Chem. (1970c), 245: 6010-6015.

Palan, J.; Ruiz-Carrillo, A. & Subirana, J.A. - Histones from sperm of the sea urchin Arbacia lixula. Eur. J. Biochem. (1969), 7: 209-213.

Pallota, D. & Berlowitz, L. - Histones of two insect species. Biochim. Biophys. Acta (1970), 200: 538-543.

Panyim, S.; Jensen, R.H. & Chalkley, R. - Proteolytic contamination of calf thymus nucleohistone and its inhibition. Biochim. Biophys. Acta (1968), 160: 252-255.

Panyim, S. & Chalkley, R. - High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. Archs. Biochem. Biophys. (1969a), 130: 337-346.

Panyim, S. & Chalkley, R. - The heterogeneity of histones. I. A quantitative analysis of calf histones in very long polyacrylamide gels. Biochemistry (1969b), 8: 3972-3979.

Panyim, S.; Chalkley, R.; Spiker, S. & Oliver, D. - Constant electrophoretic mobility of the cysteine-containing histone in plants and animals. Biochim.Biophys. Acta (1970), 214: 216-221.

Panyim, S. & Chalkley, R. - The molecular weights of vertebrate histones exploiting a modified sodium dodecyl sulphate electrophoretic method. J. Biol. Chem. (1971), 246: 7557-7560.

Panyim, S.; Bilek, D. & Chalkley, R. - An electrophoretic comparison of vertebrate histones. J. Biol. Chem. (1971), 246: 4206-4215.

Paoletti, R.A. & Huang, R.C.C. - Characterization of sea urchin sperm chromatin and its basic proteins . Biochemistry (1969), 8: 1615-1625.

Papermaster, D.S. & Preyer, W.J. - Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods. Biochemistry (1974), 13: 2438-2444.

Pardon, J.F. & Wilkins, M.H.F. & Richards, B.M. - Superhelical model for nucleohistone. Nature (1967), 215: 508-509.

Pardon, J.F. & Wilkins, M.H.F. - A super-coil model for nucleohistone. J. Mol. Biol. (1972), 68: 115-124.

Patterson, B.D. & Davies, D.D. - The specificity of methylation of pea histone. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1969), 34: 791-794.

Pestaña, A.; Sudilowsky, O. & Pitot, H.C. - Characterization of a cytoplasmic histone-Coenzyme A acetyl transferase. FEBS lett. (1971), 19: 83-86.

Phillips, D.M.P. & Clarke, M. - Behaviour of histones in exclusion Chromatography and gel electrophoresis in relation to their molecular weights. J. Chromatog. (1970), 46: 320-323.

Pitt-Rivers & Impiombato, F.S.A. - The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. Biochem. J. (1968), 109: 825-830.

Pogo, B.G.T.; Allfrey, V.G. & Mirsky, A.E. - The effect of phytohemoagglutinin on ribonucleic acid synthesis and histone acetylation in equine leukocytes. J. Cell Biol. (1967), 35: 477-482.

Pogo, B.G.T.; Pogo, A.O.; Allfrey, V.G. & Mirsky, A.E. - Changing patterns of histone acetylation and RNA synthesis in regeneration of the liver. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1968), 59: 1337-1344.

Purkayastha, R. & Neelin, J.M. - Comparison of histones from avian erythroid tissues by zone electrophoresis. Biochim. Biophys. Acta (1966), 127: 468-477.

Rall, S.C. & Cole, R.D. - Amino acid sequence and sequence variability of the amino-terminal regions of lysine-rich histones. J. Biol. Chem. (1971), 246: 7175-7190.

Rasmussen, P.S.; Murray, K. & Luck, J.M. - On the complexity of calf thymus histone. Biochemistry (1962), 1: 79-88.

Reid, B.R. & Cole, R.D. - Biosynthesis of a lysine-rich histone in calf thymus nuclei. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1964), 51: 1044-1050.

Reid, B.R.; Stellwagen, R.H. & Cole, R.D. - Further studies on the biosynthesis of very lysine-rich histones in solated nuclei. Biochim. Biophys. Acta (1968), 155: 593-602.

Reynolds, J.A. & Tanford, C. - Binding of dodecyl sulphate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1970a), 66: 1002-1003.

Reynolds, J.A. & Tanford, C. - The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulphate complexes. J. Biol. Chem. (1970b), 245: 5161-5165.

