

Differenziazione intratipica di virus polio per mezzo di test di diffusione in agar

VINCENZO SORRENTINO (*) e COLOMBA GIORGI

Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali, Istituto Superiore di Sanità

Riassunto. — I ceppi di poliovirus isolati possono essere tipizzati come ceppi vaccinali e selvaggi grazie a diverse tecniche. Nel presente lavoro noi descriviamo l'uso di antisieri intratipospecifici in test di diffusione in agar per la tipizzazione intratipica di poliovirus. La tecnica è precisa e riproducibile e in paragone con le altre metodiche più semplice e meno laboriosa.

Summary (*Intratypic serodifferentiation of poliovirus by immunodiffusion test*). — Isolates of poliovirus strains can be distinguished as Sabin-like and non Sabin-like strains using different methods. In the present report we describe the use of strain specific antisera in immunodiffusion tests for the intratypic serodifferentiation of poliovirus. The technique is effective and reproducible, can be performed more easily and is much more less time consuming than other methods.

INTRODUZIONE

Nonostante siano stati intensamente studiati per decenni, i poliovirus, agenti eziologici della malattia poliomielitica, costituiscono ancora oggi oggetto di interesse medico e biologico [1].

La malattia poliomielitica, nata come malattia endemica con bassa incidenza nella popolazione, andò aumentando la propria frequenza dalla fine del secolo scorso fino ad imporsi drasticamente all'attenzione con il manifestarsi di grandi epidemie [2], come viene evidenziato nella Tab. I ove sono riportati i casi di poliomielite registrati dal 1885 al 1915 negli Stati Uniti, paese che con gli altri Stati più economicamente progrediti dell'Europa Settentrionale, fu tra i più colpiti da queste iniziali manifestazioni epidemiche

(*) Ospite del Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali.

TABELLA 1

Casi di poliomielite dal 1885 al 1916 negli Stati Uniti [1,2]

ANNO	Casi riportati	ANNO	Casi riportati	ANNO	Casi riportati
1885	—	1895	—	1905	50
1886	—	1896	50	1906	100
1887	—	1897	50	1907	3.000
1888	—	1898	50	1908	1.000
1889	—	1899	100	1909	3.200
1890	—	1900	100	1910	7.000
1891	—	1901	100	1911	2.500
1892	—	1902	—	1912	4.000
1893	50	1903	—	1913	3.000
1894	150	1904	—	1914	2.000
				1915	2.200
				1916	29.000

della poliomielite. Questo quadro epidemiologico mantenutosi tale fino agli anni 50-60 è stato infine soppiantato dall'attuale in cui, nei paesi che attuano campagne di vaccinazione antipolio su larga scala, la malattia poliomielitica è stata virtualmente debellata grazie ai vaccini tipo Salk e tipo Sabin; ciò risulta evidente in Tab. 2 ove sono riportati i casi/anno di poliomielite in Italia dal 1946 al 1978, divisi in tre gruppi di anni:

- 1) periodo prevaccinale;
- 2) periodo della vaccinazione con vaccino inattivo tipo Salk;
- 3) periodo della vaccinazione con virus attenuato tipo Sabin.

L'interesse attuale [3] allo studio dei casi di poliomielite ancora osservati nasce dal fatto che, oltre i casi di poliomielite in soggetti non sottoposti a vaccinazione, altri sono relativi a soggetti vaccinati o che sono stati a contatto con individui vaccinati con virus attenuati.

I virus isolati da questi casi, quando sono studiati per le loro caratteristiche antigeniche presentano talora caratteri intermedi tra quelli caratteristici dei ceppi selvaggi e dei ceppi vaccinali, in altri casi caratteri simili a quelli dei ceppi selvaggi. Questi casi, assai spesso provocati dal virus di tipo 3, sembrano essere dovuti a fenomeni di riconversione dei ceppi attenuati da vaccinali a selvaggi.

TABELLA 2

Casi di polio paralitica denunciati in Italia dal 1946 al 1978*Casi segnalati*

PERIODO PRECEDENTE VACCINAZIONE ANTIPOLIO		PERIODO VACCINAZIONE CON VACCINO SALK		PERIODO VACCINAZIONE CON VACCINO SABIN	
Anno	N.	Anno	N.	Anno	N.
1946	2.869	1958	8.377	1964	841
1947	2.396	1959	4.110	1965	254
1948	2.576	1960	3.555	1966	147
1949	2.770	1961	3.415	1967	106
1950	2.034	1962	3.264	1968	87
1951	2.867	1963	2.830	1969	64
1952	2.708			1970	58
1953	5.010			1971	20
1954	3.404			1972	12
1955	2.723			1973	15
1956	3.485			1974	9
1957	4.451			1975	1
				1976	9
				1977	7
				1978	8

Si pone così attualmente il problema della ulteriore caratterizzazione dei tipi isolati dai casi di malattia poliomielitica rispetto ai ceppi vaccinali e a quelli selvaggi.

Per affrontare il problema della differenziazione intratipica dei poliovirus sono oggi disponibili varie tecniche [4].

Mentre negli anni Cinquanta l'unico test disponibile era il test sierologico, oggi con l'avvento e l'impiego in larga scala dei vaccini antipolio, lo studio dei diversi caratteri coinvolti nella mutazione da ceppi selvaggi a ceppi vaccinali ha permesso di conoscere diverse caratteristiche di questi virus impiegabili nella identificazione e differenziazione di questi ceppi.

Nella Tab. 3 sono elencati alcuni tra i più diffusi *markers* usati per la differenziazione intratipica dei virus polio. Di questi tests l'unico eseguito *in vivo* è il test di neurovirulenza in scimmia: esso è l'unico in grado di discriminare i ceppi virulenti dai ceppi attenuati; non è in grado, tuttavia, di discriminare ceppi virulenti vaccinoderivati da ceppi virulenti selvaggi.

TABELLA 3

Markers per la differenziazione intratipica dei poliovirus

<i>Interazione Virus-Cellula:</i>	
1) Capacità di replicarsi a 40°	ret/40 ^c
2) Capacità di replicarsi a 23°	ret/23 +
3) Dimensione delle placche	s
4) Resistenza al calore in AlCl ₃	a
5) Capacità di replicarsi nelle MS	m s
<i>Comportamento rispetto a sostanze inibitrici:</i>	
1) Sensibilità agli inibitori dell'agar a pH acido	d
2) Dipendenza dalla cistina	cy ^r
<i>Caratteristiche fisiche del virus:</i>	
1) Eluzione dal gel di Al (OH) ₃	Al (OH) ₃
2) Adsorbibilità su DEAE - cellulosa	e
<i>Antigenicità:</i>	
1) Variazioni immunologiche intratipiche	Mc Bride ecc.
<i>Patogenicità:</i>	
1) (Neurovirulenza)	(nv)

Gli altri tests *in vitro* non sono tutti sovrapponibili per la loro capacità di discriminare i ceppi vaccinali dai ceppi selvaggi. Di tutti questi *markers* i più riproducibili ed affidabili sono: il test RCT 40 [5], ed i tests antigenici di Mc Bride [6] e di Nakano [7].

Recentemente sono stati riportati in letteratura studi sulla differenziazione intratipica dei poliovirus per mezzo di tests di immunodiffusione con sieri specifici, sia contro i ceppi selvaggi che contro i ceppi vaccinali ottenuti mediante adsorbimento dei sieri contro il ceppo eterologo [8-11]. I primi studi sull'uso di un test di immunodiffusione per caratterizzare sottogruppi di virus sono dovuti a Rubin per la tipizzazione di alcuni sottogruppi di Arbovirus. Gli stessi principi sono stati quindi applicati da Chumacov [6] per la caratterizzazione intratipica dei poliovirus.

