WALTER COLLI

GENES REDUNDANTES RESPONSÁVEIS
PELA SÍNTESE DE RNA RIBOSSÔMICO
EM Bacillus subtilis:

- I - Relações topológicas no cromossomo
- II - Purificação sob a forma de híbridos DNA-RNA

Tese apresentada a concurso
para a obtenção do título de
Docente Livre de Bioquímica
pela Universidade de São Paulo

1971

Para

ISAIAS RAW

AGRADECIMENTOS

A Isaias Raw que através de continuado exemplo, foi quem me estimulou a entrar na carreira científica e a nela permanecer. A sua exclusiva dedicação aos problemas do Ensino e da Ciência e seu espírito eminentemente pragmático, sempre preocupado em encontrar soluções que contribuíssem para diminuir o atraso tecnológico do País, fizeram-no lançar, na sua infelizmente curta passagem pela Universidade, uma série de iniciativas tendentes a aprimorar e modernizar o Ensino no Brasil, em todos os níveis educacionais. Devo a êle não só o benefício do exemplo profissional, probo, honrado e humano, como uma sólida amizade que não diminuiu com a distância geográfica. Espero em futuro não muito distante podermos reencetar a mesma colaboração que tão bem funcionara no passado.

A Maynard E. Pullman que possibilitou destacado impulso em minha carreira de pesquisador. O auxílio profissional e pessoal que dispensou a mim e à minha família foi de inestimável valor.

A Michio Oishi em cujo laboratório passei a época mais produtiva da minha carreira científica. Lá aprendi, através de uma verdadeira colaboração, o que sei de Biologia Molecular. O seu espírito liberal permitiu que eu tomasse iniciativas que acabaram por definir as minhas opções atuais em termos de pesquisa científica.

A todo o pessoal do The Public Health Research Institute of the City of New York, Inc., pesquisadores e funcionários, cujas atitudes em face do trabalho científico demonstraram para mim como deve ser uma instituição dedicada à pesquisa científica. Este meu trabalho foi produto de interesse de muitos, sempre prontos a emprestar a sua colaboração.

Ao pessoal da Fundação Carlos Chagas, nas pessoas dos Srs. Elzo Sigueta e José Antonio Lacerda Duarte, que com muita simpatia resolveram os meus problemas gráficos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Í N D I C E

	Página
ABREVIações E SINONímIA	I
RESUMO E PERSPECTIVAS	III
(1) INTRODUÇÃO	
(A) Estrutura dos ribossomos nos organismos proca- rióticos	1
(B) Genes ribossômicos	3
(C) Mapeamento cromossômico dos genes ribossômi- cos	4
(2) MATERIAL E MÉTODOS	
(A) Material	9
(B) Métodos gerais	9
(i) Preparação de RNA ribossômico	9
(ii) Preparação de ³ H-RNA rapidamente marcado	11
(iii) Isolamento de DNA	11
(iv) Determinação de DNA	11
(v) Determinação de pesos moleculares	12
(vi) Determinação da radioatividade	12
(C) Métodos especiais usados durante as fases de puri- ficação	12
(i) Fragmentação e desnaturação do DNA	12
(ii) Separação das cadeias complementares por cromatografia em albumina metilada-kiesel- guhr (MAK)	13
(iii) Hibridização do DNA "single-stranded" com RNA ribossômico	13
(iv) Cromatografia do híbrido DNA-RNA em colu- na de hidroxiapatita	13
(3) RESULTADOS	
(A) Demonstração de "linkage" física entre os genes para a síntese de RNA ribossômico 16 S e 23 S ...	16
(I) Separação das cadeias complementares do DNA por cromatografia em coluna de MAK .	16
(II) Cromatografia do DNA em hidroxiapatita ...	18
(III) Demonstração de "linkage" gênica	18
(B) Demonstração de "linkage" física entre os genes para a síntese de RNA ribossômico 5 S e 23 S	26
(C) A purificação dos genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico	33
(4) DISCUSSÃO	38
(5) REFERÊNCIAS	44

ABREVIATURAS E SINONÍMIA

DNA	=	ácido desoxiribonucleico
RNA	=	ácido ribonucleico
rRNA	=	ácido ribonucleico ribossômico
tRNA	=	ácido ribonucleico de transferência
mRNA	=	ácido ribonucleico mensageiro, neste trabalho usado para abreviar o RNA obtido da célula bacteriana após um pulso rápido de radioatividade (30 segundos)
DNase	=	desoxiribonuclease
RNase	=	ribonuclease
RNase A	=	ribonuclease pancreática
RNase T ₁	=	ribonuclease de <u>Apergillus oryzae</u>
DABA	=	cloreto do ácido diaminobenzoico
SDS	=	dodecil sulfato de sódio
MAK	=	albumina metilada - kieselguhr
SSC	=	solução contendo NaCl 0,15 M - citrato de sódio 0,015 M
1/10 SSC	=	solução contendo NaCl 0,015 M - citrato de sódio 0,0015 M
10 x SSC	=	solução contendo NaCl 1,5 M - citrato de sódio 0,15 M
EDTA	=	ácido etileno diaminotetraacético

DNA "double stranded" = preferimos adotar a nomenclatura inglesa pois não há nenhuma outra consagrada em língua portuguesa. Sinônimos: DNA nativo, bifilamentar, bicatenário, de fita dupla.

DNA "single stranded" = DNA desnaturado, unifilamentar, monocatenário, de fita simples.

DNA renaturado = DNA "double-stranded" obtido pela reassociação de moléculas complementares de DNA "single-stranded".

"Linkage" = a palavra inglesa foi usada indiferentemente com a versão brasileira, ligação, proposta pela Sociedade Brasileira de Genética. (Boletim VIII, nºs 1, 2, 3, agosto de 1966).

a. e. = atividade específica

RESUMO E PERSPECTIVAS

1) A técnica, já descrita na literatura, de separação de DNA "single-stranded" e DNA "double-stranded" através de gradientes de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4 - \text{Hg}^{2+}$ foi pela primeira vez utilizada com sucesso para separar híbridos DNA-RNA das duas formas de DNA. Embora os experimentos tivessem sugerido que a eficiência da separação dependa da predominância das porções híbridas da molécula, não houve a preocupação neste trabalho de se estabelecer a possível correlação entre densidade de flutuação, pesos moleculares e porcentagens de estruturas híbridas.

2) Os experimentos demonstraram, através dessa técnica, que os genes responsáveis pela síntese de rRNA (5S, 16S e 23S) se alternam no cromossomo de Bacillus subtilis formando grupos de genes separados por segmentos não homólogos a rRNA, cada grupo contendo um gene para cada espécie de rRNA. Não houve possibilidade de se excluir três dos possíveis modelos de arranjo entre esses genes em virtude da falta de informação a respeito dos segmentos de DNA, inter-grupo e/ou intra-grupo, não homólogos a rRNA.

3) A mesma técnica possibilitou o isolamento de fragmentos de DNA "single-stranded" contendo informação para a síntese de rRNA. A purificação obtida foi de aproximadamente 80 vezes, indicando uma porcentagem de pureza de 30%. Fizeram-se algumas especulações a respeito da natureza dos segmentos inter-gênicos que poderiam representar sequências nucleotídicas responsáveis pelo controle específico da transcrição de rRNA. Os grupos de genes isolados em fragmentos de DNA de peso molecular de aproximadamente $2,0 \times 10^6$ representariam então verdadeiros "operons" ribossômicos.

4) O isolamento dos genes responsáveis pela síntese de rRNA permitirá, entre outros, alguns estudos relacionados com o mecanismo da transcrição:

a) A reassociação dos fragmentos isolados com suas sequências complementares permitirá a obtenção de um "template" específico para a RNA polimerase e o subsequente estudo da possível existência de fatores citoplasmáticos específicos de controle positivo da transcrição em Bacillus subtilis.

b) A ordem dos genes ribossômicos em relação à extremidade 3' da molécula poderá ser estudada através de hibridização controlada seguida de hidrólise catalisada por exonucleases específicas.

c) O isolamento de fragmentos de tamanhos diversos permitirá, através da técnica de transformação, o estudo das relações topológicas entre os genes para RNA ribossômico e os genes responsáveis pela síntese de proteínas ribossômicas.

5) As técnicas desenvolvidas neste trabalho poderão ser aplicadas para o isolamento de qualquer gene desde que se obtenha em estado puro o produto de sua transcrição.

(1) INTRODUÇÃO

Embora a existência de RNA citoplasmático fôsse conhecida há muito tempo (apud Davidson & Chargaff, 1955), somente há aproximadamente 25 anos sugeriu-se a sua participação no processo de síntese proteica quando Caspersson (1941) e Brachet (1942) observaram que células em processo ativo de síntese de proteínas eram ricas em RNA.

A partir desse momento intensa pesquisa não só confirmou o envolvimento do RNA citoplasmático na síntese de proteínas mas abriu largas avenidas que conduziram ao enorme acúmulo de informação que se tem atualmente a respeito desse processo dos mais fundamentais para a dinâmica da célula (apud Petermann, 1964).

Particularmente importantes foram os trabalhos que localizaram o RNA citoplasmático como parte integrante de uma estrutura que podia ser separada dos outros componentes celulares. Assim, Claude (1946) conseguiu obter de homogeneizados de fígado de cobaia uma fração membranosa que continha RNA, à qual deu o nome de "microssomo". A partir de 1948 o estudo das frações subcelulares, particularmente do "microssomo", foi bastante acelerado com a descoberta de que frações mais puras podiam ser obtidas pelo fracionamento de homogeneizados de fígado de rato em soluções isotônicas (e hipertônicas) de sacarose (Hogeboom, Schneider & Palade, 1948).

Um outro grande passo nesse setor foi dado quando se reconheceu que os "microssomos" são partículas complexas que podem ser separadas num componente membranoso contendo fosfolipídios e proteínas e num componente particulado que contém 60% de RNA e 40% de proteína a que se deu o nome de ribossomo (Chao & Schachman, 1956; Chao, 1957; Palade & Siekevitz, 1956; Petermann, Hamilton & Mizen, 1954; Petermann & Hamilton, 1957) e quando foi descoberto que é nos ribossomos que se dá o processo de síntese de proteínas (Littlefield, Keller, Gross & Zamecnick, 1955; Littlefield & Keller, 1957).

A pesquisa em ribossomos nos organismos procarióticos foi facilitada pela ausência de retículo endoplasmático no citoplasma desses organismos. Ribossomos foram visualizados em lisados de bactéria por meio de microscopia eletrônica em 1943 (Luria, Delbrück & Anderson, 1943). Um estudo detalhado de suas propriedades físico químicas por meio de ultracentrifugação analítica foi feito em diferentes organismos por Schachman, Pardee & Stanier (1952) e por Siegel, Singer & Wildman (1952) em Escherichia coli.

(A) Estrutura dos ribossomos nos organismos procarióticos

Os ribossomos dos organismos procarióticos são formados de duas subunidades fundamentais: a maior, com um coeficiente de sedimentação

tação de 50 S e menor, com um coeficiente de sedimentação de 30 S (Tissières, Watson, Schlessinger & Hollingworth, 1959; Britten, Lark & Norcross, 1960; Bowen, Dagley, Sykes & Wild, 1961; Lederberg & Lederberg, 1961; Kashket, Tave & Beck, 1960; Utsunomiya & Hess, 1961). Durante a síntese proteica, mRNA (Okamoto & Takanami, 1963; Takanami & Okamoto, 1963) e tRNA (Kaji, Suzuki & Kaji, 1966) combinam-se com a subunidade 30 S enquanto que a cadeia polipeptídica crescente liga-se à subunidade 50 S por meio de uma molécula de tRNA (Gilbert, 1963). Para maiores detalhes sobre o mecanismo de síntese proteica o leitor deve consultar Lengyel (1969).

As subunidades 50 S e 30 S têm um peso molecular médio de $1,8 \times 10^6$ e $0,85 \times 10^6$, respectivamente e ambas contêm 64% de RNA e 36% de proteína (Tissières et al., 1959) bem como uma pequena quantidade de poliaminas (Spahr, 1962).

A subunidade 50 S possui uma única molécula de RNA com um coeficiente de sedimentação de 23 S e a subunidade 30 S também possui uma única molécula de RNA com um coeficiente de sedimentação de 16 S (Kurland, 1960; Iwabuchi, Kono, Oumi & Osawa, 1965). Os pesos moleculares dos RNAs 23 S e 16 S são aproximadamente $1,1 \times 10^6$ e $0,55 \times 10^6$, respectivamente, quando medidos por meios físicos (Kurland, 1960; Stanley & Bock, 1965) e químicos (Midgley, 1965 a, b, c).

O RNA ribossômico possui uma composição de bases caracteristicamente assimétrica no que concerne às altas quantidades de guanina e comparativamente baixas quantidades de citosina (Spahr & Tissières, 1959; Osawa, 1960). Embora a composição de bases dos RNAs 16 S e 23 S tenha pontos em comum, existem entre eles, quanto a esse aspecto, diferenças significativas (Midgley, 1962) bem como existem diferenças entre as duas espécies de RNA no que diz respeito à distribuição de nucleotídeos (Aronson, 1962; Dubin & Gunalp, 1967). As seqüências nucleotídicas predominantes na extremidade 3' da molécula são diferentes para RNA 23 S e 16 S (McIlreavy & Midgley, 1967) bem como o são as seqüências da extremidade 5' (Takanami, 1967; Sugiura & Takanami, 1967). Esses resultados vieram negar uma sugestão anterior (Kurland, 1960) de que a subunidade 50 S poderia conter duas moléculas de RNA 16 S. Verificou-se que uma manipulação menos cuidadosa durante a extração de RNA 23 S produz RNA com coeficientes de sedimentação de aproximadamente 16 S (Midgley, 1965 a; Midgley, 1965 c). Uma publicação recente, entretanto, faz a mesma sugestão de que o RNA 23 S seria formado pela ligação covalente de duas moléculas de RNA 16 S (Mangiarotti, Apirion, Schlessinger & Silengo, 1968). Essa sugestão, baseada na evidência extremamente indireta de que as duas espécies de RNA são sintetizadas no mesmo período de tempo é totalmente contrária à sólida evidência apresentada acima. Além do mais Oishi (1969) não verifica competição entre as duas espécies em experimentos de hibridização com DNA, do mesmo modo que Yankofsky & Spiegelman (1962 a, b; 1963), que demonstraram a existência de dois cistrons distintos responsáveis pela síntese das duas espécies de RNA, estabelecendo definitivamente o fato de que o RNA 23 S e o RNA 16 S são duas espécies moleculares inde

pendentes.

Além dos quatro nucleotídeos usuais o RNA ribossômico possui várias bases metiladas (Gordon & Boman, 1964; Hayashi, Osawa & Miura, 1966; Dubin & Gualp, 1967), nucleotídeos contendo O-metil ribose (Hayashi et al., 1966; Dubin & Gualp, 1967; Nichols & Lane, 1966; Nichols & Lane, 1967) e ácido pseudo-uridílico (Dubin & Gualp, 1967).

