



INIS-uf -- 7e6

Clá **Schwartz** **Peres**

PROCESSAMENTO DO RNA MENSAGEIRO NUCLEOLAR

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

1972

CLARITA SCHVARTZ PERES

PROCESSAMENTO DO RNA MENSAGEIRO NUCLEOLAR

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

1972

a

minha

família

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani, cujo apoio e amizade constantes foram altamente valiosos para minha formação científica e realização deste trabalho.

Ao Dr. Piero Manginelli, cuja confiança em minha pessoa, foi louvável, aguardando a confecção da parte escrita desta tese, para início das atividades de pesquisa em seu laboratório.

A Srta. Maria Thereza Barros Casas e Sr. Heitor Franco de Andrade Jr., pela colaboração valiosa prestada na parte experimental.

Ao Sr. Antonio Marim Olmo, pela presença e colaboração constantes em etapas árduas deste trabalho.

A Carminha, pelo esmero e exatidão com que datilografou esta tese.

Ao Serviço Gráfico do Instituto de Energia Atômica, pela excelente impressão desta tese e, em particular à pessoa do Prof. Dr. Rui Ribeiro Franco, Diretor da Divisão de Ensino e Formação, que autorizou a execução deste serviço

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, ao Conselho Nacional de Pesquisas e a Foundation for Overseas Research Grants and Education, pelo apoio financeiro que tornou possível a execução deste trabalho.

CONTEÚDO

	PAG.
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1. MATERIAL	14
2.2. ANIMAIS	15
2.3. MÉTODOS	16
2.3.1. Preparação de Núcleos	16
2.3.1.1. Método de HYMER & KUFF (1964)	16
2.3.1.2. Método de PENMAN, SMITH & HOLTZMAN(1966)	17
2.3.1.3. Método de CHAUVEAU, MOULLÉ & REULLIER (1956)	17
2.3.2. Preparação de Nucléolos	18
2.3.2.1. Método de STEELE, OKAMURA & BUSCH (1965)	18
2.3.2.2. Método de PENMAN, SMITH & HOLTZMAN(1966)	19
2.3.3. Preparação de Microssomos	20
2.3.3.1. Método de BRENTANI (1969)	20
2.3.4. Preparação de Ribossomos	21
2.3.4.1. Método de BRENTANI, BRENTANI & RAW (1968)	21
2.3.5. Preparação de Ribossomos Pré-Incubados	21
2.3.5.1. Método de BRENTANI (1969)	21
2.3.6. Extração e Purificação de RNA	22
2.3.6.1. Método de Di GIROLAMO, HENSHAW & HIATT (1964)	22
2.3.7. Extração e Purificação de DNA	24
2.3.7.1. Método de CHURCH & MCCARTHY (1967)	24
2.3.8. Hibridização	25
2.3.8.1. Método de GILLESPIE & SPIEGELMAN (1965)	25
2.3.9. Análise por Sedimentação Zonal	26
2.3.10. Análise do DNA em Gradiente de Cloreto de Césio (CsCl)	28
2.3.10.1. Método de FLAMM, BOND & BURR (1966)	28
2.3.10.2. Cálculo do conteúdo de GC	29
2.3.11. Fracionamento de RNA em Cromatografia em Coluna de Benzoil-Dietil aminoetil Celulose (BD-Celulose)	29

	PÁG.
2.3.11.1. Método de SEDAT, LYON & SINSHEINER(1969)	29
2.3.12. Métodos Analíticos	30
2.3.12.1. Determinação do RNA	30
2.3.13. Determinação do Tm do Híbrido	31
2.3.14. Medida da Radioatividade	31
3. RESULTADOS	33
3.1. Da Análise por Sedimentação Zonal	33
3.1.1. DNA cromatínico	33
3.1.2. RNA nucleolar	34
3.1.3. RNA nucleoplasmático	37
3.2. Da Análise do RNA Nucleolar em Cromatografia em Coluna de BD-Celulose	38
3.3. Da Hibridização	39
3.3.1. Curva de temperatura de hibridização do RNA nucleolar	39
3.3.2. Tm do híbrido	40
3.3.3. Hibridização heteróloga	41
3.3.4. Comparação da reação de hibridização do RNA nucleolar com os DNAs nuclear e cromatínico	43
3.3.5. Análise de DNA em gradiente de equilíbrio em CsCl	45
3.3.5.1. Do DNA de cromatina	45
3.3.5.2. Do DNA de nucléolo	47
3.3.5.3. Hibridização das frações obtidas em gradiente de CsCl do DNA cromatínico com RNA nucleolar duplamente marcado	49
3.3.6. Comparação entre as reações de hibridização do RNA nucleolar e RNA nucleoplasmático com DNA cromatínico	51
3.3.7. Determinação do plateau de saturação e seu recíproco - Hibridização entre DNA de cromatina e RNA nucleolar	53
3.3.8. Reação de hibridização do DNA cromatínico com as frações de RNA nucleolar duplamente marcado isoladas em cromatografia em BD-celulose	56

	PAG.
3.3.9. Reação de hibridização do DNA de cromati na com as frações do RNA nucleolar isola das em gradiente de sacarose	57
3.3.10. Hibridização competitiva	59
4. DISCUSSÃO	62
5. RESUMO E CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

ABREVIATURAS

- DNA - Ácido desoxirribonucleico
RNA - Ácido ribonucleico
mRNA - RNA mensageiro
rRNA - RNA ribossômico
tRNA - RNA de transferência
DOC - Desoxicolato de sódio
SDS - Dodecil sulfato de sódio
ND - Naftaleno dissulfonato de sódio
PFO - 2,5 Difeniloxazol
POPOP - 1,4 bis-2(4 metil-5-feniloxazolil benzeno)
Tris - Tris(hidroximetil)aminometano
RSB - Tampão Tris/HCl 0,01M pH 7,4, contendo $MgCl_2$
 $1,5 \times 10^{-3}M$ e NaCl 0,01M
HS - Tampão Tris/HCl 0,01M pH 7,4, contendo NaCl 0,5M e
 $MgCl_2$ 0,05M
ATP - Trifosfato de adenosina
GTP - Trifosfato de guanosina
TSC - Tampão Tris/HCl 0,05M pH 7,4, contendo $CaCl_2$
 $3 \times 10^{-3}M$ e sacarose 0,25M
EDTA - Etileno diamino tetraacetato de sódio
DNase - Desoxirribonuclease
RNase - Ribonuclease
SSC - Solução de NaCl 0,15M e citrato de sódio 0,015M,
pH 7,0
(GC) - Guanina e citosina, conteúdo no ácido nucleico
BD-Celulose - Benzoil-dietil aminoetil celulose
DMSO - Dimetilsulfóxido
Tm - Temperatura de fusão
Tr - Temperatura de reassociação
TCA - Ácido tricloroacético

1. INTRODUÇÃO

Um dos aspectos mais importantes da biologia molecular é o estudo da síntese proteica.

Para a constituição de uma proteína os aminoácidos devem ser ordenados numa sequência determinada. Como se explicaria a estabilidade e perpetuação desta sequência ou da informação a ela relativa numa dada espécie celular?

Torna-se evidente que esta informação deve estar contida numa macromolécula estável e capaz de sobreviver à divisão celular.

O único material biológico que apresenta tais propriedades é o ácido desoxirribonucleico - DNA.

De fato, a vinculação da informação genética ao DNA foi estabelecida por AVERY & MCCARTHY (1944) em seus experimentos com pneumococos virulentos e não virulentos.

Sabe-se, porém, que o depósito da informação genética está localizado no DNA nuclear e que a síntese proteica ocorre, principalmente, ao nível microssômico (HULTIN, 1950; BORSOOK, 1950).

Foi demonstrado que o DNA só pode ser usado como informação para a síntese de proteínas em circuns -

tâncias artificiais que envolvem a denaturação da molécula e a presença de antibiótico no meio de incubação (HOLLAND & MCCARTHY, 1966).

Há que postular, portanto, um intermediário que é produzido no núcleo sob a direção do DNA e que posteriormente, vai ao citoplasma onde é traduzido em proteína. Este intermediário de fato existe e é o RNA.

Pode-se, então, estabelecer o que se chama de "dogma central". Este estabelece que a informação genética para a síntese proteica é transmitida do DNA para o RNA e deste para a proteína, resumindo os três processos fundamentais da preservação e transmissão da informação genética, ou seja:

- a) replicação - cópia do DNA visando a formação de moléculas filhas;
- b) transcrição - passagem da informação genética contida no DNA para o RNA;
- c) tradução - a informação genética é convertida no alfabeto de aminoácidos que estruturam as proteínas.

Os microssomos, sede do processo de síntese proteica, quando tratados com detergente (desoxicolato de sódio) e submetidos à ultracentrifugação, são fracionados em partículas menores, os ribossomos. Estes tem a aparência de pequenos grânulos quando observados ao nível

submicroscópico e são, essencialmente, constituídos de 50% de proteína e 50% de ácido ribonucleico (PETERMANN & HAMILTON, 1955).

Vários fatos suscitaram dúvidas quanto à função do RNA ribossômico (rRNA). Seria ele o portador do código genético?

Estudos da proporção de bases do rRNA mostraram que isto não seria possível, uma vez que sua razão de bases era totalmente diversa daquela do DNA nuclear (BELOZERSKY, 1960).

A Tabela I fornece a proporção de bases do RNA estrutural de ribossomos de alguns organismos e a sua equivalência em DNA.

A hipótese de JACOB & MONOD foi a primeira tentativa para explicar este fato - o da transferência da informação genética ao nível do DNA à proteína, sem a participação do RNA ribossômico. Esta transferência seria efetuada por uma classe de ácido ribonucleico denominada mensageiro.

Esta hipótese teve confirmação prática quase imediata por BRENNER, JACOB & MESELSON (1961), devido ao fato deste RNA ter uma vida média muito baixa em procaríotos e ser marcado rapidamente por precursores radioativos.

TABELA I

Razão de bases dos RNAs estruturais de ribossomos e seu equivalente em DNA

ORGANISMO	ADENINA (%)		GUANINA (%)		CITOSINA (%)		TIMINA (%)		URACILA (%)	
	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA	DNA
Carneiro (ret.)*	18,2	29,3	32,7	21,4	30,9	21,0	28,3		18,2	
<u>E. coli</u>	25,1	24,7	32,6	26,0	21,9	25,7	26,3		20,4	
Rato (Fígado)	18,2	28,6	30,5	21,4	29,2	20,4	28,4		22,1	
Hela	29,0	30,9	23,1	19,9	22,1	19,8	29,4		25,8	

* reticulócito

A teoria de JACOB & MONOD teve uma importância fundamental na genética molecular e serviu como marco inicial de intensos estudos sobre o ácido ribonucleico mensageiro e seu transporte para o citoplasma.

Assim, foi sugerido que o mRNA, produzido no núcleo, migra para o citoplasma onde é incorporado aos ribossomos formando agregados subcelulares responsáveis pela síntese proteica - os polissomos ou polirribossomos (WARNER, RICH & HALL, 1962) - os quais funcionam permitindo um fluxo contínuo de monômeros (ribossomos isolados) ao longo da molécula informacional, traduzindo-a à medida que sobre ela deslizam (GOODMANN & RICH, 1962).

Sabendo-se da existência intranuclear de uma série de enzimas capazes de atacar o RNA (GEORGIEV, 1967), pode-se duvidar que a associação ribossomo - mRNA se efetue ao nível citoplasmático.

Em eucariotos pouca quantidade de mRNA livre é detectada no citoplasma. Dai surgiu a hipótese de que os polissomos já sairiam formados do núcleo e se comportariam como intermediários na transferência dos mRNAs recém-formados do núcleo para o citoplasma (BACH & JOHNSON, 1966).

Mesmo em sistemas bacterianos, que não apresentam membrana nuclear, foram encontrados complexos entre DNA, RNA mensageiro e ribossomo (BYRNE e col., 1964).

Poder-se-ia supor, então, que os ribossomos nucleares seriam responsáveis por esta associação, "in vi vo", havendo formação de polissomos intranucleares que iriam para o citoplasma passando pela membrana nuclear. Convém citar aqui que já foi descrita a passagem de rRNA estrutural pela membrana nuclear (HIGASHI e col., 1968).

Ao mesmo tempo, tem-se mostrado que os polissomos não são estruturas obrigatórias para a síntese proteica. Ribossomos simples -monossomos - isolados de fígado ou músculo são ativos em síntese polipeptídica "in vitro". Experimentos de LAMFROM & KNOFF (1964) mostraram que monômeros de reticulócitos são auto-suficientes na síntese de cadeias de hemoglobina.

Há, ainda, outra teoria a respeito do transporte de mRNA - seriam partículas de ribonucleoproteínas (RNP) as carregadoras do mRNA. Estas partículas são denominadas informossomos por SPIRIN (1969). São muito semelhantes às sub-unidades ribossomais, embora com menor coeficiente de sedimentação.

Estas evidências tem sido suportadas experimentalmente por vários trabalhos: INFANTE & NEMER (1968) identificaram partículas com as características dos informossomos em embrião de ouriço do mar, e HENSHAW (1968) as encontrou em células de fígado de rato.

Embora exista profusão de dados sobre a síntese proteica, vemos que há um conflito de idéias no que se refere ao caminho do mRNA desde o seu local de origem até o alvo citoplasmático.

O encontro, em nucléolo de fígado de rato, de um RNA capaz de estimular a incorporação de aminoácidos em ribossomos carentes de mensageiro endógeno (pré-incubados) (BRENTANI, BRENTANI & RAW, 1964, 1967; BRENTANI, 1966) sugeriu hipótese de trabalho na qual o nucléolo estaria envolvido no processamento do RNA mensageiro (BRENTANI, 1968).

Assim, o mRNA se associaria a ribossomos neoformados em cuja síntese o nucléolo desempenha importante papel (PERRY, 1960).

PERRY (1960, 1961) obteve considerável queda na síntese do RNA celular (70% do RNA citoplasmático e 30% do RNA nuclear) após irradiar nucléolos com um micro feixe de raios ultravioletas.

Foi observada a ausência de nucléolos em mutantes letais de Xenopus laevis que carentes desta organela, não possuem ribossomos (BROWN, 1964).

Experimentos de SCHERRER & DARNELL (1962) demonstraram a existência de um RNA de coeficiente de sedimentação 45S no nucléolo que, posteriormente, foi identifi-

cado como sendo o precursor dos RNAs ribossomais em experiências envolvendo inibição por Actinomicina D (SCHERRER & DARNELL, 1963).

Foi observado, por análise de sedimentação zonal em gradiente de sacarose, o encontro de três classes distintas de RNA em nucléolo de fígado quanto ao seu coeficiente de sedimentação: 28S, 35S e 45S. Além destes, outros RNAs de coeficiente de sedimentação 4S e 7S foram encontrados e caracterizados como sendo RNA de transferência (tRNA) por NAKAMURA, PRESTAYKO & BUSCH (1965) mostrando mais uma vez a importância do nucléolo em relação ao seu conteúdo em ácidos nucleicos.

Além das espécies acima descritas foi também referido o encontro em nucléolo isolado de mRNA caracterizado como tal pelo seu efeito estimulatório sobre a incorporação de aminoácidos "in vitro" (BRENTANI, 1964).

Quando se compara o efeito estimulatório da incorporação de aminoácidos "in vitro" dos três compartimentos nucleares: cromatina, nucleoplasma e nucléolo (BRENTANI, 1967), verifica-se ser este último o mais rico em mRNA.

Como o nucléolo tem também capacidade de síntese (BIRNSTIEL & HYDE, 1964; DESJARDINS & BUSCH, 1964; ZIMMERMAN, 1969) de proteínas estruturais dos ribossomos, é

importante mostrar que o mRNA aí localizado não se destina exclusivamente ao consumo endógeno, mas também às atividades sintéticas citoplasmáticas.

Nos trabalhos realizados em nosso laboratório, o mRNA nucleolar foi caracterizado inicialmente pelo estímulo da incorporação de aminoácidos por ribossomos carentes de RNA endógeno empregando-se o RNA nucleolar total.

Como aí se encontra uma mistura de RNAs estruturais de ribossomo, mRNA e tRNA foi necessário fracionar essa mistura analisando separadamente cada componente e caracterizando o mRNA encontrado. Análise por sedimentação zonal em gradiente de sacarose revelou a existência de quatro espécies moleculares de RNA nucleolar - 45S, 28S, 18S e 7S (BRENTANI, 1969).

Os resultados obtidos do estímulo da incorporação de aminoácidos por essas frações são apresentados na Tabela II.