Tuttavia è a Van Wezel [12] che è dovuta la fine messa a punto di una tecnica in cui la preparazione degli antisieri è stata studiata con accuratezza al fine di ottenere reagenti altamente specifici per la caratterizzazione dei poliovirus selvaggi e dei poliovirus vaccinali.

MATERIALI E METODI

Cellule e virus

Cellule Vero, linea di epitelio renale di scimmia, sono state coltivate in « Parker medium 199 », addizionato del 5 % di siero di vitello fetale e subcoltivate a mezzo di passaggi settimanali.

Per la riproduzione dei virus, colture subconfluenti in bottiglie rotanti di vetro (area utile 470 cm²) venivano infettate ad una molteplicità di infezione di 0,1 PFU/cellula. Dopo un'ora l'inoculo veniva rimosso e venivano aggiunti 10 ml di terreno di coltura.

Dopo 16 ore dall'infezione i supernatanti delle colture venivano raccolti e dopo 3 cicli di congelamento e scongelamento, centrifugati ad 8.500 rpm in Sorvall rotore HB4 per 20 min a 4 °C per rimuovere i detriti cellulari.

Antisieri tipospecifici

Per la preparazione della sospensione virale da usarsi come antigene per l'immunizzazione degli animali il virus veniva concentrato per mezzo di centrifugazione in rotore Beckman SW 27 per 90 min a 4 °C. 0,1 ml del *pellet* di virus così ottenuto, venivano inoculati nei conigli con due iniezioni a distanza di una settimana l'una dall'altra.

Antisieri intratipo specifici

La tecnica di preparazione degli antisieri intratipo specifici, precedentemente descritta da Van Wezel [12] prevede la rimozione dalla sospensione virale dell'antigene C per mezzo di cromatografia di DEAE A50 [13], e quindi la concentrazione del materiale virale per mezzo di ultracentrifugazione come indicato in precedenza. L'ulteriore purificazione degli antisieri veniva effettuata per mezzo di adsorbimento degli antisieri sui ceppi virali eterologhi come descritto in Tab. 4.

TABELLA 4

Ceppi di poliovirus usati per la preparazione e l'adsorbimento dei sieri

POLIOVIRUS Tipo	CEPPO	
	Wild	Sabin
1	Mahoney	LSc2ab
2	MEF ₁ e 77728	P712CH2ab
3	Saukett	Leon 12a ₁ b

Concentrazione virus

Per la concentrazione della sospensione virale da usarsi come antigene nel test di immunodiffusione si è fatto ricorso all'ultracentrifugazione come descritto in precedenza, oppure alla precipitazione della sospensione virale ottenuta, dopo separazione dei detriti cellulari, per mezzo di glicole polietilenico (MW 6000) 8 %. Dopo l'aggiunta del glicole polietilenico la sospensione veniva conservata per 30 min a 4 °C, quindi il precipitato formatosi veniva raccolto per centrifugazione a 3.000 rpm. Il *pellet* così ottenuto veniva risospeso in un volume 1000/2000 volte minore di tampone Tris, pH 7,4 0,01 M EDTA [14]. Le sospensioni di virus ottenute sia per mezzo dell'ultracentrifugazione che per precipitazione con glicole polietilenico presentavano in media un titolo virale intorno a 10^{11} TCDC₅₀/ml. Le titolazioni venivano effettuate con la tecnica della determinazione del punto finale in piastrine per microtitolo.

Tests di immunodiffusione

I tests di immunodiffusione venivano effettuati in apposite piastrine per immunodiffusione preparate con 2 ml di agarosio 0,9 % in tampone Veronal più sodio azide 0,01 %. Su questi venivano ricavati per mezzo di uno stampo per immunodiffusione i pozzetti per gli antisieri e gli antigeni. 10 µl di antigene indiluito e 10 µl di antisiero diluito a seconda della potenza dell'antisiero venivano usati per ogni test. Le piastrine venivano conservate a temperatura ambiente in capsule di Petri umidificate con carta bibula e H₂O distillata. La lettura veniva effettuata dopo 36-48 h. In alcuni esperimenti, conservando le piastrine in termostato a 37 °C, la lettura poteva essere effettuata a 24 h.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Al fine di mettere a punto un test di immunodiffusione per la caratterizzazione intratipica del poliovirus abbiamo iniziato il nostro lavoro con il saggiare i sieri usati correntemente nel nostro laboratorio per il test di neutralizzazione in vitro del poliovirus con sieri tipospecifici. L'uso di tali sieri nel test di immunodiffusione ha presentato due tipi di problemi. Il primo problema [15] è dovuto alla presenza nei preparati di poliovirus di due antigeni distinti, l'antigene D e l'antigene C che è la forma degradata del primo (Fig. 1). L'uso di antisieri contenenti anticorpi contro i due antigeni, benché non interferisca con i tests di neutralizzazione *in vitro*, determina nel test di immunodiffusione la formazione di due bande di immunopreci-

pitato che possono determinare confusione nell'interpretazione dei risultati del test, come viene mostrato nella Fig. 2.

L'altro problema è legato alla difficoltà di ottenere antisieri specifici per i diversi tipi di poliovirus, dato che i sieri ottenuti da diversi animali mostrano attività crociata con altri tipi di virus oltre che con il tipo usato come antigene. Questa attività comune, che taluni sieri mostrano anche per poliovirus di tipo diverso (reazioni crociate tra poliovirus tipo 1 e tipo 3) è costante se l'antisiero viene usato contro il ceppo eterologo a quello usato per l'immunizzazione (ovvero l'antisiero contro un ceppo vaccinale testato contro il corrispondente poliovirus selvaggio, come si vede nella Fig. 3 in cui l'antisiero contro il virus vaccinale Sabin tipo 1 crossreagisce con il virus Mahoney, un virus tipo 1 selvaggio).

La base di queste reazioni crociate è dovuta per gran parte a determinanti antigenici comuni tra i diversi ceppi, mentre solo pochi siti risultano specifici per ciascun tipo di poliovirus.

Al fine quindi di mettere a punto un test specifico per la tipizzazione intratipica dei poliovirus abbiamo fatto ricorso all'uso di sieri resi specifici per mezzo della rimozione dell'attività comune ai ceppi eterologhi ed ottenuti inoculando agli animali sospensioni di poliovirus da cui l'antigene C era stato allontanato per mezzo di cromatografia su DEAE A-50, per evitare la formazione di una doppia banda di precipitazione. Questi sieri ottenuti da Van Wezel e da noi saggiati per la caratterizzazione intratipica con virus vaccinali e selvaggi non hanno mostrato alcuna affinità quando sono stati saggiati con i ceppi eterologhi, come è mostrato nella Fig. 4 in cui l'antisiero contro il virus vaccinale Sabin tipo 1 reagisce con il virus rispettivo e non con il virus Mahoney.

Dopo la caratterizzazione della specificità dei sieri contro i ceppi vaccinali e selvaggi di riferimento, abbiamo saggiato questi sieri per l'analisi intratipo specifica di ceppi di poliovirus isolati da casi di malattia poliomielitica nel nostro laboratorio negli ultimi anni, nonché di ceppi di poliovirus isolati da soggetti sani.

Per la tipizzazione di questi virus si è fatto ricorso ad uno schema di lavoro simile a quello consigliato dal Center for Disease Control, Atlanta (U.S.A.) per la tipizzazione dei virus influenzali. In questo schema il virus da tipizzare posto di fronte agli antisieri per la tipizzazione, ha accanto anche i virus di riferimento corrispondenti agli antisieri usati, di modo che la specificità della reazione tra antisiero e virus campione, sia confermata dalla banda di identificazione che questi due formano con quella che lo stesso antisiero forma con il rispettivo virus di controllo.

