

ESPERIENZE E RICERCHE

Problemi ancora aperti sulla struttura della molecola dell'acido desossiribonucleico

MARIO AGENO, ELISABETTA DORE e CLARA FRONTALI

Laboratori di Fisica

Riassunto. — Si discutono le ragioni che suggeriscono di riprendere in esame alcune caratteristiche, di secondaria importanza dal punto di vista biologico, del modello proposto fin dal 1953 da Watson e Crick per la molecola del DNA. Dopo aver riassunto brevemente i principali risultati ottenuti nello studio del processo di denaturazione alcalina del DNA *in vitro* e già esposti in precedenti pubblicazioni, si espongono quattro diverse interpretazioni di tali risultati. Tre di esse vengono messe da parte in base a tutta una serie di esperienze e misure di controllo. La quarta interpretazione porta ad ammettere che, una volta che si siano realizzate pressochè istantaneamente le condizioni di denaturazione in una soluzione di DNA, il processo di separazione delle due eliche ha, per ciascuna molecola, un inizio casuale e dura un tempo molto più breve di quanto finora si ritenesse, tanto da assumere un carattere quasi-catastrofico. Le difficoltà di carattere meccanico del modello di Watson e Crick, già rilevate dagli stessi Autori, ne risultano notevolmente aumentate.

Summary. (*Open problems on the structure of deoxyribonucleic acid*). — Reasons are discussed which suggest that some minor features of the Watson and Crick model of the DNA molecule deserve a more profound study. The results of a kinetic study of alkaline denaturation of DNA described in previous papers are here briefly summarized. According to these results, denaturation seems to be an « all or none » phenomenon, since during the time taken for the hyperchromic effect to become completely irreversible, the density gradient analysis shows the presence of native and of fully denatured molecules, the amount of the first ones decreasing steadily and the amount of the second increasing steadily with denaturation time. Four different interpretations of these results are here presented and discussed.

They can be summarized as follows: 1) the distribution observed in CsCl density gradients is an artifact produced during the 24 hours in which DNA remains in CsCl solution; 2) the « all or none » effect is produced immediately after the neutralization of DNA solutions exposed to alkaline denaturation; it is conceivable that some half-denatured molecules will complete denaturation more or less rapidly, while others will renature completely; 3) half-denatured, Y-shaped molecules could break in the bifurcation point either at the moment of neutralization, or in successive handling. As a consequence, pieces still in the native state and pieces which are completely single stranded would be formed; 4) the time necessary for one molecule to separate into two strands is much shorter than the rise-time of the irreversible hyperchromic effect, and the initiation of the process is random. Several experiments and controls were undertaken in order to test each of these hypotheses. Hypothesis 1) is shown to be unlikely on the basis of the experiments illustrated in Figs. 1-5; the second hypothesis seems to be excluded on the basis of the experiment described in Fig. 8; Figs. 9-12 show results which completely reject the third hypothesis. Only the fourth interpretation remains, and this leads us to think that, when denaturation conditions have been suddenly established, in a DNA solution, the process of separation of the two strands has a random initiation for each molecule, and lasts for a time which is much shorter than was thus far believed. The mechanical difficulties of the Watson and Crick model, discussed by the Authors themselves, are therefore increased.

INTRODUZIONE

Il modello di Watson e Crick della molecola dell'acido desossiribonucleico (¹⁻³), nella sua geniale semplicità, ha permesso di descrivere in modo veramente soddisfacente i principali aspetti dei fenomeni concernenti la conservazione, trasmissione, utilizzazione ed evoluzione del patrimonio ereditario di ogni organismo vivente. La genetica ha trovato in esso una solida base strutturale, la biochimica e la diffrazione dei raggi X ne hanno confermato le più salienti caratteristiche.

Il problema della struttura della molecola del DNA non può tuttavia ancora considerarsi completamente chiuso. È bensì vero che possediamo nell'analisi röntgenografica un metodo in linea di principio capace di risolvere qualsiasi problema di struttura e che essa è stata applicata al DNA in una serie di ricerche fondamentali (⁴⁻²⁸), che hanno estratto dalle figure di diffrazione disponibili tutte le informazioni possibili. Ma è anche vero che, in questo caso, tale modello d'analisi trova delle insormontabili limitazioni nella scarsità del numero di riflessi ottenibili anche dai migliori campioni di DNA cristallizzato e che, se la trasformata di Fourier del modello di Wat-

son e Crick, con qualche aggiustamento non importante, è stata portata ad accordarsi in modo soddisfacente coi dati sperimentali, tuttavia nessuno (a quanto sembra) si è preoccupato di vedere se non si possa trovare un accordo uguale o anche migliore partendo da un modello sostanzialmente diverso.

1. — DIFFICOLTÀ MECCANICHE DEL MODELLO WATSON-CRICK DEL DNA.

Che il modello comporti delle notevoli difficoltà di carattere meccanico, per ciò che concerne i processi di denaturazione e rinaturazione e di duplicazione della molecola, fu già segnalato da Watson e Crick in uno dei loro primi lavori sull'argomento (2). Basti citare l'esempio del DNA del fago T, che contiene circa 200.000 coppie di nucleotidi ed è quindi lungo una settantina di micron, cinquanta volte il diametro medio del batterio in cui si riproduce. E che, per riprodursi, come fa, in un tempo dell'ordine di un paio di minuti, deve ruotare una estremità della molecola rispetto all'altra alla velocità di almeno 10.000 giri al minuto.

In questi ultimi anni si è andata inoltre accumulando tutta una serie di risultati sperimentali per i quali sembra veramente arduo trovare un accordo con talune caratteristiche strutturali del modello di Watson e Crick. Si è dimostrato ad esempio che il genoma di taluni fagi e batteri ha forma circolare, la doppia elica essendo richiusa su se stessa, senza un inizio e una fine. E tuttavia la duplicazione della molecola avviene ordinatamente a partire da un punto (24-25) e con carattere semiconservativo (30) esattamente come Watson e Crick avevano previsto. È topologicamente impossibile separare due eliche intrecciate richiuse su loro stesse ad anello. Siccome tuttavia il fenomeno avviene, e le autoradiografie di Cairns fanno vedere che anche i prodotti della duplicazione hanno forma circolare, si è supposto che vi sia lungo il genoma un punto singolare: una specie di perno, che permette la rotazione relativa delle due parti di molecole che collega. Anche lasciando da parte l'ipotesi improbabile che questo perno sia addirittura il motore che provoca lo srotolamento delle due eliche, non sembra tuttavia che questa spiegazione si possa conciliare facilmente col fatto che la duplicazione può talora avere inizio in un punto qualsiasi del genoma e procedere in un senso o nell'altro fino al completamento dell'anello, senza essere arrestata dall'ipotetico perno (29-28).