Estes resultados são fortalecidos pelo trabalho de AKINO & AMANO (1970) em hepatócitos, onde eles comparam a capacidade de estimular a incorporação de aminoácidos "in vivo" nos diferentes compartimentos nucleares: nucleólo, cromatina e suco nuclear. A atividade de modelo do RNA nucleolar foi mais alta do que a dos RNAs cromatínico e nucleoplasmático. Experimentos com resultados seme-

lhantes foram realizados com células de tumor Walker (SAMSON & BUSCH, 1967).

TABELA II

Efeito estimulatório de frações do RNA nucleolar sobre microsossomos pré-incubados.

ADIÇÃO DO RNA	V/V ₀	
RNA total nucleolar	1,9	onde V/V ₀ é igual a razão entre as velocidades de reação de microsossomos pré-incubados na presença e na ausência do RNA nucleolar adicionado ou de suas respectivas frações.
45S	1,1	
28S	0,9	
18S	1,8	
10S	1,4	
7S	1,1	
28S rRNA	1,1	

Outra evidência da existência de mRNA no nucléolo é fornecida pelos experimentos realizados com heterocariotos formados pela hibridização de núcleos de eritrócitos aviários e células humanas ou de camundongos (HARRIS, 1971).

Nestes heterocariotos observa-se a síntese de proteínas ave-específicas somente quando o nucléolo do eritrócito está ativado. Nestas condições há um fluxo de

RNAs para o citoplasma, não só dos nucleolares, como também de outros compartimentos nucleares. Uma das possíveis interpretações para esta experiência é de que os mensageiros específicos necessitam de atividade nucleolar para sua expressão.

Para a caracterização mais completa do poder informacional de um ribopolímero devemos aplicar outros critérios além da capacidade de estimular a incorporação de aminoácidos, sendo um destes o estudo da estrutura física.

SINGER, JOHNES & NIREMBERG (1963) mostraram que o poder informacional de polirribonucleotídeos sintéticos é inversamente proporcional à sua complexidade estrutural.

O exame da estrutura física do mensageiro de hemoglobina, único até o momento estudado, revela escasso conteúdo de pontes de hidrogênio (11%) (HUNT & LAYCOCK, 1969).

O exame da estrutura física da fração nucleolar 18S, através de cinética de reação com formaldeído e troca hidrogênio - trítio, de perfil de denaturação térmica e de titulação potenciométrica e espectrofotométrica, revela apenas 12% de pontes de hidrogênio (BRENTANI, 1971; BRENTANI, KUBOTA & BRENTANI, 1972), confir-

mando o caráter informacional sugerido pelos experimentos de incorporação de aminoácidos.

Como uma fração de RNA com caráter informacional pode ser fruto da tradução de vários cistrons, a sua razão de bases deve refletir a do DNA que lhe deu origem e será tanto mais próxima do DNA quanto maior a porção do genoma que foi replicado. A análise da razão de bases da fração de coeficiente de sedimentação 18S nucleolar é mostrada na Tabela III.

TABELA III
Razão de bases da fração 18S nucleolar

NUCLEOTÍDIOS	%
AMP	21
UMP	33
GMP	26
CMP	20

onde A:U/G:C = 1,17, valor este bem diferente do RNA citoplasmático, que é igual a 0,88 (BRENTANI, 1969) e próximo do que caracteriza o DNA nucleolar de fígado de rato onde A:T/G:C = 1,32 (BRENTANI, BRENTANI & LEMOS, 1968).

Num processo análogo ao da renaturação do DNA pode-se associar moléculas de RNA com os cistrons de que se originaram, formando-se híbridos.

Usando-se RNA de atividade específica conhecida e sendo a reação de hibridização estequiométrica, pode-se calcular a quantidade de RNA envolvida na reação e, portanto, determinar a representação gênica do RNA empregado.

Experimentos preliminares (BRENTANI, 1969) sugerem que a representação gênica do RNA 18S nucleolar é muitas vezes maior do que a do rRNA (STEELE, 1968).

Esta reação de hibridização pode ser empregada para estudar a origem do RNA mensageiro nucleolar, uma vez que a cromatina associada ao nucléolo não contém apenas os cistrons para os RNAs ribossomais (BUSCH, 1970) existindo ainda, procedimentos para separá-la da cromatina propriamente dita.

A analogia entre dois ácidos ribonucleicos pode ser determinada por experimentos de hibridização competitiva. Empregando uma quantidade constante de uma espécie molecular de RNA radioativa e quantidades crescentes de outra espécie não marcada, haverá redução progressiva da radioatividade se ambas, as moléculas, forem complementares ao mesmo cistron do DNA empregado.

No presente trabalho pretende-se caracterizar mais intimamente o processo de hibridização do DNA nuclear com o RNA, estudar a origem do material nucleolar por hibridização e, finalmente, por experimentos de competição tentar demonstrar o destino citoplasmático deste material.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

Desoxicolato de sódio (DOC) - proveniente da Difco Laboratories U.S.A.

Dodecil sulfato de sódio (SDS) - fornecido pela QEEL (São Paulo) - recristalizado no laboratório segundo o método de CRESTFIELD, ALLEN & SMITH (1955).

Fenol - procedência Malinckrodt, destilado no laboratório e conservado em frasco âmbar, a 4°C.

Bentonita - obtida da Fischer Scientific Co. U.S.A.

Metionina - metil tritiada uniformemente marcada com atividade específica de 1,0 mCi/ml, obtida da Schwarz Bioresearch Inc. U.S.A.

Albumina, Ribose, Desoxiribose, Ribonuclease (E.C. 2.7.7.16) - obtidos da Sigma Chem. Co., U.S.A.

Fosfato de sódio ^{32}P - fornecido pelo Instituto de Energia Atômica, São Paulo.

Pronase - Obtida da Calbiochem, California, U.S.A.

Desoxiribonuclease - eletroforéticamente pura - procedência Worthington Biochemical Co. U.S.A.

Naftaleno dissulfonato de sódio - obtido da Eastman Kodak, U.S.A.

Triton X-100 - fornecido por Rohm e Haas, U.S.A.

Tween 20 - Polioxietileno Sorbitan Monolaurato - obtido da Mann Research Lab. Inc. U.S.A.

2,5 difenil oxazol (PPO) e 1,4 bis - 2 (4 metil-5-fenil oxazolil benzeno) (POPOP) foram adquiridos da Packard Inst. Co. U.S.A.

Os demais reagentes foram todos pró-análise e a água empregada no preparo das soluções, bidestilada em aparelhagem de vidro.

2.2. ANIMAIS

Foram utilizados ratos da raça Wistar fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina, e submetidos no mínimo, por 30 dias a uma dieta especial rica em proteínas.

Os animais eram sacrificados por concussão cerebral e os fígados perfundidos "in situ" pela veia porta, com solução gelada de NaCl fisiológica (0,14 M) contendo 0,2 mg/ml de bentonita.

Os fígados, a seguir, eram removidos, colocados em gelo e picados com uma tesoura de pontas finas.

As preparações foram efetuadas, em todas as etapas, em câmara fria a 4°C, salvo especificação em contrário.

2.3. MÉTODOS

2.3.1. Preparação de Núcleos

2.3.1.1. Método de HYMER & KUFF (1964)

Os fígados eram homogeneizados num homogeneizador tipo Potter, dotado de um pistilo de teflon, adaptado a um motor Cenco "stirrer" de baixo torque, em nove volumes de sacarose 0,25 M contendo MgCl_2 2×10^{-3} M.

A seguir, o homogenato era filtrado em gaze (oito camadas) e centrifugado a 2.000 r.p.m., por 15 minutos, no rotor 269 da centrífuga International Equipment Co.

O precipitado obtido era suspenso numa solução de sacarose 0,25 M contendo detergente Triton X-100 0,5% (V/V) e $1,0 \times 10^{-3}$ M/l de MgCl_2 e, submetido a agitação por 10 minutos.

Esta extração era feita três a quatro vezes e o precipitado final era suspenso em sacarose 0,25 M contendo MgCl_2 $1,0 \times 10^{-3}$ M. A suspensão era centrifugada a 2.000 r.p.m. por 10 minutos e o precipitado final, constituído de núcleos.

Núcleos extraídos por este método foram sempre destinados à purificação de DNA por conter Triton que é considerado um inibidor de desoxiribonuclease.

2.3.1.2. Método de PENMAN, SMITH & HOLTZMAN (1966)

Os fígados eram homogeneizados em 5 volumes de um tampão Tris/HCl 0,01 M, pH 7,4 contendo $MgCl_2$ $1,5 \times 10^{-3}$ M; NaCl 0,01 M e bentonita 0,2 mg/ml (Tampão RSB) e o homogeneizado, após ser filtrado em gaze (8 camadas), era centrifugado, durante 10 minutos, a 2.000 r.p.m. (700 g) na International.

O precipitado assim obtido era suspenso em igual volume do tampão RSB, adicionando-se a seguir uma solução de detergentes (DOC a 10%: uma parte e Tween 20 a 10%: duas partes) na proporção de 3 ml da mistura para cada 20 ml de suspensão nuclear e, novamente centrifugado nas mesmas condições.

O precipitado final era constituído de núcleos puros.

2.3.1.3. Método de CHAUVEAU, MOULLÉ & REULLIER (1956)

Os fígados homogeneizados em nove volumes de sacarose 0,25 M contendo $CaCl_2$ $1,8 \times 10^{-3}$ M e bentonita 0,2 mg/ml eram centrifugados, após filtragem do homogeneizado, em uma Internacional por 10 minutos a 2.000 r.p.m.

O sobrenadante era aspirado com uma bomba de vácuo, suspendendo-se o precipitado, com a ajuda do mesmo motor empregado na homogeneização dos fígados, em 9 volumes de sacarose 2,4 M contendo CaCl_2 $1,8 \times 10^{-4}$ M.

A suspensão era centrifugada durante 60 minutos no rotor 30 da ultracentrífuga Spinco modelo L a 21.000 r.p.m. (40.000 g no raio médio) e, o precipitado de núcleos puros obtido, era lavado uma vez com uma solução de sacarose 0,88 M e centrifugado na Internacional a 2.000 r.p.m. (700 g), durante 10 minutos.

2.3.2. Preparação de Nucléolos

2.3.2.1. Método de STEELE, OKAMURA & BUSCH (1965)

Os núcleos, preparados pelo método de HYMER & KUFF (1964), eram extraídos duas vezes num volume de tampão Tris/HCl 0,05 M pH 7,4, contendo NaCl 0,14 M, MgCl_2 $1,0 \times 10^{-3}$ M, equivalente a 0,5 ml/g de fígado.

O precipitado, obtido na centrifugação destes extratos a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos, era ressuspenso no mesmo tampão num volume correspondente a 0,2 ml/g de fígado, ao qual se adicionava, lentamente, e com agitação constante, um volume de NaCl 2,0 M equivalente a 4,0 ml/g de fígado.

A mistura, submetida à agitação magnética constante em câmara fria durante 30 minutos, era a seguir cen -

trifugada no rotor 30 da Spinco modelo L a 20.000 r.p.m. (40.000 g no raio médio) durante 60 minutos.

O precipitado obtido era constituído pela fração nucleolar e o sobrenadante, pela cromatina nuclear da qual posteriormente isolamos o DNA.

2.3.2.2. Método de PENMAN, SMITH & HOLTZMAN (1966)

O precipitado de núcleos obtido pelo método de PENMAN, e col. era suspenso em um volume de tampão Tris/HCl 0,01 M, pH 7,4, contendo NaCl 0,5 M e $MgCl_2$ 0,05M (meio HS), igual a 0,5 ml/g de fígado e a suspensão aquecida a 37°C em banho-maria. Após o equilíbrio de temperatura (cerca de 3 minutos) adicionava-se DNase na razão de 100 microgramas por 20 ml de suspensão e procedia-se à digestão enzimática até redução completa da viscosidade da suspensão. Geralmente eram necessários 3 a 5 minutos para isto.

A suspensão era a seguir submetida a um gradiente linear de sacarose 15% a 30% (PENMAN, 1968) no rotor SW 25 da ultracentrífuga Spinco modelo L, por 15 minutos a 20.000 r.p.m.

O precipitado obtido era constituído por nucléolos puros e empregado para o fracionamento do RNA nucleolar. O sobrenadante localizado na camada menos densa do gradiente constituía o nucleoplasma do qual também era fracionado o RNA.

2.3.3. Preparação de Microsossomos

2.3.3.1. Método de BRENTANI (1969)

Os fígados eram homogeneizados em cinco volumes de sacarose 0,25 M, com o auxílio de um homogeneizador tipo Potter, dotado de um pistilo de teflon, adaptado a um motor elétrico de baixo torque.

Esta suspensão era a seguir centrifugada em uma centrífuga Sorvall, modelo RC-2B a 10.000 r.p.m. durante 15 minutos.

Obtinha-se, assim, um precipitado e um sobrenadante bifásico cuja camada superior era constituída predominantemente pela fração lipídica da célula. Aspiravam-se cuidadosamente os 2/3 intermediários deste sobrenadante de modo a desprezar a fração lipídica.

Estes 2/3 de sobrenadante eram centrifugados no rotor 50 da ultracentrífuga preparativa Spinco modelo L a 40.000 r.p.m. (105.000 g no raio médio) durante 45 minutos.

O precipitado constituído por microsossomos era lavado, sem ser destacado da parede do tubo, com sacarose 0,24 M e a seguir, com o auxílio de um homogeneizador tipo Potter, era suspenso manualmente, em uma solução de TSC (vide 2.3.6.1.) para posterior extração e purificação do RNA.

2.3.4. Preparação de Ribossomos

2.3.4.1. Método de BRENTANI, BRENTANI & RAW (1968)

Procedia-se inicialmente da mesma forma que para a preparação de microssomos.

O sobrenadante, obtido por centrifugação a 10.000 g do homogeneizado total de fígado, era submetido a tratamento com uma solução de DOC a 5% em Tris/HCl 0,03 M, pH 8,2, correspondente a 1/9 do seu volume. A concentração final de DOC era, portanto, igual a 0,5%. Esta mistura era centrifugada, então no rotor 40 da ultracentrífuga Spinco a 40.000 r.p.m. durante 120 minutos.

O precipitado de ribossomos assim obtido era lavado, sem destacá-lo da parede do tubo, inicialmente com sacarose 0,25 M e depois com tampão Tris/HCl 1×10^{-3} M, pH 7,4, contendo $MgCl_2$ 5×10^{-3} M (meio G).

2.3.5. Preparação de Ribossomos Pré-Incubados

2.3.5.1. Método de BRENTANI (1969)

Para a preparação de ribossomos pré-incubados, ou seja, despojados do RNA mensageiro endógeno, os ribossomos (3,5 mg de proteína) eram incubados por 12 minutos em um volume total de 1,7 ml de uma mistura contendo: 2,0 mg de proteína de enzima pH 5 (vide 2.3.5.1.1.); ATP 5 μ moles; GTP 0,5 μ mol; tampão fosfato de potássio pH 7,4 20 μ moles; sacarose 87,5 μ moles; β -mercaptoetanol 10 μ moles;

MgCl₂, 12 µmoles; creatina fosfato 40 µmoles; creatina fosfoquinase, 200 µg.

Após a pré-incubação, seguia-se a extração do RNA.

2.3.5.1.1. Preparação da enzima pH 5,0 - Método de RENDI & CAMPBELL (1959)

O sobrenadante obtido na preparação de microsomas era acidificado a pH 5,2 com auxílio de ácido acético 1 N. A solução turva resultante deste tratamento era centrifugada a 10.000 g na centrífuga Sorvall, durante 10 minutos. O precipitado resultante era suspenso manualmente em sacarose 0,25 M e empregado como enzima pH 5,0 na pré-incubação dos ribossomos.

2.3.6. Extração e Purificação de RNA

2.3.6.1. Método de Di GIROLAMO, HENSHAW & HIATT (1964)

Os nucléolos eram suspensos em um volume de tampão Tris/HCl 0,05 M, pH 7,4, contendo CaCl₂ 3,0 x 10⁻³ M e sacarose 0,25 M (TSC), equivalente a 0,2 ml/15 g de fígado inicial. Adicionava-se a seguir: 0,1 volumes de SDS 10%; 14 volumes de uma mistura de TSC (uma parte) com SDS 1,0% em Tris/HCl 0,05 M pH 7,4 (9 partes); 1,5 volumes de ND 5,0% e 15 volumes de fenol a 86% contendo 0,1% de 8-hidroxiquinolina.

Esta mistura era agitada constantemente a 4°C durante 30 minutos e as fases fenólica e aquosa separadas por centrifugação a 5.000 g durante 10 minutos.

O sobrenadante (fase aquosa) era reextraído duas vezes com 0,5 volume de fenol e o RNA da fase aquosa final precipitado pela adição de NaCl e etanol absoluto a -20°C , até uma concentração final de 0,1 M e 67,0%, respectivamente. Essa mistura permanecia a -20°C por 90 minutos.

