

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

MARIO AGENO, ELISABETTA DORE, CLARA FRONTALI

## Sulla natura dello pseudo-ibrido che si forma a temperatura ambiente da DNA denaturato ed RNA ribosomico

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.1, p. 3-10.*

Accademia Nazionale dei Lincei

[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1966\\_8\\_40\\_1\\_3\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_1_3_0)

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>



# RENDICONTI

DELLE SEDUTE

DELLA ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

---

**Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali**

---

*Seduta dell'8 gennaio 1966*

*Presiede il Presidente* BENIAMINO SEGRE

---

NOTE DI SOCI

---

**Biofisica.** — *Sulla natura dello pseudo-ibrido che si forma a temperatura ambiente da DNA denaturato ed RNA ribosomico* (\*). Nota di MARIO AGENO, ELISABETTA DORE e CLARA FRONTALI (\*\*), presentata (\*\*\*) dal Corrisp. M. AGENO.

SUMMARY. — *On the nature of the pseudo-hybrid formed, at room temperature, from denatured DNA and ribosomal RNA.* — It has been shown that, at room temperature, the biologically active strand of phage  $\alpha$ , active on *B. magatherium*, binds segments of ribosomal RNA from a non-infected host. In the light of this result, the biological significance of such pseudo-hybrids is discussed, and it is pointed out how, in the phage-host cell system, their existence can give rise to difficulties in interpreting those experiments in which an attempt is made to identify, in the infected bacterium, the phage messenger RNA by means of its capacity to bind the denatured DNA of the phage itself.

È stato dimostrato in precedenti lavori [1-5] che l'RNA ribosomico può in taluni casi formare col DNA denaturato uno pseudo-ibrido a temperatura ambiente. Le molecole di questo pseudo-ibrido sono costituite da una intera elica del DNA e da segmenti di RNA ribosomico che in totale complementano non più del 5 o 10% dell'intero genoma.

(\*) Questo lavoro è stato eseguito nel quadro dell'attività svolta dai Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità con l'appoggio del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

(\*\*) Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma.

(\*\*\*) Nella seduta dell'8 gennaio 1966.

La natura e il significato biologico di questo pseudo-ibrido non sono stati finora chiariti. A questo proposito, le ipotesi che si presentano alla mente come le più ovvie sono due. Si può pensare, in primo luogo, che la complementazione avvenga tra brevi sequenze di nucleotidi che casualmente si corrispondono su di una elica del DNA e sull'RNA ribosomico. O si può invece supporre che l'RNA ribosomico si fissi esattamente su quei cistroni che contengono l'informazione necessaria per la sua stessa sintesi.

Occorre subito dire che i risultati da noi precedentemente ottenuti, sembrano rendere entrambe queste ipotesi poco probabili. Sembra particolarmente significativo il fatto che lo pseudo-ibrido si formi spontaneamente con tanta facilità, a temperatura ambiente e in condizione da escludere qualunque azione enzimatica. Ciò significa non soltanto che la associazione in questione è esotermica, ma anche che l'energia di attivazione è al più dell'ordine della energia dell'agitazione termica. A temperatura ambiente ciascuna elica del DNA è generalmente raggomitolata per effetto di legami a idrogeno casuali tra punti diversi della stessa elica, legami che si formano nel mentre che si riporta la soluzione dalle condizioni chimico-fisiche di denaturazione a quelle ambientali (temperatura ambiente,  $pH = 7$ ). Si potrebbe allora supporre che l'RNA presente abbia la possibilità di complementarsi solo con alcuni tratti dell'elica esposti verso l'esterno del gomito e che quindi il nostro pseudo-ibrido non sia sostanzialmente diverso dai veri ibridi DNA-RNA che si ottengono a  $65^{\circ}C$  se non per essere incompleto, per cause di carattere esclusivamente geometrico. In questo caso, si dovrebbe pensare che ciò che si lega all'elica del DNA sia essenzialmente RNA messaggero, presente in piccola percentuale tra l'RNA ribosomico.