A subunidade ribossômica 50 S contém uma outra molécula de RNA cujo coeficiente de sedimentação é de aproximadamente 5 S (Gallibert, Lelong, Larsen & Boiron, 1967; Rosset, Monier & Julien, 1964; Comb & Zehavi-Willner, 1967; Midgley & McIlreavy, 1967; Morell, Smith, Dubnau & Marmur, 1967). O RNA 5 S é uma espécie independente de RNA que faz parte da estrutura da subunidade 50 S e cuja função é totalmente desconhecida (apud Osawa, 1968).

Além de RNA as subunidades ribossômicas contêm 34% de proteínas. As proteínas componentes de ambas as subunidades foram identificadas primeiramente por eletroforese em gel de amido (Waller & Harris, 1961; Waller, 1964) e posteriormente em gel de acrilamida (Leboy, Cox & Flaks, 1964) que possui maior capacidade de resolução. Embora haja uma relativa discordância na literatura em relação ao número de espécies proteicas existentes em cada uma das subunidades, resultados recentes parecem indicar que a subunidade 30 S de ribossomo de Escherichia coli contém pelo menos 17 polipeptídeos distintos (Waller & Harris, 1961; Moore et al., 1968; Fogel & Sypherd, 1968 a, b; Craven, Voynow, Hardy & Kurland, 1969) enquanto que a subunidade 50 S possui aproximadamente 35 (Traut et al., 1969).

(B) Genes ribossômicos

Só recentemente tem-se feito um certo progresso no estudo dos genes que contêm informação para a síntese de componentes ribossômicos em virtude da grande dificuldade de obtenção de mutações. Schlessinger & Apirion (1969) definem um gene ribossômico estrutural como aquele que possui a informação da estrutura primária de uma proteína ou RNA ribossômicos. Uma mutação ribossômica seria portanto aquela que modifica a estrutura primária do elemento ribossômico. Aquêles autores excluem como mutação ribossômica aquela que afeta mecanismos que possam regular a velocidade de síntese dos ribossomos. As únicas mutações ribossômicas das quais têm-se certeza são as mutações que envolvem proteínas que participam na resistência ou sensibilidade à ação de alguns antibióticos no processo de síntese proteica. De todos os antibióticos estudados maior quantidade de informação foi obtida com estreptomicina. A estreptomicina é um antibiótico que inibe síntese proteica ao nível ribossômico (Spotts & Stanier, 1961). Cepas resistentes à ação da droga contêm ribossomos que num sistema de síntese proteica in vitro em presença de poli-U ou RNA de fago R17 (Anderson, Davies & Davis, 1967; Luzzato, Apirion & Schlessinger, 1968) são mais resistentes a ela do que ribossomos

de células sensíveis (Flaks, Cox, Whitting & White, 1962; Speyer, Lengyel & Basilio, 1963) e a resistência está associada à subunidade 30 S (Cox, White & Flaks, 1964; Davies, 1964). Estudos recentes muito elegantes finalmente demonstraram que sensibilidade ou resistência à estreptomicina são conferidos por uma proteína da subunidade 30 S (e não pelo RNA). Essa conclusão foi obtida pelo estudo da capacidade funcional de ribossomos reconstituídos in vitro a partir de seus componentes (RNA e proteínas) isoladas de células sensíveis e resistentes à estreptomicina (Traub & Nomura, 1968; Ozaki, Mizushima & Nomura, 1969).

Da mesma forma demonstrou-se que a grande resistência à lincomicina e à eritromicina encontrada em organismos Gram negativos como E. coli está localizada nos ribossomos (Chang, Sih & Weisblum, 1965). Esta descoberta levou ao isolamento de mutantes sensíveis àqueles antibióticos (Apirion, 1967) e à demonstração de que pelo menos em um desses mutantes (lir33) a mutação causava o aparecimento de uma proteína modificada na subunidade 50 S (Krembel & Apirion, 1968). Igualmente demonstrou-se que uma proteína da subunidade 30 S é responsável pela resistência à espectinomicina (Bollen, Helser, Yamada & Davies, 1969).

Todas as evidências acima apontadas deixam pouca dúvida de que resistência e sensibilidade a antibióticos cujo mecanismo de ação seja a inibição da síntese proteica ao nível dos ribossomos, sejam determinadas por proteínas específicas integrantes das subunidades ribossômicas.

(C) Mapeamento cromossômico dos genes ribossômicos

A aplicação de técnicas clássicas de mapeamento na análise genética de mutantes ribossômicos encontrou inúmeras dificuldades inerentes ao sistema em estudo. Embora mutações que determinam resistência a uma determinada droga sejam fáceis de ser isoladas a análise genética por meio de cruzamento (no caso de E. coli) entre mutantes torna-se impraticável tendo em vista que células sensíveis à droga têm o seu crescimento inibido. Além disso, algumas células resistentes a drogas não crescem satisfatoriamente (Apirion & Schlessinger, 1968). Apesar destas e de outras dificuldades técnicas (apud Schlessinger & Apirion, 1969) a combinação de técnicas de conjugação e transdução estabeleceu que em E. coli todas as mutações que afetam a subunidade 30 S estão localizadas umas próximas das outras na região que contém o locus responsável pela resistência à estreptomicina. Em circunstância nenhuma um gene não-ribossômico foi encontrado dentro dos limites desta região (apud Schlessinger & Apirion, 1969), o que sugere que essa região do cromossomo talvez contenha todos os genes responsáveis pela síntese de componentes da subunidade 30 S. Muito menos informação, entretanto, foi obtida para os genes que determinam a estrutura da subunidade 50 S. Somente quatro mutações que afetam essa subunidade foram relatadas na literatura. Das quatro, três se encontram espalhadas no cromossomo de E. coli e nenhuma delas se encontra próxima do locus da estreptomicina (Apirion, 1967).

Embora uma apreciável quantidade de informação sobre os genes que contêm o código para a síntese de proteínas ribossômicas em E. coli tenha sido publicada o mesmo não se dá com os genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico. Dois grupos de autores estabeleceram que há duas regiões no cromossomo de E. coli que contêm os genes para RNA ribossômico. Ambos concordam que uma dessas regiões localiza-se nas proximidades do locus da estreptomicina. Entretanto, enquanto Cutler & Evans (1967) localizam a segunda região nas proximidades do local de integração do bacteriófago lambda, Rudner et al. (Rudner, Prokop-Schneider & Chargaff, 1964; Rudner, Rejman & Chargaff, 1965) localizaram-na entre o locus da histidina e o locus do triptofano. Um terceiro grupo de pesquisadores encontrou resultados totalmente diferentes dos descritos acima (Vermeulen & Atwood, 1968).

Enquanto que em E. coli pouco se sabe sobre os genes para RNA ribossômico, em Bacillus subtilis um progresso muito maior foi verificado nesse setor. Vários pesquisadores tiraram vantagem do fato de que em B. subtilis uma correlação mais precisa entre gene e produto pode ser feita pelo uso de técnicas de hibridização de RNA com DNA associadas a medidas de atividade biológica de preparações puras de DNA através do fenômeno da transformação.

Oishi & Sueoka (1965), através de germinação sincronizada de esporos de B. subtilis (Oishi, Yoshikawa & Sueoka, 1964) em meio contendo 5-bromouracila, conseguiram determinar a ordem de replicação de vários genes. Esses autores permitiram que a germinação se processasse em tempos diferentes após os quais isolavam DNA que era centrifugado em gradientes de CsCl. Como o DNA formado de novo continha 5-bromouracila em vez de timina, duas frações de DNA eram encontradas no gradiente: uma que continha o DNA do esporo e outra que continha o DNA sintetizado de novo durante a germinação. Esta última, mais pesada, situava-se numa região de maior densidade no gradiente. As diferentes frações de DNA eram então analisadas pela sua capacidade de hibridizar com RNA 16 S e RNA 23 S e de transformar células auxotróficas em relação a um determinado caráter. Como as diferentes amostras de DNA foram obtidas em tempos diferentes durante a replicação sincronizada do cromossomo, aqueles autores foram capazes de determinar a ordem gênica a partir do ponto inicial de replicação e, conseqüentemente, que os genes para RNA ribossômico localizam-se próximos do ponto de origem da replicação, entre dois genes envolvidos no metabolismo de purinas.

Estudos de hibridização entre as duas espécies de RNA ribossômico e DNA indicaram, através de curvas de saturação, que 0,13% de DNA de B. subtilis é complementar a RNA 16 S e 0,25% a RNA 23 S. Tomando-se os valores de $0,56 \times 10^6$ e $1,1 \times 10^6$ para os pesos moleculares de RNA 16 S e RNA 23 S respectivamente (Kurland, 1960) e de $1,3 \times 10^9$ para o peso molecular do cromossomo de B. subtilis (Ganesan, 1965) calculou-se (Oishi & Sueoka, 1965) que o cromossomo contém 3 genes redundantes para cada uma das espécies de RNA ribossômico.

Usando técnicas de sincronização da replicação semelhantes às descritas acima, outros autores confirmaram esses resultados e estenderam as conclusões de Oishi & Sueoka (1965) para outros componentes ribossômicos. Dubnau, Smith & Marmur (1965) demonstraram que os genes que determinam resistência a estreptomicina, eritromicina, micrococcina e briamicina localizam-se muito próximos dos genes para RNA ribossômico. Num estudo mais detalhado (Smith, Dubnau, Morell & Marmur, 1968) determinou-se que 60-80% dos genes homólogos a RNA 5 S, 16 S e 23 S, bem como a tRNA, localizam-se na porção inicial do cromossomo, enquanto que os restantes 20-40% localizam-se na porção terminal (Quadro I). Como esses autores tomaram uma medida mais recente para o peso molecular do cromossomo, 4×10^9 (Eberle & Lark, 1967), calculou-se que o número de genes para RNA ribossômico 16 S e 23 S é de aproximadamente 10.

QUADRO I

Mapa Genético do cromossomo de *Bacillus subtilis*. As interrupções do círculo representam regiões onde ainda não se conseguiu demonstrar ligação entre os genes pertencentes a dois segmentos adjacentes (simplificado de Dubnau, 1970). Notar que os genes para RNA ribossômico (rRNA A) e de transferência (tRNA A) bem como os que determinam resistência a antibióticos estão em sua grande maioria localizados numa pequena região do primeiro quadrante do cromossomo. As distâncias são aproximadas e baseadas nas frequências de cotransdução usando fago PBS1. Em alguns casos entretanto foram usados valores obtidos por transformação. Símbolos: kan, kanamicina; lin, lincomicina; mic, micrococcina; mit, mitomicina; nea, neamicina; neo, neomicina; pab, requer ácido paraaminobenzóico; pac, pactomicina; rfm, rifamicina; spc, spectinomicina; str, estreptomicina; ery, eritromicina; col, colistina. A seta pontilhada indica o sentido da replicação do cromossomo.

O fato de que os genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico são redundantes, a maioria dos quais acha-se acumulada numa região específica do cromossomo, coloca a questão de como os diversos genes para as três espécies de RNA ribossômico nela se localizam, uns em relação aos outros. Teoricamente é grande o número de possibilidades das quais as mais plausíveis encontram-se no Quadro II.

QUADRO II

Alguns modelos possíveis de arranjo entre os genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico em *Bacillus subtilis*. As linhas pontilhadas representam segmentos do cromossomo não homólogos ao RNA ribossômico.

Seria, entretanto, muito difícil por métodos genéticos clássicos tentar entender a organização estrutural fina desses genes levando-se em consideração que o maior deles (RNA 23 S) não contém mais do que 4000 nucleotídeos. Além disso qualquer mutação nesses genes seria muito provavelmente letal.

Resolvemos então estudar o problema do arranjo relativo dos genes para RNA ribossômico no cromossomo de *B. subtilis* através de métodos bioquímicos, aproveitando o fato conhecido de que uma distinta separação entre DNA "single-stranded" e "double-stranded" pode ser obtida por centrifugação em gradientes de densidade de sulfato de cério em presença do íon mercúrico (Nandi, Wang & Davidson, 1965). A hibridização de

RNA ribossômico com fragmentos de DNA "single-stranded" parcialmente enriquecido em seqüências nucleotídicas homólogas a essa espécie de RNA, seguida pela separação desses híbridos do DNA não hibridizado, forneceu informação que indica que os três genes estão dispostos no cromossomo de um modo alternado.

As técnicas utilizadas no decorrer desse trabalho levaram a uma purificação dos genes em questão. Sob esse aspecto, é necessário comentar que as maiores dificuldades que podem ser encontradas no isolamento de um gene específico (ou um grupo de genes) são a continuidade física dos diversos genes na molécula de DNA e a relativa semelhança na composição de bases da maioria deles. Quando a composição de bases de um determinado gene é peculiar, como por exemplo, haver uma predominância no conteúdo de GC, a sua separação do restante do DNA, após fragmentação da molécula original em tamanhos convenientes, pode ser obtida por métodos clássicos (Brown & Weber, 1968 a, b; Takahashi, 1969). Esses métodos, entretanto, não podem ser amplamente aplicados pois eles se baseiam em grandes diferenças na composição de bases. O método que descrevemos nesse trabalho, ao contrário, poderá ser largamente usado na purificação de qualquer gene desde que seja possível a obtenção de seu produto em alto estado de pureza.

[2] MATERIAL E MÉTODOS

(A) Material

Uma cepa mutante de Bacillus subtilis (168 ura⁻, his⁻) proveniente do tipo selvagem 168W foi usada para a preparação de RNA ribossômico 16 S e 23 S marcado com trítio. O mutante 168 thy⁻, ind⁻, Sm^r, Er^r foi usado para a preparação de DNA. A bactéria tipo selvagem (168W) foi empregada para a preparação de RNA 23 S, 16 S e 5 S não radioativos e de RNA 5 S marcado com ³²P.

Albumina metilada foi preparada no laboratório a partir de albumina de sêro bovino (Armour) pelo método de Mandell & Hershey (1960). Kieselguhr foi obtido na Johns-Manville. Hidroxiapatita foi preparada de acordo com o método de Miyazawa & Thomas (1965). DABA foi comprada na Aldrich Chemical Co., Inc. Sulfato de césio foi obtido de Stanley H. Cohen Co. DNase pancreática (eletroforêticamente pura) e RNase foram compradas da Worthington Biochemical Corp. RNase T1 foi obtida da Sankyo Co (Tóquio) e actinomicina D da Merck, Sharp & Dohme. ³H-uridina (a.e. = 7,83 mC/ μ mol) foi obtida na New England Nuclear Corp. Os filtros de nitrocelulose usado em todos os experimentos foram comprados da Carl Schleicher & Schuell Co. (tipo B6). Todos os outros reagentes usados possuíam grau analítico.