O RNA obtido por centrifugação a 5.000 g durante 10 minutos era dissolvido em dois volumes de tampão Tris/HCl 0,01 M pH 7,4 contendo MgCl_2 $1,0 \times 10^{-3}$ M e submetido à digestão enzimática por DNase durante 5 minutos, a frio.

A DNase era removida pela adição de 0,1 volume de SDS a 10% e ND a 5,0%, seguida de uma extração com igual volume de fenol a 85%. O RNA da fase aquosa era obtido por precipitação com 2 volumes de etanol absoluto a -20°C , durante 18 horas.

Os oligodesoxirribonucleotídeos contaminantes eram removidos por tratamento com acetato de potássio, MgCl_2 e etanol absoluto a -20°C , a uma concentração final de 2,0 M; $1,0 \times 10^{-3}$ M e 30%, respectivamente. Repetia-se este tratamento várias vezes até que o sobrenadante

não apresentasse absorção apreciável a comprimento de onda de 260 nm.

2.3.7. Extração e purificação de DNA

2.3.7.1. Método de CHURCH & McCARTHY (1967)

Os núcleos obtidos pelo método de HYMER & KUFF (1964) eram suspensos em 10 volumes de 2xSSC (SSC é uma solução de NaCl 0,15 M e citrato de sódio 0,015 M, pH 7,0) e a suspensão tornada 1% em SDS e 1,0 M em perclorato de sódio. A mistura, muito viscosa, era agitada com igual volume de clorofórmio:octanol (10:1) até homogeneização total e, em seguida, centrifugada na Sorvall, modelo RC-2B a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos.

Obtinha-se, assim, uma fase aquosa e desta precipitava-se o DNA pela adição de 2 volumes de etanol a -20°C . O DNA era recolhido, envolvido num bastão de vidro e, posteriormente, dissolvido em 0,1 x SSC. Após completa dissolução, o DNA era submetido a um tratamento enzimático com ribonuclease (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 37°C durante 30 minutos e, posteriormente, com pronase (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 37°C durante 60 minutos.

A RNase empregada neste processo era dissolvida na concentração de 0,2 mg/ml em uma solução de 1x SSC pH 5,0 e aquecida a 80°C por 15 minutos antes do seu emprego.

A pronase empregada era dissolvida em 1 x SSC e incubada a 37°C durante 120 minutos para auto digestão de enzimas contaminantes.

Após a digestão enzimática, repetia-se o tratamento com clorofórmio:octanol (10:1) e o DNA, obtido da fase aquosa por adição de 2 volumes de etanol a -20°C, era novamente dissolvido em 0,1 x SSC.

2.3.8. Hibridização

2.3.8.1. Método de GILLESPIE & SPIEGELMAN (1965)

O DNA a ser empregado nos experimentos de hibridização era denaturado por ação de NaOH 1,0 N durante 10 minutos. A mistura era então neutralizada com 4 volumes de HCl 1 N, tampão Tris/HCl 0,01 N, pH 8,0 e NaCl 0,4 N na proporção de, respectivamente, 1:1:2.

O grau de denaturação era verificado determinando-se a hipercromicidade provocada pela ação do álcali. Nas nossas experiências o incremento da absorbância a 260 nm oscilou sempre entre 25% e 35%.

As alíquotas de DNA, em um volume de 3 a 5 ml na solução de 2 x SSC, eram aplicadas, com sucção discreta, sobre filtros Millipore tipo GS (tamanho especificado na descrição dos resultados) que haviam permanecido 12 horas em embebição em 2 x SSC.

Após a fixação do DNA nos filtros, estes eram deixados secando à temperatura ambiente por 4 a 12 horas e, em seguida, a 80°C por 2 horas. Estes eram, então, conservados por tempo indeterminado em um dessecador contendo CaCl_2 e P_2O_5 , a 4°C, sob vácuo.

Os híbridos eram formados pela imersão dos filtros contendo DNA, em solução de RNA marcado sendo o solvente 2 x SSC. A hibridização era feita por 17 horas a 68°C ou 55°C, conforme o experimento e interrompida colocando-se os recipientes no gelo e excesso de solução de 2 x SSC gelada. O volume de incubação era de 3 ml.

Os filtros eram lavados juntos 3 vezes em solução de 2 x SSC, após em solução de 2 x SSC contendo RNase numa concentração de 30 µg/ml e, posteriormente, tres vezes em solução de 2 x SSC.

2.3.9. Análise por sedimentação zonal

Como as técnicas convencionais de fracionamento em rotores do tipo basculante tinham rendimento reduzido, adotamos o método de análise em rotores preparativos (de ângulo fixo) já utilizado com sucesso na análise de proteínas e DNA.

Esta adaptação (BRENTANI, BRENTANI & RAW, 1967) permitiu uma redução considerável do tempo necessário e um aumento substancial do rendimento do processo.

Gradientes de sacarose 5 a 20% eram preparados em câmara de vasos comunicantes tipo BRITTEN & ROBERTS (1951) em tubos de nitrocelulose do rotor 50 da Spinco modelo L. O volume total era de 8,0 ml. As amostras a serem analisadas eram colocadas sobre esta solução e os tubos centrifugados na ultracentrífuga a 40.000 r.p.m. durante 90 minutos com o freio desligado. Ao término da centrifugação os tubos eram colocados em um suporte em cuja base havia uma agulha de injeção a qual, ao exercer-se pressão através de um parafuso, perfurava o fundo do tubo permitindo o escoamento do seu conteúdo.

Para a padronização do método foi empregado RNA ribossômico, purificado pelo método de KIRBY(1965). A linearidade do gradiente foi seguida adicionando-se ácido adenílico a uma das soluções de sacarose e determinando-se a absorção, no comprimento de onda de 260 nm, das frações obtidas.

As soluções de sacarose continham sempre tampão Tris/HCl 0,01 N pH 7,4; NaCl 1×10^{-3} N, EDTA 1×10^{-3} N. Colhiam-se sempre 40 frações contendo 15 gotas cada uma. A absorbância destas frações era determinada a 260 nm.

Para a determinação da radioatividade do RNA nucleolar, depois de verificada a absorbância das frações, adicionava-se a todos os tubos 200 microgramas de albumina bovina e ácido tricloroacético (TCA) a uma concentração final de 5%:

2.3.10. Análise do DNA em gradiente de Cloreto de Césio (CsCl)

2.3.10.1. Método de FLAMM, BOND & BURR (1966)

Uma solução contendo 20 a 100 µg de DNA em 3,36 ml de tampão Tris/HCl 0,01 M pH 7,5 era adicionada a 4,271 g de CsCl. Nestas condições obtém-se 4,5 ml de uma solução com densidade final de, aproximadamente, 1,700 g/cm³, que pode ser determinada refratometricamente pela expressão empírica de VINOGRAD & HEARST (1962):

$$\rho_{25^{\circ}} = a \cdot \frac{n_D^{25^{\circ}} - b}{D}$$

onde a e b são constantes iguais a 10,8601 e 13,4974, respectivamente, e $\rho_{25^{\circ}}$ e $n_D^{25^{\circ}}$ são a densidade da solução a 25°C e o índice de refração médio a 25°C, respectivamente,

As centrifugações foram feitas em tubos de nitrocelulose no rotor 65 Ti da ultracentrífuga Spinco modelo L2 a 42.000 r.p.m., por 40 horas, à temperatura de 25°C. Antes da centrifugação os tubos eram preenchidos até o topo com óleo mineral tipo Nujol. Após a centrifugação perfuravam-se os tubos na parte inferior e coletavam-se as gotas segundo o número de frações desejadas. As frações eram, então, diluídas a um volume de 0,3 ml para leitura das absorvâncias. Eventualmente, quando havia interesse em se determinar a densidade da posição de equilíbrio da banda de DNA, o índice de refração das frações era medido antes de se proceder à diluição das mesmas.

2.3.10.2. Cálculo do conteúdo de GC

O equilíbrio do DNA em gradiente de CsCl aumenta linearmente com o seu conteúdo de GC, relação esta representada por SCHILDKRAUT (1962) como:

$$(GC) = \frac{\rho - 1,660}{0,098}$$

onde (GC) representa a fração molar de guanina + citosina no DNA nativo e ρ , a densidade calculada do DNA.

2.3.11. Fracionamento de RNA em cromatografia em coluna de benzoil-diethyl aminoetil celulose (BD-celulose)

2.3.11.1. Método de SEDAT, LYON & SINSHEINER (1969)

O RNA nucleolar, purificado conforme 2.3.6., foi submetido à cromatografia em coluna de BD-celulose com a finalidade de identificar as espécies moleculares que o compreende.

A coluna empregada tinha por dimensões: raio de 0,9 cm, altura de 15 cm e fluxo de 15 ml/hora. Foram aplicadas cerca de 1,2 mg de RNA nucleolar diluído em tampão Tris/HCl 0,02 M, pH 7,5 contendo EDTA 1×10^{-3} M e NaCl 0,3 M. A coluna foi a seguir lavada com o mesmo tampão e após tratada com uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 40%, NaCl 1 M, Tris/HCl 0,02 M, pH 7,5; EDTA 1×10^{-3} M. Em

seguida, foi tratada com uréia 8 M, NH_4Cl 1 M, tampão acetato 0,1 M, pH 3,5. Finalmente, foi lavada com uréia 8 M contendo SDS a 2%. As frações, colhidas com o auxílio de um coletor tipo LKB com registro automático da absorbância a 260 nm, eram de aproximadamente 1,0 ml.

As frações assim coletadas foram divididas em duas metades cada uma, sendo parte destinada à curva de radioatividade e parte, à precipitação por adição de 2 volumes de etanol a -20°C para posterior realização da reação de hibridização das frações, em separado, com o DNA cromatográfico.

2.3.12. Métodos analíticos

2.3.12.1. Determinação do RNA

Utilizava-se o método de DISCHE & SCHWARZ (1955), adotando ribose como padrão. Rotineiramente, a concentração de RNA era estimada medindo-se a sua absorção a 260 nm, considerando-se que uma solução contendo 1 mg/ml correspondia a 24 densidades ópticas (aferida com RNA de ribossomo cuja concentração era determinada pelo método colorimétrico dos autores acima).

2.3.12.2. Determinação do DNA

Empregava-se a determinação pela difenilamina, usando desoxirribose como padrão (SIEBERT, 1965) para

obter um padrão para as determinações de absorção no ultravioleta (260 nm) que eram usadas rotineiramente.

A solução contendo 1 mg/ml de DNA correspondia a 22 densidades ópticas a 260 nm.

2.3.13. Determinação do T_m do híbrido

Para determinação do T_m do híbrido formado pela reação entre DNA cromatínico e RNA nucleolar procedeu-se da seguinte maneira: os filtros, após terem sua radioatividade medida, foram retirados dos frascos de cintilação, lavados várias vezes em clorofórmio para remoção do tolueno e colocados num volume determinado de 2 x SSC. Foram então incubados num banho-maria com controle de temperatura variando-se esta de 5 em 5 °C desde 50 °C até 95 °C.

Os filtros permaneciam 10 minutos em cada temperatura retirando-se amostra para medida da radioatividade.

Os valores de denaturação térmica do híbrido foram calculados em % da radioatividade total inicial.

2.3.14. Medida da radioatividade

Os filtros obtidos nos experimentos de hibridização, após lavados, e secos eram colocados em frascos de cintilação e a radioatividade determinada num espectrometro de cintilação Beckman modelo LS-100. Empre-

gava-se para esta operação o líquido de cintilação com a seguinte composição:

PPO (2,5-difenioxazol): 4 g/l
POPOP (1-4-bis-2(4-metil-5-feniloxazolil benzeno)):
100 mg/ml
Tolueno: 1000 cm³

Para determinação da radioatividade das frações de RNA obtidas a partir de gradiente de sacarose e de cromatografia em coluna de BD-celulose, empregou-se o método de MALT (1967).

A cada fração adicionava-se 200 microgramas de albumina bovina como "carregadora" e a mistura era precipitada pela adição de TCA para uma concentração final de 5,0%. O material assim precipitado era colocado sobre filtros de fibra de vidro tipo GF/B Whatmann e a radioatividade de determinada como mencionamos acima.

3. RESULTADOS

3.1. Da Análise por Sedimentação Zonal

3.1.1. DNA cromatínico

Caracterizamos aqui o DNA cromatínico empregado nos experimentos de hibridização. O DNA foi extraído e purificado conforme MÉTODOS 2.3.7.1., a partir da solubilização da cromatina em NaCl concentrado (STEELE, 1965) de núcleos obtidos por tratamento com detergente Triton X-100.

Foram aplicadas 5,0 D.O. (230 microgramas) de DNA, dissolvidas em 0,2 ml de 0,1 x SSC, sobre um gradiente de sacarose 5 a 20% em tampão Tris/HCl 0,01 M, pH 7,4, contendo NaCl 1×10^{-3} M e EDTA 1×10^{-3} M. Estes foram submetidos a 40.000 r.p.m. por 60 minutos numa ultracentrífuga Spinco modelo L, no rotor 50. Após a corrida foram coletadas amostras de 15 gotas cada uma e determinadas as suas absorbâncias a 260 nm, como se verifica na Figura 1.

Observa-se, na Figura 1, a distribuição das moléculas do DNA ao redor da região que corresponde ao coeficiente de sedimentação 14S, o que representa um tamanho adequado para a realização dos experimentos de hibridização.

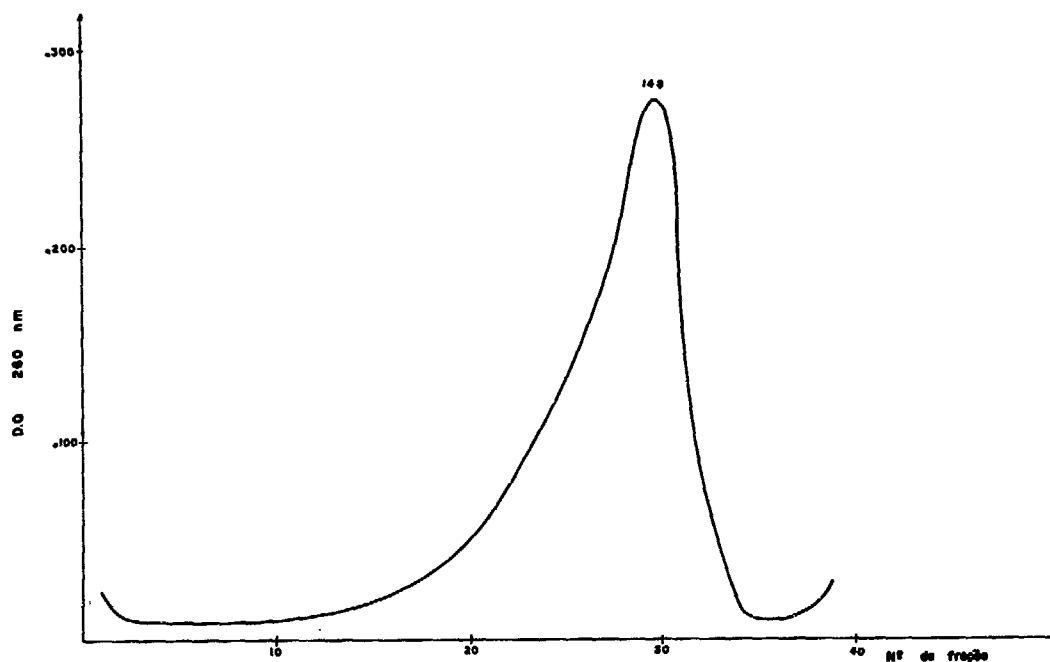


FIGURA 1 - Análise por sedimentação zonal do DNA cromatínico em gradiente de sacarose.

3.1.2. RNA nucleolar

O RNA nucleolar, extraído e purificado conforme MÉTODOS 2.3.6.1. de nucléolos 2.3.2.2., foi obtido a partir de animais submetidos à injeção intraperitoneal de fosfato de sódio ^{32}P por 3 horas e, endovenosa de metionina metil tritiada por 30 minutos antes do sacrifício.