Questa interpretazione sembra tuttavia da scartarsi, per le seguenti ragioni. Noi abbiamo effettivamente trovato [1] che 5  $\gamma$  di RNA di termofilo sono sufficienti per trasformare in pseudo-ibrido tutte le eliche attive (cioè la metà del numero totale di eliche) presenti in 2  $\gamma$  di DNA denaturato. In queste condizioni tuttavia l'RNA impegnato nello pseudo-ibrido è solo circa un terzo del massimo possibile. Se questo massimo corrisponde, come si può valutare, a circa 5-10% della totale lunghezza del genoma, basterebbe per spiegare i nostri risultati la presenza nell'RNA ribosomico di meno dell'1% di RNA messaggero, cosa senz'altro possibile. Per quanto l'elica singola di DNA possa essere raggomitolata sembra tuttavia difficile ammettere che solo il 10% (al massimo) del genoma sia esposto verso l'esterno e quindi complementabile con RNA messaggero. Inoltre non sembra che i legami a idrogeno casuali possano dare all'elica di DNA denaturato una struttura rigidamente definita. Sembra molto probabile che si verifichino continuamente scambi tra tali legami isolati e quelli tra molecole d'acqua e viceversa, di modo che in pratica tutta l'elica va pensata in grado di esporsi via via alla possibilità di complementazione coll'RNA disponibile e non soltanto il 10% o meno di essa.

Sembra inoltre improbabile che una molecola di RNA messaggero possa formare legami con il tratto dell'elica del DNA lungo cui è avvenuta la sua sintesi, nelle condizioni in cui si forma il nostro pseudo-ibrido, cioè a tempe-

ratura ambiente e con una energia di attivazione dell'ordine delle energie di agitazione termica. In tal caso infatti, la molecola di RNA appena sintetizzata via via che fosse staccata dalla matrice dall'azione di un opportuno enzima, tenderebbe a legarsi nuovamente alla matrice stessa: occorrerebbe postulare l'esistenza di un meccanismo di trasporto capace di impegnare immediatamente l'estremità della molecola di RNA messaggero appena liberata dalla matrice e di impedirne così la ricomposizione con l'elica biologicamente attiva del DNA. In caso contrario la sintesi del messaggero risulterebbe bloccata. Non è certo facile immaginare un meccanismo di trasporto di questo tipo, sempre pronto a funzionare in qualunque punto dell'intero genoma.

Messa quindi da parte questa obiezione preliminare, ci siamo preoccupati di esaminare più da vicino le due ipotesi prima avanzate, circa la natura dello pseudo-ibrido da noi trovato. La prima di queste ipotesi, la complementazione tra sequenze casualmente corrispondenti tra elica di DNA ed RNA, è resa molto improbabile dal fatto da noi dimostrato, che lo pseudo-ibrido si forma solo su *una* delle due eliche del DNA di termofilo. Lo pseudo-ibrido è stato infatti separato dal DNA residuo su colonna cromatografica e in gradiente preparativo di CsCl e si è dimostrato che il DNA residuo, che è esattamente la metà del totale, non rinatura con se stesso e contiene quindi eliche tutte della stessa specie.

Abbiamo tuttavia sottoposto questa ipotesi ad un ulteriore controllo sperimentale servendoci del DNA del fago  $\alpha$  (attivo su *B. megatherium*) le cui due eliche hanno differenti densità in cloruro di cesio e sono quindi chiaramente distinguibili in gradiente di concentrazione di tale sostanza. Realizzando il gradiente in centrifuga analitica si osservano infatti due bande ben distinte corrispondenti ciascuna ad un'elica del DNA di  $\alpha$  denaturato [6-7].