Rifkind, J.M. & Eichhorn, G.L. - Specificity for the interaction of nucleotides with basic polypeptides. Biochemistry (1970), 9: 1753-1761.

Ristow, H. & Arends, S. - A system in vitro for the synthesis of RNA and protein by isolated salivary glands and by nuclei from Chironomus larvae. Biochim.Biophys. Acta (1968), 157: 178-186.

Robbins, E. & Borun, T.W. - The cytoplasmic synthesis of histones in HeLa cells and its temporal relationship to DNA replication. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1967), 57: 409-416.

Rudkin, G.T. & Corlette, S.L. - Disproportionate synthesis of DNA in a polytene chromosome region. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) (1957), 43: 964-968.

Rudkin, G.T. - The proteins of polytene chromosomes. In The Nucleohistones (Bonner, J. & Ts'o, P., eds.) Holden Day, San Francisco (1964) pp. 184-192.

Sadgopal, A. & Bonner, J. - The relationship between histone and DNA synthesis in HeLa cells. Biochim. Biophys. Acta (1969), 186: 349-357.

Sahasrabuddhe, G.G. & van Holde, K.E. - The effect of trypsin on nuclease-resistant chromatin fragments. J. Biol. Chem. (1974), 249: 152-156.

Santelli, R.V.; Machado-Santelli, G.M. & Lara, F.J.S. - RNA synthesis by isolated nuclei of Rhynchosciara americana. Chromosoma (Berl.) (1976), no prelo.

Schmir, M.; Révet, B.M.J. & Vinograd, J. - Dependence of the sedimentation coefficient of denatured closed circular DNA in alkali on the degree of strand interwinding. The absolute sense of supercoils. J. Mol. Biol. (1974), 83: 35-45.

Schochetman, G. & Perry, R.P. - Early appearance of histone messenger RNA in polyribosomes of cultured L cells. J. Mol. Biol. (1972), 63: 591-596.

Seale, R.L. & Simpson, R.T. - Effects of cycloheximide on chromatin biosynthesis. J. Mol. Biol. (1975), 94: 479-501.

Seligy, V.L. & Neelin, J.M. - Transcription properties of stepwise acid-extracted chicken erythrocyte chromatin. Biochim. Biophys. Acta (1970), 213: 380-390.

Seligy, V.L.; Adams, G.H.M. & Neelin, J.M. - In The Biochemistry of Gene Expression in Higher Organisms (Pollak, J.K. & Lee, J.W., eds.). Australia and New Zealand Book Co. Sidney (1973), pp. 117-190.

Seligy, V.L. & Lurquin, P.F. - Relationship between dye binding and template activity of isolated avian chromatin. Nature New Biol. (1973), 243: 20-21.

Seligy, V.L. & Neelin, J.M. - Phosphorylation of histones in avian erythroblasts. Can. J. Biochem. (1973), 51: 1316-1324.

Seligy, V.L. & Miyagi, M. - Comparison of template--property changes after salt extraction of avian erythrocyte and liver chromatin. Eur. J. Biochem. (1974), 46: 259-269.

Senior, M.B.; Olins, A.L. & Olins, D.E. - Chromatin fragments resembling ν bodies. Science (1975), 187: 173-175.

Senshu, T. - Fractionation of histones from chicken erythrocyte and sea urchin sperm by CM-cellulose chromatography with ethanolic formic acid. Biochim. Biophys. Acta (1971), 243: 323-331.

Sivolap, Y.M. & Bonner, J. - Association of chromosomal RNA with repetitive DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1971), 68: 387-389.

Shepherd, G.R.; Noland, B.J. & Roberts, C.N. - Phosphorus in histones. Biochim. Biophys. Acta (1970), 199: 265-276.

Shepherd, G.R.; Hardin, J.M. & Noland, B.J. - Methylation of lysine residues of histone fractions in synchronized mammalian cells. Archs. Biochem. Biophys. (1971), 143: 1-5.

Shepherd, G.R. - Evidence for the biological coupling of biosynthesis and internal acetylation of histone fraction F2a1(IV) in cultured mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta (1973), 299: 485-491.

Sherod, D.; Johnson, G. & Chalkley, R. - Phosphorylation of mouse ascites tumor cell lysine-rich histone. Biochemistry (1970), 9: 4611-4618.

Shih, T.Y. & Bonner, J. - Template properties of DNA polypeptide complexes. J. Mol. Biol. (1970), 50: 333-344.