Inoltre, si è dimostrato che le due eliche del DNA sono effettivamente antiparallele come previsto dal modello di Watson e Crick (30). Dato che le due eliche si riproducono insieme, partendo dallo stesso punto e procedendo nello stesso verso, ciò significa che un'elica si riproduce nel verso 5' → 3' e l'altra nel verso opposto 3' → 5'. Ma ciò sembrerebbe richiedere per le due eliche precursori diversi, che in realtà non sembra si trovino nella cellula.

Altre difficoltà sembrano derivare dal tipo di accoppiamento tra le basi complementari. I legami a idrogeno non hanno un carattere specifico. Resta quindi da spiegare come, nel corso della duplicazione del DNA, in corrispondenza di ciascuna base venga selezionata proprio sempre la base complementare. Parimenti, non è molto chiaro come nel processo di rinaturazione possa aversi così facilmente un riordinamento della molecola praticamente completo.

Sembra dunque che, pur dovendosi considerare definitivamente acquisite le principali caratteristiche del modello di Watson e Crick (l'andamento elicoidale, la presenza di due eliche per molecola, la complementarità delle basi corrispondenti, ad esempio), molti risultati sperimentali inducono a riconsiderarne criticamente altri aspetti, di rilevanza secondaria dal punto di vista biologico, quali l'intrecciamento delle eliche e il loro antiparallelismo, le modalità dell'accoppiamento tra basi complementari.

2. — FORZE IN GIOCO NELLA DENATURAZIONE E RINATURAZIONE DEL DNA.

Sulla base di queste considerazioni, noi abbiamo in particolare fissata la nostra attenzione sulla questione dell'intrecciamento delle due eliche e ci siamo ripetuti prima di tutto la domanda che già si erano posti, nel 1953, Watson e Crick: quali sono le forze chimiche o fisiche responsabili dello srotolamento e del riordinamento della molecola, nei processi di denaturazione e rinaturazione? Ci è parso che, per poter tentare di dare una qualsiasi risposta a questo interrogativo, sia necessario prima di tutto una conoscenza più approfondita della fenomenologia dei due processi, in condizioni fisico-chimiche completamente controllate.

Lasciato quindi da parte lo studio dei fenomeni *in vivo*, abbiamo fatto una serie di esperienze sulla denaturazione alcalina del DNA *in vitro*, allo scopo di chiarire nei particolari l'andamento temporale dei fenomeni di dissociazione e riassociazione delle due eliche e di determinare il più esattamente possibile l'ordine di grandezza degli intervalli di tempo relativi, nelle condizioni fisico-chimiche prescelte. Questi dati sono infatti il banco di prova di qualunque ipotesi si voglia fare sulla natura ed origine delle forze in gioco.

I principali risultati da noi ottenuti, già esposti in lavori precedenti (40-43), si possono brevemente riassumere nel modo seguente.

Una soluzione di DNA viene posta pressoché istantaneamente in condizioni di denaturazione, portandone il pH ad un valore convenientemente elevato e il processo di separazione delle due eliche viene seguito nel tempo, con diverse tecniche osservative. In un tempo inferiore al decimo di secondo (e probabilmente, almeno in certi casi, assai inferiore) l'effetto ipercromico raggiunge il suo valore massimo di circa il 40%. Ciò significa che tutti quei legami a cui sono soggette le basi nel DNA e che ne riducono l'assorbimento

in confronto a quello delle basi libere, si rompono pressochè istantaneamente, quando le condizioni di denaturazione sono raggiunte.

Se tuttavia, dopo un tempo τ convenientemente breve si riporta in modo pressochè istantaneo la soluzione di DNA al pH di neutralizzazione, l'effetto ipercromico risulta in parte reversibile. Facendo variare τ abbiamo determinato per DNA di varia provenienza il tempo che impiega l'effetto ipercromico a diventare completamente irreversibile e trovato tempi dell'ordine di parecchi secondi (circa 20 s nel caso, ad esempio, del DNA del fago T₂) dipendenti dal peso molecolare del DNA sotto esame. Ciò può interpretarsi nel senso che non appena i legami che riducono l'assorbimento delle basi sono rotti, le due eliche, ancora intrecciate insieme, incominciano a srotolarsi ed impiegano a srotolarsi completamente un tempo pari al tempo di salita dell'effetto ipercromico irreversibile. Se la soluzione viene neutralizzata bruscamente prima che il processo di srotolamento sia completo, tale processo si arresta e in quella parte della molecola in cui le eliche sono ancora intrecciate i legami tra le basi si ricostituiscono immediatamente.

Questa interpretazione, in accordo col modello di Watson e Crick, sembra tuttavia non conciliabile coi risultati di un'altra serie di esperienze da noi effettuate. Abbiamo infatti esaminato alla ultracentrifuga analitica, in gradiente di densità di cloruro di cesio, il materiale mantenuto in condizioni di denaturazione per un intervallo di tempo τ , e questo per τ variabile tra 0 e 30 secondi. Nell'ipotesi di uno srotolamento progressivo delle due eliche di cui la molecola del DNA è costituita, avremmo dovuto sempre trovare, nel gradiente di densità, una sola banda dovuta al DNA sotto esame. Per $\tau = 0$ questa banda avrebbe dovuto avere la densità del DNA nativo; al crescere di τ la banda avrebbe dovuto spostarsi progressivamente verso le densità maggiori, fino ad assumere, alla fine del processo, la densità del DNA completamente denaturato.

Abbiamo invece osservato un andamento temporale del processo qualitativamente diverso. La densità della banda, nella posizione del DNA nativo, non subisce alcuna variazione al crescere del tempo di denaturazione τ . L'area della banda tuttavia diminuisce progressivamente, mentre compare una seconda banda, di area via via crescente in posizione corrispondente alla densità del DNA totalmente denaturato. Tra le due bande vi è solo una frazione assai piccola di materiale di densità intermedia, quantità che si forma prima dell'apparire della banda del denaturato e scompare dopo lo sparire della banda del nativo. Finchè le bande estreme sono ambedue presenti, la quantità di questo materiale intermedio non varia sensibilmente al variare di τ . In altre parole, tutto avviene come se il tempo impiegato da una singola molecola nello scindersi in due fosse assai breve in confronto al tempo di salita dell'effetto ipercromico irreversibile e come se tale processo a carattere quasi catastrofico non avvenisse immediatamente in tutte le molecole

all'atto dell'instaurarsi delle condizioni di denaturazione, ma in tali condizioni ciascuna molecola avesse una certa probabilità finita d'iniziare il processo entro un certo intervallo finito di tempo.