(B) Métodos gerais

(i) Preparação de RNA ribossômico:

RNA ribossômico marcado com trítio foi preparado essencialmente de acordo com o que foi descrito por Oishi & Sueoka (1965). A cepa 168 ura⁻ his⁻ foi crescida a 37°C em 20 ml de um meio consistindo do meio básico de Anagnostopoulos & Spizizen (1961) suplementado com ³H-uridina (100 μ C/ml), L-triptofano (50 μ g/ml), L-histidina (100 μ g/ml), uridina (10 μ g/ml), hidrolisado de aminoácidos (250 μ g/ml) e extrato de levedo (40 μ g/ml). Quando o crescimento bacteriano atingiu o início da fase estacionária (2 a 3 x 10⁸ células viáveis/ml) as células foram submetidas à centrifugação e posteriormente ressuspensas em 40 ml do mesmo meio contendo 100 μ g de uridina não radioativa por ml. Nesse meio as células foram incubadas por 90 minutos adicionais quando então 10 μ g de actinomicina D foram adicionadas por ml de meio permitindo-se que a incubação se processasse por mais 10 minutos. Esse tratamento permite a exaustão do RNA mensageiro pré-formado e inibe a síntese de nova mensagem (Levinthal, Keynan & Higa, 1962). As células foram então lavadas e ressuspensas em 2 ml de Tris 0,01 M, pH 7,4, MgCl₂ 0,005 M. Depois da adição de DNase (10 μ g/ml) e lisozima (1 mg/ml) a suspensão foi submetida a ciclos repetidos de congelamento rápido e descongelamento (7 a 8 vezes) após o que adicionou-se dodecil sulfato de sódio para uma concentração fi-

nal de 2%. As células lisadas foram então prontamente agitadas com um volume igual de fenol saturado com água por 30 minutos à temperatura ambiente e o RNA foi precipitado da fase aquosa pela adição de 2,5 volumes de etanol frio. O precipitado foi dissolvido em 1,5 ml do tampão de Tris-MgCl₂ acima descrito e a precipitação etanólica foi repetida por duas vezes. A amostra de RNA foi então cromatografada numa coluna de MAK para separar os RNAs 16 S e 23 S segundo o método descrito por Oishi & Sueoka (1965). Ambas as espécies de RNA foram purificadas por recromatografia na coluna de MAK. As atividades específicas finais foram 4,23 x 10⁷ counts/min/ μ mol (equivalentes nucleotídicos) e 4,33 x 10⁷ counts/min/ μ mol (equivalentes nucleotídicos) para os RNA 16 S e 23 S respectivamente.

RNAs 16 S e 23 S não radioativos foram preparados pelo mesmo processo com as seguintes diferenças: uma cepa tipo selvagem foi usada como fonte de material e o crescimento foi feito no meio de Anagnostopoulos & Spizizen suplementado apenas com 0,5% de hidrolisado de aminoácidos. As células foram coletadas no fim da fase logarítmica de crescimento (2 x 10⁸ células/ml) sendo que a segunda incubação bem como o tratamento por actinomicina D foram omitidos. Ambas as espécies de RNA ribossômico foram isoladas e purificadas como descrito anteriormente. O grau de contaminação de uma espécie de RNA pela outra foi determinado por hibridização competitiva. Essa análise revelou que as frações de RNA obtidas eram puras,

Para a preparação de RNA 5 S marcado com fósforo radioativo a cepa 168W foi crescida em 150 ml de um meio com baixa concentração de fosfato contendo: NaCl (3g/l), MgSO₄.7H₂O (0,4 g/l), CaCl₂.2H₂O (4 mg/l), lactato de sódio (2 g/l), MnSO₄ (0,4 mg/l), arginina (100 mg/l), Bacto-peptona (5 g/l), glicose (5 g/l), ³²P (330 μ C/ml) e Tris, pH 7,4 (25 mM) a 34°C. Quando a cultura atingiu a um nível de 4 x 10⁸ células/ml ela foi diluída com um volume igual de meio contendo alta concentração de fosfato (o mesmo meio descrito acima substituindo-se o fosfato radioativo por K₂HPO₄ (7 g/l) e KH₂PO₄ (3 g/l) após o que a cultura foi reincubada por 1 hora. Terminada a incubação a cultura foi resfriada e imediatamente centrifugada. As células foram então lavadas uma vez com 20 ml de Tris 0,005 M, pH 7,5 e MgCl₂ 0,01 M, ressuspensas em 9 ml do mesmo tampão e rompidas numa Prensa Francesa (American Instrument Co.) com uma pressão de 1,6 ton/cm². Após a adição de desoxirribonuclease (10 μ g/ml) e bentonita (2 mg/ml) a preparação foi centrifugada a 27.000 x g por 15 min a 4°C para sedimentar células intactas e restos de membrana. Ao sobrenadante adicionou-se novamente Bentonita (2 mg/ml) e a mistura foi centrifugada a 105.000 x g por 1 hora a 4°C no rotor 40 da ultracentrifuga Spinco, modelo L-2. O sedimento ribossômico assim obtido foi lavado com acetato de sódio 0,1 M, pH 5,2, evitando-se perturbar o sedimento. Os ribossomos foram então suspensos em 10 ml do mesmo tampão de acetato suplementado com 0,5% de SDS. RNA 5 S foi então extraído e purificado de acordo com o descrito por Morell et al. (1967) o que inclui uma extração fenólica, precipitação etanólica e cromatografia em Sephadex

G-100 e MAK. A atividade específica do RNA 5 S assim preparado ^{variou} de $1-2 \times 10^6$ counts/min/ μ g.

Para a preparação do RNA 5 S não radiativo procedeu-se do mesmo modo exceto que a cultura de células foi feita no meio contendo alta concentração de fosfato.

(ii) Preparação de ^3H -RNA rapidamente marcado:

RNA rapidamente marcado ("mRNA") foi preparado de acordo com a técnica de Dubnau, Smith, Morell & Marmur (1965). A atividade específica do RNA preparado foi de 16 000 counts/min/ μ g.

(iii) Isolamento de DNA:

As células foram crescidas no meio de Penassay (Difco, 25 g/l) a 37°C e coletadas na fase tardia de crescimento exponencial. O DNA foi obtido de acordo com o método de Saito & Miura (1963) que inclui lise das células por lisozima e SDS a pH 9 seguida de extração fenólica e tratamento por RNase. A purificação do DNA foi feita através de precipitação por isopropanol de acordo com o que foi descrito por Marmur (1961). A contaminação da preparação de DNA por RNA foi menor que 0,5%.

(iv) Determinação de DNA:

A concentração de DNA foi medida pelo método do indol (Ceriotti, 1952) e por absorbância a 260 m μ com DNA de timo de bezerro como padrão (Worthington). Entretanto, nas duas últimas fases de purificação do gene uma modificação do método fluorimétrico de Kissane & Robins (1958) foi usado. Vinte μ l de uma solução de DABA 2 M em água foram adicionados a tubos contendo amostras secas de DNA. Após enérgica agitação, os tubos, tampados com rolha de esmeril, foram incubados por 30 min a 60°C. Imediatamente após a incubação, alíquotas (2 a 8 μ l) foram removidas com uma micro-seringa Hamilton e adicionadas a uma célula de fluorímetro contendo 2 ml de ácido perclórico 0,6 N. As leituras dos brancos foram reduzidas a um mínimo extraindo-se previamente a solução de DABA por três vezes, com 20 mg de carvão (Norit A) lavado com ácido. Para evitar qualquer contaminação residual com desoxiribose os tubos foram previamente lavados com ácido e exaustivamente enxaguados antes da adição das amostras de DNA. Esta precaução fez-se necessária pois uma pequena contaminação levaria a resultados falsos uma vez que as quantidades de desoxiribose determinadas variaram de 50 a 3000 m μ g. Nesse intervalo encontrou-se uma relação linear entre leituras de emissão e quantidades de DNA de timo de bezerro e de B. subtilis usados como padrão. A fluorescência foi determinada num fluorímetro Eppendorf. Um filtro Eppendorf que deixava passar a radiação excitante de 405 e 436 m μ foi colocado na frente da lâmpada de mercúrio. A radiação fluorescente emitida foi isolada por uma combinação de um filtro Eppendorf (400 a 3000 m μ) com um filtro Wratten nº 8 da Kodak que bloqueia radiação de comprimento de onda abaixo de 460 m μ . Esses dois filtros foram colocados na frente do tubo fo

tomultiplicador. A saída do tubo estava conectada a um registrador potenciométrico Honeywell. Os três métodos de medida de DNA concordaram uns com os outros dentro de um erro de $\pm 5\%$.

(v) Determinação de pesos moleculares:

Os pesos moleculares das amostras de DNA foram estimados por centrifugação em gradiente de sacarose alcalino (sacarose 5-20%, NaCl 0,9 M, NaOH 0,1 M, EDTA 0,001 M) usando a seguinte equação (Studier, 1965): $S_{20,w}^0 = 0,0528 (M)^{0,4}$. Os padrões usados foram DNA de fago T7 ($S = 37,2$) ou DNA de fago T4 fragmentado até $S = 15,7$. O coeficiente de sedimentação do fago T4 foi determinado por velocidade de sedimentação na centrífuga analítica Spinco, Modelo E e confirmado por centrifugação em gradiente de sacarose alcalina usando-se como referência DNA de fago $\phi 80$ (gentilmente fornecido pelo Dr. H. Yamagishi).

Como alternativa para estimar pesos moleculares relativamente baixos usou-se um gradiente composto de sacarose 5-20% contendo NaCl 0,15 M e citrato de sódio 15 mM, pH 7. A equação usada para o cálculo do peso molecular foi $S_{20,w}^0 = 0,022 (M)^{0,48}$, sugerida por Eigner & Doty (1965). O DNA padrão usado como referência foi extraído de fago fd (gentilmente fornecido pelo Dr. Loren Day) que nas condições usadas tem um $S = 24,4$ (Marvin & Hoffman-Berling, 1963).

(vi) Determinação da radioatividade:

As membranas de nitrocelulose secas contendo material radioativo foram colocadas em frascos de cintilação na presença de 10 ml de fluido de cintilação (PPO, 4g/l; POPOP, 0,1 g/l; tolueno 1000ml) e a radioatividade foi determinada num espectrômetro Beckman (LS-200 B) com eficiência de 50% para trítio.

(C) Métodos especiais usados durante as fases de purificação

Neste item procuramos descrever os métodos que foram usados para a purificação dos genes para RNA ribossômico com a finalidade de evitar que a apresentação dos resultados ficasse excessivamente complicada com detalhes técnicos. Essas etapas são, em linhas gerais, as mesmas usadas para o mapeamento dos genes. As variações que foram empregadas neste último caso serão descritas nos textos das figuras.

(i) Fragmentação e desnaturação do DNA:

A preparação purificada de DNA (13 mg) foi dissolvida em 1/10 SSC para uma concentração final de 43 $\mu\text{g/ml}$ e fragmentada a 4°C por 30 min num misturador mecânico Sorvall. Nestas condições o peso molecular médio do DNA obtido foi de $7,0 \times 10^6$ daltons. Adicionou-se então NaOH para uma concentração final de 0,1 N. Após 20 minutos à tem

peratura ambiente a solução foi neutralizada com NaH_2PO_4 . Após a desnaturação a solução de DNA foi prontamente usada nos experimentos subsequentes.

(ii) Separação das cadeias complementares por cromatografia em albumina metilada-kieselguhr (MAK):

A coluna de MAK (5,1 cm x 10 cm) foi preparada segundo Mandell & Hershey (1960) com as quantidades de todos os componentes aumentadas de 4 vezes. A solução de DNA fragmentado e desnaturado foi aplicada à coluna depois que se ajustou a concentração de sal para 0,6 M de NaCl e 0,05 M de fosfato de sódio, pH 6,7. A coluna foi lavada e exaustivamente com o mesmo tampão antes e depois da absorção do DNA. A eluição foi feita à temperatura ambiente com um gradiente linear de NaCl (0,6 M a 1,2 M, 900 ml totais) contendo o tampão de fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,7. As frações eluídas, que possuíam capacidade de hibridização com RNA ribossômico (ensaiadas independentemente com ^3H -RNA 23 S e 16 S), foram reunidas e dialisadas no frio contra 1/10 SSC por 3 horas com a finalidade de remover o excesso de sal. A solução foi então concentrada por diálises repetidas contra Sephadex sólida (G75). A solução, após atingir 1/7 do seu volume original, foi dialisada durante a noite, a 4°C, contra 4 litros de Na_2SO_4 0,05 M-borato de sódio 0,01 M, pH 8,0. A concentração de DNA obtida foi de 188 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

(iii) Hibridização do DNA "single-stranded" com RNA ribossômico:

O DNA "single-stranded" obtido como o descrito acima (280 μg) foi incubado a 37°C por 24 horas com 26 μg de ^3H -RNA 16 S (a.e. = $1,4 \times 10^7$ counts/min/ μmol) e 31 μg de ^3H -RNA 23 S (a.e. = $1,6 \times 10^7$ counts/min/ μmol) na presença de NaCl 0,32 M, fosfato de sódio 0,01 M (pH 7,0) e formamida na concentração final de 32%. Após a incubação, a mistura (volume total = 5,6 ml) foi dializada a noite contra NaCl 0,05 M - fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0) para remover a formamida. Imediatamente antes da cromatografia em hidroxiapatita (ver abaixo), o híbrido dialisado foi incubado por 15 minutos a 37°C com 20 μg de RNase A e 30 unidades de RNase T₁ com a finalidade de hidrolisar o RNA não hibridizado.

(iv) Cromatografia do híbrido DNA-RNA em coluna de hidroxiapatita:

A mistura tratada com RNase foi prontamente aplicada a uma coluna de hidroxiapatita (total = 280 μg de DNA; 239.000 counts/min) de 1,7 cm x 4,3 cm, previamente equilibrada com fosfato de sódio 0,07 M, pH 7,0. A coluna foi então lavada 5 vezes com 5 ml do mesmo tampão. Fêz-se a eluição à temperatura ambiente com um gradiente linear de fosfato de sódio (0,07 M a 0,4 M, 240 ml totais) a pH 7,0. As frações que continham material radioativo foram coletadas, reunidas e concentradas para um total de 4 ml com Sephadex sólida. O híbrido assim purificado foi finalmente dialisado por três vezes contra 4 litros de Na_2SO_4 0,02M borato de sódio 0,01 M, pH 8,0.