I virus tipizzati per mezzo di tests di immunodiffusione con sieri intratipo specifici sono elencati nella Tab. 5, ove accanto sono indicati i risultati della caratterizzazione rispetto ai caratteri vaccinale e selvaggio.

TABELLA 5

Poliovirus isolati sul campo e testati per la tipizzazione intratipica con l'uso dell'immunodiffusione con sieri adsorbiti con il ceppo eterologo

VIRUS	TIPO	Tipizzazione con antisieri intratipospecifici	
		Sabin	Wild
1A3	3		+
2B1	1		+
3C3	3		+
4D1	1	+	
5E3	3	+	
6F3	3		+
7G3	3		+
8H3	3	+	
9I1	1		+

Come si è visto, pertanto, con l'uso di tre tipi di poliovirus attenuati di Sabin, con l'uso di tre tipi di ceppi selvaggi (Tab. 4), nonché con l'esame di alcuni ceppi virali isolati da soggetti sani e da ammalati di poliomielite (Tab. 5), il test di immunodiffusione, eseguito con antisieri specifici per i caratteri vaccinali e selvaggi dei poliovirus permette la caratterizzazione di questi senza che si venga a determinare sovrapposizione di risultati con gli altri virus.

Pertanto, data la sensibilità mostrata e la semplicità di esecuzione dei tests di immunodiffusione, la tecnica descritta appare prestarsi per la tipizzazione dei virus polio tuttora isolati da casi di malattia, nonché per seguire l'evoluzione dei poliovirus nella popolazione, assai più delle tecniche convenzionali [5-7] di tipizzazione intratipica dei poliovirus che richiedono tutte maggior tempo e maggior impiego di personale.

Ricevuto il 2 marzo 1981.

Accettato il 6 marzo 1981.

BIBLIOGRAFIA

1. PAUL, J. R. 1971. *A History of Poliomyelitis*. Yale University Press.
2. NATHANSON, N. & MARTIN, J. R. 1979. The epidemiology of poliomyelitis. *Am. J. Epidemiol.* **110**: 672-692.
3. COSSART, Y. 1977. Evolution of poliovirus. *Brit. Med. J.* **15**: 1621-1623.

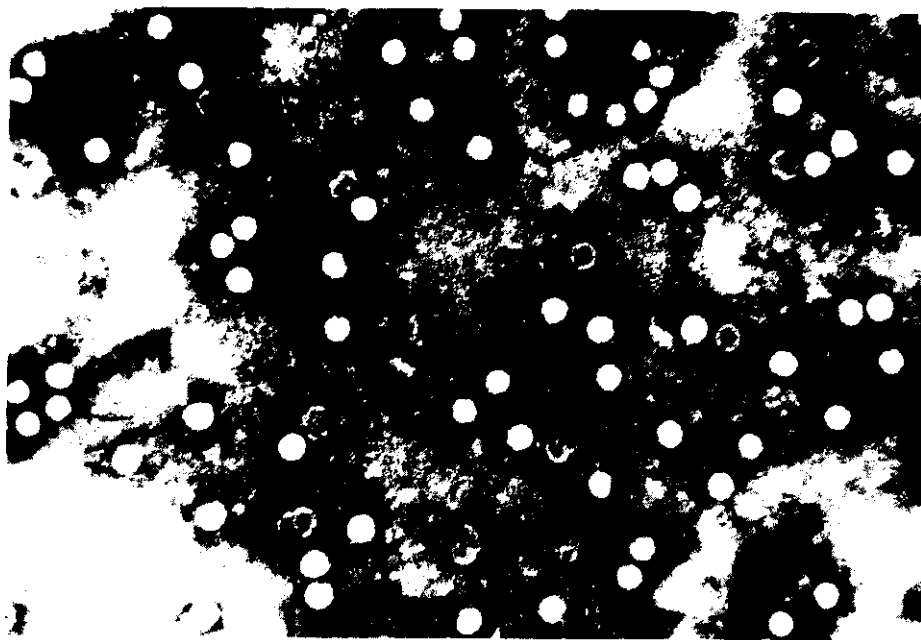


Fig. 1. — Preparato di poliovirus Sabin tipo 2. Sono visibili virioni integri, antigene D, e forme degradate di questi, antigene C.

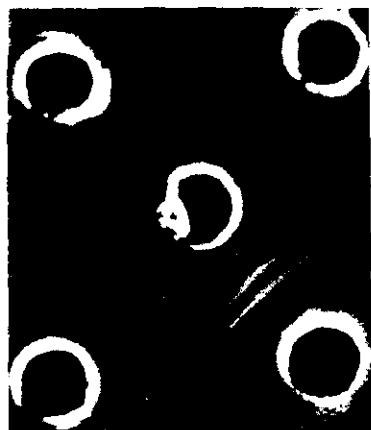


Fig. 2. Formazione di una doppia banda di immunoprecipitato dovuta alla presenza dei due antigeni C e D.
(A) antisiero anti Sabin tipo 3.
(B) poliovirus tipo 3 di Sabin.

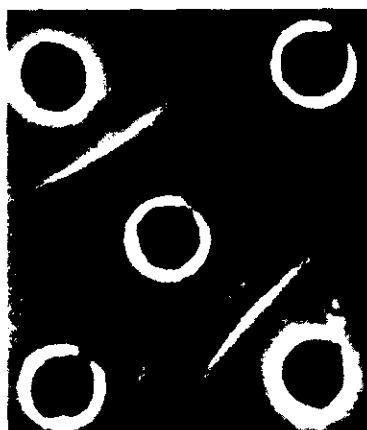


Fig. 3. Reazione crociata di un antisiero tipospecifico anti Sabin 1 (A) che crossreagisce con il virus tipo 1 Mahoney (B), oltre che con il rispettivo poliovirus tipo 1 di Sabin (C).

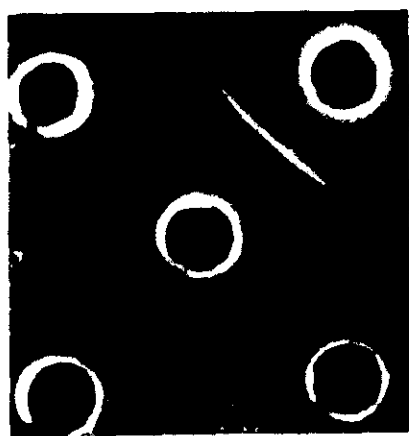


Fig. 4. Antisiero intratipospecifico anti Sabin 1 (A), poliovirus tipo 1 di Sabin (B) e (C) poliovirus Mahoney.

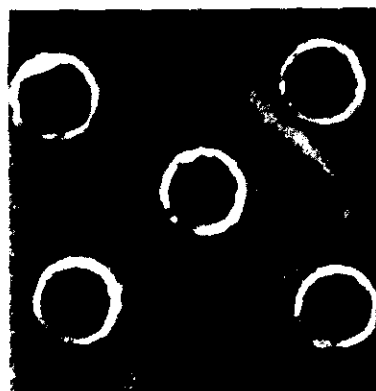


Fig. 5. Caratterizzazione intratipica di un ceppo isolato (5E3), tipizzato con simil vaccinale.
(A) antisiero anti Sabin tipo 3.
(B) ceppo tipizzato (5E3).
(C) poliovirus tipo 3 di Sabin di riferimento.