3. — ALCUNE POSSIBILI INTERPRETAZIONI DEI DATI DI DENATURAZIONE E RINATURAZIONE DEL DNA.

Naturalmente, questa non è l'unica interpretazione possibile dei nostri risultati. Vogliamo anzi in questo lavoro esaminare quattro possibili alternative, per vedere se si può trarre dalle esperienze da noi finora eseguite, alla luce di ciò che è finora noto sulla molecola del DNA, una qualche conclusione attendibile. Le quattro interpretazioni alternative che vogliamo considerare sono le seguenti:

1) la distribuzione del materiale sotto esame, che si osserva nel gradiente di densità, è sostanzialmente un artefatto, che si produce nel periodo di almeno 24 ore in cui il DNA rimane sospeso nella soluzione di cloruro di cesio;

2) l'effetto « sì o no » nella denaturazione delle singole molecole del DNA si produce subito dopo la neutralizzazione della soluzione, in quanto la neutralizzazione non blocca immediatamente ogni processo di denaturazione o rinaturazione, ma, più o meno rapidamente, alcune delle molecole semidenaturate completano la denaturazione, mentre altre rinaturano completamente;

3) le molecole semidenaturate, a forma Y, al momento della neutralizzazione della soluzione o nei trattamenti successivi, si rompono in corrispondenza della biforcazione, dando così luogo da un lato a pezzi di molecola allo stato nativo e dall'altro a pezzi di molecola allo stato totalmente denaturato;

4) il tempo di denaturazione delle singola molecola è effettivamente molto breve in confronto al tempo di salita dell'effetto ipercromico irreversibile e l'inizio del processo quasi-catastrofico è effettivamente casuale.

a) *Completamento in CsCl della denaturazione delle molecole semidenaturate.*

La prima ipotesi, che le molecole di DNA semidenaturate nella soluzione di cloruro di cesio tendano spontaneamente a denaturare completamente oppure a ritornare allo stato nativo è stata sottoposta a controllo sperimentale in tre modi diversi. In primo luogo, è stato controllato come varia la densità ottica di una soluzione di DNA all'atto dell'aggiunta di cloruro di cesio e nel corso delle 24 ore successive, necessarie alla formazione del gradiente di densità nell'ultracentrifuga analitica. La Fig. 1 mostra l'andamento della densità ottica di una soluzione di DNA parzialmente denaturato ($\tau = 15$ s), in funzione del tempo a partire dalla fine delle operazioni di denaturazione, prima e dopo l'aggiunta del cloruro di cesio. Come si vede, in assenza di cloruro di cesio la densità ottica va lentissimamente diminuendo. Quando si aggiunge il cesio, essa subisce una brusca variazione, scendendo però

sempre allo stesso valore indipendentemente dal momento in cui viene fatta l'aggiunta. La densità ottica della soluzione di DNA in cloruro di cesio risulta poi praticamente costante.

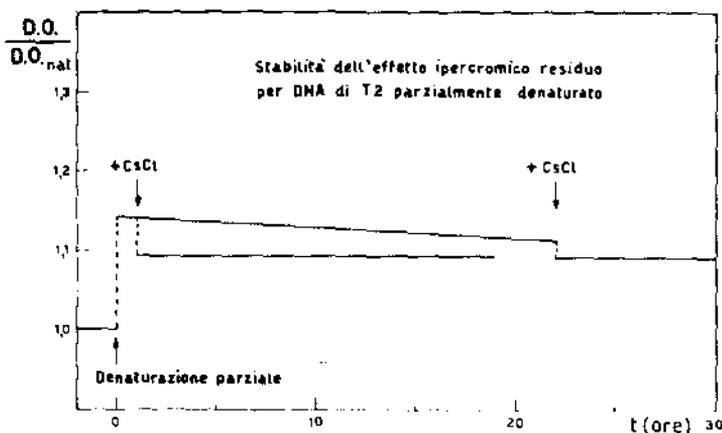


Fig. 1. — Andamento nel tempo della densità ottica a 260 μ per una soluzione di DNA di T2 denaturato parzialmente (mediante esposizione di 15 secondi a pH 12,5, seguita da rapida neutralizzazione). La diminuzione nell'effetto ipercromico residuo causata dall'aggiunta di CsCl (a concentrazione finale 8 M) è risultata indipendente dalla concentrazione del DNA.

Che le variazioni della densità ottica prima e al momento dell'aggiunta del cloruro di cesio non siano dovute a parziale rinaturazione è provato da due fatti. Innanzi tutto il fenomeno si riproduce esattamente (Fig. 2) anche

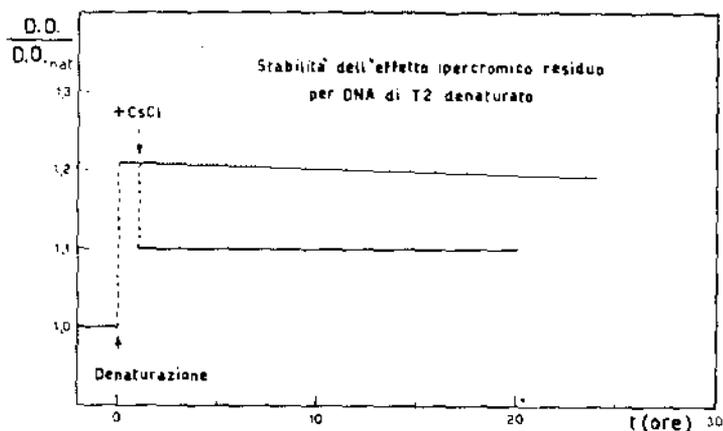


Fig. 2. — Andamento nel tempo della densità ottica a 260 μ per una soluzione di DNA di T2 completamente denaturata (mediante esposizione di 2 minuti a pH 12,5, seguita da rapida neutralizzazione). L'effetto ipercromico residuo, del 21 % circa, si riduce ad un valore inferiore ($\sim 10\%$) per aggiunta di CsCl, a concentrazione finale 8 M. In assenza di CsCl, la diminuzione è lentissima, essendo appena sensibile nel corso di 24 ore.