Dissolveu-se 0,3 mg (7,0 D.O.) de RNA em água e foram aplicadas sobre um gradiente de sacarose de 5 a 20% em um tampão Tris/HCl 0,01 M pH 7,4, contendo NaCl

$1 \times 10^{-3} M$ e EDTA $1 \times 10^{-3} M$, Os gradientes foram submetidos a 40.000 r.p.m. por 90 minutos numa ultracentrífuga Spinco modelo L e analisados conforme descrito em MÉTODOS 2.3.9. Foram colhidas frações de 15 gotas cada uma, analisadas quanto à absorbância a 260 nm e, posteriormente, medida a sua radioatividade num espectrômetro de cintilação líquida Beckman modelo LS-100. Para a medida da radioatividade a cada fração adicionaram-se 200 microgramas de albumina bovina, TCA a uma concentração final de 5% e o material, assim precipitado, foi colocado sobre filtros de fibra de vidro tipo GF/B Whatmann ou filtros Millipore, tipo GS, 25mm. A eficiência em ambos os filtros é praticamente a mesma. Os perfis são observados na Figura 2.

Apesar deste resultado (Figura 2) ser fruto de inúmeras experiências, não conseguimos uma ótima resolução do material, ora por problemas de marcação com o isótopo radioativo, ora por falhas de equipamento preparativo e analítico. No resultado acima representado verificamos degradação do material e um pico na região de coeficiente de sedimentação 18S que é consideravelmente submetilado, quando comparado ao 28S que é constituído por RNA ribossômico. Isto está de acordo com trabalhos de GREENBERG & PENMAN (1966); ZIMMERMAN & HOLLER (1967); MURAMATSU (1967) que afirmam ser o RNA ribossômico metilado.

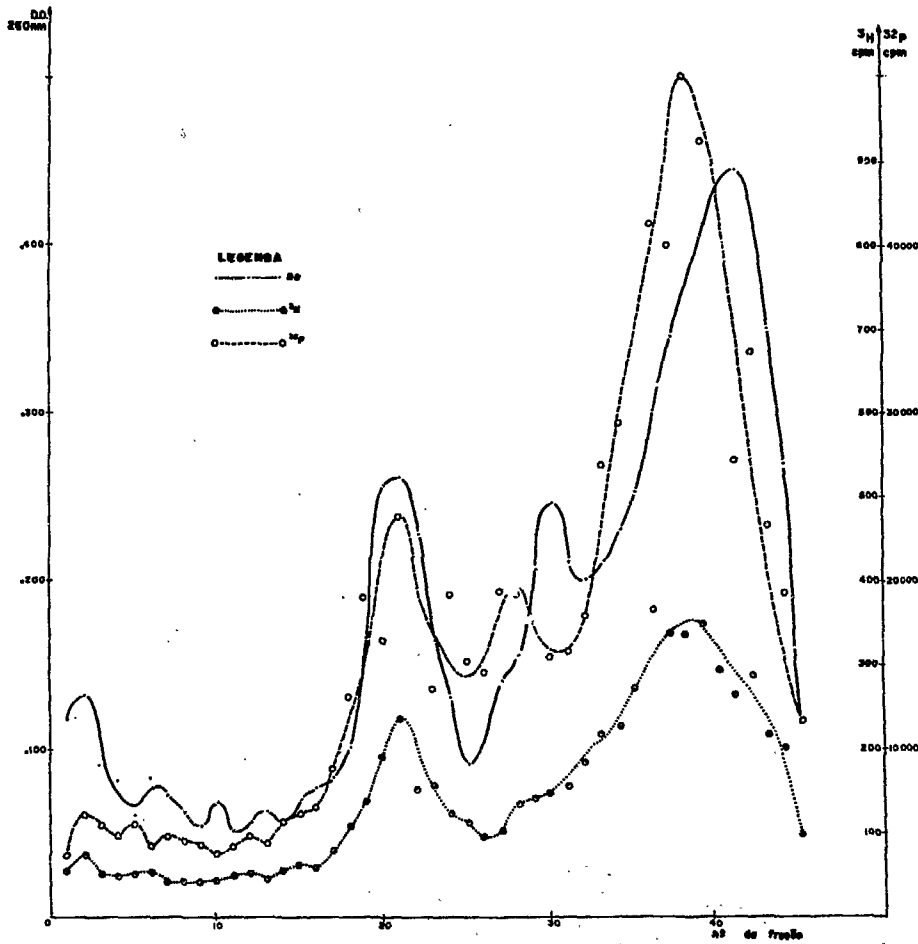


FIGURA 2 - Análise do RNA nucleolar duplamente marcado em gradiente de sacarose. Núcleos e nucléolos obtidos segundo PENMAN (1966). RNA purificado conforme Di GIROLAMO (1964).

3.1.3. RNA nucleoplasmático

O RNA de nucleoplasma foi purificado da mesma forma que o nucleolar, a partir de animais submetidos a idêntico tratamento isotópico, e, submetido a fracionamento em gradiente de sacarose 5 a 20% da mesma forma que o RNA nucleolar (Figura 3).

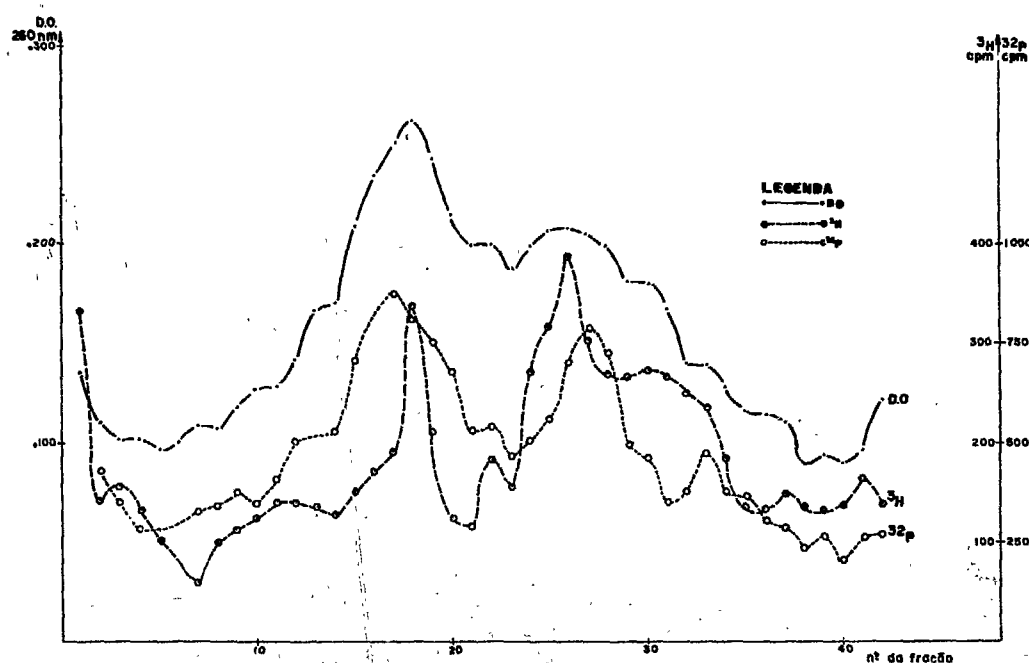


FIGURA 3 - Análise do RNA nucleoplasmático em gradiente de sacarose. Nucleoplasma isolado segundo PENMAN (1968).

Verifica-se aqui (Figura 3) que as frações de coeficiente de sedimentação 28S e 18S apresentam uma relação fosfato/metil-³H muito próxima, ou seja, a metilação é semelhante em ambas.

3.2. Da Análise do RNA Nucleolar em Cromatografia em Coluna de BD-Celulose

O RNA nucleolar empregado foi obtido por técnica já descrita, a partir de animais injetados com os dois isótopos radioativos. A cromatografia se processou conforme MÉTODOS 2.3.11. e é observada na Figura 4.

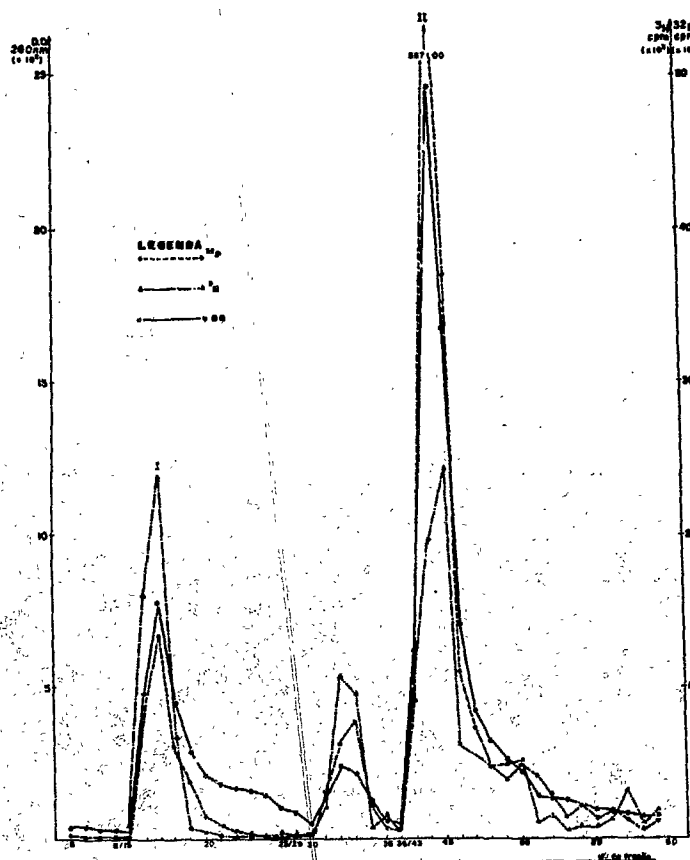


FIGURA 4 - Cromatografia em coluna de BD-celulose de RNA nucleolar duplamente marcado.

A análise por cromatografia em coluna de BD-celulose (Figura 4) revelou que o RNA nucleolar compreende espécies moleculares que são eluídas apenas com uréia e altas concentrações de NH_4Cl , condições estas consideradas características para ácido ribonucleico mensageiro. Ainda observamos que essa fração, representada pelo pico II, é notadamente submetilada.

3.3. Da Hibridização

3.3.1. Curva de temperatura de hibridização do RNA nucleolar

O DNA cromatínico, dissolvido em 0,1 x SSC e denaturado com álcali, foi colocado em filtros Millipore tipo GS, 25 mm na quantidade de 50 microgramas por filtro.

A hibridização foi feita com RNA nucleolar marcado com fosfato de sódio ^{32}P (3 horas de marcação), na proporção de 50 microgramas por filtro, nas temperaturas de 30, 40, 50, 55, 60, 65 e 68°C (Figura 5). O volume de incubação foi de 1,5 ml em solução de 2 x SSC e o tempo de incubação foi de 17 horas.

Pelo resultado obtido (Figura 5) verifica-se que um ótimo de temperatura para a hibridização do RNA nucleolar encontra-se em torno de 55°C. Isto está de acor-

do com trabalhos de GILLESPIE (1968), em que há citação de que a temperatura de hibridização deve ser baixa para moléculas de pouca estrutura secundária, e, com a ausência de estrutura secundária determinada para o RNA nucleolar de coeficiente de sedimentação 18S, considerada mensageiro (BRENTANI, KUBOTA & BRENTANI, 1972).

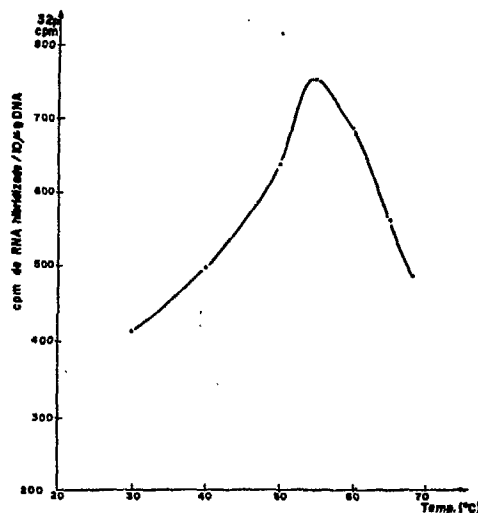


FIGURA 5 - Curva de temperatura - Hibridização entre DNA cromatínico e RNA nucleolar ³²P.

3.3.2. T_m do híbrido

Empregou-se filtros contendo híbridos resultantes da reação entre DNA de cromatina e RNA nucleolar ³²P, ao nível de saturação. A Figura 6 mostra o comportamento térmico destes híbridos.

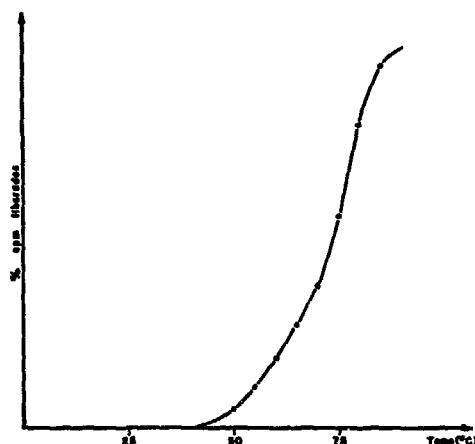


FIGURA 6 - Determinação do T_m do híbrido

Verifica-se que o T_m do híbrido formado entre o DNA de cromatina e o RNA nucleolar é de 75°C (Figura 6), valor este bem próximo daquele do DNA de cromatina que é de 80°C (BRENTANI, 1971 - resultados não publicados).

Além do valor de T_m , um outro indicio da grande complementaridade entre o RNA e o DNA envolvidos na reação de hibridização é a forma da curva, que apresenta grandes aumentos dentro de uma faixa estreita de variação de temperatura, como o esperado para o pareamento de estruturas altamente complementares.

3.3.3. Hibridização heteróloga

Realizamos aqui uma comparação entre as reações de hibridização do RNA nucleolar duplamente marcado

com DNA de Bacillus subtilis e DNA de rato.

O DNA de cromatina empregado foi o descrito anteriormente e o DNA de B. subtilis foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Walter Colli.

O RNA nucleolar empregado foi obtido segundo MÉTODOS, a partir de animais submetidos à injeção intraperitoneal de fosfato de sódio ^{32}P por 3 horas e injeção endovenosa de metionina metil tritiada por 30 minutos, 8 mCi e 100 μCi por animal, respectivamente.

Os DNAs foram denaturados em álcali e colocados em filtros Millipore tipo GS, 13 mm; a quantidade de RNA nucleolar empregada foi de 125 microgramas por filtro, sendo a incubação feita por 17 horas a 55°C num volume de 1,5 ml de 2 x SSC.

A Tabela IV representa a média de três experiências.

TABELA IV

DNA	cpm RNA hibridizado/filtro	
	^3H	^{32}P
<u>B. subtilis</u>	3	0
Rato	23	518

Observa-se que não há reação de hibridização do RNA nucleolar com DNA heterólogo.

3.3.4. Comparação da reação de hibridização do RNA nucleolar com os DNAs nuclear e cromatínico

O RNA nucleolar foi extraído e purificado como nos experimentos anteriores, a partir de animais submetidos à injeção intraperitoneal de fosfato de sódio ^{32}P e sacrificados 60 minutos após. A atividade específica do material foi de 1000 cpm por micrograma.

O DNA nuclear (Figura 7) foi purificado conforme descrito em MÉTODOS 2.3.7.1. a partir de núcleos 2.3.1.1.

O DNA de cromatina (Figura 8) foi purificado da mesma forma.

Em ambos os experimentos a reação de hibridização foi realizada a 55°C por 17 horas num volume de incubação de 1,5 ml de 2 x SSC. Os filtros, contendo $10\mu\text{g}$ de DNA denaturado com álcali, foram do tipo GS, Millipore, 13 mm e, após a reação, foram lavados com 2 x SSC e submetidos ao tratamento enzimático com RNase ($30\mu\text{g/ml}$ da solução de lavagem, que é da ordem de 10 ml por filtro).

STEELE (1968) refere-se à saturação do DNA total com RNA ribossômico nucleolar 28S ao nível de $12\mu\text{g}$

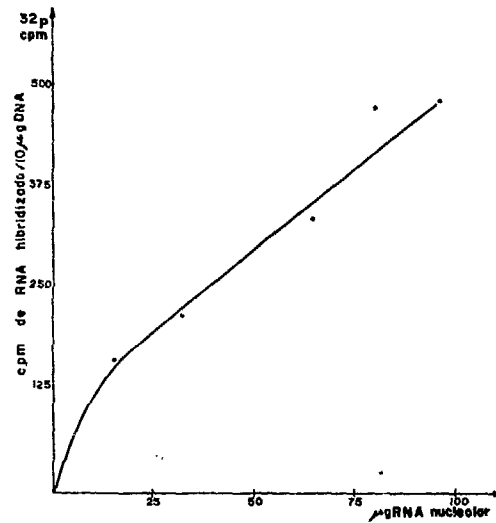


FIGURA 7 - Hibridização do RNA nucleolar com DNA de núcleo

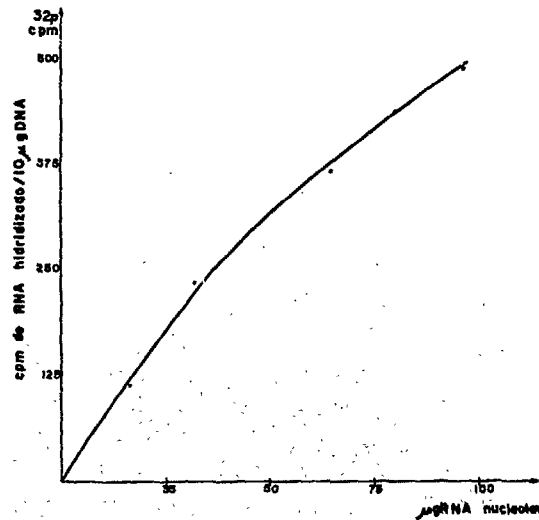


FIGURA 8 - Hibridização do RNA nucleolar de cromatina

de RNA aproximadamente. Como em nossos experimentos uma quantidade de 100 μ g pode representar um valor próximo da saturação, isto constitui um indicio de que não estamos hibridizando apenas RNA ribossômico.