- (v) Centrifugação do híbrido DNA-RNA em gradiente de densidade de sulfato de césio-mercúrio (2^+):

Nandi, Wang & Davidson (1965) já descreveram os detalhes desse método para separar DNA "single-stranded" de "double-stranded". O híbrido DNA-RNA ($50 \mu\text{g}$, calculado na base da quantidade de DNA) eluído da coluna de hidroxiapatita foi misturado com $25 \mu\text{g}$ de DNA nativo de B. subtilis, $0,3 \text{ ml}$ de tampão de borato de sódio $0,2 \text{ M}$, $\text{pH } 9,0$ e $3,6 \text{ g}$ de Cs_2SO_4 sólido. Após a dissolução completa do sal, adicionou-se lentamente e com leve agitação $0,55 \text{ ml}$ de HgCl_2 10^{-4} M . Esta quantidade de mercúrio corresponde a um R_F (relação molar entre Hg^{2+} total e DNA (fosfato) total) de $0,27$. A densidade da solução foi levada para $1,583 \text{ g/cm}^3$ pela adição de água. Usou-se a equação $\rho^{25^\circ} = 13,6986 \eta_D^{25} - 17,3233$ (Vinograd & Hearst, 1962) para o cálculo da densidade e a partir do índice de refração, medido por refratometria. A mistura, com um volume total de $4,9 \text{ ml}$ foi centrifugada a 34.000 rev/min por 43 horas a 4°C no rotor SW 50.1 da Spinco.

O DNA nativo, usado como marcador de densidade, foi previamente purificado por centrifugação em gradiente de $\text{Cs}_2\text{SO}_4 - \text{Hg}^{2+}$ com a finalidade de eliminar-se qualquer DNA na forma "single-stranded" ou "double-stranded" parcial. Tanto o híbrido DNA-RNA quanto o DNA nativo foram extensivamente dialisados (três vezes contra 4 litros de Na_2SO_4 $0,02 \text{ M}$ - borato de sódio $0,01 \text{ M}$, $\text{pH } 8,0$) antes da centrifugação. As membranas de diálise foram exaustivamente lavadas com água bi-destilada antes de serem usadas. Essas precauções foram necessárias para eliminar ânions que poderiam agir como fortes quelantes do íon mercúrico. Após a centrifugação coletaram-se frações de 5 gotas através de punção do fundo do tubo. Aos tubos pares adicionou-se $0,3 \text{ ml}$ de NaCl $0,015 \text{ M}$ -EDTA $0,001 \text{ M}$ e determinou-se a absorbância a $260 \text{ m}\mu$ e a radioatividade das amostras. As frações às quais não se adicionou tampão e que não continham radioatividade ou substâncias absorvendo radiação ultravioleta foram usadas para determinação do índice de refração para o cálculo da curva de densidade do gradiente.

- (vi) Ensaio da capacidade de hibridização dos fragmentos de DNA homólogos a RNA ribossômico após a fase de purificação:

As amostras de DNA obtidas após cada fase de purificação foram incubadas à temperatura ambiente por 20 min com $5 \mu\text{g}$ de DNA de fago T_4 (usado como "carrier") e NaOH $0,1 \text{ M}$ (concentração final) para um volume total de $0,5 \text{ ml}$. O tratamento por álcali fez-se necessário porque nas últimas duas fases de purificação o DNA estava na forma de híbrido DNA-RNA. Em experimentos controle demonstrou-se que o RNA liberado do híbrido após tratamento com NaOH não era capaz de rehibridizar com DNA em níveis detectáveis quando submetido às condições de hibridização usadas nesse trabalho. Isso se deu, provavelmente, em virtude das baixas concentrações do RNA liberado no que contribuiu a sua hidrólise parcial em presença do álcali. Após o tratamento alcalino adicionou-se a ca-

da fração 0, 15 ml de NaH_2PO_4 0,5 M, 0,25 ml de NaCl 1,2 M-fosfato de sódio 0,05 M (pH 6,7) e 0,2 μg de ^3H -RNA 16 S (a.e. = $4,23 \times 10^7$ counts/min/ μmol) ou de ^3H -RNA 23 S (a.e. = $4,33 \times 10^7$ counts/min/ μmol). Diferentes quantidades de DNA foram usadas com a finalidade de assegurar que as medidas estivessem sendo feitas numa região de proporcionalidade entre quantidades de DNA e níveis de hibridização. Em todos os casos usaram-se quantidades saturantes de RNA (nunca menos de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de DNA). Os tubos contendo um volume total de 1 ml foram incubados a 68°C por 2 horas. Após a incubação adicionou-se 4 μg de RNase A e 5 unidades de RNase T₁ em cada tubo e permitiu-se a exposição a 37°C por mais 15 minutos. Adicionavam-se então 10 ml de KCl 0,5 M a cada tubo e as soluções foram filtradas em filtros membranosos. Os filtros foram lavados com 50 ml de KCl 0,5 M, secados e as radioatividades determinadas num contador de cintilação com correção automática para contagem de "background".

[3] RESULTADOS

(A) Demonstração de "linkage" física entre os genes para a síntese de RNA ribossômico 16 S e 23 S

(I) Separação das cadeias complementares do DNA por cromatografia em coluna de MAK:

A cromatografia em coluna de albumina metilada-kieselguhr revelou-se eficiente na separação das cadeias complementares do DNA de Diplococcus pneumoniae (Roger, Beckmann & Hotchkiss, 1966 a, b ; Roger, 1968) e de Bacillus subtilis (Rudner, Karkas & Chargaff, 1968). Com DNA de Bacillus subtilis reações de hibridização demonstraram que tanto o RNA ribossômico quanto o RNA de transferência hibridizam com a cadeia que é eluída da coluna nas concentrações mais altas de sal (Oishi, 1969 a,) ou seja, com a fita H (Rudner et al., 1968). Tendo-se em vista que as técnicas a serem aplicadas durante a consecução desse trabalho baseavam-se na obtenção de híbridos DNA-RNA, tornou-se altamente desejável que se separassem as cadeias complementares do DNA, pois durante as reações de hibridização essas últimas iriam obscurecer os resultados competindo com as cadeias homólogas ao RNA ribossômico. A figura 1 mostra que DNA de B. subtilis pode ser parcialmente separado em suas cadeias componentes por cromatografia em albumina metilada-kieselguhr e que RNA ribossômico 16 S e 23 S hibridizam com as frações de DNA eluídas tardiamente no segundo pico (fita H). Esses resultados concordam com as observações feitas por Oishi (1969 a) mas demonstram com mais clareza a localização dos fragmentos que contêm informação para a síntese de RNA ribossômico nos eluatos da coluna. O método de Rudner et al. (1968) foi modificado pelo uso de um gradiente linear contínuo de menor inclinação o que resultou no aparecimento de picos mais largos, aumentando, consequentemente, a resolução durante a separação. É necessário comentar que é possível obter-se a separação completa dos dois picos (Rudner et al., 1968) pela aplicação de um gradiente descontínuo durante a eluição. Entretanto esse método é altamente trabalhoso e não traria vantagens a sua aplicação em virtude da posição privilegiada em que são eluídos os genes ribossômicos, suficientemente distantes das fitas L (1º pico) e, portanto, sujeitos a um mínimo de contaminação por cadeias homólogas complementares. A posição das frações complementares às fitas H dos genes para RNA ribossômico foi determinada através de reações de hibridização, fazendo-se competir cada fração de DNA eluída no 1º pico com ³H-RNA 23 S pelas fitas H dos genes ribossômicos (RNA) eluídas no segundo pico (mistura das frações 37 a 43, Figura 1). Como mostra a Figura 1, as fitas de DNA complementares às fitas H dos genes ribossômicos (RNA) são eluídas no início do 1º pico. Esse resultado demonstra que as cadeias complementares do DNA que codifica RNA ribossômico podem ser completamente separadas em duas frações distintas e não superponíveis.

Fig. 1 — Cromatografia de DNA desnaturado em coluna de albumina metilada-kieselguhr.

DNA de alto peso molecular foi fragmentado de acordo com o que foi descrito em Material e Métodos, Seção 2.c.i para um peso molecular de $5,5 \times 10^6$ ("single-stranded") e submetido à desnaturação à temperatura ambiente em presença de NaOH 0,1 M por 20 minutos. Após neutralização pela adição de NaH_2PO_4 a concentração de sal foi ajustada para 0,6 M de NaCl e 0,05 M de fosfato de sódio, pH 6,7. O DNA desnaturado foi aplicado à coluna ($3,2 \times 10$ cm) e a eluição foi efetuada por um gradiente linear de NaCl (0,6 - 1,2 M, total de 500 ml) na presença de tampão de fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,7. Foram coletadas frações de 5,5 ml. Após a leitura da absorbância a 260 mμ (●), tomou-se 0,1 ml de cada fração e procedeu-se à hibridização com ^3H -RNA 16S (□) e ^3H -RNA 23S (▲). Quantidades saturantes de RNA ribossômico radioativo (0,2 μg/ml) foram usadas durante a hibridização. A reação processou-se em presença de NaCl 0,3 M-fosfato de sódio 0,01 M (pH 7) em um volume total de 1 ml a 68°C por 2 horas. Após esse tempo adicionou-se a cada tubo 4 μg/ml de RNase A e 5 unidades/ml de RNase T_1 , incubando-se as misturas por mais 15 minutos a 37°C. Após a adição de 10 ml de KCl 0,5 M a cada tubo as misturas foram filtradas em filtros membranosos determinando-se os níveis de radioatividade (Nygaard & Hall, 1963). A concentração relativa de DNA competitivo com RNA ribossômico durante a hibridização foi determinada pela incubação de 0,2 ml de cada fração do primeiro pico (L) com 2,3 μg de DNA obtido pela reunião das frações 37-43 e 0,2 μg de ^3H -RNA 23S nas mesmas condições acima descritas. No controle omitiu-se DNA do pico L. Os valores α (○) foram obtidos pela normalização da atividade inibitória β aplicando-se a equação $\alpha = \beta(1 - \beta)$ ($\beta = 1$ quando a inibição é 100%). A coluna foi preparada segundo Mandell & Hershey (1960) com as quantidades de todos os componentes aumentadas de 2 vezes. A inclinação do gradiente foi determinada por refratometria.

(II) Cromatografia do DNA em hidroxiapatita:

Os eluatos contidos nos tubos 37 a 43 da Figura 1 foram misturados e a solução de DNA enriquecida em informação para a síntese de RNA ribossômico foi submetida a condições que permitem a reassociação de cadeias complementares (ver texto da Figura 2 para detalhes técnicos). A solução foi então aplicada a uma coluna de hidroxiapatita. O resultado está descrito na Figura 2. Como se vê, menos que 10% do DNA foi eluído como DNA renaturado. Isso veio demonstrar que a fração de DNA "single-stranded" enriquecida em seqüências homólogas a RNA ribossômico, obtida na coluna de MAK, continha pouca contaminação de fragmentos complementares. Entretanto a sua remoção pela coluna de hidroxiapatita provou ser fundamental pois nas fases posteriores dêsse trabalho essa pequena fração de DNA renaturado obscurecia os resultados obtidos na centrifugação em gradiente de $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Hg}^{2+}$, migrando juntamente com o híbrido DNA-RNA.

Fig. 2 — Cromatografia do DNA desnaturado em coluna de hidroxiapatita.

As frações contidas nos tubos 37-43 do experimento anterior foram reunidas (620 μg) e incubadas a 68°C por 3 horas numa solução contendo NaCl 0,3 M, fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,4 e EDTA 0,001 M. Após a incubação adicionou-se tampão fosfato a pH 7,0 para diluir a concentração de NaCl para 0,1 M e obter uma concentração final de tampão fosfato de 0,05 M. A mistura foi então aplicada a uma coluna de hidroxiapatita (1,9 x 5 cm). A coluna foi lavada por 5 vezes com porções de 5 ml de fosfato de sódio 0,07 M, pH 7,0. A eluição foi realizada à temperatura ambiente com um gradiente linear de fosfato de sódio a pH 7 (0,07 M-0,4 M, total 240 ml) coletando-se frações de 5 ml. O pico maior é DNA "single-stranded" e o menor DNA reassociado. A inclinação do gradiente foi determinada por refratometria.

(III) Demonstração de "linkage" gênica:

Íons mercúricos (Hg^{2+}) associam-se a DNA "single-stranded" com maior efetividade do que o fazem com DNA "double-stranded". Portanto, a formação de um complexo com íons mercúricos permite uma boa separação entre DNA "single-stranded" e "double-stranded" quando o complexo é submetido à centrifugação em gradiente de densidade de Cs_2SO_4 (Nandi et al., 1965). Conseqüentemente, era de se esperar que um

híbrido DNA-RNA fôsse capaz de se localizar no gradiente numa posição de menor densidade em relação à posição do DNA "single-stranded".

O DNA "single-stranded" purificado na coluna de hidroxiapatita foi então hibridizado com quantidades saturantes de RNA 16 S (Figura 3), 23 S (Figura 4) ou ambos (Figura 5) radioativos (trítio).

Fig. 3 — Centrifugação em gradiente de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Hg}^{2+}$ do híbrido $^3\text{H-RNA}$ 16S-DNA.

Após extensa diálise de todos os componentes macromoleculares da reação contra Na_2SO_4 0,05 M-tampão borato de sódio 0,01 M, pH 8,0, procedeu-se à hibridização (hibridização inicial, Hib) do DNA "single-stranded" obtido na coluna de hidroxiapatita com $^3\text{H-RNA}$ 16S nas seguintes condições: 15 μg de DNA, 1,5 μg de $^3\text{H-RNA}$ 16S, Na_2SO_4 0,15 M e tampão borato de sódio 0,01 M, pH 8,0. Após o período de incubação de 2 horas a 68°C adicionou-se 4 $\mu\text{g/ml}$ de RNase A e 5 unidades/ml de RNase T1 prolongando-se a incubação por mais 15 minutos a 37°C . A solução foi então misturada com 30 μg de DNA nativo de *B. subtilis* (marcador de densidade), tampão borato de sódio para uma concentração final de 0,02 M, pH 9,0, Cs_2SO_4 sólido e HgCl_2 , nesta ordem, para uma densidade final de 1,580 g/cm^3 (medido por refratometria) e um R_F (Hg^{2+} /fósforo) = 0,25-0,30. A mistura (4 ml) foi centrifugada a 4°C por 40 horas a 36000 revoluções por minuto no rotor SW50 da Spinco. Após a centrifugação frações de 5 gotas foram coletadas por punção do fundo do tubo e misturadas com 0,3 ml de NaCl 0,015 M-EDTA 0,001 M. A absorbância das amostras foi determinada a 260 $\text{m}\mu$ (●). O pico da esquerda é DNA "single-stranded" e o da direita é o DNA "double-stranded" marcador colocado no gradiente.