Shih, T.Y. & Fasman, G.D. - Conformation of deoxyribonucleic acid in chromatin: A circular dichroism study. J. Mol. Biol. (1970), 52: 125-129.

Simpson, R.T. & Sober, H.A. - Circular dichroism of calf liver nucleohistone. Biochemistry (1970), 9: 3103-3109.

Sin, Y.T. - Changes in basic proteins of chromatin during the larval development of the blowfly Calliphora. Insect Biochem. (1973), 3: 389-395.

Sirlin, J.L. & Schor, N.A. - Observations on isolated polytene nuclei. Exp. Cell Res. (1962a), 27: 165-167.

Sirlin, J.L. & Schor, N.A. - Further observations on isolated polytene nuclei. Exp. Cell Res. (1962b), 27: 363-366.

Skandrani, E.; Mizon, J.; Santière, P. & Biserte, G. - Etude de la fraction F2b des histones de thymus de veau. Biochimie (Paris) (1972), 54: 1267-1272.

Skidmore, C.; Walkers, I.O. & Pardon, J.F. & Richards, B.M. - The structure of partially histone depleted nucleohistone. FEBS lett. (1973), 32: 175-178.

Sluyser, M. & Hermes, Y. - A rat-specific lysine-rich histone. Biochim. Biophys. Acta (1973), 295: 605-612.

Smart, J.E. & Bonner, J. - Studies on the role of histones in the structure of chromatin. J. Mol. Biol. (1971), 58: 661-674.

Smerdon, M.J. & Isemberg, I. - Conformational changes in histone GRK (f2a1). Biochemistry (1974), 13: 4046-4049.

Smith, D.L.; Brueger, J.B.; Halpern, R.M. & Smith, R.A. - New histone kinases in nuclei of rat tissues. Nature (1973), 246: 103-104.

Smith, D.L.; Chen, C.C.; Bruegger, B.B.; Holtz, S.L.; Halpern, R.M. & Smith, R.A. - Characterization of protein kinases forming acid-labile histone phosphates in Wlaker-256 carcinosarcoma cell. Biochemistry (1974), 13: 3780-3784.

Smythies, J.R.; Benington, F. & Morin, R.D. - A mechanism for the interaction of a histone and DNA. J. theor. Biol. (1972), 37: 151-158.

Smythies, J.R.; Benington; F.; Bradley, R.J.; Morin, R.D. & Romine, W.O., Jr. - On the mechanism of interaction between histone I and DNA and histone III and DNA. J. theor. Biol. (1974), 47: 309-315.

Spalding, J.; Kajiwara, K. & Mueller, G.C. - The metabolism of basic proteins in HeLa cell nuclei. Proc. Nat. Acad. Sci US (1966), 56: 1535-1542.

Solymosy, F.; Fedorcksák, F.; Gulyás, A.; Farkas, G.L. & Ehremberg, L. - A new method based on the use of diethyl pirocarbonate as a nuclease inhibitor for extraction of undegraded nucleic acid from plant tissues. Eur. J. Biochem. (1968), 5: 520-527.

Stedman, E. & Stedman, E. - Cell specificity of histones. Nature (1950), 166: 780-781.

Stedman, E. & Stedman, E. - The basic proteins of the cell nucleus. Phil. Trans. Royal. Soc. London (1951), B235: 565-567.

Stein, G.S.; Stein, J.S. & Kleinsmith, L.J. - Chromosomal proteins and gene regulation. Sci. Am. (1975), 232: 46-57.

Stellwagen, R.H. & Cole, R.D. - Chromosomal proteins. Ann. Rev. Biochem. (1969), 38: 951-990.

Stevely, W.S. & Stocken, L.A. - Phosphorylation of rat--thymus histone. Biochem. J. (1966), 100: 20C.

Stevely, W.S. & Stocken, L.A. - Variations in the phosphate content of histone F1 in normal and irradiated tissues. Biochem. J. (1968), 110: 187-191.

Stocker, A.J. & Pavan, C. - The influence of ecdysterone on gene amplification, DNA synthesis, and puff formation in the salivary gland chromosomes of Rhynchosciara hollaenderi. Chromosoma (Berl.) (1974), 45: 295-319.

Strickland, W.N.; Strickland, M.; Brandt, W.F.; Morgan, M. & von Holt, C. - Partial amino acid sequence of two new arginine-serine rich histones from male gonads of the sea urchin (Parechinus angulosus). FEBS lett. (1974), 40: 161-166.