O experimento realizado com o RNA nucleolar contra DNA cromatínico (Figura 8) tem por objetivo demonstrar a possível origem cromatínica do referido material. Podemos observar por esta reação que a curva obtida foi semelhante à com DNA nuclear (Figura 7), o que sugere que o RNA nucleolar envolvido na reação de hibridização não é determinado por cistrons de origem nucleolar.

3.3.5. Análise de DNA em gradiente de equilíbrio em CsCl

3.3.5.1. Do DNA de cromatina

O DNA de cromatina foi submetido ao fracionamento em CsCl conforme descrito em MÉTODOS 2.3.10.1.

Foram aplicadas 200 μ g de DNA dissolvidas em 0,1 x SSC. Após centrifugação ininterrupta por 40 horas a 42.000 r.p.m. a 25°C, na ultracentrífuga Spinco modelo L, foram coletadas frações (36 em média), determinadas as absorvâncias respectivas a 260 nm e também os índices de refração para posterior cálculo das densidades.

As frações de DNA obtidas foram também submetidas à denaturação com álcali e colocadas individual -

mente sobre filtros Millipore, tipo GS, 13 mm, para o pro-
cessamento da reação de hibridização com RNA ribossômi-
co (Figura 9).

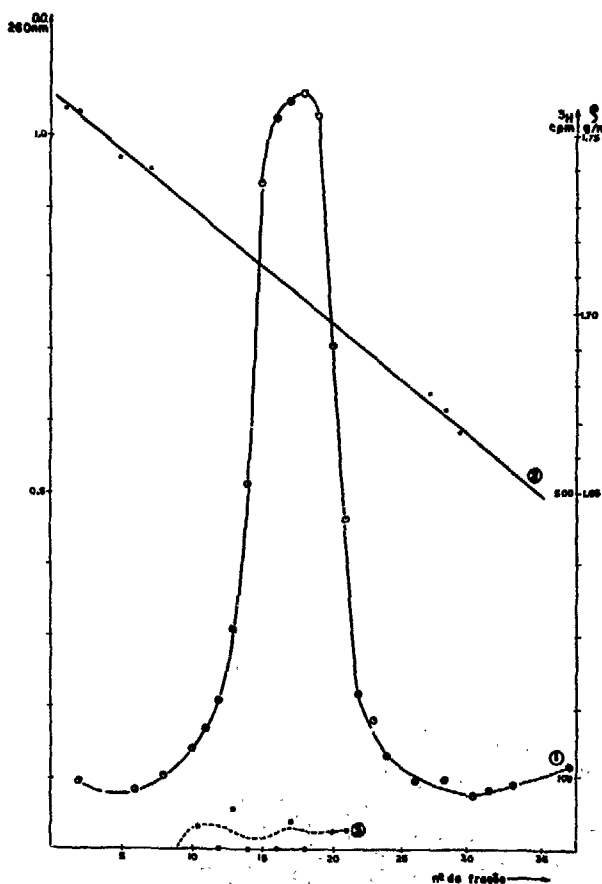


FIGURA 9 - Análise do DNA cromatínico em CsCl - Cálculo da densidade e reação de hibridização com rRNA.

O RNA ribossômico foi obtido pelo MÉTODO 2.3.4.1., a partir de animais parcialmente hepatectomiza

'dos (HIGGENS & ANDERSON, 1931) que receberam por 4 dias, após a operação, injeção diária de 250 μ Ci de metionina metil tritiada por via endovenosa. O sacrifício foi no quinto dia, quando apresentavam alto grau de regeneração hepática.

Pode-se observar um perfil aproximadamente simétrico do DNA (Figura 9), e a densidade calculada é 1,703 na banda principal, estimada pela fórmula de VINOGRAD & HEARST, através dos índices de refração medidos.

O conteúdo de GC, estimado pela relação linear de SCHILDKRAUT, foi de 43%.

Quanto à hibridização, observa-se que não houve reação com o rRNA o que significa que este compartimento nuclear não está contaminado por cistrons de rRNA.

3.3.5.2. Do DNA de nucléolo

A análise do DNA nucleolar em gradiente de CsCl foi realizada da mesma maneira que o DNA cromatínico e pode ser observada na Figura 10. Assim, determinou-se a absorbância das frações de 260 nm, seus índices de refração para cálculo das densidades e teor de (GC).

Ainda realizou-se hibridização das frações com RNA ribossômico marcado com metionina-metil tritiada, preparado como o anterior.

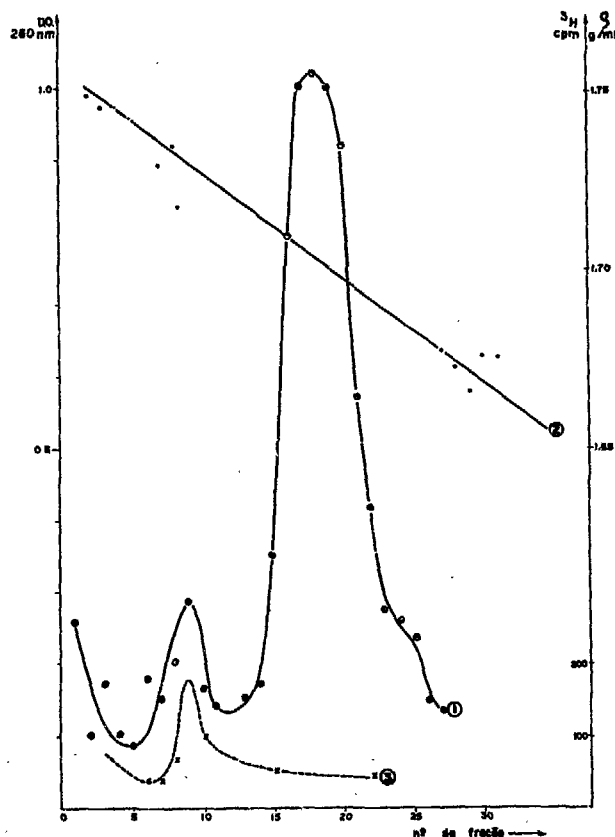


FIGURA 10 - Análise do DNA nucleolar em CsCl - Cálculo da densidade e reação de hibridização com rRNA.

Curva 1 - D.O.; Curva 2 - ρ ; Curva 3 - Hibridização

Observa-se, nitidamente, na Curva 1 da Figura 10, uma região de alta densidade que corresponde ao DNA satélite nucleolar, fato este, já observado por inúmeros pesquisadores (BUSCH & SMETANA, 1970; BIRNSTIEL, 1971).

O cálculo da densidade foi feito como descrito anteriormente e obtivemos para o satélite um valor de 1,728 e para a banda principal, 1,702 (Curva 2, da Figura 10).

O conteúdo de (GC), estimado pela relação linear de Schildkraut, foi de 69% para o satélite e 42% para a banda principal.

Quanto à hibridização, observa-se que houve reação apenas na região do satélite (Curva 3 da Figura 10).

Realizamos este experimento de hibridização do DNA nucleolar com o rRNA para facilitar a hibridização do RNA ribossômico, com o qual encontramos dificuldade na obtenção de atividade específica apreciável que nos possibilitasse detectar a reação de hibridização. Mesmo assim, os valores encontrados são relativamente baixos.

3.3.5.3. Hibridização das frações obtidas em gradiente de CsCl do DNA cromatínico com RNA nucleolar duplamente marcado

O RNA nucleolar foi obtido, como já descrevemos, a partir de animais submetidos à injeção intraperitoneal de fosfato de sódio ^{32}P (8 mCi/animal) por 3 horas e injeção endovenosa de metionina metil tritiada (100 $\mu\text{Ci/animal}$) por 30 minutos antes do sacrifício.

O RNA nucleolar foi submetido à reação de hibridização com as frações do DNA cromatínico nas temperaturas de 55°C e 68°C, favoráveis, respectivamente, à reação da fração mensageiro e ribossômico, conforme demonstrado na Figura 11.

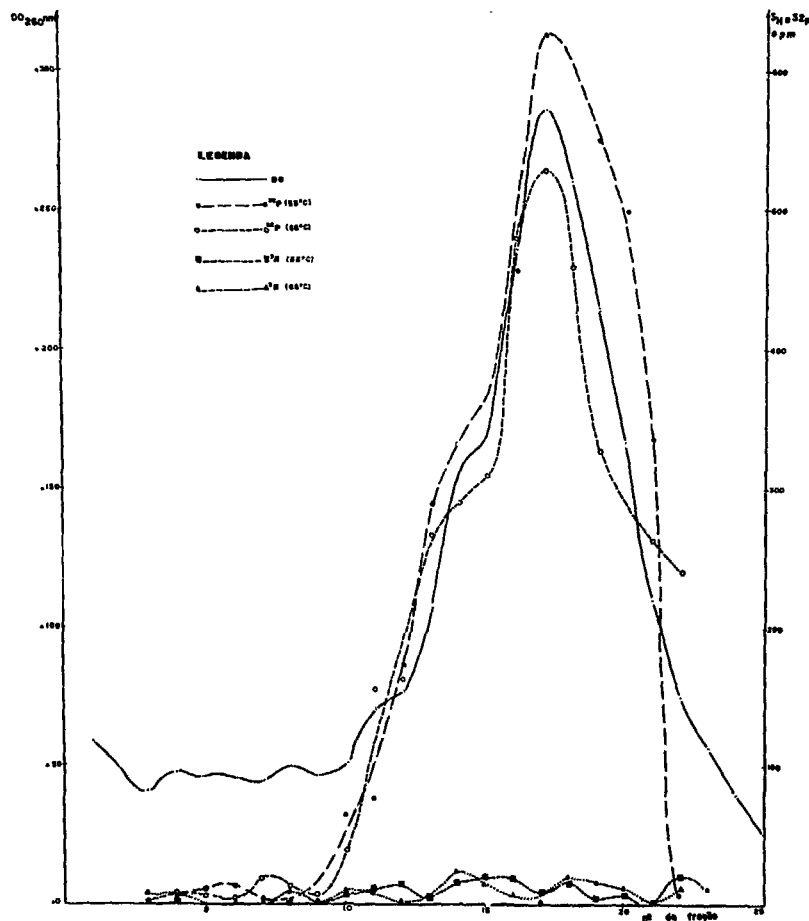


FIGURA 11 - Reação de hibridização do DNA cromatínico fracionado em CsCl com RNA nucleolar duplamente marcado a 55°C e 68°C.

Observa-se pela Figura 11 que a hibridização do RNA nucleolar duplamente marcado à temperatura de 55°C é bem mais eficiente que a de 68°C. Isto confirma os dados de que a molécula de mRNA, de baixa estrutura secundária, reage à temperatura inferior àquelas encontradas para moléculas de alto grau de estrutura secundária, como o RNA ribossômico.

Quanto à reação de hibridização da porção metil marcada, verificou-se que foi praticamente nula, mostrando que não ocorre formação de híbridos com rRNA quando se usa DNA de cromatina.

3.3.6. Comparação entre as reações de hibridização do RNA nucleolar e RNA nucleoplasmático com DNA cromatínico.

O DNA foi submetido à denaturação com álcali, conforme descrito em MÉTODOS 2.3.8.1. e imobilizado em filtros Millipore tipo GS, 13 mm, na concentração de 2,0 µg por filtro.

Os RNAs nucleolar e nucleoplasmático foram purificados a partir de nucléolos e nucleoplasma isolados conforme PENMAN (1968). Os animais destinados a sua obtenção foram submetidos ao tratamento com os dois isótopos radioativos, como descrito anteriormente.

A reação de hibridização, observada na Figura 12, se processou por 17 horas, a 55°C, em 1,5 ml de solução de 2 x SSC.

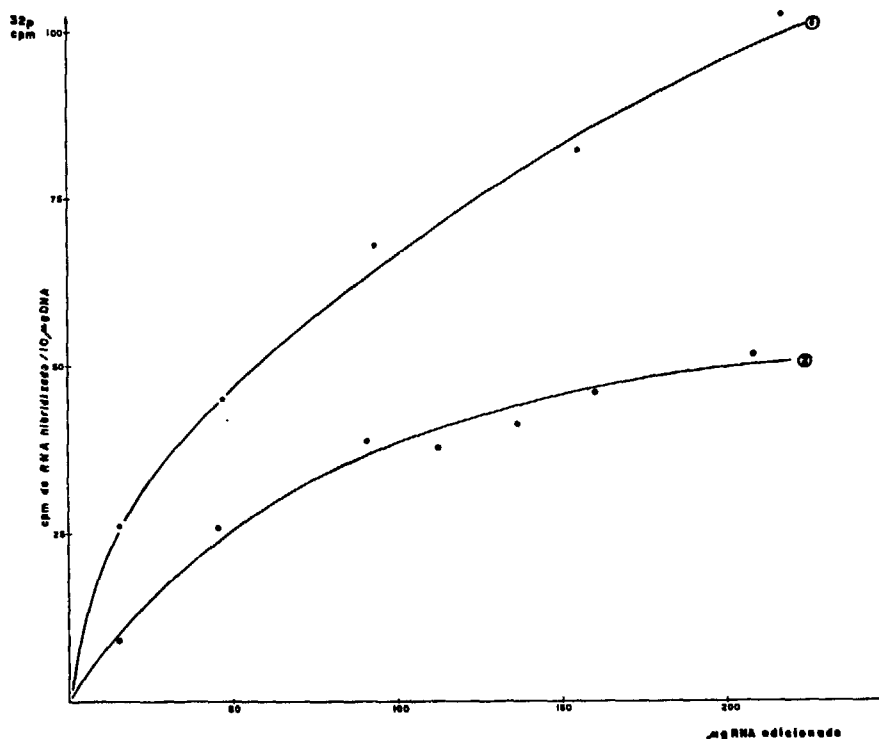


FIGURA 12 - Hibridização do DNA cromatínico com RNA nucleolar (Curva 1) e RNA nucleoplasmático (Curva 2).

Já foi provado experimentalmente que a fração 18S nucleolar apresenta estrutura física diferente da fração 18S nucleoplasmática (BRENTANI, KUBOTA & BRENTANI, 1972).

Observamos também que a fração 18S nucleolar se apresenta notadamente submetilada quando comparada com a nucleoplasmática.

Apesar de todas as evidências citadas foi conveniente demonstrar o comportamento desses dois compartimentos nucleares quando hibridizados com DNA cromatínico, experimento este muito importante também para salientar a inexistência de contaminação dos dois compartimentos citados.

A comparação da capacidade de hibridização dos RNAs referidos revela maior eficiência para o nucleolar (Figura 12), sugerindo que o material aí encontrado não pode resultar de simples contaminação da fração nucleolar por RNA nucleoplasmático.

3.3.7. Determinação do plateau de saturação e seu recíproco - Hibridização entre DNA de cromatina e RNA nucleolar

O DNA cromatínico empregado foi preparado de acordo com a descrição anterior e o RNA nucleolar foi obtido a partir de animais submetidos ao tratamento com fosfato de sódio ^{32}P (8 mCi/animal), por via intraperitoneal, 3 horas antes do sacrifício.

O DNA foi denaturado com álcali e colocado em filtros Millipore tipo GS, 13 mm na quantidade de 5 μg por

filtro. A reação de hibridização se processou a 55°C, por 17 horas, em um volume de 1,5 ml de 2 x SSC, com quantidades crescentes de RNA (Figura 13).