4. NAKANO, J. 1978. Parameter for differentiation of vaccine derived and wild poliovirus strains. *Progr. Med. Virol.* **24**: 178-206.
5. KANTOCH, M. & NAKANO, J. 1974. Studies on the characteristics of poliovirus type 3. *Acta Virol. Prague*, **18**: 121-128.
6. MCBRIDE, J. H. 1959. Antigenic analysis of poliovirus by kinetic studies of serum neutralization. *Virology*, **7**: 45-58.
7. NAKANO, J. H. & GELFAND, H. M. 1962. The use of a modified Wecker technique for differentiation of type 1 poliovirus. *Am. J. Hyg.* **75**: 363-376.
8. RUBIN, H. 1971. A. G. D. P. test for viruses. Trans. URSS AMS Inst. of Poliomyelitis XIV: 143 Moscow.
9. CHUMAKOV, M. P. 1971. A method for intratypic differentiation of poliovirus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **46**: 61-65.
10. RUBIN, H. 1974. A method for intratypic differentiation of poliovirus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **46**: 66-70.
11. PERVIKA, J. U. V. 1978. Intratypic serodifferentiation of poliovirus circulating in Malay. *Vop. Virusol.* **4**: 470-475.
12. VAN WEZEL, A. L., HAZENDOAK, 1979. Intratypic serodifferentiation by strain specific antisera. *Intervirology*, **11**: 2-8.
13. VAN WEZEL, A. L. 1974. New trends in the preparation of cell substrates for the production of virus vaccine. *Progr. Immunobiol. Stand.* **5**: 187-192.
14. SAVINSKAYA, S. S., SHEKOYAN, L. A. & SHIRMANN, G. A. 1979. Demonstration of antigenic differences between type 1 poliovirus by agar precipitation test. *Acta Virol.* **23**: 183-188.
15. RAMHORST, J. D. 1966. C and D antigen of poliovirus. *Immunology*, **11**: 297-311.

Difference spectrophotometry as a probe for small changes in nucleic acid structure

MAURO BELLI (a) (*), FILOMENA MAZZEI (a) and GIUSEPPE ONORI (b) (*)

(a) *Laboratorio delle Radiazioni, Istituto Superiore di Sanità*

(b) *Istituto di Fisica, Università di Perugia*

(*) and *Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Sezione Sanità*

INTRODUCTION

The spectroscopic properties of nucleic acids in the ultraviolet region are mainly governed by the electronic properties of the bases, so that the UV spectroscopy is in principle a powerful tool for investigating a number of problems in which the electronic properties of the bases are involved.

In recent years many efforts have been made to characterize the absorption properties of nucleic acids. This fact, besides developing high sensitivity spectrophotometers, has expanded the field of application of the absorption spectrophotometry. This paper, after a section devoted to the principles of UV absorption spectroscopy of nucleic acids, briefly reviews the work done at the Istituto Superiore di Sanità using a very sensitive differential UV spectrophotometric technique. A number of examples will be presented, concerning quite different kinds of problems, all characterized by modifications in the electronic properties of the bases, such as the effects of UV irradiation and the interactions of nucleic acids with proteins and ions.

UV ABSORPTION OF NUCLEIC ACIDS AND THEIR COMPONENTS

The UV optical properties of bases are related to their electronic wave functions and energies. There are not many experimental data on the charge distribution and energy levels in nucleic acid bases, so that reference is often made to calculations [1].

Abbreviations used: UV, ultraviolet; DNA, deoxyribonucleic acid; RNA, ribonucleic acid; rRNA, ribosomal RNA; tRNA, transfer RNA; A, adenine; T, thymine; U, uracil; G, guanine; C, cytosine; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; Tris, tris (hydroxymethyl) aminomethane.

The electronic states can be described in terms of molecular orbitals and for our purpose it will be sufficient to consider the n (non-bonding), the σ and π (bonding) besides the σ^* and π^* (anti-bonding) orbitals. A schematic diagram showing the energy levels of these five classes of orbitals is shown in Fig. 1.

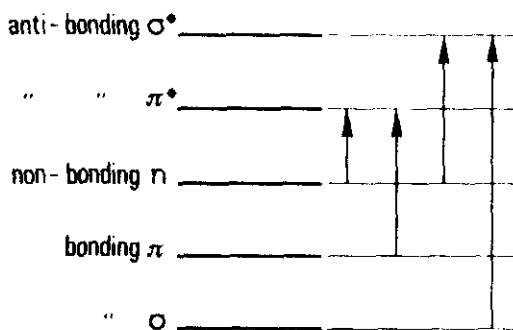


Fig. 1. — Schematic sequence of energy levels.

The $\pi \rightarrow \pi^*$ and $n \rightarrow \pi^*$ transitions in which the « aromatic » electrons are involved are responsible for the absorption at wavelengths higher than about 180 nm, while at shorter wavelengths the spectrum is dominated by the $\sigma \rightarrow \sigma^*$ transitions [2, 3].

As the bases are polyatomic systems, an electronic transition is accompanied by vibrational (and rotational) transitions, this leading to the appearance of a band spectrum.

Fig. 2 shows the UV absorption spectra for the five principal bases at pH near 7, where they are uncharged [4]. The spectra of the nucleosides or deoxynucleosides and their phosphate derivatives are very similar to those of the corresponding bases. A change in the pH which causes the ionization of the base results in a marked change in the spectrum.

The UV absorption of nucleic acids, although essentially due to the bases, is not given simply by the sum of their absorption because of the base-base interactions (stacking interactions).

It is well known for instance that the absorption at 260 nm of double-stranded DNA and RNA is less than the sum of their components. This phenomenon (hypochromism) has been described in terms of interaction between transition dipoles of neighboring bases both with classical and quantum mechanical approaches (see ref. [5] for a review). The theory developed by Tinoco [6, 7] uses a quantum mechanical exciton model to relate the hypochromism to the absorption properties of the monomers. This approach predicts a dependence of the hypochromism upon the base composition and helical length, but a more detailed computation of it would

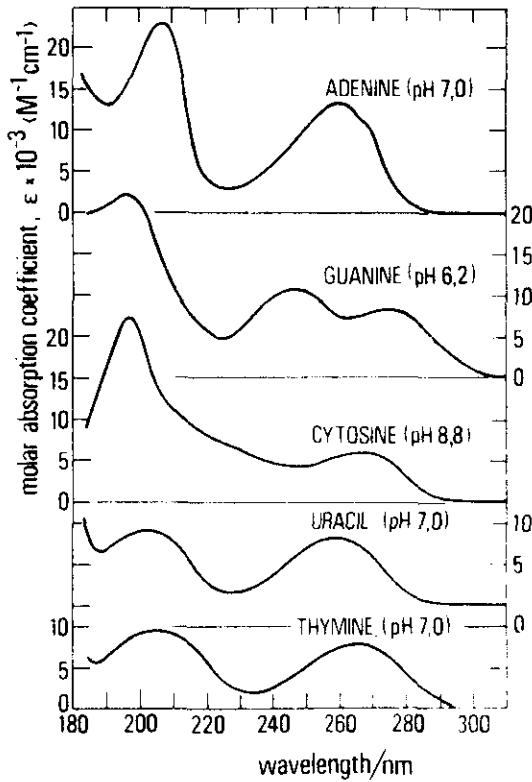


Fig. 2. -- UV absorption spectra of the five principal bases in neutral solution. (Adapted from ref. [4]).

require a complete knowledge of the electronic transitions of the nucleotides and their sequence along the polymer. An experimental approach is given by the study of spectral changes following the disruption of base pairing in natural and synthetic polynucleotides. When the double strands are melted by high temperatures, their spectra approach that of their mononucleotides. It has been found that the thermal denaturation spectrum of DNA is affected by its base composition, and that denaturation of synthetic polynucleotides containing only AT (AU) or GC base pairs shows very distinctive spectra.