Studier, F.W. - Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gel. J. Mol. Biol. (1973), 79: 237-248.

Subirana, J.A.; Cozcolluela, C.; Palan, J. & Unzeta, M.- Protamines and other basic proteins from spermatozoa of molluscs. Biochim. Biophys. Acta (1973), 317: 364-379.

Sun, T.T.; Bollen, A.; Kahan, L. & Traut, R.R. - Topography of ribosomal proteins of the Escherichia coli 30S subunit as studied with the reversible cross--linking reagent methyl-4-mercaptobutyrimidate. Biochemistry (1974), 13: 2334-2340.

Sutton, W.D. - Chromatin packing, repeated DNA sequences and gene control. Nature (1972), 237: 70-71.

Swift, H. - Nucleic acids and cell morphology in dipteran salivary glands in The Molecular Control of Cellular Activity (Allen, J.M., ed.) McGraw-Hill, N.Y. (1961), pp. 23-125.

Takai, S.; Borun, T.W.; Muchmore, J. & Lieberman, I. - Concurrent synthesis of histone and deoxyribonucleic acid in liver after partial hepatectomy. Nature (London) (1968), 219: 860-861.

Takaku, F.; Nakao, K.; Ono, T. & Terayama, H. - Changes in histone acetylation and RNA synthesis in the spleen of polycythemic mouse after erythropoietin injection. Biochim. Biophys. Acta (1969), 195: 396-400.

Teller, D.C.; Kinkade, J.M., Jr. & Cole, R.D. - The molecular weight of lysine-rich histone. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1965), 20: 739-744.

Temussi, P.A. - Automatic comparison of the sequences of calf thymus histones. J. theor. Biol. (1975), 50: 25-33.

Terra, W.R.; Bianchi, A.G.; Gambarini, A.G. & Lara, F.J.S.- Haemolymph amino acids and related compounds during cocoon production by the larvae of the fly Rhynchosciara americana. J. Insect Physiol. (1973), 19: 2097-2106.

Terra. W.R.; Bianchi, A.G.; Gambarini, A.G.; Pueyo, M.T. & Lara, F.J.S. - A medium for short-term incubation of Rhynchosciara salivary glands. Ciência e Cultura (1976) (no prelo).

Thomson, J.A. - Effects of exogenous molting hormone on protein and RNA synthesis in insect tissues, in Invertebrate Endocrinology and Hormonal Heterophylly (Burdette, W.J., ed.). Springer-Verlag, New York (1974), pp. 79-86.

Tuan, D.Y.H. & Bonner, J. - Optical absorbance and optical rotatory dispersion studies on calf thymus nucleohistone. J. Mol. Biol. (1969), 45: 59-76.

Ui, N. - Preparation, fractionation and properties of calf thymus histone. Biochim. Biophys. Acta (1957), 25: 493-502.

Umaña, R.; Updike, S.; Randall, J. & Dounce, A.V. - Histone metabolism. In The Nucleohistones (Bonner, J. & Ts'o, P., eds.) Holden-Day, San Francisco (1964), pp. 200-229.

Vandegrift, V.; Serra, M.; Moore, D.S. & Wagner, T.E. - The role of the arginine-rich histones in the maintenance of DNA conformation in chromatin. Biochemistry (1974), 13: 5087-5092.

Vendrely, R. & Vendrely, C. - Biochemistry of histones and protamines. Protoplasmatologia (1966), 5: 1-88.

Vidali, G.; Gershey, E.L. & Allfrey, V.G. - Chemical studies of histone acetylation. The distribution of ε-N-acetyllysine in calf thymus histone. J. Biol.Chem. (1968), 243: 6361-6366.

Vidali, G. & Neelin, J.M. - The stability of acid-soluble chromosomal proteins from avian erythrocytes. Can. J. Biochem. (1968), 46: 781-787.

Vidali, G.; Boffa, L.C. & Allfrey, V.G. - Properties of an acidic histone-binding protein fraction from cell nuclei. Selective precipitation and deacetylation of histones F2a1 and F3. J. Biol. Chem. (1972), 247: 7365-7373.

Vinograd, J.; Lebowitz, J. & Watson, R. - Early and late helix-coil transitions in closed circular DNA. The number of super-helical turns in polyoma DNA. J. Mol. Biol. (1968), 33 : 173-197.

van Heyden, H.W. & Zachau, H.G. - Characterization of RNA in fractions of calf thymus chromatin. Biochim. Biophys. Acta (1971), 232: 651-660.

von Hippel, P.H. & McGhee, J.D. - DNA-protein interactions. Ann. Rev. Biochem. (1972), 41: 231-300.