per il DNA totalmente denaturato: l'esame dello spettro di densità in gradiente di cloruro di cesio mostra in questo caso che non si è avuta riassociazione tra le eliche complementari. In secondo luogo, abbiamo dimostrato che la variazione percentuale della densità ottica di una soluzione di DNA totalmente denaturato non dipende dalla concentrazione del DNA: anche questo fatto esclude che si possa trattare di riassociazione. Si tratta quindi semplicemente di un riassetamento dei legami intraelica, dovuto all'aumentata concentrazione ionica. A parte questo effetto, la densità ottica della soluzione di DNA non varia col tempo: sembra improbabile che la variazione dovuta a materiale che rinatura sia, per ogni valore di τ , esattamente compensata dalla variazione in senso opposto dovuta a materiale che continua a denaturare.

In secondo luogo, si è visto che la quantità di materiale di densità intermedia tra quella del nativo e quella del denaturato non diminuisce, se si prolunga di altre 24 ore la permanenza del DNA semidenaturato in centrifuga analitica, nella soluzione di CsCl (Fig. 3). In terzo luogo, si è controllato

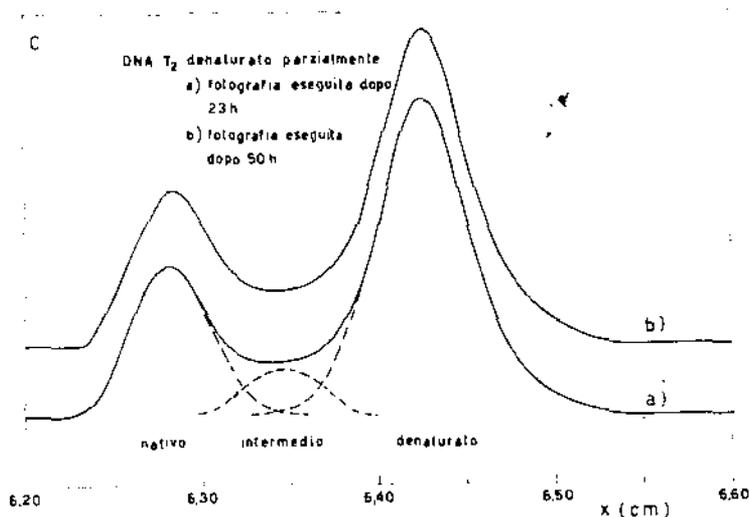


Fig. 3. — DNA di T2 parzialmente denaturato, esaminato in gradiente di densità di CsCl: a) fotografia eseguita dopo 23 ore; b) fotografia eseguita dopo 50 ore. I due grafici sono esattamente sovrapponibili, in particolare per quel che riguarda la zona del materiale intermedio.

che molecole di DNA semidenaturate, ottenute per parziale rinaturazione di materiale precedentemente completamente denaturato, permangono come tali in soluzione di CsCl. Nella Fig. 4 sono messe a confronto le due bande del DNA del fago α (attivo su *Bacillus megatherium*) completamente denaturato, con lo spettro di densità che si osserva dopo 1 ora di rinaturazione a pH 10,55, in una soluzione alla concentrazione di 20 γ /ml. La figura dimostra

che nelle 24 ore di permanenza in CsCl non si produce affatto l'effetto « sì o no » da noi osservato.

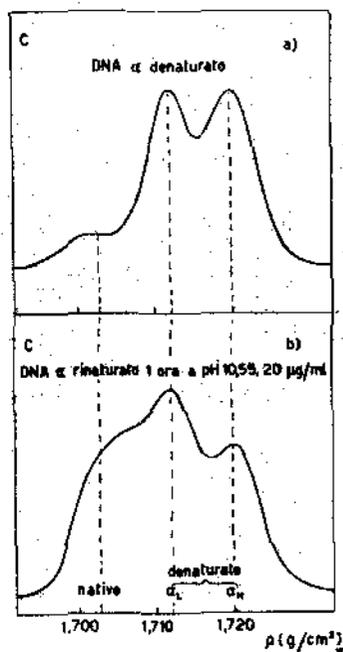


Fig. 4. — DNA del fago α denaturato (a), e rinaturato parzialmente per esposizione di 1 ora a pH 10,55 (b). Si vede chiaramente la presenza di materiale di densità intermedia tra quella del nativo e quella del denaturato.

La Fig. 5 pone a confronto lo spettro di densità di una soluzione di DNA del fago T, alla concentrazione di 20 γ /ml, rinaturata per 1^h a 45° C:

a) messa in ultracentrifuga subito dopo la fine della rinaturazione e il mescolamento con soluzione di CsCl di opportuna densità;

b) messa in ultracentrifuga 24^h dopo la fine della rinaturazione e l'aggiunta del CsCl;

c) mescolata con la soluzione di CsCl e messa in ultracentrifuga 24^h dopo la fine della rinaturazione (quindi dopo 24^h di permanenza in NaCl 0,1 M).

Come si vede, nelle 24 ore di permanenza fuori della centrifuga a temperatura ambiente, sia in CsCl sia in soluzione 0,1 M di NaCl, si produce effettivamente una certa rinaturazione. La quantità di materiale intermedio è un po' aumentata a spese del denaturato e la densità media di questo materiale si è avvicinata alla densità del nativo.

Questo effetto, che è del resto perfettamente in accordo coi risultati delle nostre misure nella cinetica di rinaturazione (4), non è però in grado di spiegare l'effetto « sì o no » da noi osservato in denaturazione. Innanzi tutto esso è di gran lunga troppo piccolo e in secondo luogo tende a fare sparire la banda del denaturato, anziché renderla evidente.

Per quanto a rigore queste prove non escludano del tutto ogni possibilità di un artefatto dovuto al CsCl, sembra tuttavia ragionevole ammettere che tale ipotesi sia altamente improbabile.