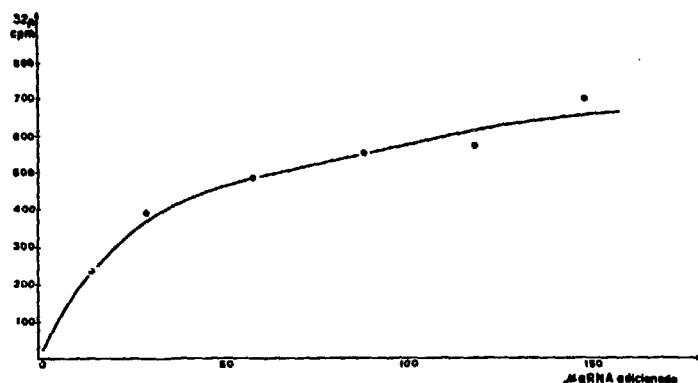


FIGURA 13 - Curva de saturação - DNA cromatínico e RNA nucleolar

Observa-se um aspecto satisfatório, pois aparentemente a reação de hibridização está próxima dos valores de saturação (Figura 13). Para demonstrar este fato, construímos um gráfico representativo dos recíprocos dos valores obtidos, para determinar o valor real da saturação.

Recíproco do plateau - Cálculo da saturação

Baseamo-nos aqui em trabalho de BISHOP(1969). Para uma boa compreensão da Figura 14, apresentamos a Table V mostrando os resultados obtidos na experiência acima e os cálculos efetuados com base neles.

TABELA V
Cálculo do valor de saturação

h	cpm RNA hibrdizado	r	h/r
10	230	0,085	118
20	380	0,14	141
40	480	0,16	250
60	550	0,20	300
80	570	0,21	380
100	700	0,27	400

onde: h - concentração do RNA marcado ($\mu\text{g/ml}$)

r - hibridização (μg de RNA hibridizado por μg de DNA)

a - atividade específica do RNA hibridizante (cpm/ μg) - em nosso experimento, $a = 2660$ cpm/ μg .

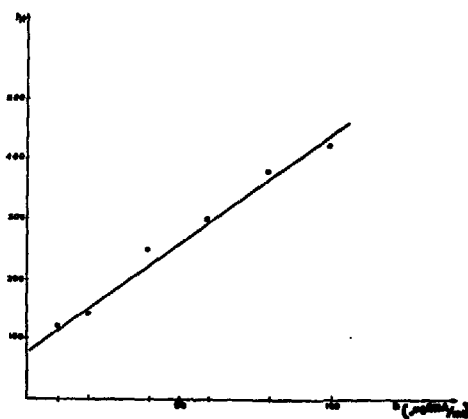


FIGURA 14 - Recíproco do Plateau de hibridização

Sabe-se que r_s representa o valor de saturação, que é a hibridização máxima obtida por extrapolação para a concentração infinita de RNA e é obtido como o recíproco da queda de h/r contra h .

No nosso experimento, a partir da Figura 14:

$$\text{tg } \alpha = 3,66$$

$$\text{Como } \text{tg } \alpha = \frac{1}{r_s} \rightarrow r_s = 0,27.$$

Isto significa que se atinge a saturação quando empregamos, aproximadamente, 100 microgramas por ml de RNA nucleolar para 5 microgramas de DNA cromatínico contidas num filtro.

3.3.8. Reação de hibridização do DNA cromatínico com as frações de RNA nucleolar duplamente marcado isoladas em cromatografia em BD-celulose

Como pudemos observar em 3.2., a análise do RNA nucleolar em cromatografia em coluna de BD-celulose revelou a existência de dois picos principais constituídos de espécies moleculares que eluem, respectivamente, com DMSO, e mistura de uréia e NH_4Cl . Este último apresenta um material com considerável grau de submetilação (Pico II).

Após a determinação da absorbância das frações coletadas, os picos referidos foram reunidos e destinados à hibridização com DNA de cromatina. Os resultados são observados na Tabela VI.

TABELA VI
Hibridização das frações do RNA nucleolar
obtidas em BD-celulose

RNA	ELUENTE	^3H	^{32}P
Pico I	DMSO	13	110
Pico II	Uréia-NH ₄ Cl	60	915

Observa-se que o material contido no pico II apresenta maior capacidade de hibridizar com DNA de cromatina, quando comparado ao eluído com DMSO que se sabe conter mRNA além do RNA ribossômico (SAUSER, 1969).

3.3.9. Reação de hibridização do DNA de cromatina com as frações do RNA nucleolar isoladas em gradiente de sacarose

O RNA nucleolar foi obtido a partir de animais submetidos ao tratamento com os dois isótopos radioativos já referidos. O DNA empregado foi de cromatina, preparado como já mencionamos, denaturado com álcali e imobi

lizado em filtros Millipore tipo GS, 25 mm, 50 microgramas por filtro.

A reação de hibridização se processou por 17 horas, a 55°C, num volume de 3 ml de 2 x SSC.

O RNA nucleolar foi separado nas suas quatro frações principais e os resultados obtidos de sua hibridização com o DNA de cromatina são mostrados na Tabela VII.

TABELA VII
Hibridização das frações do RNA nucleolar
obtidas em gradiente

COEFICIENTES DE SEDIMENTAÇÃO DA FRAÇÃO (S)	³² P(cpm)	³ H(cpm)
45	26	0
28	32	1
18	145	0
7	84	0

Pelos resultados apresentados acima observamos, como anteriormente, que não há reação de rRNA (que é metilado) com DNA de cromatina. Entre as frações isoladas a que mostrou maior reatividade é a de coeficiente de sedimentação 18S, fração esta já caracterizada por nós como mensageiro, no que se refere às suas propriedades físicas, químicas e biológicas.

3.3.10. Hibridização competitiva

Em todos os experimentos de hibridização competitiva empregamos DNA de cromatina preparado como já mencionamos, denaturado com álcali e imobilizado em filtros Millipore; tipo GS, 13 mm na quantidade de 2 microgramas por filtro.

Empregamos RNA nucleolar marcado com fosfato de sódio ^{32}P (injeção intraperitoneal de 8 mCi por animal 3 horas antes do sacrifício) sempre na quantidade de 150 μg por ponto da hibridização, valor este que constitui a saturação do DNA cromatínico, nas condições do experimento. Permitiu-se a reação dessa quantidade fixa de RNA nucleolar marcado com DNA de cromatina na presença de quantidades crescentes de RNA nucleolar não marcado, RNA ribossômico não marcado e RNA ribossômico pré-incubado, não marcado.

Os micrôssomos e ribossomos foram preparados conforme MÉTODOS 2.3.3.1. e 2.3.4.1. respectivamente, a pré-incubação dos ribossomos conforme 2.3.5. e os RNAs, extraídos e purificados como o RNA nucleolar, omitindo-se o tratamento com DNase que é, no caso, desnecessário.

A reação de hibridização se processou por 17 horas a 55°C , em 3 ml de 2 x SSC e é observada na Figura 15.

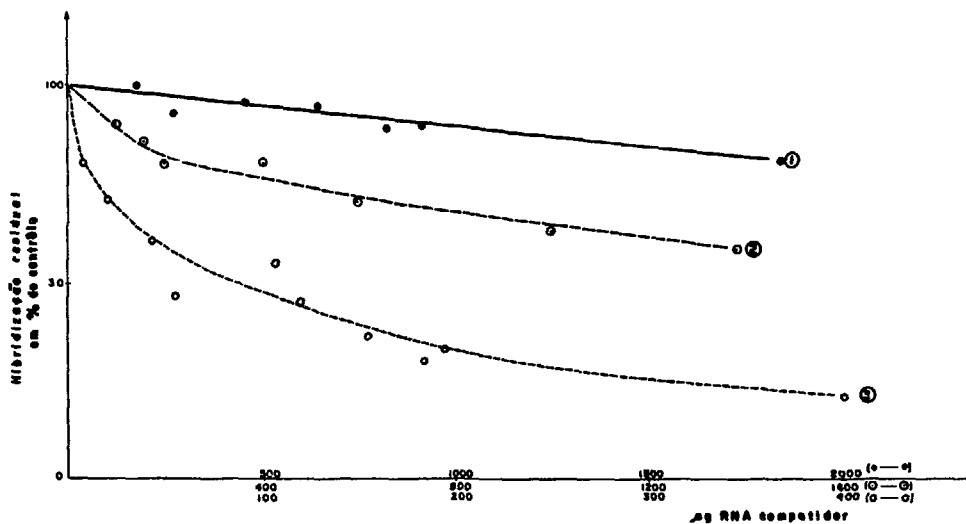


FIGURA 15 - Hibridização competitiva
Curva 1 - RNA nucleolar ^{32}P e RNA ribossômico pré-incubado
Curva 2 - RNA nucleolar ^{32}P e RNA microssômico
Curva 3 - RNA nucleolar ^{32}P e RNA nucleolar

A verificação da existência de competição entre RNA microssômico e RNA nucleolar marcado (Curva 2 da Figura 15), atingindo 56% daquela observada entre RNA nucleolar frio e marcado (Curva 3 da Figura 15), demonstra que ambas as espécies consideradas possuem sequências de nucleotídeos em comum, sugerindo um fluxo de RNA do nucléolo para o citoplasma, conforme postulado em nossa hipótese de trabalho. A fraca competição entre RNA nucleolar e RNA obtido a partir de ribossomos pré-incubado (Curva 1 da Figura 15), revela não se tratar de competição

-61-

entre precursores e RNAs estruturais do ribossomo, podendo-se explicá-la admitindo contaminação destas partículas por mRNA não removido completamente pela pré-incubação.

4. DISCUSSÃO

Embora alguns anos já tenham decorrido desde que a hibridização RNA-DNA foi descrita pela primeira vez (HALL & SPIEGELMAN, 1961; SCHILDKRAUT, MARMUR, FRESCO & DOTY, 1961), as bases cinéticas da reação ainda não estão perfeitamente esclarecidas. NYGAARD & HALL (1964) mostraram que a velocidade inicial da reação é determinada pelo produto das concentrações de RNA e DNA, isto sugere que a reação é proporcional à frequência de colisões das sequências complementares de RNA e DNA. Estágios posteriores da reação de hibridização, entretanto, parecem ser mais complexos (BISHOP, 1969a).

A formação de complexos estáveis de RNA com fitas denaturadas de DNA complementar (SCHILDKRAUT e col., 1961; HALL & SPIEGELMAN, 1961) fornece um ensaio biológico que relaciona o DNA com o produto imediato da expressão do gen. Na última década, a formação de híbridos RNA-DNA tem constituído parte importante de milhares de pesquisas e, provavelmente, nenhum outro ensaio tem sido tão empregado na biologia molecular.

Desde que a química de formação do híbrido DNA-RNA é semelhante àquela da renaturação DNA-DNA, a maioria dos seus aspectos básicos são comuns a esta reação.

A química de denaturação e reassociação do DNA é discutida em extensas revisões de MARMUR, ROWND & SCHILDKRAUT (1963) e, FELSENFELD & MILES (1967). Muitos químicos ainda acreditam que as maiores forças de sustentação de uma dupla fita de ácido nucleico são derivadas de energia livre de empilhamento cooperativo (MARMUR e col., 1963; CROTHERS & ZIMM, 1964). Pontes de hidrogênio, embora provavelmente importantes para a especificidade da reação, tomam a menor parte na estabilidade total da dupla hélice em solução. Em certos casos, alguns agentes químicos e físicos causam a separação das fitas ou denaturação do DNA. Os dois agentes mais usados são o calor e pH elevado. Entretanto, algumas moléculas orgânicas são também efetivas. Formamida, em particular, tem sido útil porque a altas concentrações causa denaturação à temperatura ambiente (BONNER e col., 1967; McCONAUGHY e col., 1969), sem cisão intra-fita. Embora a velocidade de quebra de ligações fosfodiéster ou glicosil no RNA seja relativamente vagarosa nas temperaturas comuns de reação (EIGNER e col., 1961) tal quebra tem sido observada com RNA ribossômico (BONNER e col., 1967; ATTARDI e col., 1965). Portanto, a formamida é útil em estudos onde se deseja a recuperação do híbrido com RNA intacto ou quando são requeridos tempos muito longos de hibridização.

Um processo experimental que é frequentemente empregado é a reação de quantidades constantes de DNA (geralmente imobilizado sobre filtros de membrana de nitrocelulose) com diferentes quantidades de RNA. O resultado é a curva de "saturação": incrementos iguais e sucessivos na concentração inicial de RNA produzem incrementos progressivamente menores na quantidade do híbrido RNA-DNA formado. Observa-se, frequentemente, que o recíproco da quantidade de híbrido RNA-DNA formado neste tipo de experimento é linearmente proporcional ao recíproco da concentração inicial de RNA (LAVALLÉ & HAUWER, 1968; BISHOP, 1969a; BISHOP, ROBERTSON, BURNS & MELLI, 1969). BISHOP e col. (1969) fizeram um estudo detalhado do emprego desta relação recíproca na análise dos dados de hibridização DNA-RNA.

Há dois modelos de hibridização DNA-RNA que fornecem relações recíprocas lineares: (1) O primeiro propõe que a velocidade de formação do híbrido depende inicialmente da concentração do RNA e em segundo lugar de concentração do DNA (BISHOP, 1969a); foi demonstrado que isto não é uma explicação suficiente. (2) Sob certas condições e, considerando que a velocidade de formação do híbrido é proporcional ao produto das concentrações de RNA e DNA, espera-se uma relação recíproca se for estabelecido um equilíbrio entre RNA livre e o híbrido DNA-RNA (LAVALLÉ

& HAUWER, 1968). Este modelo é muito atraente mas ainda não foi examinado criticamente.

Realizamos a curva de saturação do RNA nucleolar com DNA cromatínico (Figura 13) empregando quantidades fixas deste e crescentes do RNA, na qual alcançamos um platô da ordem de 150 μ g RNA/5 μ g DNA, valor este calculado através dos recíprocos, mostrando que para a obtenção dos híbridos há necessidade de muito mais material do que se fosse RNA ribossômico (STEELE, 1968).

É de suma importância salientar que o RNA nucleolar empregado não está contaminado por RNA da fração nucleoplasmática. Assim, como controle, isolamos RNA de nucleoplasma e observamos que a reação de hibridização desta fração é duas vezes menor que a do RNA nucleolar com o DNA (Figura 12), mostrando menor conteúdo em RNA capaz de hibridizar, na fração nucleoplasmática, quando comparada à nucleolar.

Muitos fatores afetam a reassociação do DNA denaturado. Em geral, a temperatura ótima da reassociação (T_r) está relacionada com a temperatura de fusão térmica (T_m) e é cerca de 25°C mais baixa (MARMUR, ROWND & SCHILDKRAUT, 1963; MARMUR & DOTY, 1962). A velocidade de renaturação depende de vários fatores incluindo concentração de sal, conteúdo de G + C e viscosidade do solvente (SUBIRANA & DOTY, 1971; THROWER & PEACOCKE, 1966).

A reação de hibridização está sujeita às mesmas variáveis.

Foi demonstrado (GILLESPIE, 1968; CHERRY, 1966) que a temperatura ótima de reassociação para mRNAs que, de fato, tem um teor de G + C baixo semelhante ao do DNA homólogo, é menor que para rRNAs.

A curva de temperatura de hibridização mostra que o nosso material apresenta um ótimo de reação em temperatura bem mais baixa do que a do rRNA, sugerindo mais uma vez o caráter informacional do RNA empregado (Figura 5).

WETMUR & DAVIDSON (1968) mostraram que a velocidade de reação era proporcional à raiz quadrada do comprimento da fita; fitas mais longas reagem mais rapidamente que as mais curtas. Além disso, a velocidade obedece a cinética de reação de segunda ordem (MARMUR, ROWND & SCHILDKRAUT, 1963; WETMUR & DAVIDSON, 1968); isto significa que a velocidade de reação é uma função da concentração dos reagentes. Segue-se que as fitas de um genoma complexo renaturarão mais vagarosamente que aquelas de um genoma menos complexo, desde que todos os outros parâmetros, tais como tamanho, concentração total, conteúdo de G + C, sejam os mesmos (BRITTEN & KOHNE, 1968).

A relação direta entre o produto da concentração de fitas complementares e a velocidade de reassociação sugeriu que a etapa inicial limitante na reassociação é um evento de nucleação causado pela colisão e formação de uns poucos pares corretos de bases (MARMUR, ROWND & SCHILDKRAUT, 1963; WETMUR & DAVIDSON, 1968). A subsequente reação de fechamento é presumivelmente rápida e resulta na derradeira formação do complexo estável. Entretanto, há um comprimento mínimo abaixo do qual a dupla hélice não é estável. Vários experimentos tem sido efetuados com polinucleotídios sintéticos (RICH, 1960; LIPSETT e col., 1961; LIPSETT, 1964; MICHELSON & MONNY, 1967; NIYOGI & THOMAS, 1967) ou com ácidos nucleicos naturais que tem sido aparados para tamanhos definidos (Mc CARTHY, 1967; NIYOGI & THOMAS, 1967) para estimar este comprimento mínimo. Estes estudos foram revistos por WALKER (1969) e THOMAS (1966) e parece que dependendo do conteúdo de G + C (MARMUR & DOTY, 1962; NYIOGI, 1969; MOORE & McCARTHY, 1968), o tamanho mínimo para um complexo estável é de 10 a 20 nucleotídios. A estabilidade térmica cresce abruptamente para comprimentos maiores de tal modo que, dependendo do conteúdo de G + C, a estabilidade de uma dupla hélice complementar de 25-50 nucleotídios se aproxima daquela de qualquer complexo muito maior (BRITTEN & KOHNE, 1968; LIPSETT, 1964; McCARTHY, 1967; NIYOGI, 1969).