Alíquotas foram retiradas para a determinação da radioatividade das amostras (□, Hib). Outra alíquota de cada tubo foi submetida à hidrólise alcalina pela adição de NaOH 0,1 M a 30°C por 12 horas, após o que as frações foram neutralizadas com NaH_2PO_4 e incubadas em presença de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de $^3\text{H-RNA}$ 23S a 68°C por 2 horas após ajustar-se a concentração de sal para 0,3 M de NaCl. (Rehibridização). A radioatividade (▲, Re-Hib), foi determinada como está descrito no texto da Figura 1. Algumas frações do gradiente foram reservadas para a determinação de densidade através do Índice refratométrico.

As misturas foram submetidas à centrifugação em gradiente de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4 - \text{Hg}^{2+}$ na presença de DNA "double-stranded" usado como referência. Como fôra predito os híbridos obtidos com RNA 16 S (Figura 3, $\square$) ou RNA 23 S (Figura 4, $\blacktriangle$) localizaram-se numa posição de menor densidade do que o DNA "single-stranded" não hibridizado. Deve-se notar nas figuras que, em relação a este último, o híbrido RNA 23 S-DNA deslocou-se mais que o híbrido RNA 16 S-DNA, refletindo a diferença em extensão da região híbrida nos fragmentos de DNA.

Fig. 4 — Centrifugação em gradiente de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Hg}^{2+}$ do híbrido ^3H -RNA 23S-DNA.

As condições estão descritas no texto da Figura 3. A hibridização inicial (Hib) foi feita com ^3H -RNA 23S ($\blacktriangle$) e a rehibridização (Re-Hib) com ^3H -RNA 16S ($\square$). Absorvância, ($\bullet$).

Fig. 5 — Centrifugação em gradiente de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Hg}^{2+}$ do híbrido $^3\text{H-RNA 16S} + 23\text{S-DNA}$.

As condições estão descritas no texto da Figura 3. A hibridização inicial (Hib) foi feita simultaneamente com $^3\text{H-RNA 16S}$ e $^3\text{H-RNA 23S}$ ($\square$) e a rehibridização com $^3\text{H-RNA}$ rapidamente marcado ("m-RNA," $\circ$). Como controle da eficiência da hidrólise alcalina, alíquotas das frações foram hidrolisadas e submetidas à reação de hibridização sem adição de RNA ($\blacksquare$). Absorbância, ($\bullet$).

Quando ambos os RNAs foram simultaneamente incubados com o DNA na reação de hibridização, o deslocamento do híbrido obtido após centrifugação (Figura 5, $\square$) foi maior do que os deslocamentos observados pelos híbridos individuais, em relação ao DNA "single-stranded" não hibridizado (Figuras 3 e 4). Os resultados quantitativos desses experimentos estão resumidos na Tabela I (Experimentos 1 e 2). A formação do híbrido introduz uma certa quantidade de estrutura bifilamentar com um tamanho proporcional ao tamanho do RNA empregado. Considerando-se que o peso molecular do RNA 23 S ($1,1 \times 10^6$) é duas vezes maior que o do RNA 16 S ($0,56 \times 10^6$) (Kurland, 1960) explica-se que a diferença de densidade do híbrido RNA 23 S-DNA seja duas vezes maior que a diferença de densidade do híbrido RNA 16 S-DNA em relação ao DNA "single-stranded". As diferenças obser

vadas nos deslocamentos de densidade quando comparamos os diferentes experimentos da Tabela I são provavelmente devidas aos diferentes tamanhos dos fragmentos de DNA empregados. É necessário dizer que para fragmentos de DNA de mesmo peso molecular e mantendo-se as mesmas concentrações de mercúrio obtiveram-se resultados reprodutíveis, mesmo que a quantidade de RNA empregada para a hibridização fôsse variável, embora sempre acima das concentrações de saturação. Além disso, o deslocamento observado pelo híbrido obtido por associação simultânea das duas espécies de RNA ribossômico com fragmentos de DNA de peso molecular de $1,5 - 2,3 \times 10^6$ foi a somatória dos deslocamentos observados pelos híbridos individuais. Considerando-se que há diferentes loci para as duas espécies de RNA ribossômico (Oishi & Sueoka, 1965; Smith, et al., 1968) os resultados acima descritos sugerem uma estreita vizinhança ("linkage" física) entre os dois genes em fragmentos de DNA com um peso molecular médio de $1,9 \times 10^6$. Nesses experimentos o DNA unifilamentar inicial possuía um peso molecular médio de $5,5 \times 10^6$. Durante as reações de hibridização ou reassociação, entretanto, ocorreu degradação, provavelmente em virtude das altas temperaturas usadas (Eigner, Boedtker & Michaels, 1961). Observa-se que os resultados do Experimento 3 da Tabela I não apresentam aditividade nos deslocamentos dos híbridos. Esses resultados serão discutidos juntamente com outros, obtidos em fragmentos de DNA menores que $1,5 \times 10^6$. Por ora basta comentar que em tais fragmentos há uma perda de "linkage" entre os genes responsáveis pela síntese das duas espécies de RNA ribossômico em B. subtilis.

TABELA I - Deslocamentos na densidade dos fragmentos de DNA contendo informações para RNA ribossômico após hibridização com RNA.

RNA hibridizado antes da centrifugação	Diferenças de densidade entre o DNA "single-stranded" e os híbridos *		
	Exp. 1	Exp. 2 ***	Exp. 3
^3H -RNA 16 S	0,022	0,012 **	0,040
^3H -RNA 23 S	0,042	0,023	0,051
^3H -RNA 16 S + ^3H -RNA 23 S	0,062	0,038	0,069
RNA ribossômico de <u>E. coli</u>	-	0	-
Poli-IG	-	0	-

* As condições experimentais são as descritas na legenda das Figuras e em Material e Métodos.

** Adicionou-se um excesso de RNA 16 S não radioativo.

*** Dados obtidos do experimento descrito nas Figuras 3, 4 e 5.

Uma evidência mais definitiva da existência de "linkage" física entre os dois genes foi obtida com os experimentos seguintes. Após as centrifugações em gradientes de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4 - \text{Hg}^{2+}$, descritas nas figuras 3, 4 e 5, cada fração foi submetida a uma hidrólise alcalina (NaOH 0,1 M, 30°C, 12 horas) para destruir o RNA hibridizado. Após neutralização, cada uma das frações foi novamente hibridizada (rehibridização) com as espécies de RNA que não haviam sido usadas na hibridização inicial, isto é, antes da centrifugação em gradiente (p. ex., se a hibridização inicial foi feita com ^3H -RNA 23 S a rehibridização foi feita com ^3H -RNA 16 S e vice-versa). Portanto, cada fração de DNA da figura 3 foi rehibridizada com ^3H -RNA 23 S (▲), da figura 4 com ^3H -RNA 16 S (□) e da figura 5, como controle, com ^3H -mRNA (○). Como pode ser visto nas figuras, o perfil de rehibridização coincide com o perfil de hibridização inicial. Os fragmentos de DNA que foram "deslocados" para uma posição de menor densidade em relação ao DNA "single-stranded" em virtude da hibridização inicial, são os mesmos fragmentos que hibridizaram com as espécies de RNA alternativas nas reações de rehibridização (figuras 3 e 4). Isso quer dizer que as sequências de DNA complementares a ambos os RNA (16 S e 23 S) estão localizadas no mesmo fragmento de DNA.

Em contraste, quando as frações de DNA do experimento representado na Figura 5 foram rehibridizadas com RNA rapidamente marcado ("m-RNA"), obteve-se hibridização apenas com as frações que continham DNA "single-stranded", isto é, com o DNA que não foi "deslocado" no gradiente pela hibridização inicial com RNA ribossômico. Esse experimento demonstra que os fragmentos de DNA que foram "deslocados" pela hibridização inicial contêm sequências específicas complementares ao RNA ribossômico.

Para afastar a possibilidade de que os fragmentos de DNA complementares ao RNA ribossômico pudessem "deslocar-se" no gradiente para uma posição de menor densidade em virtude de uma diferença de composição de bases em relação ao restante do genoma, o DNA "single-stranded" foi centrifugado como tal, isto é, sem prévia hibridização com RNA ribossômico. Cada fração obtida do gradiente após a centrifugação foi então hibridizada com ^3H -RNA 16 S e ^3H -RNA 23 S (Figura 6), obtendo-se um perfil de hibridização superponível ao perfil de absorbância do DNA "single-stranded". Isso demonstrou que os fragmentos de DNA enriquecidos em informação para a síntese de RNA ribossômico somente se "deslocam" no gradiente quando hibridizados ao RNA.

Em outros experimentos controle o DNA "single-stranded" de *Bacillus subtilis* foi inicialmente hibridizado com RNA ribossômico de *E. coli* e poli-IG (Opara-Kubinska, Kubinski & Szybalski, 1964) e as misturas foram submetidas à centrifugação nas mesmas condições usadas para os experimentos anteriores. Após a centrifugação as frações foram submetidas à hidrólise alcalina e, após neutralização, foram hibridizadas com ^3H -RNA 23 S (figuras 7 e 8). Como se vê nem o RNA de *E. coli* nem o RNA sintético foram capazes de "deslocar" os fragmentos de DNA

que hibridizam com RNA ribossômico de B. subtilis.

Esses experimentos demonstram que a hibridização do DNA com RNA ribossômico homólogo é uma reação bastante específica e que, portanto, as estruturas híbridas de DNA e RNA separadas do DNA "single-stranded" não hibridizado contêm os genes responsáveis pela síntese de ambas as espécies de RNA, 16 S e 23 S.

Fig. 6 — Centrifugação do DNA "single-stranded" não hibridizado em gradiente de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Hg}^{2+}$.

DNA "single-stranded" obtido na coluna de hidroxiapatita (15 μg) foi misturado com 30 μg de DNA "double-stranded" e com os componentes do gradiente como descrito no texto da Figura 3. Após a centrifugação alíquotas das frações obtidas foram hibridizadas com 3H-RNA 16S ($\square$) e 3H-RNA 23S ($\blacktriangle$). Absorbância, ($\bullet$).

Fig. 7 — Centrifugação em gradiente de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Hg}^{2+}$ do DNA "single-stranded" previamente submetido à hibridização com RNA heterólogo (*E. coli*).

DNA "single-stranded" obtido na coluna de hidroxiapatita foi submetido às condições de hibridização descritas no texto da Figura 3 com RNA ribossômico total não radioativo de *E. coli* e procedeu-se ao experimento como está descrito no mesmo texto. A rehibridização foi feita com ^3H -RNA 23S ($\blacktriangle$). Absorbância, ($\bullet$).

Fig. 8 — Centrifugação em gradiente de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Hg}^{2+}$ do DNA "single-stranded" previamente submetido à hibridização com RNA sintético (poli IG).

As condições são as mesmas descritas no texto da Figura 7. Rehibridização com ^3H -RNA 23S, (▲); absorbância, (●).

(B) Demonstração de "linkage" física entre os genes para a síntese de RNA ribossômico 5 S e 23 S

Da mesma forma que os RNA 16 S e 23 S, o RNA 5 S hibridiza com o DNA "single-stranded" que é eluído com alta concentração de sal na coluna de MAK (figura 9). Esse mesmo DNA foi usado, após reassociação e eliminação das estruturas bifilamentares em hidroxiapatita, para demonstração de linkage gênica entre as estruturas homólogas aos RNA 5 S e 23 S.

Fig. 9 — Localização dos fragmentos de DNA homólogos a RNA 5S nos eluatos obtidos por cromatografia de DNA desnaturado em coluna de albumina metilada-kieselguhr.

As condições do experimento são as descritas no texto da Figura 1. Absorbância, (●); hibridização com ^3H -RNA 16S (Δ), ^3H -RNA 23S (▲) e ^{32}P -RNA 5S (○).

A planificação do experimento seguiu as mesmas linhas usadas para as demonstrações anteriores: o DNA "single-stranded" foi hibridizado com ^3H -RNA 23 S ou ^3H -RNA 16 S e submetido a uma centrifugação em Cs_2SO_4 na presença do íon mercúrico. Depois de estabelecido o equilíbrio, as frações foram coletadas e a absorbância e a radioatividade de cada fração medidas de modo que se pudesse conhecer a posição do híbrido DNA-RNA relativa à posição do DNA "single-stranded". Alíquotas dessas frações foram submetidas à hidrólise alcalina e, após neutralização, rehibridizadas com ^{32}P -RNA 5 S e com a outra espécie de RNA ribossômico que não fôra usada na hibridização inicial. Nas figuras 10 e 11, o DNA "single-stranded" com um peso molecular entre $2-4 \times 10^6$ foi hibridizado com ^3H -RNA 23 S (▲) e ^3H -RNA 16 S (Δ) respectivamente. Após a centrifugação, a rehibridização com ^3H -RNA 16 S (Δ) na figura 10 e ^3H -RNA 23 S na figura 11 (▲) e com ^{32}P -RNA 5 S (○) em ambos os experimentos demonstrou que as seqüências de DNA homólogas aos RNA ribossômicos usados para rehibridização foram "deslocadas" juntamente com os híbridos contendo RNA 23 S ou RNA 16 S preparados antes da centrifugação. Esses resultados indicaram que em fragmentos de DNA com um peso molecular acima de 2×10^6 os genes que codificam para as três espécies de RNA ribossômico são "linked".

Fig. 10 — Centrifugação em gradiente de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Hg}^{2+}$ do híbrido ^3H -RNA 23S-DNA e localização dos fragmentos de DNA homólogos a RNA 5S (pêso molecular do DNA = 2.4×10^6).

O DNA eluído da coluna de albumina metilada-kieselguhr (frações 64-70) foi submetido a condições que propiciam reassociação e cromatografado em hidroxiapatita de acordo com o descrito no texto da Figura 2. Após extensa diálise de todos os componentes macromoleculares da reação contra Na_2SO_4 0,05 M-borato de sódio 0,01 M, pH 8,0, procedeu-se à hibridização (hibridização inicial, Hib) do DNA "single-stranded" obtido na coluna de hidroxiapatita com ^3H -RNA 23S na seguinte mistura de reação: 13,6 μg de DNA, 2,4 μg de ^3H -RNA 23S, Na_2SO_4 0,15 M, tampão borato de sódio 0,01 M, pH 8,0 e 30% de formamida em volume final de 2,7 ml. Após o período de incubação de 24 horas a 37°C a mistura foi dialisada por 24 horas contra 2 vezes 3 litros de Na_2SO_4 0,01 M-borato de sódio 0,01 M, pH 8,0. O material dialisado foi incubado a 37°C por 15 minutos com 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNaseA e 5 unidades/ml de RNase T₁ após o que adicionou-se 23 μg de DNA nativo (marcador de densidade), tampão borato para uma concentração final de 0,02 M, pH 9,0; Cs_2SO_4 sólido e HgCl_2 , nesta ordem, para uma densidade final de 1,580 g/cm^3 e um $R_F = 0,27$. A mistura foi centrifugada a 36000 revoluções por minuto a 4°C por 40 horas no rotor SW50 da Spinco. Após a centrifugação coletaram-se as frações em 0,3 ml de NaCl 0,015 M - EDTA 0,001 M. Após determinação da absorbância (●) a 260 mμ, adicionou-se mais 0,5 ml do mesmo tampão a todas as frações e cada uma delas foi dividida em três alíquotas. Uma das alíquotas de cada fração foi usada para a determinação dos níveis de radioatividade relacionadas com o ^3H -RNA 23S (▲). As outras duas alíquotas de cada fração foram incubadas a 30°C por 12 horas em presença de NaOH 0,1 M, neutralizadas com NaH_2PO_4 e re-hibridizadas (Re-Hib) com ^3H -RNA 16S (△) e ^{32}P -RNA 5S (○) nas condições descritas no texto da Figura 3. O DNA nativo usado como referência flutuou a uma densidade menor (aproximadamente 1,650) e seu perfil de absorbância foi omitido da figura para simplificar-la.