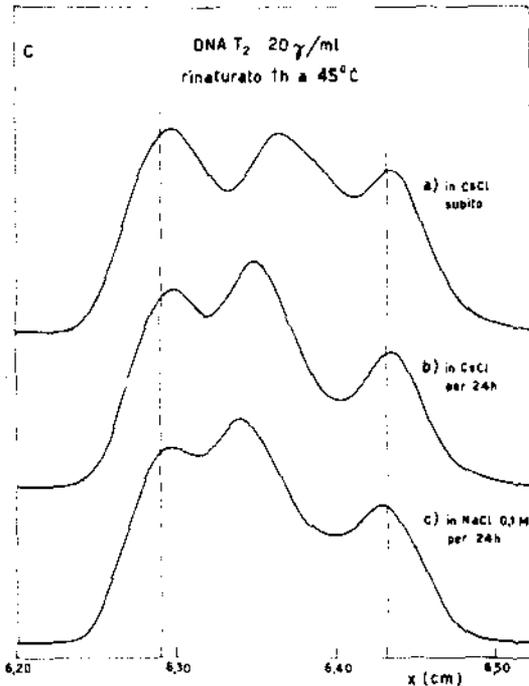


Fig. 5. — DNA di T2, denaturato e quindi rinaturato parzialmente per esposizione di 1 ora alla temperatura di 45°C. In *a*) e in *b*) la soluzione è stata portata subito dopo la rinaturazione alla densità adatta, mediante aggiunta di CsCl. In *a*) l'analisi in ultracentrifuga è stata iniziata subito dopo l'aggiunta del CsCl; in *b*) dopo 24 ore di permanenza a temperatura ambiente. In *c*) la stessa soluzione è stata tenuta per 24 ore a temperatura ambiente dopo la rinaturazione, e prima dell'aggiunta del CsCl e successiva analisi in ultracentrifuga analitica.

b) Completamento della denaturazione subito dopo la neutralizzazione.

La seconda delle interpretazioni proposte per i risultati da noi ottenuti, può essere sottoposta al vaglio della esperienza esaminando quali trasformazioni hanno luogo nella soluzione di DNA, a neutralizzazione avvenuta. Come nel caso precedente, sembra si possa escludere una lenta denaturazione e rinaturazione delle molecole semidenaturate alla fine del tempo τ : a partire da 60 secondi dopo la neutralizzazione, misure di assorbimento eseguite a intervalli di tempo con la tecnica usuale mostrano che l'effetto ipercromico della soluzione non varia sensibilmente (Fig. 1). Inoltre, come si è detto, esaminando alla ultracentrifuga analitica, in gradiente di densità, a intervalli di 24 ore frazioni prelevate dalla stessa soluzione di DNA semidenaturato o semirinaturato, si trova che la percentuale di molecole di densità intermedia tra quella del nativo e quella del denaturato non diminuisce (Fig. 5).

Resta dunque da esaminare ciò che avviene nei primi 60 secondi seguenti la neutralizzazione. Si dovrebbe osservare all'atto della neutralizzazione

della soluzione una brusca diminuzione dell'effetto ipercromico dovuta al ristabilirsi dei legami tra le basi ancora vicine, seguita da una variazione più lenta (dello stesso ordine di τ) dovuta a quelle molecole che proseguono nel loro moto di srotolamento o che si riarrotolano fino a rinaturazione completa. A questo scopo abbiamo realizzato un dispositivo automatico di me-



Fig. 6. — Dispositivo per il rapido mescolamento di soluzioni nelle vaschette dello spettrofotometro.

scolamento rapido, atto a portare quasi istantaneamente il pH di una soluzione di DNA al valore di denaturazione e , dopo un tempo τ prefissato ad arbitrio, a riportarlo quasi istantaneamente al valore di neutralizzazione. Si tratta in sostanza di un raddoppio del dispositivo già usato per la misura del tempo di salita dell'effetto ipercromico (⁴⁰). Due siringhe azionate dallo stesso motorino a induzione iniettano al tempo $t = 0$ rispettivamente soluzione di NaOH 0,2 M e di NaCl 0,1 M nelle due *cuvettes* dello spettrofotometro a doppio raggio, in cui sono contenute due soluzioni identiche di DNA in NaCl 0,1 M. La prima soluzione passa quindi in condizioni di denaturazione, mentre la seconda viene semplicemente diluita, in modo da compensare l'effetto di diluizione della prima. Al tempo $t = \tau$, altre due siringhe

azionate da un secondo motorino a induzione, iniettano nelle stesse *cuvettes* dello spettrofotometro rispettivamente una opportuna soluzione acida che riporta il pH al valore di neutralizzazione e ancora una soluzione di NaCl per compensare l'effetto di diluizione. Un dispositivo elettronico fa partire il secondo motorino esattamente τ secondi dopo l'arrivo a fine corsa della prima coppia di siringhe. Il tempo τ può essere variato a piacere; i tempi di mescolamento coincidono praticamente coi tempi di iniezione e sono misurati da contatori elettronici a decadi al centesimo di secondo. L'uscita dello spettrofotometro è portata sull'asse verticale di un oscillografo catodico, la cui traccia orizzontale è svincolata automaticamente dallo stesso comando a pulsante che avvia il primo motorino. L'oscillografo è fotografato da una camera Du Mond con film Polaroid, Pola Pan 200. Le Fig. 6 e 7 mostrano alcuni particolari del dispositivo.



Fig. 7. — Dettaglio del dispositivo per il rapido mescolamento di soluzioni nelle vaschette dello spettrofotometro. Le due metà servono per l'iniezione rispettivamente della soda e dell'acido.

Un esempio dei risultati ottenuti è contenuto nella Fig. 8. Come si vede, all'atto della neutralizzazione si ha una diminuzione dell'effetto ipercromico avente un tempo di discesa dello stesso ordine del tempo di salita iniziale. È quindi escluso che in questa fase del processo si possano avere srotolamenti o riavvolgimenti parziali di molecole. Successivamente non si nota più alcuna variazione dell'effetto ipercromico, il che sembra dimostrare che effettivamente ogni processo di denaturazione o rinaturazione risulta bloc-

cato all'atto della neutralizzazione della soluzione di DNA. Anche la seconda interpretazione sembra dunque da escludersi.