A semiempirical treatment of the hypochromism has been developed by Felsenfeld and Hirshman [8]; they obtained the following expression for DNA (Eq. 1):

$$\Delta \varepsilon(\lambda) = f_{AT} \cdot \Delta \varepsilon_{AT}(\lambda) + f_{GC} \cdot \Delta \varepsilon_{GC}(\lambda) + [2 K(\lambda) - 1] f_{AT} \cdot f_{GC} \cdot \Delta \varepsilon_{AT}(\lambda) \cdot \Delta \varepsilon_{GC}(\lambda)$$

in which $\Delta\epsilon(\lambda)$ is the change in the absorption coefficient observed on melting, f_{AT} and f_{GC} are the mole fractions of the total number of nucleotides which are in AT and GC base pairs, $\Delta\epsilon_{AT}(\lambda)$ and $\Delta\epsilon_{GC}(\lambda)$ are the contribution to the hypochromism arising from AT-AT and GC-GC base pair interactions, respectively; $K(\lambda)$ accounts for the AT-GC interactions. For double-stranded DNA and RNA, the values of $K(\lambda)$ is near 0.5 for most wavelengths, so that the third term is negligible and the equation can be used to measure the base composition f_{AT} and f_{GC} of the polynucleotide, provided that the «reference» spectra $\Delta\epsilon_{AT}(\lambda)$ and $\Delta\epsilon_{GC}(\lambda)$ are known. Fig. 3 shows the reference spectra which can be used for RNA; it has been obtained from the thermal denaturation spectra of model polyribonucleotides [9].

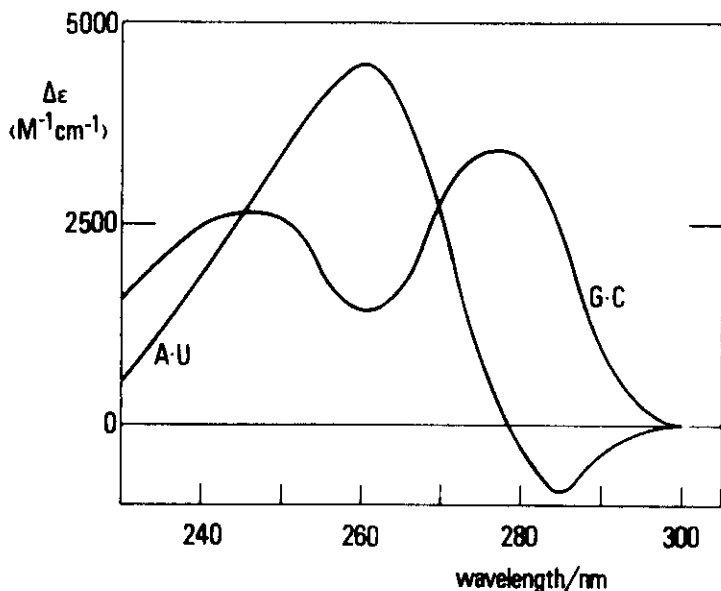


Fig. 3. — Reference spectra for denaturation of A U and G C pairs, obtained from melting of model polynucleotides [9].

This description is not necessarily restricted to thermal denaturation processes, but it is also applicable to those conformational changes involving base-stacking modifications in the double-stranded regions of the molecule.

The spectral range of interest for conformation studies is that dominated by the $\pi \rightarrow \pi^*$ and $n \rightarrow \pi^*$ transitions (therefore the strong absorption band around 260 nm) since the aromatic systems are delocalized and very sensitive to conformational changes; at short wavelengths the absorption is dominated by the $\sigma \rightarrow \sigma^*$ transitions and it is not likely to be used for this purpose

because the type orbitals are localized on to C-C and C-N bonds [3]. The UV absorption of nucleic acids can be changed not only by modifications in base stacking, but also as a consequence of localized interactions capable of affecting the electronic distribution of individual bases; in principle it is possible to distinguish among these effects by means of a detailed analysis of the observed spectrum modifications. Some examples will be given later in this report, which concern dimer formation after UV irradiation and interaction of bases with proteins and metal ions.

All the experiments we will describe have been performed by means of a differential spectrophotometric technique with the experimental arrangement shown in Fig. 4. Both the sample and reference cuvettes have been first filled with the same substance (for example, with solutions of DNA or RNA); in this circumstance the two transmitted beams were of the same intensity and therefore $\log I_0/I = 0$ over all the wavelength range. Then

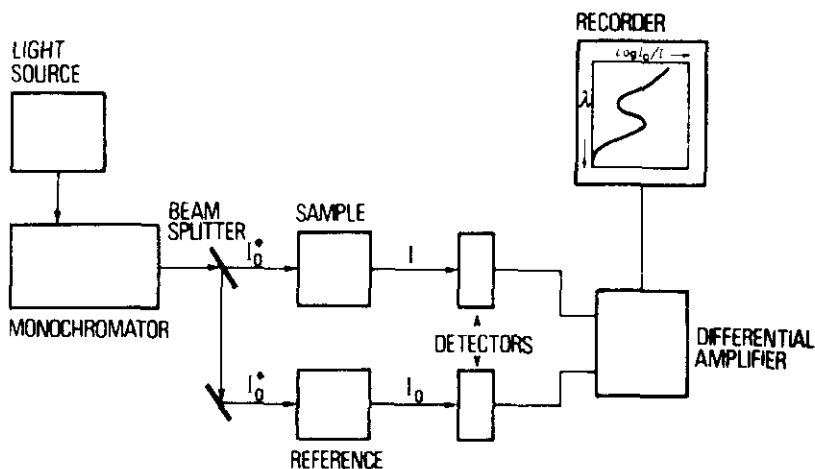


Fig. 4. --- Schematic representation of an absorption spectroscopy experiment.

a perturbation has been induced in the sample and the consequent changes in the absorbance have been recorded. Then the difference spectrum has been analyzed in order to get information about the structure changes induced by the perturbation.

By using a Cary mod. 17 spectrophotometer it is possible, in principle, to detect absorbance changes as small as 0.001. This means, for example, that it is possible to detect the formation or the disruption of one-two base pairs per molecule of 16S RNA.

A further point is to be mentioned, regarding the problem of scattered light. In addition to the absorption processes, biological samples, in some cases, scatter light and this fact results in a reduction of the intensity reaching

the detector. The scattering contribution is important in the presence of large particles or aggregates, and several techniques exist for adequate corrections [10].

SOME APPLICATIONS

Effects of UV radiation on T_2 phage DNA

The photochemical reactions induced by UV radiation on the DNA molecule in solution, essentially involve the pyrimidine bases. The main photoproducts found are the thymine and cytosine dimers ($\hat{T}\hat{T}$, $\hat{T}\hat{C}$, $\hat{C}\hat{C}$) and the cytosine hydrates.

The changes in the absorption spectrum as a function of the UV dose are useful for investigating the kinetics and cross-section of the photoproduct formation. We report here some results on the effects of relatively low doses of UV radiation on T_2 phage DNA, obtained by this approach [11-13].

T_2 DNA has a high thymine content (35 %) and has the cytosine replaced by the corresponding 5-hydroxymethyl form, which does not give rise to hydrates under irradiation. T_2' DNA has therefore the advantage that only the thymine photoproducts are to be considered.