Fig. 11 — Centrifugação em gradiente de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Hg}^{2+}$ do híbrido ^3H -RNA 16S-DNA e localização dos fragmentos de DNA homologos a RNA 5S (pêso molecular do DNA = 2.4×10^6). As condições são as mesmas descritas no texto da Figura 10, exceto que o DNA foi hibridizado (Hib) com $1.7 \mu\text{g}$ de ^3H -RNA 16S (Δ) antes da centrifugação. A rehibridização (Re-Hib) foi feita com ^3H -RNA 23S ($\blacktriangle$) e ^{32}P -RNA 5S ($\circ$). Absorbância, ($\bullet$).

Quando o mesmo experimento foi feito com DNA "single stranded", com um pêso molecular médio de $1,0 \times 10^6$, obteve-se um resultado diferente. A figura 12 mostra o perfil de hibridização obtido pela hibridização de ^3H -RNA 23 S com o DNA antes da centrifugação ($\blacktriangle$) e de ^3H -RNA 16 S (Δ) e ^{32}P -RNA 5 S ($\circ$) após a centrifugação. Como se vê na figura 12, aproximadamente 50% das seqüências complementares a RNA 16 S foram "deslocadas" juntamente com as seqüências complementares a RNA 23 S. Isso significa que quando os fragmentos de DNA têm um tamanho menor que a soma do tamanho de ambos os genes, alguns fragmentos contendo seqüências homologas a RNA 23 S não contêm seqüências homologas ao RNA 16 S. Portanto, a prévia hibridização com RNA 23 S não causou o deslocamento concomitante de tôdas seqüências homologas a RNA 16 S como aconteceu com fragmentos maiores que $2,0 \times 10^6$. É, entretanto, evidente pela figura 12 que tôdas as seqüências complementares a RNA 5 S foram deslocadas concomitantemente com as seqüências homologas a RNA 23 S, pela hibridização prévia dessa espécie de RNA com os fragmentos de DNA antes da centrifugação.

Fig. 12 — Centrifugação em gradiente de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Hg}^{2+}$ do híbrido ^3H -RNA 23S-DNA e localização dos fragmentos de DNA homólogos a RNA 5S (pêso molecular do DNA = $1,0 \times 10^6$).

As condições foram as mesmas descritas no texto da Figura 10, exceto que o DNA "single-stranded" possuía um pêso molecular de 1×10^6 e o volume empregado para a hibridização foi de 1,5 ml. Essa amostra de DNA foi obtida pela fragmentação posterior de uma aliquota das frações obtidas na cromatografia em coluna de MAK (frações 64-70) cujos resultados estão descritos na Figura 9. Hibridização (Hib) com ^3H -RNA 23S (▲); rehibridização (Re-Hib) com ^3H -RNA 16S (Δ) e ^{32}P -RNA 5S (○); absorbância, (●).

Na Figura 13 o experimento recíproco foi efetuado. O DNA "single-stranded" de baixo pêso molecular foi hibridizado com ^3H -RNA 16 S antes da centrifugação (Δ) após a qual as frações coletadas foram rehibridizadas com ^3H -RNA 23 S (▲) e ^{32}P -RNA 5 S (○). Nesse caso, embora algumas seqüências homólogas ao RNA 23 S tivessem acompanhado a migração do híbrido ^3H -RNA 16 S-DNA, uma boa parte delas permaneceu no pico principal de DNA "single-stranded". A rehibridização com ^{32}P -RNA 5 S acompanhou o perfil obtido com o RNA 23 S e portanto mais uma vez diferiu do perfil obtido com o RNA 16 S.

Fig. 13 — Centrifugação em gradiente de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Hg}^{2+}$ do híbrido ^3H -RNA 16S-DNA e localização dos fragmentos de DNA homólogos a RNA 5S (pêso molecular do DNA = $1,0 \times 10^6$).

As condições foram as mesmas descritas no texto da Figura 12. Hibridização (Hib) com ^3H -RNA 16S (Δ); rehibridização (Re-Hib) com ^3H -RNA 23S ($\blacktriangle$) e ^{32}P -RNA 5S ($\circ$); absorbância, ($\bullet$).

Fazendo-se o mesmo tipo de experimento com fragmentos de DNA menores ainda (pêso molecular médio $0,3-0,5 \times 10^6$) êsse fenômeno de perda de linkage entre as seqüências homólogas a RNA 23S e RNA 16S torna-se mais evidente. Na Tabela I (expt. 3) verificou-se que os deslocamentos de densidade não mais observam as diferenças que eram aparentes com DNA de pêso molecular acima de $1,9 \times 10^6$. Na Figura 14 verifica-se que o perfil obtido com RNA 5S ($\circ$) acompanha o perfil de hibridização com RNA 23S ($\blacktriangle$) e na Figura 15 demonstra-se nitidamente que o deslocamento do híbrido RNA 16S-DNA ($\blacktriangle$) não é acompanhado pelas seqüências homólogas a RNA 5S ($\circ$). Nesses experimentos as rehibridizações com RNA 16S (Figura 14) e com RNA 23S (Figura 15) não foram efetuadas, porque quantidades insuficientes de DNA foram recuperadas dos gradientes. No entanto, os resultados obtidos com DNA de pêso molecular

de $1,0 \times 10^6$ apresentaram a mesma tendência, demonstrando cabalmente que as seqüências nucleotídicas homólogas a RNA 5S encontram-se, no cromossomo de B. subtilis, muito mais próximas das seqüências homólogas a RNA 23S do que das seqüências homólogas a RNA 16S.

Fig. 14 — Centrifugação em gradiente de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Hg}^{2+}$ do híbrido ^3H -RNA 23S-DNA e localização dos fragmentos de DNA homólogos a RNA 5S (peso molecular do DNA = $0,3\text{-}0,5 \times 10^6$).

As condições foram as mesmas descritas no texto da Figura 3 exceto que a hibridização (Hib) foi feita com $1,5 \mu\text{g}$ de ^3H -RNA 23S (▲) e a reibridização (Re-Hib) com ^{32}P -RNA 5S (○) em condições de saturação (Smith et al., 1968). Em virtude das baixas concentrações de DNA recuperadas do gradiente, somente RNA 5S foi usado para a reibridização. Absorvância, (●).

Fig. 15 — Centrifugação em gradiente de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Hg}^{2+}$ do híbrido ^3H -RNA 16S-DNA e localização dos fragmentos de DNA homólogos a RNA 5S (pêso molecular do DNA = $0,3\text{-}0,5 \times 10^6$).

As condições usadas foram as mesmas descritas no texto da Figura 14 exceto que a hibridização (Hib) foi feita com ^3H -RNA 16S ($\blacktriangle$) e a rehibridização com ^{32}P -RNA 5S ($\circ$). Absorbância, ($\bullet$)

(C) A purificação dos genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico

O fato de que os genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico encontram-se próximos uns dos outros, levou-nos a adotar as linhas gerais dos métodos descritos neste trabalho para purificá-los na forma de híbridos DNA-RNA.

O DNA de Bacillus subtilis foi desnaturado e cromatografado em coluna de albumina metilada-kieselguhr do modo descrito em Material e Métodos, secção 2.C.i. e 2.C.ii.. Os resultados obtidos foram semelhantes aos já descritos nas Figuras 1 e 9. O DNA eluído da coluna de MAK homólogo a RNA ribossômico foi reunido e concentrado para $188 \mu\text{g}/\text{ml}$ como descrito na secção 2.C.ii.. Nesse ponto, convém lembrar, uma pequena modificação foi introduzida em relação aos experimentos anteriores. O DNA obtido da coluna de MAK que nos experimentos anteriores era submetido a uma reassociação, com posterior cromatografia em hidroxia-

patita, para eliminar qualquer estrutura "double-stranded" que se pudesse ter formado, foi agora incubado com RNA ribossômico (^3H -RNA 23 S + ^3H -RNA 16 S) como descrito em Material e Métodos (secção 2.C.iii.) e então cromatografado em hidroxiapatita (secção 2.C.iv.). Esse experimento possibilitou a eliminação de estruturas "double-stranded" formadas durante a reação de hibridização ao mesmo tempo que se obtinha o híbrido. Com isso eliminou-se a necessidade de expor o DNA por duas vezes a temperaturas elevadas, que causam a sua fragmentação, como já havia sido anteriormente demonstrado (Eigner, Boedtker & Michaels, 1961). Além disso a reação de hibridização foi efetuada em presença de 32% de formamida o que permitiu o abaixamento da temperatura de hibridização (Bonner, Kung & Bekhor, 1967; Weiss, Hsu, Foft & Scherberg, 1968; Westmoreland, Szybalski & Ris, 1969). No caso particular de RNA ribossômico determinamos que os níveis máximos de hibridização eram obtidos pela incubação de RNA com DNA na presença de 32% de formamida e de tampão de fosfato de sódio 0,01 M - NaCl 0,3 M, pH 7, a 37°C por 24 horas. Nessas condições os níveis de hibridização eram comparáveis aos obtidos pela incubação a 68°C por 3 horas na ausência de formamida.

Os resultados da cromatografia em coluna de hidroxiapatita estão descritos na Figura 16. Embora a hidroxiapatita não tivesse conseguido separar apreciavelmente o híbrido DNA-RNA do DNA "single-stranded" ela permitiu a eliminação de DNA renaturado ou parcialmente renaturado. A remoção desse contaminante é bastante importante pois esse material migrava com o híbrido DNA-RNA durante a centrifugação em gradiente de Cs_2SO_4 - Hg^{2+} . É difícil explicar no presente momento porque uma ligeira separação entre o híbrido e o DNA "single-stranded" foi observada. Admite-se que a estrutura secundária dos ácidos nucleicos sejam um componente importante na sua retenção pela coluna de hidroxiapatita (Bernardi, 1965; Oishi, 1969 b) bem como o seu grau de glicosilação. É muito possível portanto que a estrutura do híbrido obtido não contivesse estrutura secundária, além do fato de que o excesso de regiões "single-stranded" na sua estrutura estivesse possivelmente predominando sobre as regiões "double-stranded" no comportamento cromatográfico. A recuperação, nessa fase da purificação, variou, nos diversos experimentos, de 50 a 80% em relação ao DNA aplicado à coluna. As frações contendo o híbrido (tubos 52 a 58 da Figura 16) foram reunidas e concentradas do modo descrito na seção 2.C.iv. .

Fig 16 — Cromatografia em hidroxiapatita do híbrido. ^3H -rRNA-DNA.

DNA "single-stranded" de peso molecular de $3,5 \times 10^6$ foi obtido de acordo com o que está descrito em Material e Métodos (2.c.i, ii). A hibridização foi feita com ^3H -RNA 16S e ^3H -RNA 23S simultaneamente de acordo com a seção 2.c.iii. Após a hibridização o material foi aplicado à coluna (1,7 x 4,3 cm) previamente preparada de acordo com a seção 2.c.iv e eluída com tampão de fosfato de sódio, pH 7,0 num gradiente que variou de 0,07 M a 0,4 M, em volume total de 240 ml. Frações de 2,5 ml foram coletadas e as que continham radioatividade (x) na região de eluição do DNA "single-stranded" foram reunidas e concentradas para um volume de 4 ml com Sephadex sólida. Absorbância, (●) sendo o pico da esquerda DNA "single-stranded" e o da direita DNA reassociado.

O híbrido DNA-RNA (50 μg , calculado na base da quantidade de DNA) eluído da coluna de hidroxiapatita foi então submetido à centrifugação em gradiente de Cs_2SO_4 - Hg^{2+} como descrito na seção 2.C.v.. Os resultados podem ser vistos na Figura 17. A maior parte do material hibridizado (densidade média = 1,615 g/cm^3) separou-se do DNA "single-stranded" (densidade média = 1,649 g/cm^3). A área sombreada sob a curva indica as frações que foram reunidas (tubos 24 a 30) para as medidas finais do processo de purificação gênica. A presença do DNA "double-stranded" usado como marcador de densidade fez-se necessária para a obtenção de valores de densidade de flutuação reprodutíveis de experimento para experimento. Isso muito possivelmente se deve às grandes variações de densidade que ocorreram com pequenas variações da concentração do íon mercúrico (Nandi, et al., 1965). É possível portanto que a menor capacidade de associação do DNA "double-stranded" com o íon mercúrico em relação ao DNA "single-stranded" fizesse com que o primeiro DNA, atuasse como uma espécie de "tampão" removendo pequenos excessos de íon mercúrico do meio. É necessário dizer que a presença do DNA marcador "double-

stranded" não afetou as atividades de hibridização nem as quantidades de DNA recuperadas na região do gradiente onde flutuou o híbrido.

Fig. 17 — Purificação de fragmentos de DNA homólogos a RNA ribossômico em gradiente de densidade de $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Hg}^{2+}$.

O híbrido DNA-RNA obtido na cromatografia de hidroxiapatita foi centrifugado em $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Hg}^{2+}$ de acordo com o que está descrito em Material e Métodos, secção 2.c.v. Das frações coletadas, o híbrido, detectado pelos níveis de radioatividade (x), foi obtido pela reunião das frações representadas pela área achuriada da figura. A absorvância a 260 mμ (●) indica o pico de DNA "single-stranded" à esquerda e o de DNA "double-stranded" usado como marcador de densidade, à direita.

Em cada fase da purificação, alíquotas foram usadas para determinar a capacidade de hibridização (secção 2.C.vi.), a quantidade de DNA recuperada (secção 2.B.iv.) e o peso molecular médio (secção 2.B.v.). Esses resultados foram resumidos na Tabela II.

A Tabela II mostra que a purificação total obtida foi de 80 vezes e a atividade total recuperada foi de 4%. Durante as fases de purificação ocorreu uma ligeira degradação do DNA que não foi suficiente para alterar os resultados pois o peso molecular final do DNA era de $2,4 \times 10^6$, um pouco maior que o peso teórico esperado para a soma dos três genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico ($1,71 \times 10^6$).