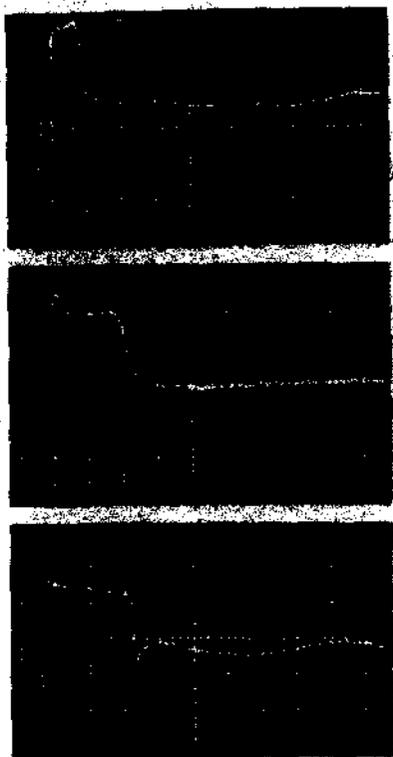


Fig. 8. — Risultati ottenuti mediante il dispositivo per il rapido mescolamento. Per vari tempi di permanenza a pH elevato (2, 4 e 12 secondi rispettivamente) si vede che il ritorno dell'effetto ipercromico al valore residuo dopo neutralizzazione è immediato e che questo valore rimane costante. La velocità della traccia, per le prime due fotografie è di 0,5 div/secondo; per la terza di 0,2 div/secondo.

c) *Rottura della biforcazione delle molecole semidenaturate.*

La terza interpretazione dei nostri risultati, che le molecole semidenaturate si rompano in buona parte nel punto di biforcazione, quando si neutralizza la soluzione o subito dopo, sembra a prima vista molto plausibile. Anch'essa tuttavia non si accorda con alcuni risultati sperimentali, raccolti proprio allo scopo di controllarne l'attendibilità. Bisogna anche dire, prima di tutto, che non si vede alcuna ragione precisa perchè la denaturazione debba procedere regolarmente da un estremo della molecola verso l'altro: è molto più plausibile che lo srotolamento avvenga contemporaneamente un po' su tutta l'estensione della molecola, mentre le due estremità di questa ruotano in senso inverso. Inoltre anche ammesso che la denaturazione proceda regolarmente da un estremo all'altro della molecola, non si capisce perchè il DNA si debba rompere proprio nel punto di biforcazione. Tale punto può considerarsi un punto particolarmente debole nel corso della duplicazione, perchè

in tal caso esso è l'unico punto in cui il DNA è a elica singola. Ma nel nostro caso, l'intera porzione denaturata della molecola è in ogni punto altrettanto fragile e quindi in ogni punto ugualmente soggetta a rotture.

Se poi questa interpretazione è quella corretta si possono fare delle previsioni precise sull'andamento in funzione del tempo di denaturazione τ :

a) delle semiampiezze delle gaussiane costituenti il profilo delle due bande del nativo e del denaturato in gradiente di densità;

b) del coefficiente di sedimentazione delle due frazioni nativa e denaturata del DNA sotto esame.

Infatti, sia le semiampiezze delle gaussiane, sia il coefficiente di sedimentazione dipendono dal peso molecolare e tale dipendenza è nota sia per il DNA nativo, sia per il DNA denaturato.

La semiampiezza σ della banda varia in ragione inversa della radice quadrata del peso molecolare del relativo DNA. Nelle Fig. 9 e 10 (curva a) è calcolato l'andamento in funzione di τ di σ_n e di σ_d semiampiezza della banda del nativo e del denaturato rispettivamente, per un DNA che si dena-

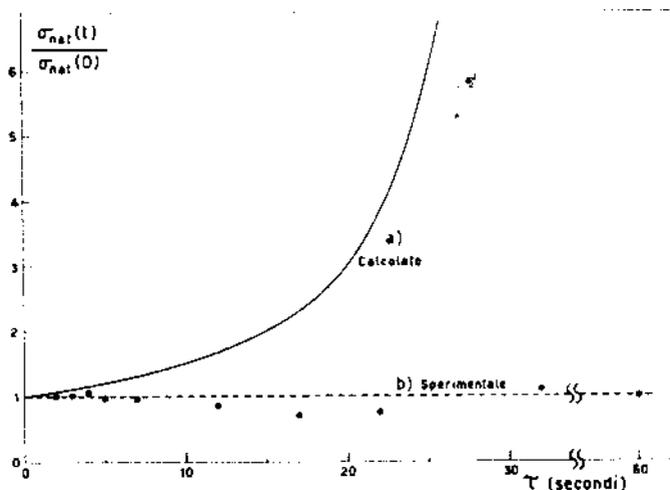


Fig. 9. — Andamento in funzione di τ , tempo di permanenza a pH 12,5, per l'ampiezza della banda data in gradiente di densità di CsCl dalla frazione nativa (relativa all'ampiezza misurata per $\tau = 0$) per DNA di T2 parzialmente denaturato. La linea tratteggiata (b) mostra l'andamento sperimentale; la curva continua (a) è calcolata nell'ipotesi 3). (v. testo).

turi completamente in 30 s (come quello del fago T₂), le cui eliche si srotolino con velocità angolare costante, rompendosi nel punto di biforcazione all'atto della neutralizzazione. Le curve b mostrano invece l'andamento in funzione di τ sperimentalmente osservato per σ_n e σ_d , nel caso del DNA di

T₁. Come si vede tali andamenti sono qualitativamente diversi da quelli calcolati.

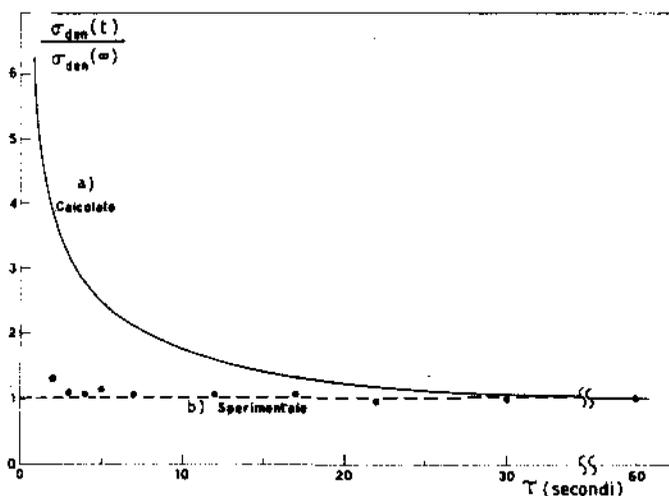


Fig. 10. — Andamento in funzione di τ , tempo di permanenza a pH 12,5, per l'ampiezza della banda data in gradiente di densità di CaCl dalla frazione denaturata (relativa all'ampiezza misurata per lo stesso DNA a denaturazione completa) per DNA di T2 parzialmente denaturato. La linea tratteggiata (b) mostra l'andamento sperimentale; la curva continua (a) è calcolata nell'ipotesi 3). (v. testo).