Fig. 5 shows the difference spectrum observed when a sample of T_2 phage DNA was irradiated with several incident doses of radiation at $\lambda = 280$ nm. This spectrum gives directly the absorption changes produced

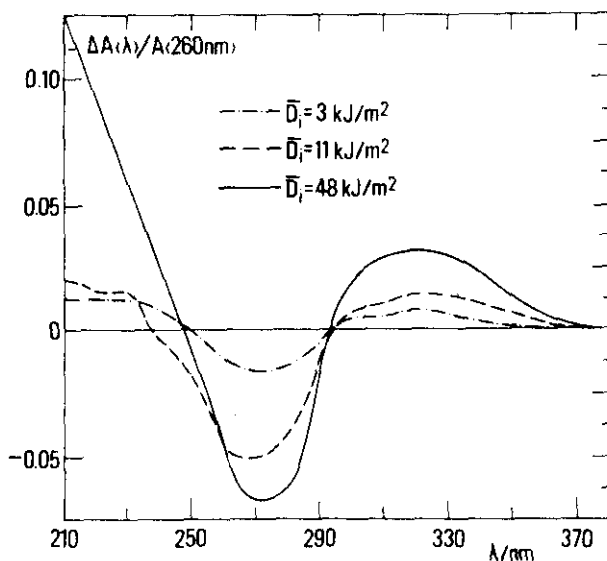


Fig. 5. — Absorption changes observed in T_2 DNA samples irradiated with several incident doses of UV light at 280 nm.

by UV irradiation. In the range 250–300 nm, a decrease in the optical density is observed, with a minimum at 270 nm. This can be interpreted as the disappearance of some thymine residues with the concomitant formation of photoproducts (especially thymine dimers), whose absorption is very small at 270 nm.

The absorption increase at $\lambda > 300$ nm indicates the formation of a photoproduct with an absorption maximum at $\lambda = 325$ nm, similarly to the photoproduct denoted as TpT⁴ (a thymine adduct different than the cyclobutane-type thymine dimer) found by Johns and Coll. [14] irradiating thymine aqueous solution. It should be mentioned that all attempts to isolate this photoproduct in DNA by the usual methods (acids or alkaline hydrolysis) have proved unsuccessful, since it is stable only in a neutral solution. Instead, the spectrophotometric analysis is non-destructive and allows a direct comparison between the photochemical effects on TpT and those on DNA. In fact, a detailed study [13, 15] of the spectral modification produced in T₂ DNA and TpT solutions by irradiation with increasing doses of monochromatic light at several wavelengths, has allowed to point out the close analogies in the photochemical behaviour and in the optical properties of the photoproduct found in DNA and of the TpT⁴ found in TpT solutions.

Intraphagic DNA structure

There are several lines of evidence which indicate that the double-stranded DNA molecule in a phage particle is in a structural state which differs from that of native DNA in solution. Information about this state can be obtained through the study of the absorbance changes following the dissociation of the phage particle into DNA and phagic proteins. This can be accomplished by heating a phage solution to a proper temperature and then by recooling the same at room temperature. Treating in this way T₂ phage particles, has led to the differential spectrum reported in Fig. 6, which has been related [16,17] to a difference in the molar absorption coefficient of the DNA between the isolated and the intraphagic form. The similarity between this spectrum and the spectral modifications observed on lowering the pH of a DNA (in the absence of denaturation) strongly suggests that the intraphagic DNA is in a protonated state. A comparison with the variations observed on lowering the pH of the individual nucleotides indicated that cytosine is most likely the protonated base in the intraphagic DNA [17].

RNA structure in the ribosome

Another point we have considered is which kind of modifications appear in the RNA structure (secondary or tertiary) when it interacts with the ribosomal proteins and cations to form the ribosome particle. Many authors

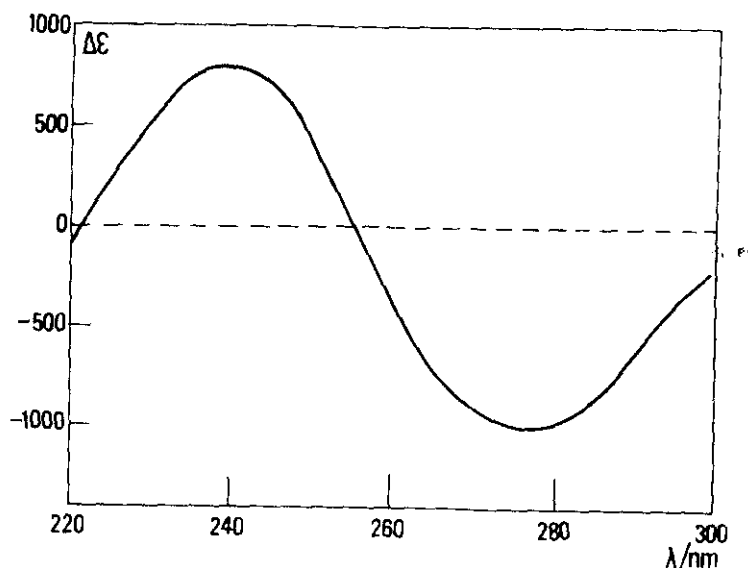


Fig. 6. — Spectrum change observed in T_2 phage after heating at 70 °C for 15 min followed by cooling at 20 °C.

have compared, using a number of techniques, the structure of the RNA molecules inside the ribosome with that of the isolated molecules in solution. It is generally agreed that the double-helical content is similar in the two cases. Nevertheless we have been able to detect small but significant differences by a comparative analysis of the difference spectra upon thermal denaturation [18–22]. These denaturation spectra, which give information about the amount of the ordered and stacking-stabilized structure in the RNA moiety, are compared in Fig. 7 for the subunits and their RNA.

It can be seen that the spectra for subunits are lower than those for their RNA and this indicates that the amount of the stacking interaction is less in the intraribosomal RNA than in the isolated RNA molecules.

They can all be obtained as superposition of the denaturation spectra for A–U and G–C pairs in double helical polyribonucleotides («reference spectra»), according to Eq. 1 which can be simplified, by taking $K(\lambda) = 0.5$, as

$$(\text{Eq. 2}) \quad \Delta\epsilon(\lambda) = f_{AU} \cdot \Delta\epsilon_{AU}(\lambda) + f_{GC} \cdot \Delta\epsilon_{GC}(\lambda).$$

We have used the best fit procedure in order to get the best estimate of fractions f_{AU} and f_{GC} in our sample. This analysis gives only approximated values, as the contribution coming from the stacking in the structured single