A estabilidade térmica de uma dupla hélice de ácido nucleico é extremamente sensível à presença de pares de nucleotídios desemparelhados dentro das fitas polímeras (BAUTZ & BAUTZ, 1964; KOTAKA & BALDWIN, 1964; MCCARTHY & McCONAUGHY, 1968; UHLENBECK, HARRISON & DOTY, 1968). As estabilidades reduzidas de alguns complexos as sociados, de células de organismos superiores, resultam de extensos desemparelhamentos variáveis dentro da dupla hélice na formação de híbrido (MCCARTHY & McCONAUGHY, 1968; MCCARTHY, 1967; WALKER, 1969).

A estabilidade térmica do híbrido formado revelou, pelo valor do T_m obtido e pela forma da curva, uma especificidade altamente satisfatória na reação de hibridização estudada (Figura 6).

Para verificar a especificidade da reação de hibridização que estamos medindo, além de examinar a estabilidade dos híbridos formados, estudamos tal reação com DNAs heterólogos concluindo favoravelmente pela espe cificidade, por não haver reação neste caso (Tabela IV).

Uma característica importante do mRNA é a submetilação. Sabe-se que o nucléolo é sede de metilases (BIRNSTIEL, FLEISSNER & BOREK, 1963), enzimas que me tilam o RNA precursor ribossomal 45S e os seus produtos 35S, 28S e 18S. A única espécie molecular de RNA que não é metilada é o mRNA (SRINIVASAN & BOREK, 1964; MOORE, 1966).

Sabendo-se que o RNA nucleolar é uma mistura, era importante examinar o comportamento dos componentes na reação em estudo, embora trabalhos anteriores mostrassem que o 18S era responsável pelo papel de mensa - geiro (BRENTANI, 1969; BRENTANI, 1969a).

Assim, o rRNA 28S e seus precursores são metilados e o pico 18S é submetilado (Figura 2). O mesmo não se verifica para o componente 18S da fração nucleo - plasmática que se apresenta tão metilado quanto o rRNA 28S (Figura 3), tornando pouco provavel a contaminação do material nucleolar por este RNA. Aliás, idêntica conclusão se pôde tirar da comparação das propriedades físi-cas destes materiais (BRENTANI, KUBOTA & BRENTANI, 1972).

Quando se hibridiza as frações, obtidas através da sedimentação zonal (Tabela VII), do RNA nucleolar observa-se que o RNA que reage é o 18S, sugerindo mais uma vez que é mensageiro, firmado ainda pelas caracte - rísticas da reação de hibridização que são as mais pro - pícias para reagir mRNA.

Resultados concordantes com estes são os obtidos da caracterização do material em cromatografia em coluna de BD-celulose e da hibridização de suas frações com o DNA cromatínico (Figura 4 e Tabela VI, respectivemente). A BD-celulose é uma resina que se caracteriza

pela alta recuperação do material por ela eluído. Sua resolução parece depender (a pH 7,5) da interação preferencial de regiões de fitas simples dos ácidos nucleicos com os anéis aromáticos. Portanto, em princípio, uma diferença estrutural em um RNA pode permitir que ele seja separado dos outros RNAs celulares.

De fato, obtivemos duas frações, uma altamente submetilada (Pico II) e que, hibridizada com DNA de cromatina, mostra alta afinidade com os seus cistrons, comparável à da fração nucleolar 18S obtida do fracionamento em gradiente de sacarose (Tabela VII).

Podemos pois afirmar que a espécie molecular responsável pela reação de hibridização é a fração mensageiro do RNA nucleolar.

Pode-se usar a reação de hibridização para examinar a origem do material empregado. Hibridizando o RNA nucleolar com os DNAs nuclear total e cromatínico (Figuras 7 e 8, respectivamente) observamos a mesma cinética de reação, o que constitui evidência indireta de que os cistrons, envolvidos na reação, se encontram totalmente constituídos na fração cromatínica que é o DNA empregado na maior parte das experiências descritas.

A demonstração direta desta origem obtém-se hibridizando o RNA em questão com frações do DNA obtidas em gradiente de CsCl. Assim, DNA nucleolar (Figura 10)

e cromatínico (Figura 9), após terem sido fracionados em CsCl, foram submetidos à hibridização com RNA ribossômico marcado, usado aqui como controle. Encontramos reação no satélite do DNA nucleolar (Figura 10) como já foi mostrado em HeLa (ATTARDI, HUANG & KABAT, 1965), fumo (TEWARI & WILDMAN, 1966), bactérias (ATTARDI, HUANG & KABAT, 1965a; YANKOFKY & SPIEGELMAN, 1963) e em mamíferos (WALLACE & BIRNSTIEL, 1966; RITTOSA, ATWOOD, LINDSLEY & SPIEGELMAN, 1966; STEELE, 1968).

Observa-se neste experimento mais uma vez o efeito da temperatura na hibridização do mRNA. Como observamos na Figura 5, encontramos um ótimo para a reação do RNA nucleolar com DNA de cromatina ao redor de 55°C. Neste experimento hibridizamos também a 68°C. Observa-se uma queda sensível da reação quando há aumento da temperatura (Figura 11).

A reação de hibridização presta-se ainda para pesquisar o destino do material nucleolar.

Sabe-se que duas moléculas idênticas competirão entre si por um sítio de ligação comum se este for limitante. Este princípio simples tem sido usado frequentemente para encontrar similaridades entre duas populações de RNA competidoras por um DNA comum. A ocorrência de competição entre RNA nucleolar e citoplasmático

(Figura 15) se constitui em forte sugestão de que, efetivamente, o material encontrado no nucléolo migra em parte para o citoplasma.

O exame da cinética de renaturação revela a existência de diferentes classes de DNA, caracterizadas por sua velocidade de reassociação. Como é evidente, esta é função da concentração de tais sequências no genoma, ou seja, do número de cópias aí contido (BRITTEN & KOHNE, 1971). Foi assim proposto que existe uma fração de DNA em eucariotos que contém extensões de nucleotídios repetidas centenas ou milhares de vezes e que, provavelmente, pouco diferem umas das outras (BRITTEN & KOHNE, 1968; McCARTHY & McCONAUGHY, 1968; WARING & BRITTEN, 1966). BRITTEN & DAVIDSON propuseram um modelo que mostra a função para as sequências repetitivas no DNA. O modelo toma o sistema de operon original de JACOB & MONOD (1961) e amplifica-o para incluir operons múltiplos interatuantes (BRITTEN & DAVIDSON, 1969). A maioria do RNA que contém sequências repetitivas pode incluir RNA de renovação rápida que está confinado no núcleo; este RNA nuclear parece representar o grosso do RNA que está sendo sintetizado na célula (DARNELL, 1969; CHURCH & McCARTHY, 1967; ATTARDI, PARNAS, HWANG & ATTARDI, 1966). Tal RNA poderia tomar parte no papel regulatório, ligando-se a sítios específicos do operador sobre os cromossomos (HUANG

& HUANG, 1969). A presença de sequências repetidas aumenta a complexidade das reações DNA-DNA ou DNA-RNA.

A maioria das experiências DNA-RNA realizadas até agora só permitiu detectar hibridização com sequências de DNA reiterado, por motivos cinéticos. Isto é, nessas experiências os tempos de reação empregados e as concentrações de RNA e DNA não seriam suficientes para se observar hibridização de DNA não reiterado, ou seja, de sequências únicas (BISHOP, 1968; WALKER, 1968; MELLI & BISHOP, 1969).

De modo geral, admite-se porém que mRNA é feito sobre DNA não reiterado. Por exemplo, foi demonstrado que mRNA de hemoglobina é determinado por DNA não reiterado (BISHOP, PEMBERTON & BAGLIONI, 1972). Nas nossas condições experimentais, todavia, só se pode detectar hibridização com a fração reiterada do DNA.

Podemos imaginar duas explicações para esta discrepância:

(1) Que o RNA envolvido na reação não é mensageiro.

Esta hipótese não parece plausível porque o RNA 18S encontrado no nucléolo foi caracterizado como mensageiro através de suas propriedades: (a) químicas - submetilação (3.1.2. e 3.2.), razão de bases (BRENTANI,

1969; BRENTANI, 1969a), comportamento na cromatografia em BD-celulose (3.2.); (b) físicas - titulação potenciométrica e espectrofotométrica, cinética de reação com formaldeído e análise da denaturação térmica (BRENTANI, 1971; BRENTANI, 1972) e (c) biológicas - hibridização (Tabela VII) e estímulo da incorporação de aminoácidos "in vitro" (BRENTANI, 1969; BRENTANI, 1969a).

Em outro material biológico foi também demonstrado que o RNA de nucléolo é capaz de, quando adicionado a um sistema heterólogo de síntese de proteínas, determinar a síntese de uma proteína específica - o colágeno (BRENTANI, PERES, ODA & WANG, 1972).

(2) Que os mensageiros possam hibridizar com DNA reiterado.

Foi demonstrado que grande parte do RNA rapidamente marcado (presumivelmente mRNA), obtido de fígado em regeneração (CHURCH & MCCARTHY, 1967), hibridiza com DNA reiterado.

Uma demonstração mais convincente é dada pela hibridização com mRNA de histona (KEDES & BIRNSTIEL, 1971).

Parece, assim, válido admitir que do nucléolo de fígado de rato se pode extrair um RNA, caracterizado como mRNA, capaz de hibridizar com DNA reiterado e que apresenta origem cromatínica, destinando-se em parte ao citoplasma.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

5.1. O RNA nucleolar de fígado de rato foi fracionado por sedimentação zonal em componentes 45S, 28S, 18S e 10S.

5.2. O único componente a se apresentar submetilado foi o RNA 18S.

5.3. O único componente capaz de formar híbridos com DNA, nas condições experimentais, foi o RNA 18S.

5.4. A cromatografia do RNA nucleolar em coluna de BD-celulose permite a obtenção de duas frações; a segunda, eluída em condições referidas na literatura, como próprias para separação de mRNA, apresentou-se submetilada em relação à primeira e foi muito mais eficiente do que esta na reação de hibridização com DNA.

5.5. A hibridização do RNA nucleolar com DNA de frações subcelulares sugere uma origem cromatínica para este RNA.

5.6. A hibridização competitiva entre RNA nucleolar e microssomal sugere destino citoplasmático para pelo menos parte do RNA nucleolar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKINO, T. & AMANO, M. - Stimulation of amino acid incorporation into protein "in vitro" by various nuclear RNA fractions of the AH-130 hepatoma cells. *J. of Biochemistry*, 67:533, 1970.
2. ATTARDI, G.; HUANG, P.C. & KABAT, S. - Recognition of ribosomal RNA sites in DNA. The HeLa cell system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 54:185, 1965.
3. ATTARDI, G.; HUANG, P.C. & KABAT, S. - Recognition of ribosomal RNA sites in DNA. I. Analysis of the E. coli system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 53:1490, 1965a.
4. ATTARDI, G.; PARNAS, H.; HWANG, M.L. & ATTARDI, B.- Giant size rapidly labelled nuclear RNA and cytoplasmic messenger RNA in immature duck erythrocytes. *J. Mol. Biol.*, 20:145, 1966.
5. AVERY, O.T.; MacLEOD, C.M. & McCARTHY, Y.M. - Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exptl. Med.*, 79:137, 1944.

6. BACH, M.K. & JOHNSON, H.G. - Polysomes on a nuclear membrane fraction as intermediates in the transfer of ribonucleic acid from the nucleus to the cytoplasm. *Nature*, 209:893, 1966.
7. BAUTZ, E.K.F. & BAUTZ, F.A. - The influence of non-complementary bases on the stability of ordered polynucleotides. *Proc. Natl Acad. Sci., U.S.*, 53: 1476, 1964.
8. BELOZERSKY, A.N. & SPIRIN, S. - The nucleic acids of microorganisms. *The Nucleic Acids*. Ed. Chargaff & Davidson. Academic Press, Vol. III:181, 1960.
9. BIRNSTIEL, M.L.; FLEISSNER, E. & BOREK, E. - Nucleolus a center of RNA methylation. *Science*, 142: 1577, 1963.
10. BIRNSTIEL, M.L. & HYDE, B.B. - Protein synthesis by isolated pea nucleoli. *J. Cell. Biol.*, 18: 41, 1963.
11. BIRNSTIEL, M.L.; CHIPCHASE, M. & SPEIRS, J. - The ribosomal RNA cistrons. *Prog. in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol.*, Ed. J.N. Davidson & W.E. Cohn, N.Y. 11:351, 1971.

12. BISHOP, J.O. - Effect of deoxyribonucleic acid complexing in ribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization data. *Biochem. J.*, 108:53P, 1968.
13. BISHOP, J.O.; ROBERTSON, F.W.; BURNS, J.A. & MELLI, M. - Appendix: Methods for the analysis of deoxyribonucleic acid-ribonucleic acid hybridization data. *Biochem. J.*, 115:361, 1969.
14. BISHOP, J.O. - The effect of genetic complexity on the time-course of ribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization. *Biochem. J.*, 113,805, 1969a.
15. BISHOP, J.O.; PEMBERTON, R. & BAGLIONI, C. - Reiteration frequency of haemoglobin genes in the duck. *Nature New Biology*, 235:231, 1972.
16. BONNER, J.; KUNG, G. & BEKHOR, I. - A method for the hybridization of nucleic acid molecules at low temperature. *Biochemistry*, 6; 3650, 1967.
17. BORSOOK, H.; DEABY, C.L. & HAAGEN-SMITH, A.J.; KEIGHLEY, G. & LOWY, P.H. - Metabolisms of ¹⁴C-labelled glycine, L-histidine and L-lysine. *J. Biol. Chem.*, 187; 839, 1950.
18. BRENNER, S.; JACOB, J. & MESELSON, M. - An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, 190:576, 1961.

19. BRENTANI, M.; BRENTANI, R. & RAW, I. - Role of nucleolar ribonucleic acid on the incorporation of ribosomal amino acid. *Nature*, 201:1130, 1964.
20. BRENTANI, R. - Purificação e propriedades do RNA nucleolar de fígado de rato. Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1966.
21. BRENTANI, R.; BRENTANI, M. & RAW, I. - Messenger activity of purified RNA from rat liver nucleoli. *Nature*, 214:1122, 1967.
22. BRENTANI, R. - On the nucleolar role in protein synthesis. *Rev. Bras. de pesquisas Med. Biol.*, 1:25, 1968.
23. BRENTANI, R.; BRENTANI, M.; BOUQUET, M. & RAW, I. - Localização citoplasmática do ácido ribonucleico mensageiro. *Ciência e Cultura*, 20:431, 1968.
24. BRENTANI, R.; BRENTANI, M.; LEMOS, A.M. & RAW, I. - Especialização cistrônica ao nível dos compartimentos subnucleares. *Ciência e Cultura*, 20:431, 1968.
25. BRENTANI, R.; BRENTANI, M.; WROTCHINSKY, N. & RAW, I. - The effect of ribonuclease on rat-liver ribosomes. *Biochem. J.*, 106:263, 1968.

26. BRENTANI, R. - Caracterização de um biopolímero informacional de origem nucleolar. Tese de Livre-Docência apresentada à Cadeira de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São, Paulo, 1969.
27. BRENTANI, R. & BRENTANI, M. - Messenger RNA in the nucleolus. *Genetics*, suppl. 61:391, 1969a.
28. BRENTANI, M. - Estudos de fisiologia nucleolar: Caracterização biofísica dos ácidos ribonucleicos nucleares. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1971.
29. BRENTANI, M.; KUBOTA, M. & BRENTANI, R. - Physical studies on nucleolar RNA - *Biochem. J.*, 130:11, 1972.
30. BRENTANI, R.; PERES, C.; ODA, C. & WANG, L. - Messenger RNA processing in vertebrate cells, in "gene expression and its regulation". Eds. F.T. Kenney, B. Hamkalo, G. Favelukes & J.T. August. Plenum Press, no prelo, 1972.
31. BRITTEN, R.J. & ROBERTS, R.B. - High resolution density gradient sedimentation analysis. *Science*, 131:32, 1960.