Wagner, K.G. & Arav, R. - On the interaction of nucleotides with poly-L-lysine and poly-L-arginine. I. The influence of the nucleotide base on the binding behavior. Biochemistry (1968), 7: 1771-1777.

Wagner, T. & Spelberg, T.C. - Aspects of chromosomal structure. I. Circular dichroism studies. Biochemistry (1971), 10: 2599-2605.

Walsh, D.A.; Perkins, J.P. & Krebs, E.G. - An adenosine 3'-5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. J. Biol. Chem. (1968), 243: 3763-3765.

Wangh, L.; Ruiz-carrillo, A. & Allfrey, V.G. - Separation and analysis of histone subfractions differing in their degree of acetylation: Some correlations with genetic activity in development. Archs. Biochem. Biophys. (1972), 150: 44-56.

Wanka, F.; Moors, J. & Krijzer, F.N.C.M. - Dissociation of nuclear DNA replication from concomitant protein synthesis in synchronous cultures. Biochim. Biophys. Acta (1972), 269: 153-161.

Weber, K. & Osborn, M. - The reliability of molecular weight determination by dodecyl-sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. (1969), 244: 4406-4412.

Weber, K.; Pringle, J.R. & Osborn, M. - Measurements of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel.In Methods in Enzymology (Hirs, C.H.W. & Timasheff, S.M., eds.). Academic Press N.Y. (1972), 26: 3-27.

Weinberg, E.S.; Birnstiel, M.L.; Purdom, I.F. & Williamson, R. - Genes coding for polysomal 9S RNA of sea urchins: Conservation and divergence. Nature (1972), 240: 225-228.

Weinberg, E.S.; Overton, G.C.; Shutt, R.H. & Reeder, R.H.- Histone gene arrangement in the sea urchin Strongylocentrotus purpuratus. Proc. Nat. Acad. Sci. US (1975), 72: 4815-4819.

Weintraub, H. - A possible role for histone in the synthesis of DNA. Nature (1972), 240: 449-453.

Weintraub, H. - The assembly of newly replicated DNA into chromatin. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. (1973), 38: 247-256.

Wilhelm, F.X.; Champagne, M.H. & Daune, M.D. - Conformation du DNA dans la nucléoprotéine. Eur. J. Biochem. (1970), 15: 321-330.

Wilhelm, J.A.; Spelsberg, T.C. & Hnlica, L.S. - Nuclear proteins in genetic restriction. I. The histones. Sub-Cell. Biochem. (1971), 1: 39-65.

Williams, R.E.; Lurkin, P.F. & Seligy, V.L. - Circular dichroism of avian-erythrocyte chromatin and ethidium bromide bound to chromatin. Eur. J. Biochem. (1972), 29: 426-432.

Williams, R.E. & Seligy, V.L. - Avian erythrocyte histones: salt-induced conformational changes in the erythrocyte--specific histone V (f2c). FEBS lett. (1973), 33: 197-200.

Wilson, M.C.; Melli, M. & Birnstiel, M.L. - Reiteration frequency of histone coding sequences in man. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1974), 61: 354-359.

Wouters-Tyrou, D.; Sautière, P. & Biserte, G. - Purification and characterization of glycine,arginine, lysine--rich and alanine, leucine, glycine-rich histones from sea urchin gonad. Biochim. Biophys. Acta (1974), 342: 360-366.

Ziccardi, R. & Schumaker, V. - Interaction of histone f2a1 with T7 deoxyribonucleic acid. Cooperativity of histone binding. Biochemistry (1973), 12: 3231-3235.

Zubay, G. - Nucleohistone structure and function. In The Nucleohistones (Bonner, J. & T'so, P., eds.). Holden-Day, San Francisco (1964) pp. 95-107.

Yokotsuka, K.; Yoshida, M. & Shimura, K. - Fractionation of histones from calf thymus and posterior silk glands by countercurrent distribution. J. Biochem. (Tokyo) (1968), 64: 129-136.

Yoshida, M.; Yokotsuka, K. & Shimura, K. - Amino acid composition and heterogeneity of histones from posterior silk gland. J. Biochem. (Tokyo) (1966), 60: 586-588.