L'esperienza è consistita nel tentativo di formare lo pseudo-ibrido tra il DNA di  $\alpha$  denaturato e l'RNA del batterio ospite, *B. megatherium*, non infettato con  $\alpha$ . La fig. 1 mostra il primo risultato ottenuto. La densità del nativo è 1,705 e quella delle due eliche del denaturato rispettivamente: 1,714 e 1,722 ( $\Delta\rho = 0,008$ ). In *a*) sono mostrate le bande del DNA denaturato, e in *b*) le bande che si osservano mescolando 2  $\gamma$  di DNA di  $\alpha$  denaturato al calore con 24  $\gamma$  di RNA di *B. megatherium*, parzialmente degradato (coefficiente di sedimentazione 5,4 s; corrispondente ad un peso molecolare medio dell'ordine di  $10^5$ ). L'analisi in componenti gaussiane dei grafici della densità ottica misurata sulle lastre della centrifuga analitica in assorbimento u. v., è stata fatta col metodo di Montecarlo. I relativi calcoli sono stati eseguiti con calcolatore elettronico 7040 dei nostri Laboratori di Fisica, usando il programma Orango [8] realizzato nei laboratori stessi. Come si vede, in ambedue le corse era presente una piccola percentuale di DNA non denaturato (picco sulla sinistra a  $\rho = 1,705$ ). Il picco relativo all'elica leggera ( $\rho = 1,714$ ) rimane inalterato, mentre il picco relativo all'elica più pesante si sposta da  $\rho = 1,723$  a  $\rho = 1,730$  e si allarga molto notevolmente. È presente un residuo dell'elica più pesante non ibridata, ed è da notare che il relativo picco ( $\rho = 1,720$ ) risulta più vicino del normale all'elica più leggera.