TABELA II - PURIFICAÇÃO DOS GENES RIBOSSOMICOS (RNA)

Fase de Purificação	DNA $\mu\text{g}(\mu\text{mol}^*)$	Genes 23 S			Genes 16 S			A. E. 1 A. E. 2	Peso molecular médio do DNA (daltons $\times 10^{-6}$)
		Atividade total (unidades**)	Recuperação (%)	A. E. *** 1	Atividade total (unidades**)	Recuperação (%)	A. E. *** 2		
DNA fragmentado e desnaturado	13.000 (41,0)	90,2	100,0	2,2	57,4	100,0	1,4	1,57	3,6
Cromatografia em MAX	1.763 (5,6)	49,5	55,0	8,9	33,9	59,0	6,1	1,46	3,5
Concentração e diálise	1.391 (4,4)	39,1	43,0	8,9	26,6	46,0	6,1	1,46	2,9
Cromatografia em hidroxiapatita	352 (1,1)	9,2	10,0	8,3	7,0	12,1	6,3	1,32	2,9
Centrifugação em Cs_2SO_4 - Hg^{2+}	5,6(0,018)	3,3	3,6	182,0	1,9	3,4	106,0	1,72	2,4

* Equivalente nucleotídico.

** Uma unidade é definida como sendo 1 μmol de RNA hibridizado com DNA a 68°C por 2 horas em NaCl 0,3 M - fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0.

*** A. E., atividade específica, μmoles de RNA hibridizados por μmol de DNA.

[4] DISCUSSÃO

Embora uma considerável quantidade de informação houvesse sido obtida a respeito dos genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico em Bacillus subtilis não havia até o presente momento nenhum trabalho que se preocupasse com as relações topológicas finas existentes entre eles.

Após a demonstração de que esses genes encontram-se, na sua maioria, localizados no 1º quadrante do cromossomo (ver Quadro I), colocou-se a pergunta de como seria o seu interrelacionamento. Algumas hipóteses mais plausíveis estão descritas no Quadro II (Introdução).

O fato de que a hibridização de fragmentos de DNA "single-stranded", de peso molecular variando de $1,5 \times 10^6$ a 4×10^6 , com uma das espécies de RNA, provoca um deslocamento da atividade hibridizante para a outra espécie de RNA ribossômico no gradiente de $\text{Cs}_2\text{SO}_4 - \text{Hg}^{2+}$, demonstra que a informação para essas duas espécies de RNA acha-se localizada no mesmo fragmento. Ora, considerando-se que a soma dos pesos moleculares dos dois RNAs ribossômicos (23S e 16S) é $1,66 \times 10^6$ e que para cada molécula de RNA há um correspondente número de nucleotídeos na molécula do DNA, deve-se concluir que o tamanho da informação para ambos os RNAs ribossômicos seja da mesma ordem de grandeza. Levando-se em consideração a existência de aproximadamente 10 genes redundantes em Bacillus subtilis para a síntese de RNA ribossômico (Smith et al., 1968) há que se concluir que os genes responsáveis pela síntese de RNA 23S e RNA 16S nessa bactéria são alternados, isto é, a um gene para RNA 23S segue-se outro para RNA 16S. Corroborando essa conclusão estão os experimentos de medida de densidade de flutuação dos híbridos demonstrando que um híbrido DNA-RNA 23S desloca-se, em relação ao DNA "single-stranded", duas vezes mais que o híbrido DNA-RNA 16S, o que refletiria o tamanho da região híbrida, lembrando-se que o peso molecular do RNA 23S é o dobro do peso molecular do RNA 16S. Além do mais, um híbrido contendo as duas espécies de RNA desloca-se no gradiente pela somatória dos deslocamentos dos híbridos individuais (Tabela I).

Os mesmos experimentos demonstraram que, com fragmentos de DNA de peso molecular acima de $2,0 \times 10^6$, os genes para a síntese de RNA 5S (peso molecular de aproximadamente 50.000) acompanham no gradiente a migração dos híbridos contendo RNA 16S ou RNA 23S, sugerindo a existência de uma estreita vizinhança entre os três genes ribossômicos (Figuras 10 e 11).

A utilização de fragmentos de DNA com um peso molecular médio menor que a soma teórica dos pesos moleculares dos três genes levou a resultados interessantes. Assim, com fragmentos de peso molecular médio de $1,0 \times 10^6$ notou-se uma perda parcial de "linkage" entre os ge

nes 23 S e 16 S (Figuras 12 e 13). Entretanto, mesmo com fragmentos de DNA com um peso molecular de $0,3-0,5 \times 10^6$ um certo grau de "linkage" foi obtido (resultados não apresentados) apesar de que as diferenças de densidade relatadas nos experimentos 1 e 2 da Tabela I não foram observadas (exp. 3, Tabela I). Esses resultados seriam de se esperar pois a fragmentação ao acaso das moléculas de DNA em pedaços 3 a 5 vezes menores que o tamanho teórico dos dois genes, teria que produzir fragmentos contendo seqüências complementares a somente uma das espécies de RNA. Por outro lado, considerando-se que mesmo em fragmentos diminutos ainda se observou um certo grau de "linkage" é sugestivo que os dois tipos de genes acham-se intimamente ligados no cromossomo de Bacillus subtilis. Nesses experimentos com fragmentos de DNA onde há perda parcial de "linkage" (Figuras 12, 13, 14 e 15) é evidente que o perfil de hibridização do RNA 5S acompanha o perfil do RNA 23 S mas não acompanha o do 16 S. Pelo fato dos genes 5 S serem muito pequenos em relação aos outros dois genes (5% em relação ao tamanho do gene 23 S e 10% em relação ao do gene 16 S), a perfeita ligação entre o gene 5 S e o gene 23 S, em fragmentos de peso molecular $0,3-0,5 \times 10^6$, sugere fortemente que os genes 5 S estejam muito mais próximos dos genes 23 S do que dos genes 16 S.

Foi impossível através desses experimentos determinar-se a existência de um pequeno segmento de DNA "inerte" entre um gene 16 S e um gene 23 S. Se considerarmos, como evidenciamos experimentos, que os três genes formam "grupos", cada grupo contendo um gene para cada uma das espécies de RNA ribossômico, repetindo-se várias vezes, impõem-se algumas considerações de ordem especulativa. Na figura 13 demonstra-se que aproximadamente 50% dos genes 5 S permanecem ligados aos genes 16 S em fragmentos de DNA de peso molecular de $1,0 \times 10^6$ enquanto que na figura 15 pouca ou nenhuma ligação foi observada entre os dois genes. Isso sugere que em cada grupo um gene 5 S está separado de um gene 16 S por um segmento de DNA com um peso molecular menor que $1,0 \times 10^6$ mas maior ou igual a $0,4 \times 10^6$.

Algumas possibilidades mais prováveis de arranjo entre os genes para RNA ribossômico no cromossomo estão descritas no Quadro III.

QUADRO III

Modelos prováveis das relações topológicas entre os genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico em *Bacillus subtilis*. G simboliza segmentos do cromossomo não homólogos a RNA ribossômico inter-grupos (um grupo contém um gene para cada espécie de RNA ribossômico); I simboliza segmentos do cromossomo não homólogos a RNA ribossômico intra-grupo.

Suponhamos de início que o espaço G existente entre dois grupos de genes consecutivos seja suficientemente grande que não permita a detecção de "linkage" entre dois genes pertencentes a grupos consecutivos, levando-se em consideração os pesos moleculares dos fragmentos de DNA usados nos experimentos. Nesse caso as conclusões obtidas nos experimentos dever-se-iam limitar às relações gênicas intra-grupo. Com essas preliminares o modelo (1) fica afastado porque o gene 5 S está separado do gene 16 S pelo gene 23 S que possui um peso molecular de $1,1 \times 10^6$. Os experimentos de demonstraram que os genes 5 S e 16 S estão ligados num excesso de 50% para fragmentos de DNA de peso molecular de $1,0 \times 10^6$. Dentro desse raciocínio o modelo (2) também fica afastado, favorecendo portanto o modelo (3). Nesse caso o "espaço" I intra-grupo deverá ser maior que $0,4 \times 10^6$, pois nesse peso molecular há perda quase total da ligação entre os genes 16 S e 5 S, e menor que $1,0 \times 10^6$ pois há uma ligação de 50% entre os genes 5 S e 16 S em fragmentos com esse peso molecular.

Suponhamos agora que o espaço G tenha um tamanho suficiente para que se detecte, com os pesos moleculares dos fragmentos de DNA utilizados, "linkage" inter-grupo. Nesse caso os modelos (1) e (2) seriam igualmente possíveis. O único requisito para que tal acontecesse seria a de que o "espaço" G tivesse um tamanho que permitisse uma aproximação suficiente entre um gene 16 S de um grupo e o gene 5 S do grupo consecutivo. Portanto, para se decidir a respeito de um dos modelos apresentados no Quadro III há necessidade de maior conhecimento a respeito do "espaçamento" existente entre os grupos de genes para RNA ribossômico no cromossomo de *Bacillus subtilis*.

Com esses resultados podem-se levar as especulações para a área da biossíntese dessas espécies de RNA in vivo. Em primeiro lugar, a evidência da estreita ligação entre os genes 5 S e 23 S talvez indique

que ambos os genes formem um "operon" e que essas moléculas, ambas constituintes da subunidade ribossômica 50 S, sejam transcritas sob um mecanismo regulatório comum. É estimulante a hipótese de que ambas as moléculas sejam primeiramente transcritas como uma molécula única que seria posteriormente quebrada em duas espécies moleculares antes ou durante a formação da subunidade 50 S. Outros autores (Bleyman, Kondo, Hecht & Woese, 1969) utilizando-se de uma análise cinética também postularam a existência de um operon comum para a síntese de RNA 5 S e 23 S. A este respeito, deve-se mencionar que em organismos superiores (Xenopus laevis), os genes 5 S não estão ligados aos genes 18 S e 28 S (Brown & Weber, 1968 a). As técnicas aqui empregadas, como foi discutido acima, não resolveram a questão de se há um pequeno espaço entre os genes 16 S e os genes 5 S-23 S como foi sugerido em Xenopus para os genes 18 S e 28 S (Brown & Weber, 1968 b). Uma dificuldade que aqui não foi resolvida é a questão da existência de um número menor de genes para RNA 5 S em relação aos genes para RNA 16 S e 23 S. De fato, Smith et al., (1968) indicam que o número de genes 5 S é 5 enquanto o número de genes 16 S e 23 S é 10. Essa discrepância levou-nos a repetir aqueles experimentos usando RNA 5 S marcado com ^{32}P tendo-se em vista que os níveis de hibridização obtidos por aqueles autores usando ^3H -RNA 5 S eram muito baixos e portanto sujeitos a erro (Smith, 1969). Nossos resultados (Colli, 1970) confirmaram os resultados daqueles pesquisadores encontrando-se um número de 5-6 genes 5 S e de 9-10 genes 16 S e 23 S em cinco experimentos independentes. Esses resultados não invalidam as conclusões apresentadas acima mas sugerem que nem todos os grupos de genes alternados contêm informação para RNA 5 S. Uma das abordagens possíveis para a resolução desses problemas, inclusive o problema do espaçamento entre os genes, seria a observação direta do híbrido RNA-DNA ao microscópio eletrônico, após extensa purificação, que pode ser efetuada como demonstram os resultados.

Nossos resultados demonstraram ser possível separar do DNA total, fragmentos de DNA que contêm informação específica para um determinado tipo de RNA. Nesse sentido eles estão a sugerir que todas as vezes que se dispuser do produto gênico de forma relativamente pura há a possibilidade de se aplicar as técnicas aqui desenvolvidas no sentido de purificar o gene correspondente. Nossos resultados demonstraram que o passo mais importante durante a purificação foi a centrifugação em gradientes de densidade de Cs_2SO_4 - Hg^{2+} que produziu a separação do híbrido DNA-RNA "single-stranded". A purificação total quando medida pela capacidade de hibridização do DNA purificado com RNA 16 S ou 23 S foi de aproximadamente 80 vezes. Um μmol (equivalente nucleotídico) do DNA purificado foi capaz de hibridizar com aproximadamente 300 μmoles (equivalente nucleotídico) de RNA ribossômico tomando-se em consideração as atividades de hibridização de ambas as espécies de RNA (Tabela II). Isso indica que 30% do DNA purificado é homólogo a RNA ribossômico. Esse valor poderá ser maior se a eficiência de hibridização for menor que 100%. Considerando-se que há evidências de espaçamento entre os genes aqui discutidos e que os fragmentos de DNA usados durante a purificação possuíam um peso molecular de 2.4×10^6 , que é um pouco maior do que o peso molecular esperado para os dois genes combinados ($1,66 \times 10^6$), seria de se esperar que

nesses fragmentos houvesse regiões não homólogas a RNA ribossômico. Isso é necessariamente inevitável, pois os genes formam uma sequência contínua no cromossomo mantida por ligações covalentes. Portanto seria muito difícil a remoção desse RNA excedente a não ser que se submetesse o híbrido RNA-DNA à hidrólise por nucleases que removeriam as regiões excedentes de DNA não hibridizado. Entretanto, isso foi propositadamente evitado por razões que serão explicadas.

Levando-se em consideração esses fatos e também que os fragmentos de DNA purificados foram obtidos pela fragmentação mecânica de moléculas maiores, o que pode ser definido como um procedimento "ao acaso", então é possível que a proporção de fragmentos de DNA contendo informação para a síntese de RNA ribossômico na preparação final fôsse maior que 50%.

Outros autores preocuparam-se em isolar genes específicos por hibridização de fragmentos de DNA desnaturados com seus produtos específicos. Kohne (1968) publicou a purificação de cistrons para RNA ribossômico de Escherichia coli usando essa técnica. Esse autor, entretanto, usou fragmentos de DNA contendo de 300 a 500 nucleotídeos, o que representa tão somente 10% do tamanho de um gene estrutural para RNA ribossômico. Outros ainda tentaram a purificação por hibridização eliminando as caudas de DNA "single-stranded" do híbrido DNA-RNA bem como DNA "single-stranded" não hibridizado através de hidrólise catalisada por nucleases específicas (Mc Farlane & Fraser, 1964; Sgaramella, Spadari & Falaschi, 1968; Marks & Spencer, 1969, 1970; Jayaraman & Goldberg, 1969). Embora esse tipo de estudo isole sequências complementares a um determinado tipo de RNA ele é incapaz de manter intactas as estruturas de DNA adjacentes à unidade gênica isolada. Deve-se convir, entretanto, que uma unidade de transcrição, é formada de loci responsáveis pela iniciação e regulação da transcrição, além dos genes estruturais propriamente ditos. O uso de nuclease, portanto, aumentaria muito as probabilidades de se eliminar as sequências regulatórias adjacentes aos genes isolados.