In modo analogo, le Fig. 11 e 12 riportano l'andamento in funzione di τ dei relativi coefficienti di sedimentazione, calcolati (46-48) e misurati nel caso del T₁. Anche qui non vi è accordo tra dati calcolati e dati sperimentali.

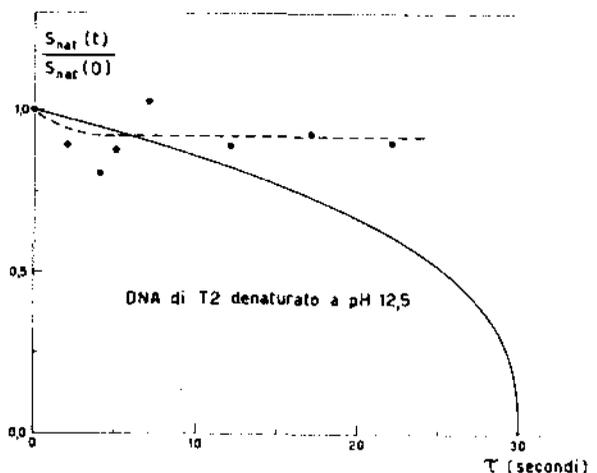


Fig. 11. — Andamento in funzione di τ per il coefficiente di sedimentazione della frazione nativa (relativo a quello misurato per lo stesso DNA allo stato nativo) per DNA di T2 parzialmente denaturato. La curva tratteggiata mostra l'andamento sperimentale. La curva continua è calcolata nell'ipotesi 3).

Sembra quindi che anche questa terza interpretazione non si accordi con l'esperienza e vada quindi messa da parte.

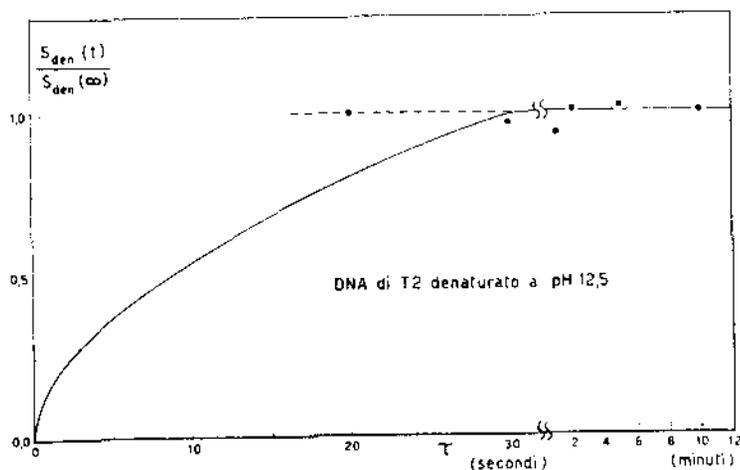


Fig. 12. — Andamento in funzione di τ per il coefficiente di sedimentazione della frazione denaturata (relativo a quello misurato per lo stesso DNA a denaturazione completa) per DNA di T2 parzialmente denaturato. La linea tratteggiata mostra l'andamento sperimentale. La curva continua è calcolata nell'ipotesi 3).

d) *Inizio casuale a carattere quasi-catastrofico della denaturazione.*

Ci resta da prendere in esame la quarta ed ultima interpretazione possibile dei risultati da noi ottenuti. Essa consiste nell'ammettere che le curve come quella della Fig. 13 rappresentino, in funzione del tempo a partire

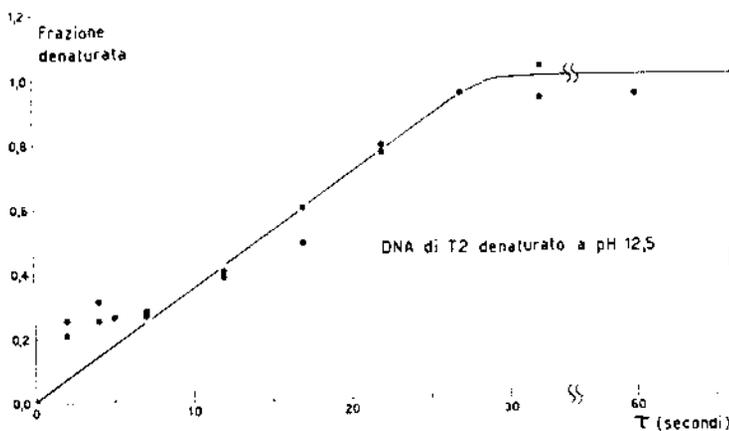


Fig. 13. — Andamento in funzione di τ , tempo di permanenza a pH 12,5, per la percentuale di materiale che compare nella banda di densità corrispondente al DNA denaturato, nel caso del DNA di T2.

dall'istante in cui si instaurano le condizioni di denaturazione, la frazione di molecole che ha già subito la denaturazione completa, mentre le molecole restanti sono per la maggior parte ancora allo stato nativo.

Per quanto non abbiamo trovato finora dei risultati sperimentali che si oppongano a questa interpretazione, è tuttavia necessario mettere in rilievo ch'essa presenta non poche difficoltà di varia natura.

In primo luogo essa è in contraddizione con le idee universalmente accettate sul fenomeno della denaturazione del DNA. Si dovrebbe ammettere infatti che nell'istante in cui si instaurano le condizioni di denaturazione, il processo di separazione delle due eliche non ha affatto inizio contemporaneamente in tutte le molecole. L'inizio di tale processo sarebbe in realtà un fatto casuale, dipendente o da processi interni di riassetamento della molecola, dopo la rottura dei legami a idrogeno (processi aventi vite medie loro proprie, ben definite), o dal realizzarsi localmente nella soluzione, di determinati incontri o di determinate fluttuazioni. Una volta iniziata, la separazione delle due eliche procederebbe poi con velocità assai maggiore di quanto si è sempre ritenuto finora, assumendo il carattere di un processo quasi-catastrofico.

Una delle esperienze da noi già pubblicate ⁽⁴²⁾ esclude che l'inizio della denaturazione dipenda solo da processi interni alla molecola. Infatti abbiamo potuto verificare che il tempo di salita dell'effetto ipercromico irreversibile dipende linearmente dalla viscosità del mezzo. È da tener presente che questo risultato può per altro interpretarsi benissimo nel quadro fino ad oggi adottato: se tale tempo di salita coincidesse col tempo che impiegano le due eliche di ciascuna molecola a srotolarsi, esso dipenderebbe proprio linearmente dalla viscosità del mezzo.