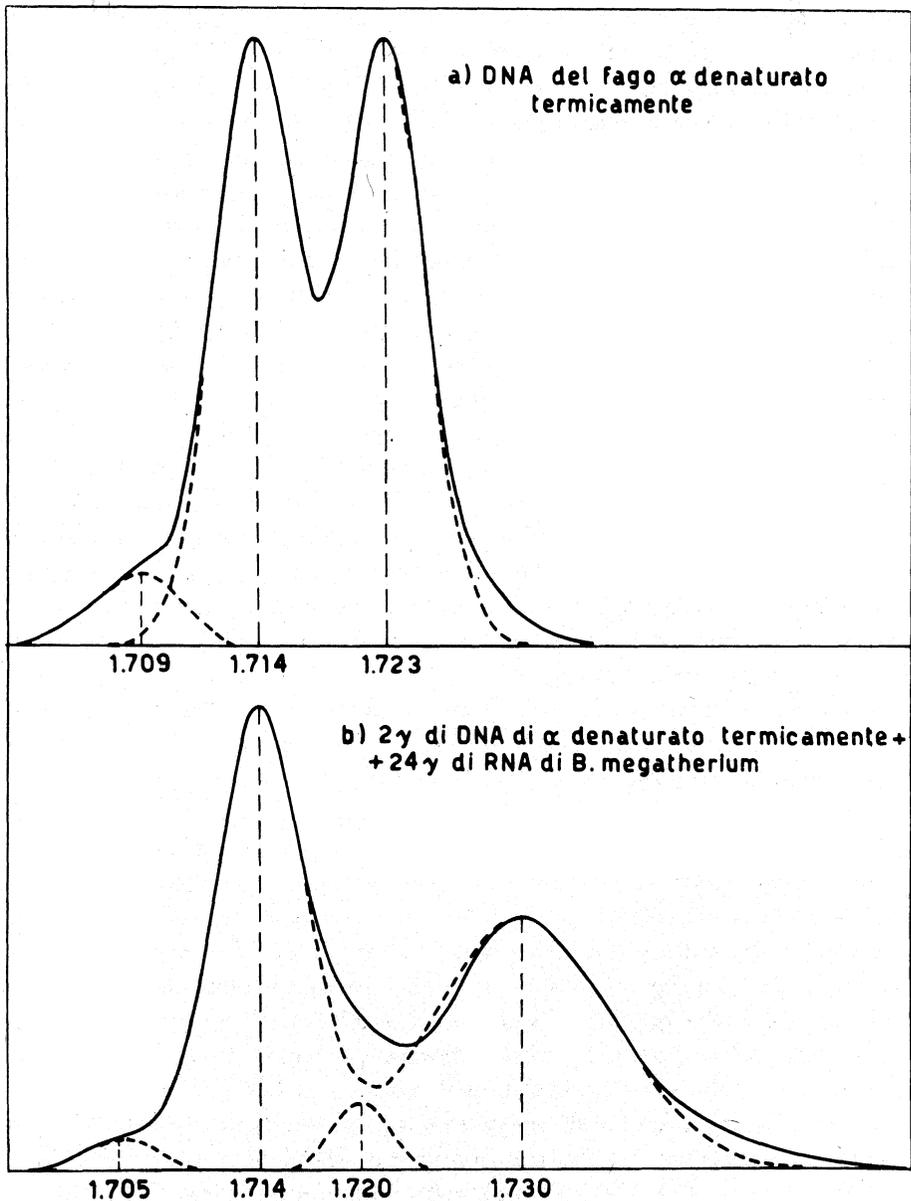


Fig. 1.

In prove successive, si è aumentata la percentuale di RNA, per vedere se il residuo non ibridato dell'elica pesante si riducesse a zero. La fig. 2 *a* mostra ciò che si osserva mescolando 2  $\gamma$  di DNA denaturato con 110  $\gamma$  di RNA. Come si vede, la banda dell'ibrido si è ulteriormente appesantita ( $\rho = 1,752$ ) e slargata, mentre è ancora presente un residuo di elica pesante non ibridata, la cui densità ( $\rho = 1,720$ ) si è anche qui avvicinata a quella dell'elica leggera. In fig. 2 *b* è mostrato l'effetto, sullo stesso preparato della