32. BRITTEN, R.J. & KOHNE, D.E. - Repeated sequences in DNA. *Science*, 161:529, 1968.
33. BRITTEN, R.J. & DAVIDSON, E.H. - Gene regulation for higher cells: a theory. *Science*, 165; 349, 1969.
34. BRITTEN, R.J. & KOHNE, D.E. - Repetition of nucleotide sequences in chromosomal DNA. *Handbook of molecular Cytology*, Ed. A. Lima-De-Faria, pg. 21, 1971.
35. BROWN, D.D. & GURDON, J.B. - Absence of ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutant of Xenopus laevis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 51:139, 1964,
36. BUSCH, H. & SMETANA, K. - The nucleolus. Academic Press N.Y., pg. 175, 1970.
37. BYRNE, R.; LEVINE, J.G.; BLADEN, H.A. & NIRENBERG, M.W. - The "in vitro" formation of a DNA ribosome complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 52:140, 1964.
38. CHAUVEAU, J.; MOULLÉ, Y. & ROUILLER, C. - Isolation of pure and unaltered nuclei, morphology and chemical characterization. *Exptl. Cell Res.*, 11:317, 1956.
39. CHERRY, J.H. & HUYSTEE, R.B. - Hybridization of messenger RNA with DNA from plants. *Biochem. Biophys., Res. Comm.*, 23:835, 1966.

40. CHURCH, R.B. & McCARTHY, B.J. - RNA synthesis in re
generating and embryonic liver. I. The synthesis
of new species of RNA during regeneration of mouse
liver after partial hepatectomy. J. Mol. Biol., 24:
459, 1967.
41. CHURCH, R.B. & McCARTHY, B.J. - Ribonucleic acid
synthesis in regenerating and embryonic liver. I.
The synthesis of new species of RNA during regene
ration of mouse liver after partial hepatectomy.
J. Mol. Biol., 24:459, 1967.
42. CHURCH, R.B. & McCARTHY, B.J. - Changes in nuclear
and cytoplasmic RNA in regenerating mouse liver.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 58:1548, 1967.
43. CRESTFIELD, A.M.; SMITH, K.C. & ALLEN, F.W. - The
preparation and characterization of ribonucleic
acid from yeast. J. Biol. Chem., 216:185, 1955.
44. CROTHERS, D.M. & ZIMM, B.H. - Theory of the
melting of synthetic polynucleotides: Evaluation
of the stacking free energy. J. Mol. Biol., 9:1,
1964.
45. DARNELL, J.E., Jr. - Ribonucleic acids from animal
cells. Bacteriol. Rev., 32:262, 1969.

46. DESJARDINS, R. & BUSCH, H. - Effects of uracil mustard on the incorporation of l-lysine U-¹⁴C into acidic nucleolar proteins of the Walker tumor and liver. Texas Rep. Biol. Med., 22:444, 1964.
47. Di GIROLAMO, A.; HENSHAW, A.E. & HIATT, H. - Messenger ribonucleic acid in rat liver nuclei and cytoplasm. J. Mol. Biol., 8:479, 1964.
48. DISCHE, Z. & SCHWARZ, K. - Citado em Nucleic Acids. Ed. E. Chargaff, Academic Press N.Y., Vol. I:301, 1955.
49. EIGNER, J.; BOEDTKER, H. & MICHAELS, G. - Thermal degradation of nucleic acids. Biochim. Biophys. Acta, 51:165, 1961.
50. FELSENFELD, G. & MILES, H.T. - The physical and chemical properties of nucleic acids. Ann. Rev. Biochem. 36: Part II, 407, 1967.
51. FLAMM, W.G.; BOND, H.E. & BURR, H.E. - Density gradient centrifugation of deoxyribonucleic acid in a fixed angle rotor: a higher order of resolution. Biochim. Biophys. Acta, 129:310, 1966.
52. GEORGIEV, G.D. - The nucleus. Enzyme Cytology. Ed. D.B. Rodin. Academic Press N.Y., pg. 27, 1967.

53. GILLESPIE, D. - The formation and detection of DNA-RNA hybrids. Methods in Enzymology XII, Part B, Ed. L. Grossman & K. Moldave, pg. 641, 1968. 60.
54. GILLESPIE, D. & SPIEGELMAN, S. - A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA imobilized on a membrane. J. Mol. Biol., 12:829, 1965. 61.
55. GOODMAN, H.M. & RICH, A. - Formation of DNA-soluble RNA hybrid and its relation to the origin, evolution and degeneracy of soluble RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 48:2101, 1962. 62.
56. GREENBERG, H. & PENMAN, S. - Methylation and processing of ribosomal RNA in HeLa cells. J. Mol. Biol., 21:527, 1966. 63.
57. HALL, B.D. & SPIEGELMAN, S. - Sequence complementarity of T₂-DNA and T₂-specific RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 47:137, 1961. 63.
58. HARRIS, H. - The expression of genetic information: A study with hibrid animal cells. The Harvey Lectures - pg. 1 Academic Press, N.Y., 1971. 64.
59. HENSHAW, E.C. - Messenger RNA in rat liver polyribosomes: Evidence that it exists as ribonucleoprotein particles. J. Mol. Biol., 36:401, 1968. 65.

60. HIGASHI, K.; MATSUHISA, T.; KITAO, A. & SAKAMOTO, Y.-
Selective suppression of nucleolar RNA metabolism
in the absence of protein synthesis. *Biochim.
Biophys. Acta*, 106:388, 1968.
61. HIGGINS, J.M. & ANDERSON, R.M. - Experimental patho-
logy. I - Restoration of the liver of white rats
following partial surgical removal. *Arch. Path.*,
12:186, 1931.
62. HOLLAND, J.J.; BUCK, C.A. & MCCARTHY, B.J. - Stimu-
lation of protein synthesis "in vitro" by partially
degraded ribosomal ribonucleic acid. *Biochemistry*,
5:358, 1966.
63. HUANG, R.C.C. & HUANG, P.C. - Effect of protein-
bound RNA associated with chick embryo chromatin
on template specificity of the chromatin. *J. Mol.
Biol.*, 39:365, 1969.
64. HULTIN, T. - Incorporation "in vivo" of ¹⁵N-labelled
glycine into liver cell fractions of newly hatched
chicks. *Exptl. Cell Res.*, 1:376, 1950.
65. HUNT, J.A. & LAYCOCK, D.G. - Characterization of
messenger RNA for hemoglobin. *Cold Spring Harbor*,
34:579, 1969.

66. HYMER, W.C. & KUFF, G.L. - Isolation of nuclei from mammalian tissues through the use of triton X-100. J. Histochem. Cytochem., 12:359, 1964.
67. INFANTE, A.A. & NEMER, M. - Heterogeneous ribonucleo protein particles in the cytoplasm of sea urchin embryos. J. Mol. Biol., 32:543, 1968.
68. JACOB, F. & MONOD, J. - Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol., 3:318, 1961.
69. KEDES, L.H. & BIRNSTIEL, M.L. - Reiteration and clustering of DNA sequences complementary to histone messenger RNA. Nature New Biology, 230:165, 1971.
70. KIRBY, K.S. - Isolation and characterization of ribosomal ribonucleic acid. Biochem. J., 96:266, 1965.
71. KOTAKA, T. & BALDWIN, R.L. - Effects of nitrous acid on the dAT copolymer as a template for DNA polymerase. J. Mol. Biol., 9:323, 1964.
72. LAMFROM, H. & KNOFF, P.M. - Initiation of hemoglobin synthesis in cell-free systems. J. Mol. Biol., 9:558, 1964.
73. LAVALLE, R. & HAUWER, G. - Messenger RNA synthesis during amino acid starvation in Escherichia coli. J. Mol. Biol., 37:269, 1968.

74. LIPSETT, M.N. - Complex formation between polycytidylic acid and guanine oligonucleotides. J. Biol. Chem., 239:1256, 1964.
75. LIPSETT, M.N., HEPPEL, L.A. & BRADLEY, D.F. - Complex formation between oligonucleotides and polymers. J. Biol. Chem., 236:857, 1961.
76. MALT, R. & MILLER, W. - Increased efficiency in liquid scintillation counting: glass fiber discs and a new scintillator. Anal. Biochem., 18:388, 1967.
77. MCCARTHY, B.J. - The arrangement of base sequences in DNA. Bacteriol. Rev., 31:215, 1967.
78. MCCARTHY, B.J. & McCONAUGHY, B.L. - Related base sequences in the DNA of simple and complex organisms I. DNA/DNA duplex formation and the incidence of partially related base sequences in DNA. Biochem. Genet., 2:37, 1968.
79. McCONAUGHY, B.L.; LAVID, C.D. & MCCARTHY, B.J. - Nucleic acid reassociation in formamide. Biochemistry, 8:3289, 1969.
80. MARMUR, J. & DOTY, P. - Determination of base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J. Mol. Biol., 5:109, 1962.

81. MARMUR, J.; ROWND, R. & SCHILDKRAUT, C.L. - Denaturation and renaturation of deoxyribonucleic acid. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1:231, 1963.
82. MELLI, M. & BISHOP, J.O. - Hybridization between rat liver DNA and complementary RNA. *J. Mol. Biol.*, 40:117, 1969.
83. MICHELSON, A.M. & MONNY, C. - Polynucleotides. X. Oligonucleotides and their association with polynucleotides. *Biochim. Biophys. Acta*, 149:107, 1967.
84. MOORE, P.B. - Methylation of messenger RNA in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.*, 18:38, 1966.
85. MOORE, R.L. & MCCARTHY, B.J. - Variability in the base sequence of the reduplicated genes for ribosomal RNA in rabbit. *Biochem. Genet.*, 2:75, 1968.
86. MURAMATSU, M. - Comunicação Pessoal, 1967.
87. NAKAMURA, T. & PRESTAYKO, A.W. - Studies on nucleolar 4S to 6S ribonucleic acid of Novikoff hepatoma cells. *J. Biol. Chem.*, 243:1368, 1968.
88. NIYOGI, S.K. & THOMAS, C.A., Jr. - The specific association of ribonucleotides of known chains length with denatured DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 26:51, 1967.

89. NIYOGI, S.K. - The influence of chain length and base composition on the specific association of oligoribonucleotides with denatured deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 244:1576, 1969.
90. NYGAARD, A.P. & HALL, B.D. - Formation and properties of RNA-DNA complexes. *J. Mol. Biol.*, 9:125, 1964.
91. PENMAN, S.; SMITH, I. & HOLTZMAN, E. - Ribosomal RNA synthesis and processing in a particulate site in the HeLa cell nucleus. *Science*, 154:786, 1966.
92. PENMAN, S.; VESCO, C. & PENMAN, M. - Localization and kinetics of formation of nuclear heterodisperse RNA, cytoplasmic heterodisperse RNA, and polyribosome associated messenger RNA in HeLa cells. *J. Mol. Biol.*, 34:49, 1968.
93. PERRY, R.P. - On the nucleolar and nuclear dependence of cytoplasmic RNA synthesis in HeLa cells. *Exptl. Cell Res.*, 20:216, 1960.
94. PERRY, R.P.; HILL, A. & ERRERA, M. - The role of the nucleolus in RNA and protein synthesis. *Biochim. et Biophys. Acta*, 49:47, 1961.
95. PETERMANN, M.L. & HAMILTON, M.G. - A stabilizing factor for cytoplasmic ribonucleoprotein in particles. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1:496, 1955.

96. RENDI, R. & CAMPBELL, P.N. - The role of cytoplasmic ribonucleic acid in the incorporation of amino acids into microsomal proteins. *Biochem.J.*, 72:435, 1959.
97. RICH, A. - A hybrid helix containing both deoxyribose and ribose polynucleotides and its relation to the transfer of information between the nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 46:1044, 1960.
98. RITOSSA, F.M.; ATWOOD, K.C.; LINDSKEY, D.L. & SPIEGELMAN, S. - On the chromosomal distribution of DNA complementary to ribosomal and soluble RNA. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 23:449, 1966.
99. SALSER, W.; GESTELAND, R.F. & RICARD, B. - Characterization of lysozyme messenger and lysozyme synthesized in vitro. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, 34:771, 1969.
100. SAMSON, T.J. & BUSCH, H. - Template activity of nuclear RNA fractions of the Walker tumor. *Biochim. et Biophys. Acta*, 138:249, 1967.
101. SCHERRER, K. & DARNELL, J.E. - Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 7:486, 1962.
102. SCHERRER, K.; LATHAM, H. & DARNELL, J.E. - Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 49:240, 1963.

103. SCHILDKRAUT, C.L.; MARMUR, J.; FRESCO, J. & DOTY, P. - Formation and properties of polyribonucleotide-polydeoxyribonucleotide helical complexes. J. Biol. Chem., 236:PC2, 1961.
104. SCHILDKRAUT, C.L.; MARMUR, J. & DOTY, P. - Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. J. Mol. Biol., 4:443, 1962.
105. SEDAT, J.; LYON, A. & SINSCHMEIMER, R.L. - The purification of E. coli pulse labelled RNA by benzoylated DEAE-cellulose chromatography. J. Mol. Biol., 44:415, 1969.
106. SIEBERT, G. - Enzymology of the nucleus. Adv. Enzym., 27:239, 1965.
107. SINGER, M.E.; JONES, O.W. & NIRENBERG, M.W. - The effect of secondary structure on the template activity of polyribonucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 49:392, 1963.
108. SPIRIN, A.S. - Informosomes. European J. Biochem., 10:20, 1969.
109. SRINIVASAN, P.R. & BOREK, E. - Enzymatic alteration of nucleic acid structure. Science, 145:548, 1964.

110. STEELE, W.J.; OKAMURA, N. & BUSCH, H. - Effects of thioacetamide on the composition and biosynthesis nucleolar and nuclear RNA in rat liver. J. Biochem. Chem, 240:1742, 1965.
111. STEELE, W.J. - Localization of deoxyribonucleic acid complementary to ribosomal ribonucleic acid and preribosomal ribonucleic acid in the nucleolus of rat liver. J. Biol. Chem., 243: 3333, 1968.
112. SUBIRANA, J.A. & DOTY, P. - Citado em: Principles and practices of Nucleic Acid Hybridization by David E. Kennel. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., Ed. J.N. Davidson e W.E. Cohn, N.Y., 11: 260, 1971.
113. TEWARI, K.K. & WILDMAN, S.G. -Chloroplast DNA from tobacco leaves. Science, 153:1269, 1966.
114. THOMAS, C.A., Jr. - Recombination of DNA molecules. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 5:315, 1966.
115. THROWER, K.J. & PEACOCKE, A.R. - The kinetics of renaturation of DNA. Biochim. Biophys. Acta, 119:652, 1966.
116. UHLENBECK, O.; HARRISON, R. & DOTY, P. - "Molecular Associations in biology" (B. Pullman, ed.) pg. 107. Academic Press, N.Y., 1968.

117. VINOGRAD, J. & HEARST, J.E. - Equilibrium sedimentation of macromolecules and viruses in a density gradient. Fortschr. Chem. Org. Naturst (L. Zechmeister, ed.) Spring-Verlag, Viena, 372, 1962.
118. WALKER, P.M.B. - Heterogeneity in the renaturation rates of mammalian deoxyribonucleic acids and its consequence in hybridization experiments. Biochem. J., 108:29P, 1968.
119. WALKER, P.M.B. - The specificity of molecular hybridization in relation to studies on higher organisms. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 9:301, 1969.
120. WALLACE, H. & BIRNSTIEL, M.L. - Ribosomal cistrons and the nucleolar organizer. Biochim. Biophys. Acta, 114:296, 1966.
121. WARING, M. & BRITTEN, R.J. - Nucleotide sequence repetition: A rapidly reassociating fraction of mouse DNA. Science, 154:791, 1966.
122. WARNER, J.R.; RICH, A. & HALL, C.E. - Electron microscope studies of ribosomal clusters synthesizing hemoglobin. Science, 138:1399, 1962.
123. WETMUR, J.G. & DAVIDSON, N. - Kinetics of renaturation of DNA. J.Mol.Biol., 31:349, 1968.

124. YANKOFSKY, S.A. & SPIEGELMAN, S. - Distinct cistrons for the two ribosomal RNA components. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 49:538, 1963.
125. ZIMMERMAN, E.F. & HOLLER, B.W. - Methylation of 45S ribosomal RNA precursor in HeLa cells. J. Mol. Biol., 23:149, 1967.
126. ZIMMERMAN, E.F.; HACKNEY, J.; NELSON, P. & ARIAS, I.M. - Protein synthesis in isolated nuclei and nucleoli of HeLa cells. Biochemistry, 8, 2636, 1969.