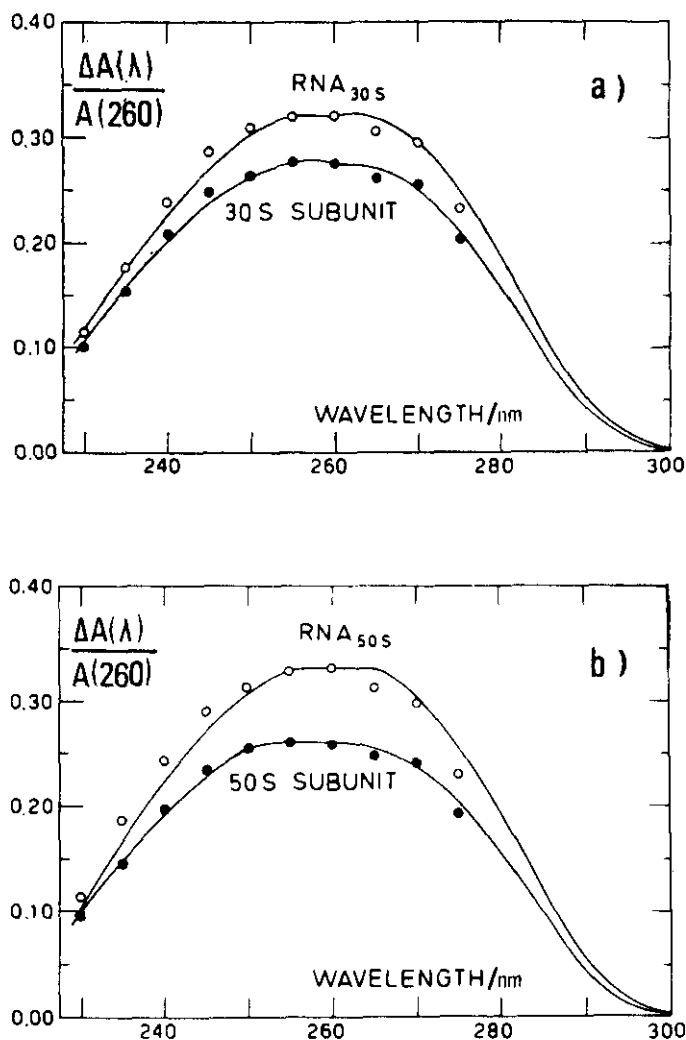


Fig. 7. — Denaturation spectra for a) 30S subunits and their RNA; b) 50S subunits and their RNA. Solid line represent the experimental spectra; circles correspond to the values obtained by fitting the experimental spectra with a superposition of the "reference spectra" for denaturation of A-U and G-C base pairs.

stranded regions is neglected. Bearing this in mind, our analysis indicates that the RNA inside the subunits has a lower amount of A-U and G-C base pairs than the isolated RNA, the difference being 0.07 ± 0.02 in f_{AU} and 0.06 ± 0.02 in f_{GC} . These results suggest that proteins may play a role in determining the secondary structure of RNA inside the ribosome.

Structure changes of E. coli RNA on ribosome unfolding

It is well known that magnesium ions play an important role in the ribosome organization and that the removal of the magnesium ions bound to the *E. coli* ribosomes caused a conformational change (unfolding) that affects their sedimentation coefficients and radii of gyration. The point we have studied [23-25] is whether this process also involves changes in the secondary structure of the intraribosomal RNA.

Fig. 8 shows the changes observed in the UV absorption spectra of *E. coli* ribosomal subunits when magnesium ions are completely removed by chelation with EDTA. These «unfolding spectra» indicate that only very slight changes occur at 260 nm while a significant decrease in the absorption can be observed at higher wavelengths; Mg^{2+} removal causes in fact about 6 % decrease in $\Delta A(285)/A(285)$.

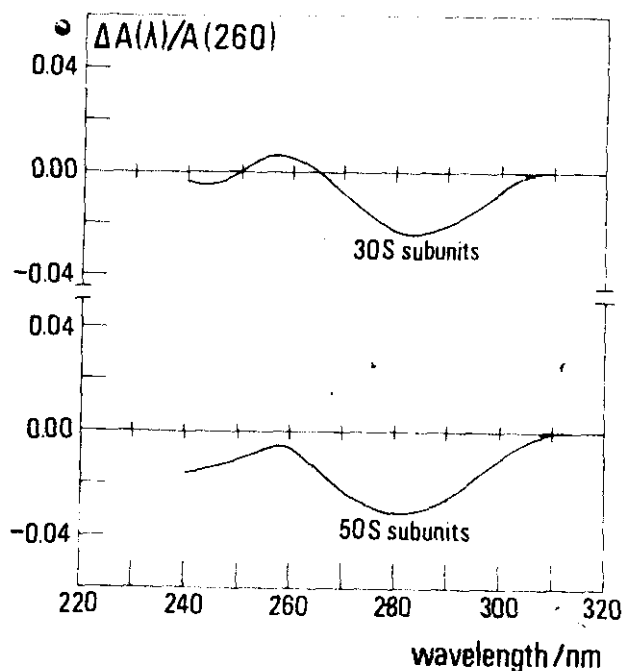


Fig. 8. — Unfolding spectra for the subunits and their RNAs. They represent the changes in the absorption spectra on Mg^{2+} removal by EDTA addition.

Since rRNA is the principal absorbing species in the range 240-300 nm and since the protein conformation is not significantly affected by Mg^{2+} removal, it is realistic to assume that the unfolding spectra are related to a rearrangement in the RNA ordered structure.

In principle, a number of different contributions can be invoked, namely: 1) modifications in the double helical content, 2) changes in the single strand base-stacking or 3) alteration in the tertiary structure; the analysis of the observed spectral changes does not enable us to distinguish among these possibilities.

A quantitative interpretation of the «unfolding spectra» can be suggested if the first cause is the predominant one. In this case, a description should be possible in terms of superposition of the reference spectra for denaturation of A-U and G-C base pairs in double helical polyribonucleotides according to the procedure already mentioned for the denaturation spectra, based on Eqs. 1 and 2. The results showed that the spectrum modifications upon ribosome unfolding are consistent with the modifications in the double helical content of the RNA, that is, with an increase of 0.06 ± 0.01 in the fraction f_{gc} besides an average decrease of 0.02 ± 0.01 in the fraction f_{au} .

Metal ions-ribonucleic acids interaction

This examples deals with the investigation on Mg^{2+} and Mn^{2+} interactions with ribonucleic acids. It is known that divalent cations are of fundamental importance in determining the active structure of nucleic acids which are involved in the protein synthesis. Mg^{2+} ions are especially required for the stabilization of the rRNA and tRNA structure.

The role of Mg^{2+} ions seems highly specific but they sometimes can be substituted by other ions without appreciable lack of biological activity. Mn^{2+} , for example, is known to be a good Mg^{2+} substituent in some reactions involved in the protein synthesis.

Metal ions react with sites having high electronic density or negatively charged residues. At first, two types of sites are available for the interaction with nucleic acids: a) phosphate groups situated on the polynucleotide backbone; b) donor atoms N or O of the bases. Studies of the interactions between metal ions and DNA show that Mg^{2+} ions interact only with phosphate groups, while Mn^{2+} ions can interact also with the bases [26]. We used the UV differential spectrophotometric technique in order to clarify [27] the extent to which the structural role of Mn^{2+} is similar to that of Mg^{2+} in rRNA and tRNA.

Fig. 9 shows the changes observed in the UV spectra upon addition of Mg^{2+} or Mn^{2+} to tRNA^{Met}_f, 50S subunits and their RNA. Analogous results (not shown here) have been obtained for the 30S subunits and their RNA.