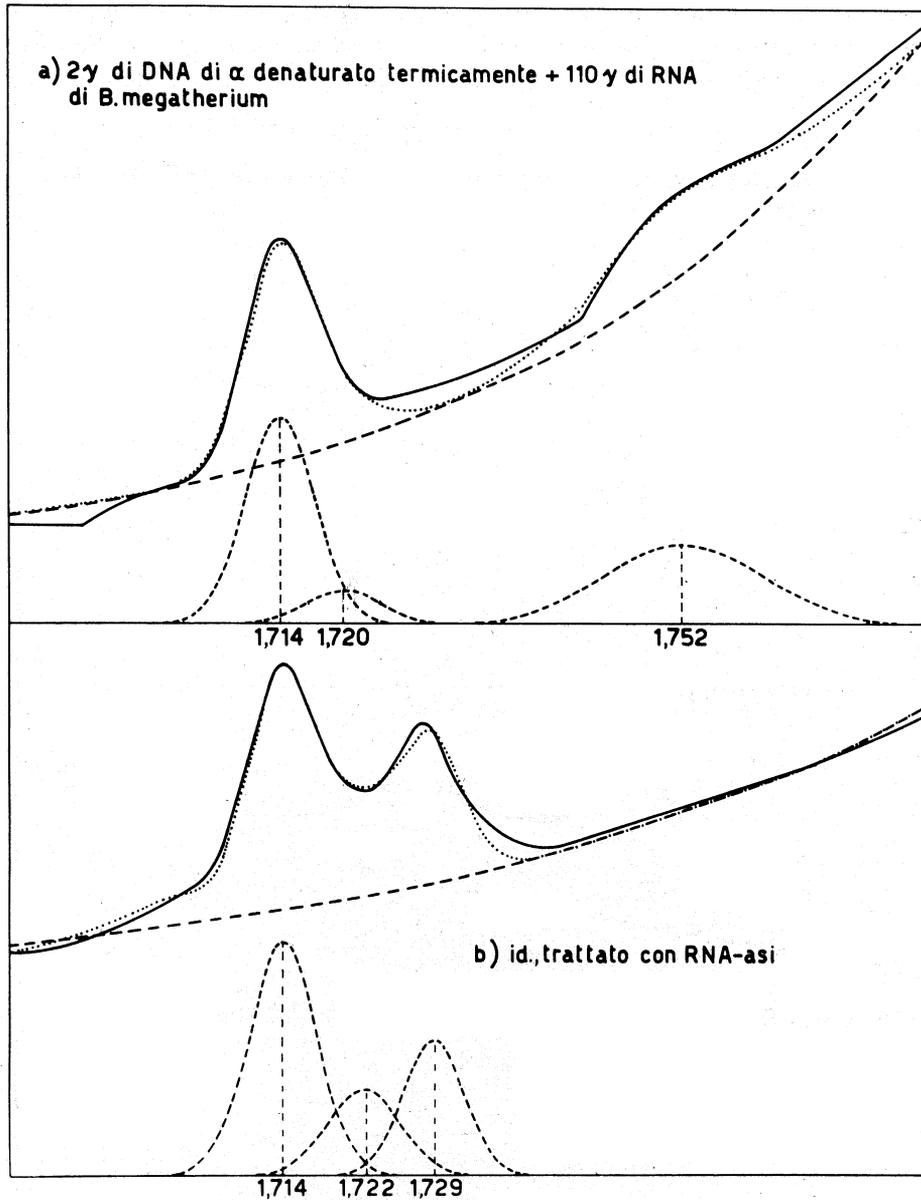


Fig. 2.

fig. 2 a, del trattamento con RNasi (1  $\gamma$ /ml per 90<sup>m</sup>). La banda dell'ibrido si è notevolmente ristretta, è ravvicinata alla densità ( $\rho = 1,722$ ) dell'elica pesante di  $\alpha$  ed è percentualmente aumentata la frazione non ibridata di quest'ultima elica.

Tutto ciò può facilmente spiegarsi tenendo conto del fatto che le eliche del DNA di  $\alpha$  denaturato sono certamente almeno in parte rotte. La frazione di eliche pesanti non ibridabili può essere allora formata semplicemente da

quei pezzi che causalmente non contengono i segmenti ibridabili del genoma. Il fatto che la densità media di tale frazione residua sia inferiore a quella media dell'elica pesante mostra che i segmenti del genoma ibridabili sono partico-