Uma outra abordagem recentemente usada para o isolamento de um gene específico foi a usada por Shapiro et al. (1969). Esses autores isolaram parte do operon lac de E. coli em elegantes estudos que utilizavam a propriedade que têm certos fagos de realizar transdução especializada. É óbvio entretanto, que até o presente momento, esse método se restringe ao isolamento de certos genes passíveis de serem transferidos de uma célula a outra através desse fenômeno.

O método descrito no presente trabalho possui também certas limitações que poderão talvez ser contornadas. Uma delas é o requisito de separação das duas fitas de DNA que permite a obtenção de bons resultados pois o método de isolamento gênico baseia-se na diferença de propriedades entre uma estrutura bicatenária e uma monocatenária. A segunda dificuldade é que ele exige como condição sine qua non a existência de um RNA isolado e em alto estado de pureza. É possível entretanto que com o desenvolvimento de técnicas para o isolamento de RNA mensageiros pu-

ros êsse método se torne de mais utilidade no isolamento dos genes corres
pondentes. Atualmente o mesmo método está sendo utilizado com sucesso
para o isolamento em bloco dos genes para a síntese de RNA de transferên
cia em Bacillus subtilis (Colli & Carniol, 1971).

[5] REFERÊNCIAS

1. Anagnostopoulos, C. & Spizizen, J. (1961), J. Bacteriol., 81, 741.
2. Anderson, P., Davies, J. & Davis, B.D. (1967), J. Mol. Biol., 29 203.
3. Apirion, D. (1967), J. Mol. Biol., 30, 255.
4. Apirion, D. & Schlessinger, D. (1968), J. Bacteriol., 96, 768.
5. Aronson, A.I. (1962), J. Mol. Biol., 5, 453.
6. Bernardi, G. (1965), Nature, 206, 779.
7. Bleyman, M., Kondo, M., Hecht, N. & Woese, C. (1969), J. Bacteriol., 99, 535.
8. Bollen, A., Helser, T. Yamada, T. & Davies, J. (1969), Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 34, 95.
9. Bonner, J., Kung, G. & Bekhor, I. (1967), Biochemistry, 6, 3650.
10. Bowen, T.J., Dagley, S., Sykes, J. & Wild, D.C. (1961), Nature, 189, 638.
11. Brachet, J. (1942), Arch. Biol. (Liège), 53, 207.
12. Britten, R.J., Lark, K.G. & Norcross, F. (1960), Biochim. Biophys. Acta, 39, 150.
13. Brown, D.D. & Weber, C.S. (1968 a), J. Mol. Biol., 34, 661.
14. Brown, D.D. & Weber, C.S. (1968 b), J. Mol. Biol., 34, 681.
15. Caspersson, T. (1941), Naturwissenschaften, 28, 33.
16. Ceriotti, G. (1952), J. Biol. Chem., 198, 297.
17. Chang, F.N., Sih, C.J. & Weisblum, B. (1965), Proc. Natl. Acad. Sci., Wash., 55, 431.
18. Chao, F.C. (1957), Arch. Biochem. Biophys., 70, 426.
19. Chao, F.C. & Schachman, H.K. (1956), Arch. Biochem. Biophys., 61, 220.

20. Claude, A. (1946), J. Exptl. Med., 84, 61.
21. Colli, W. (1970), resultados não publicados.
22. Colli, W. & Carniol. C. (1971), em preparação.
23. Comb, D.G. & Zehavi-Willner, T. (1967), J. Mol. Biol., 23, 441.
24. Cox, E.C., White, J.R. & Flaks, J.G. (1964), Proc.Natl.Acad. Sci., Wash., 51, 703.
25. Craven, G.R., Voynow, P., Hardy, S.J.S. & Kurland, C.G.(1969), Biochemistry, 8, 2906.
26. Cutler, R.G. & Evans, J.E. (1967), J. Mol. Biol., 26, 91.
27. Davidson, J.N. & Chargaff, E. (1955), in E. Chargaff & J.N. Davidson (eds.), The Nucleic Acids, Academic Press, N.Y., vol I, p. 1.
28. Davies, J. (1964), Proc.Natl.Acad.Sci., Wash., 51, 659.
29. Dubin, D. & Gunalp, A. (1967), Biochim. Biophys. Acta, 134, 106.
30. Dubnau, D. (1970), comunicação pessoal.
31. Dubnau, D., Smith, I. & Marmur, J. (1965), Proc.Natl.Acad.Sci., Wash., 54, 483.
32. Dubnau, D., Smith, I., Morell, P. & Marmur, J. (1965), Proc. Natl.Acad.Sci., Wash., 54, 491.
33. Eberle, H. & Lark. K.G. (1967), Proc. Natl.Acad.Sci., Wash., 57, 95.
34. Eigner, J., Boedtker, H. & Michaels, G. (1961), Biochim. Biophys. Acta, 51, 165.
35. Eigner, J. & Doty, P. (1965), J. Mol. Biol., 12, 549.
36. Flaks, J.G., Cox, E.C., Whitting, M.L. & White, J.R. (1962), Biochem.Biophys.Res. Commun., 7, 390.
37. Fogel, S. & Sypherd, P.S. (1968 a), Proc. Natl.Acad.Sci., Wash., 59, 1329.
38. Fogel, S. & Sypherd, P.S. (1968 b), J. Bacteriol., 96, 358.
39. Galibert, F., Lelong, J.C., Larsen, C.J. & Boiron, M. (1967), Biochim.Biophys. Acta, 142, 89.

40. Ganesan, A.T. (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18, 824.
41. Gilbert, W. (1963), *J. Mol. Biol.*, 6, 374.
42. Gordon, J. & Boman, H.G. (1964), *J. Mol. Biol.*, 9, 638.
43. Hayashi, Y., Osawa, S. & Miura, K. (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, 129, 519.
44. Hogeboom, G.H., Schneider, W.C. & Palade, G.E. (1948), *J. Biol. Chem.*, 172, 619.
45. Iwabuchi, M., Kono, M., Oumi, T. & Osawa, S. (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, 108, 211.
46. Jayaraman, R. & Goldberg, E.B. (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.*, 64, 198.
47. Kaji, H., Suzuki, I. & Kaji, A. (1966), *J. Biol. Chem.*, 241, 1251.
48. Kashket, S., Tave, J.L. & Beck, W.S. (1960), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3, 435.
49. Kissane, J.M. & Robins, E. (1958), *J. Biol. Chem.*, 233, 184.
50. Kohne, D. E. (1968), *Biophys. J.*, 8, 1104.
51. Krembel, J. & Apirion, D. (1968), *J. Mol. Biol.*, 33, 363.
52. Kurland, C.G. (1960), *J. Mol. Biol.*, 2, 83.
53. Leboy, P.S., Cox, E.C. & Flaks, J.G. (1964), *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.*, 52, 1367.
54. Lederberg, S. & Lederberg, V. (1961), *Exptl. Cell Res.*, 25, 198.
55. Lengyel, P. (1969), *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 34, 828.
56. Levinthal, C., Keynan, A. & Higa, A. (1962), *Proc. Natl. Acad. Sci. Wash.*, 48, 1631.
57. Littlefield, J. W. & Keller, E.B. (1957), *J. Biol. Chem.*, 224, 13.
58. Littlefield, J. W., Keller, E.B., Gross, J. & Zamecnick, P.C. (1955), *J. Biol. Chem.*, 217, 111.
59. Luria, S.E., Delbrück, M. & Anderson, T.F., (1943), *J. Bacteriol.*, 46, 57.

60. Luzzato, L., Apirion, D. & Schlessinger, D. (1968), Proc. Natl. Acad. Sci., Wash., 60, 873.
61. Mandell, J.D. & Hershey, A.D. (1960), Anal. Biochem., 1, 66.
62. Mangiarotti, G., Apirion, D., Schlessinger, D. & Silengo, L. (1968), Biochemistry, 7, 456.
63. Marks, A. & Spencer, J.H. (1969), Fed.Proc., 28, 531.
64. Marks, A. & Spender, J.H. (1970), J. Mol. Biol., 51, 115.
65. Marvin, D.A. & Hoffman-Berling, H. (1963), Zeitschrift für Naturforschung, 18B, 884.
66. McFarlane, E.S. & Fraser, M.J. (1964), Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 351.
67. McIlreavy, D.J. & Midgley, J.E.M. (1967), Biochem. biophys. Acta 142, 47.
68. Midgley, J.E.M. (1962), Biochim. Biophys. Acta, 61, 513.
69. Midgley, J.E.M. (1965 a), Biochim. Biophys. Acta, 95, 232.
70. Midgley, J.E.M. (1965 b), Biochim. Biophys. Acta, 108, 340.
71. Midgley, J.E.M. (1965 c), Biochim. Biophys. Acta. 108, 348.
72. Midgley, J.E.M. & McIlreavy, D.J. (1967), Biochim. Biophys. Acta 142, 345.
73. Miyazawa, Y. & Thomas, C.A. (1965), J. Mol. Biol., 11, 223.
74. Moore, P.B., Traut, R.R., Noller, H., Pearson, P. & Delius, H. (1968), J. Mol. Biol., 31, 441.
75. Morell, P., Smith, I., Dubnau, D. & Marmur, J. (1967), Biochemistry, 6, 258.
76. Nandi, U.S., Wang, J.C. & Davidson, N. (1965), Biochemistry, 4, 1687.
77. Nichols, J.L. & Lane, B.G. (1966), Biochim. Biophys. Acta, 119, 649.
78. Nichols, J.L. & Lane, B.G. (1967), Can. J. Biochem., 44, 1633.
79. Nygaard, A.P. & Hall, B.D. (1963), Biochem. Biophys. Res. Commun., 12, 98.

80. Oishi, M. (1969 a), *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.*, 62, 256.
81. Oishi, M. (1969 b), *J. Bacteriol.*, 98, 104.
82. Oishi, M. & Sueoka, N. (1965), *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.*, 54, 483.
83. Oishi, M., Yoshikawa, H. & Sueoka, N. (1964), *Nature*, 204, 1069.
84. Okamoto, T. & Takanami, M. (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, 68, 325.
85. Opara-Kubinska, Z., Kubinski, H. & Szybalski, W. (1964), *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.*, 52, 923.
86. Osawa, S. (1960), *Biochim. Biophys. Acta*, 42, 244.
87. Osawa, S. (1968), *Annual Review Biochem.*, 37, 109.
88. Ozaki, M., Mizushima, S. & Nomura, M. (1969), *Nature*, 222, 333.
89. Palade, G.E. & Siekevitz, P. (1956), *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 171.
90. Petermann, M.L. (1964), *The Physical and Chemical Properties of Ribosomes*, Elsevier, N.Y. .
91. Petermann, M.L. & Hamilton, M.G. (1957), *J. Biol. Chem.*, 224, 725.
92. Petermann, M.L., Hamilton, M.G. & Mizen, N.A. (1954), *Cancer Res.*, 14, 360.
93. Roger, M. (1968), *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.*, 59, 200.
94. Roger, M., Beckmann, C.O. & Hotchkiss, R.D. (1966 a), *J. Mol. Biol.*, 18, 156.
95. Roger, M., Beckmann, C.O. & Hotchkiss, R.D. (1966 b), *J. Mol. Biol.*, 18, 174.
96. Rosset, R., Monier, R. & Julien, J. (1964), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46, 87.
97. Rudner, R., Karkas, J.D. & Chargaff, E. (1968), *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.*, 60, 630.
98. Rudner, R., Prokop-Schneider, B. & Chargaff, E. (1964), *Nature*, 203, 479.

99. Rudner, R., Rejman, E. & Chargaff, E. (1965), Proc.Natl.Acad. Sci., Wash., 54, 904.
100. Saito, H. & Miura, K. (1963), Biochim. Biophys. Acta, 72, 619.
101. Schachman, H.K., Pardee, A.B. & Stanier, R.Y. (1952), Arch. Biochem. Biophys., 38, 245.
102. Schlessinger, D. & Apirion, D. (1969), Annual Review Microbiol., 23, 387.
103. Sgaramella, V., Spadari, S. & Falaschi, A. (1968), Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 33, 839.
104. Shapiro, J., Machattie, L., Eron, L., Ihler, G., Ippen, K. & Beckwith, J. (1969), Nature, 224, 768.
105. Siegel, A., Singer, S.J. & Wildman, S.G. (1952), Arch. Biochem. Biophys., 41, 278.
106. Smith, I. (1969), comunicação pessoal.
107. Smith, I., Dubnau, D., Morell, P. & Marmur, J. (1968), J. Mol. Biol. 33, 123.
108. Spahr, P.E. (1962), J. Mol. Biol., 4, 395.
109. Spahr, P.E. & Tissières, A. (1959), J. Mol. Biol., 1, 237.
110. Speyer, J.F., Lengyel, P. & Basilio, C. (1962), Proc.Natl.Acad. Sci., Wash., 48, 684.
111. Spotts, C.R. & Stanier, R.Y. (1961), Nature, 192, 633.
112. Stanley Jr., W.M. & Bock, R.M. (1965), Biochemistry, 5, 1320.
113. Studier, F.W. (1965), J. Mol. Biol., 11, 373.
114. Sugiura, M. & Takanami, M. (1967), Proc.Natl.Acad. Sci., Wash., 58, 1595.
115. Takahashi, H. (1969), Biochim. Biophys. Acta, 190, 214.
116. Takanami, M. (1967), J. Mol. Biol., 23, 135.
117. Takanami, M. & Okamoto, T. (1963), J. Mol. Biol., 7, 323.
118. Tissières, A., Watson, J.D., Schlessinger, D. & Hollingworth, B. R. (1959), J. Mol. Biol., 1, 221.

119. Traub, P. & Nomura, M. (1968), *Science*, 160, 198.
120. Traut, R.R., Delius, H., Ahmad-Zadeh, C., Bickle, T.A., Pearson, P. & Tissières, A. (1969), *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 34, 25.
121. Utsunomiya, T. & Hess, E.L. (1961), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 6, 100.
122. Vermeulen, C. & Atwood, K. (1968), in Osawa, S., *Annual Review Biochem.*, 37, 109.
123. Vinograd, J. & Hearst, J.E. (1962), *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.*, 20, 395.
124. Waller, J.P. (1964), *J. Mol. Biol.*, 10, 319.
125. Waller, J.P. & Harris, J.I. (1961), *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.*, 47, 18.
126. Weiss, S.B., Hsu, W.T., Foft, J.W. & Scherberg, N. H. (1968), *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.*, 61, 114.
127. Westmoreland, B.C., Szybalski, W. & Ris, H. (1969), *Science*, 163, 1343.
128. Yankofsky, S.A. & Spiegelman, S. (1962 a) *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.*, 48, 1069.
129. Yankofsky, S.A. & Spiegelman, S. (1962 b), *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.*, 48, 1466.
130. Yankofsky, S.A. & Spiegelman, S. (1963), *Proc. Natl. Acad. Sci., Wash.*, 49, 539.