As it may be observed, Mg^{2+} or Mn^{2+} addition causes a decrease in the absorption spectra throughout most of the spectral range examined; such a decrease is about the same as in the three cases reported, and corresponds

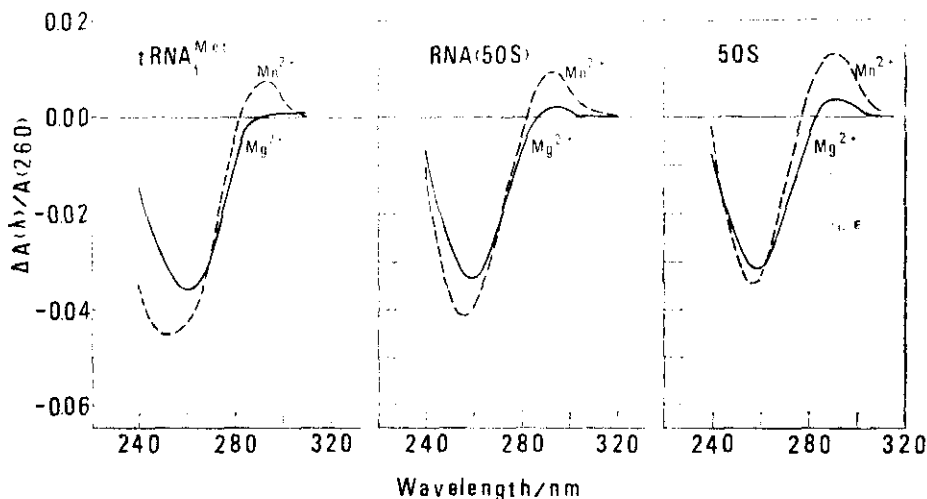


Fig. 9. — Changes in the absorption upon addition of Mg^{2+} or Mn^{2+} to 50S subunits, rRNA from 50S, and $tRNA_{Met}^{met}$.

to a net increase in the stacking interactions, due to a refolding of the molecules. In the 280–300 nm range, only for the Mn^{2+} case an appreciable absorption increase appears, with a maximum at 294 nm. Analogous effects have been shown in DNA–Mn complex [26] which have been ascribed to the coordination of bases with the metal ions. Similar conclusions can be drawn for RNA–Mn interactions, that is, the structural role of Mn^{2+} ions in RNA structure may be, as that of Mg^{2+} , the screening of the electrostatic repulsion between phosphates but, in addition, a binding with bases is to be considered.

Ricevuto l' 8 gennaio 1981.

Accettato il 21 febbraio 1981.

REFERENCES

1. PULLMAN, B. & PULLMAN, A. 1969. Quantum-mechanical investigations of the electronic structure of nucleic acids and their constituents. *Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* **9**: 327–402.
2. SONTAG, W. & WEIBEZAHN, K. F. 1975. Absorption of DNA in the region of vacuum - UV (3–25 eV) *Rad. Environm. Biophys.* **12**: 169–174.
3. SUTHERLAND, J. C. 1979. Biophysical spectroscopy in the visible and ultraviolet using synchrotron radiation. In: *Synchrotron Radiation Applied to Biophysical and Biochemical Research*. Castellani, A. & Quercia, I. F. (Eds.), Plenum Publ., London & New York.

4. VOET, D., GRATZER, W. B., COX, R. A. & DUTY, P. 1963. Absorption spectra of nucleotides, polynucleotides, and nucleic acids in the far ultraviolet. *Biopolymers*. **1**: 193-208.
5. WEISSBLUTH, M. 1971. Hypochromism. *Quart. Rev. Biophys.*, **4**: 1-34.
6. TINOCO, I. Jr. 1960. Hypochromism in polynucleotides. *J. Chem. Phys.* **33**: 1332.
7. DE VOE, H. & TINOCO, I. 1962. The hypochromism of helical polynucleotides. *J. Mol. Biol.* **4**: 518-527.
8. FELSENFELD, G. & HIRSHMAN, S. Z. 1965. A neighbor-interaction analysis of the hypochromism and spectra of DNA. *J. Mol. Biol.* **13**: 407-427.
9. COX, R. A. 1970. Conformation of nucleic acids and analysis of the hypochromic effect. *Biochem. J.* **120**: 539-547. COX, R. A. (private communication).
10. BUTLER, W. L. 1972. Absorption spectroscopy of biological materials. *Meth. Enzymol.* **27**: 3-25.
11. CREMONESE, M., GIAMPAOLI, C., MATZEU, M. & ONORI, G. 1969. Spectral modification in UV irradiated solutions of T₂ phage DNA. *Rapporto dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità*, ISS 69/38.
12. CREMONESE, M., GIAMPAOLI, C., MATZEU, M. & ONORI, G. 1970. Cesium chloride density gradient study of some modification induced by ultraviolet radiation on the denatured DNA molecule of phage T₂. *Biophys. J.*, **9**: 1451-1463.
13. CREMONESE, M., GOZZI, D., MATZEU, M. & ONORI, G. 1971. A new photoproduct in T₂ phage DNA. *Stud. Biophys.*, **29**: 37-44.
14. JOHNS, H. E., PEARSON, M. L., LE BLANC, J. C. & HELLEINER, C. W. 1964. The ultraviolet photochemistry of thymidyl-(3'-5')-thymidine. *J. Mol. Biol.* **9**: 503-524.
15. CREMONESE, M., GOZZI, D., MATZEU, M. & ONORI, G. 1974. Cross-sections for some TpT photoproducts. *Stud. Biophys.* **44**: 101-108.
16. CREMONESE, M., GRECO, S., MATZEU, M. & ONORI, G. 1973. Modificazioni dell'assorbimento ultravioletto di una soluzione fagica in funzione della temperatura. *Ann. Ist. Super. Sanità*. **9**: 129-132.
17. CREMONESE, M., MATZEU, M. & ONORI, G. 1971. Some evidence of the different properties of DNA in the intraphage state with respect to its state in solution. *Proceedings of First European Biophysics Congress*. E. Broda, A. Locker, H. Spinger-Lederer (Eds). Vienna, 1971, **1**: 538-542.
18. ARACO, A., BELLI, M., GIORGI, C. & ONORI, G. 1975. The secondary structure of *E. coli* ribosomes and ribosomal RNA's: a spectrophotometric approach. *Nucl. Ac. Res.*, **2**: 373-381.
19. BELLI, M., MAZZEI, F. & ONORI, G. 1980. Studio spettrofotometrico della struttura dell'RNA del ribosoma di *E. Coli*. I) Principi teorici e sperimentali della spettrofotometria UV. *Rapporto del Laboratorio delle Radiazioni dell'Istituto Superiore di Sanità*, ISS R 80/2.
20. ARACO, A., BELLI, M., MAZZEI, F. & ONORI, G. 1980. Studio spettrofotometrico della struttura dell'RNA del ribosoma di *E. Coli*. II) Effetto di ioni e proteine sulla struttura secondaria dell'RNA. *Rapporto del Laboratorio delle Radiazioni dell'Istituto Superiore di Sanità*, ISS R 80/3.

21. ARACO, A., BELLI, M., MAZZEI, F. & ONORI, G. 1980. A spectrophotometric study on the structure of rRNA in the ribosome and in free state. In: *Developments in Biophysical Research*, Borsellino *et al.* (Eds). Plenum Publ., London-New York, pp. 303-312.
22. ARACO, A., BELLI, M., MAZZEI, F. & ONORI, G. 1980. Spectroscopic studies of the structure of the RNA in the ribosome: Influence of Mg^{2+} ions and ribosomal proteins. *Stud. Biophys.* **78**: 57-71.
23. BELLI, M., ONORI, G., ARACO, A. & GIORGI, C. 1976. Changes in the ultraviolet absorption of *E. coli* rRNA on ribosome unfolding. *Biopolymers*. **15**: 1229-1232.
24. ONORI, G., ARACO, A., BELLI, M. & GIORGI, C. 1977. Spectroscopic studies on the unfolding of *E. coli* ribosomes. *Stud. Biophys.* **65**: 155-160.
25. ARACO, A., BELLI, M. & ONORI, G. 1979. Structure changes of *E. coli* rRNA on ribosome unfolding. *Stud. Biophys.* **75**: 25-30.
26. LUCK, C. & ZIMMER, G. 1972. Conformational aspects and reactivity of DNA. Effects of Manganese and Magnesium ions on interaction with DNA. *Eur. J. Biochem.* **29**: 528-536.
27. ARACO, A., BELLI, M., MAZZEI, F. & ONORI, G. 1980. Metal ions in RNA structure. *Stud. Biophys.* (in press).