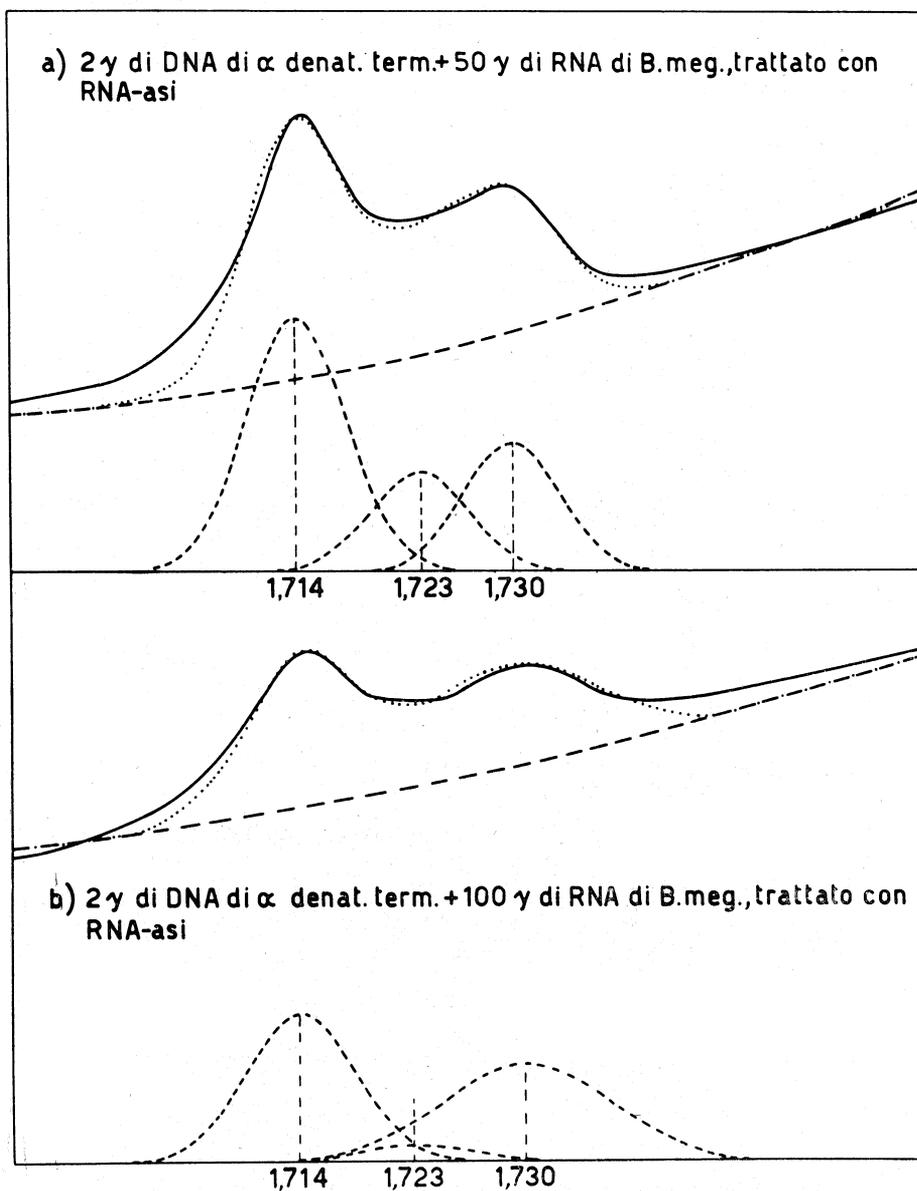


Fig. 3.

larmente ricchi in G + C. Ciò in accordo con le osservazioni di Szibalsky e coll. [5].

Come da noi già posto in rilievo [1-4] l'effetto della RNasi consiste molto probabilmente anche in questo caso nel demolire le code di RNA attaccate

allo pseudo-ibrido (in quanto contigue ai tratti di RNA ibridati), ma rimaste libere. L'andamento della frazione residua non ibridata e il lieve aumento della sua densità, mostrano che talora l'RNasi è in grado di decomporre completamente lo pseudo-ibrido.

La fig. 3 *a, b* mostra infine ciò che si ottiene mescolando con 2  $\gamma$  di DNA denaturato rispettivamente 50 e 100  $\gamma$  di RNA, trattando successivamente il preparato con RNasi (1  $\gamma$ /ml a 37° C per 30<sup>m</sup>) e successivamente dializzando per una notte contro SSC, allo scopo di eliminare i piccoli frammenti di RNA residui non sedimentabili.

I risultati precedenti permettono di giungere ad alcune conclusioni circa la natura dello pseudo-ibrido di cui ci stiamo occupando. Innanzi tutto, il fatto ora confermato in modo diretto, che soltanto un'elica (e precisamente quella biologicamente attiva nel caso di  $\alpha$  [9]), venga ibridata, mostra senza possibilità di dubbio che non si tratta di una complementarità casuale tra brevi sequenze di nucleotidi del DNA e dell'RNA ribosomico rispettivamente. La prima delle due ipotesi formulate all'inizio di questo lavoro può quindi senz'altro essere messa da parte. Resta dunque la seconda ipotesi: che l'RNA ribosomico si attacchi a quei tratti dell'elica del DNA biologicamente attiva, che contengono l'informazione necessaria per la sua stessa sintesi. Il fatto però che lo pseudo-ibrido si formi tra il DNA denaturato di un fago e l'RNA dell'ospite *non* infettato, rende tale ipotesi veramente molto improbabile. Non si capisce infatti perché il DNA del fago dovrebbe contenere l'informazione necessaria per la sintesi dell'RNA ribosomico dell'ospite, dato che il fago per riprodursi utilizza tutto l'apparato biochimico già presente in quest'ultimo e in particolare trova già pronti quei ribosomi che dovrebbe essere in grado di sintetizzare.

Sembra dunque di poter concludere che i siti del genoma ove spontaneamente si fissano i segmenti di RNA ribosomico, non hanno a che fare con i cistroni contenenti l'informazione necessaria per la sintesi dell'RNA ribosomico stesso. È da rilevare d'altra parte che per questi cistroni vale l'osservazione già fatta a proposito della possibilità di complementarsi tra ciascun cistrone del genoma e la corrispondente molecola di RNA messaggero: sembra veramente difficile ammettere che tale complementazione possa avvenire spontaneamente a temperatura ambiente.

Il problema del significato biologico degli pseudo-ibridi da noi studiati resta dunque ancora aperto. In note successive ci proponiamo di dar conto del risultato delle ricerche che abbiamo in corso su tale argomento.

Ci limitiamo per il momento a porre in rilievo come l'esistenza di pseudo-ibridi tra DNA fagico denaturato ed RNA dell'ospite *non* infettato possa creare delle difficoltà di interpretazione in quelle esperienze nelle quali si cerca di individuare, nel batterio infettato da un fago, l'RNA messaggero *del fago* mediante la sua capacità di complementarsi con il DNA denaturato del fago stesso [9-12].

## BIBLIOGRAFIA.

- [1] M. AGENO, M. ARCÀ, E. DORE, C. FRONTALI, L. FRONTALI e G. TECCE, Rapporti dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità, 15 dicembre 1964, ISS 64/47.
- [2] E. DORE, Rapporti dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità, 22 dicembre 1964, ISS 64/48.
- [3] M. AGENO, E. DORE, C. FRONTALI, M. ARCÀ, L. FRONTALI e G. TECCE, «Accad. Naz. dei Lincei, Rend.», VIII, 38, 325 (1965).
- [4] M. AGENO, E. DORE, C. FRONTALI, M. ARCÀ, L. FRONTALI e G. TECCE, «Journal of Molecular Biology», in corso di stampa.
- [5] E. OPARA KUBINSKA, H. KUBINSKY e W. SZIBALSKY, «Proc. Nat. Acad. Sci.», 52, 923 (1964).
- [6] A. AURISICCHIO, S. COPPO, P. DONINI, C. FRONTALI, F. GRAZIOSI e G. TOSCHI, Rapporti dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità (1961) ISS 61/33.
- [7] S. CORDES, M. T. EPSTEIN e J. MARMUR, «Nature», 191, 1097 (1961).
- [8] G. CORTELLESA, G. FARCHI, Rapporti dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità (1965), ISS 65/10.
- [9] G. P. TOCCHINI-VALENTINI, M. STODOLSKY, A. AURISICCHIO, M. SARNAT, F. GRAZIOSI, S. B. WEISS e E. P. GEIDUSHEK, «PNAS», 50, 935 (1963).
- [10] B. D. HALL, M. GREEN, A. P. NYGAARD e J. BOEZI, «Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology», 28, 201 (1963).
- [11] J. MARMUR, C. M. GREENSPON, E. POLEREK, F. M. KAHAN, J. LENINE e M. MANDEL, «Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology», 28, 191 (1963).
- [12] J. MARMUR e C. M. GREENSPAN, «Science», 142, 387 (1963).