D'altra parte, le difficoltà meccaniche già rilevate a proposito del modello di Watson e Crick, risultano in questa quarta interpretazione notevolmente aggravate. Riprendiamo l'esempio del DNA del fago T₂. Dalla quantità del materiale di densità intermedia presente nel gradiente di densità, si può valutare (valendo l'interpretazione ora presa in esame) a circa 1 secondo il tempo effettivamente impiegato dalle due eliche di ciascuna molecola a separarsi completamente. Ciò comporta una velocità angolare nel moto di rotazione relativo delle due estremità del genoma di ben 20.000 giri al secondo e l'energia necessaria per vincere le forze di attrito del mezzo, nel moto di srotolamento, risulta 1.000 volte maggiore di quanto calcolato da Levinthal e Crane ⁽⁴⁷⁻⁴⁸⁾. D'altro canto, anche se l'indagine röntgenografica non ha potuto finora dire una parola definitiva e se non v'è prova che non esista una struttura sensibilmente diversa da quella proposta da Watson e Crick che s'accordi ugualmente bene coi dati di diffrazione, è indispensabile tuttavia non perdere di vista il fatto che questi dati hanno lo stesso un peso ed una importanza che non debbono essere sottovalutati. Qualunque tentativo di costruire un modello, che risolva le difficoltà

meccaniche e le apparenti contraddizioni, deve prima di tutto fare i conti con questi dati.

E se, anche, nulla vieta di concedere all'immaginazione una qualche libertà facendo dei tentativi in tal senso, l'unica conclusione scientificamente seria e sicura che per il momento si può trarre è che è ancora necessario estendere ed approfondire l'indagine sperimentale.

23 novembre 1966.

BIBLIOGRAFIA

- (1) WATSON, J. D. & F. H. C. CRICK, 1953. *Nature*, **171**, 737.
- (2) WATSON, J. D. & F. H. C. CRICK, 1953. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **18**, 123.
- (3) CRICK, F. H. C. & J. D. WATSON, 1954. *Proc. Roy. Soc. London Ser. A*, **223**, 80.
- (4) WILKINS, M. H. F., A. R. STOKES & H. R. WILSON, 1953. *Nature*, **171**, 738.
- (5) FRANKLIN, R. E. & R. G. GOSLING, 1953. *Nature*, **171**, 740.
- (6) FRANKLIN, R. E. & R. G. GOSLING, 1953. *Acta Cryst.*, **6**, 673.
- (7) FRANKLIN, R. E. & R. G. GOSLING, 1953. *Acta Cryst.*, **6**, 678.
- (8) FRANKLIN, R. E. & R. G. GOSLING, 1953. *Nature*, **172**, 156.
- (9) WILKINS, M. H. F., W. E. SEEDS, A. R. STOKES & H. R. WILSON, 1953. *Nature*, **172**, 759.
- (10) FRANKLIN, R. E. & R. G. GOSLING, 1955. *Acta Cryst.*, **8**, 151.
- (11) WILKINS, M. H. F., 1956. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **21**, 75.
- (12) LANGRIDGE, R., W. E. SEEDS, H. R. WILSON, C. W. HOOPER, M. H. F. WILKINS & L. D. HAMILTON, 1957. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 767.
- (13) ZUBAY, C. & M. R. WATSON, 1954. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **5**, 51.
- (14) WILKINS, M. H. F. & G. ZUBAY, 1959. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **5**, 55.
- (15) HAMILTON, L. D., R. K. BARCLAY, M. H. F. WILKINS, G. L. BROWN, H. R. WILSON, D. A. MARVIN, H. EPHUSSEI-TAYLOR & W. A. SIMMONS, 1959. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **5**, 397.
- (16) WILKINS, M. H. F. & G. ZUBAY, 1959. *J. Mol. Biol.*, **1**, 171.
- (17) LANGRIDGE, R., H. R. NELSON, C. W. HOOPER, M. H. F. WILKINS & L. D. HAMILTON, 1960. *J. Mol. Biol.*, **2**, 19.
- (18) LANGRIDGE, R., D. A. MARVIN, W. E. SEEDS, H. R. WILSON, C. W. HOOPER, M. H. F. WILKINS & L. D. HAMILTON, 1960. *J. Mol. Biol.*, **2**, 38.
- (19) MARVIN, D. A., M. SPENCER, M. H. F. WILKINS & L. D. HAMILTON, 1961. *J. Mol. Biol.*, **3**, 547.
- (20) WILKINS, M. H. F., 1962. *Proc. 11th Annual Reunion Soc. Chimie Physique*, June 1961, Pergamon Press, Oxford, p. 15.
- (21) ARNOTT, S., M. H. F. WILKINS, L. D. HAMILTON & R. LANGRIDGE, 1965. *J. Mol. Biol.*, **11**, 391.
- (22) FULLER, W., M. H. F. WILKINS, H. R. WILSON & L. D. HAMILTON, 1965. *J. Mol. Biol.*, **12**, 60.
- (23) MARVIN, D. A., M. H. F. WILKINS & L. D. HAMILTON, 1966. *Acta Cryst.*, **20**, 663.
- (24) CAIRNS, J., 1961. *J. Mol. Biol.*, **3**, 756.
- (25) CAIRNS, J., 1962. *J. Mol. Biol.*, **5**, 407.
- (26) CAIRNS, J., 1962. *Nature*, **194**, 1274.
- (27) CAIRNS, J., 1963. *J. Mol. Biol.*, **6**, 208.
- (28) CAIRNS, J., 1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 43.

- (30) CAIRNS, J., 1966. *Sci. Am.*, **214**, fasc. 1, 57.
- (31) MESELSON, M. & F. W. STAHL, 1958. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 671.
- (32) MAALE, O., 1962. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **26**, 45.
- (33) NAGATA, T., 1962. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **8**, n. 5, 348.
- (34) NAGATA, T., 1963. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **49**, 551.
- (35) NAGATA, T., 1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 55.
- (36) YOSHIKAWA, H. & N. SUEOKA, 1962. *Genetics*, **47**, 996.
- (37) YOSHIKAWA, H. & N. SUEOKA, 1963. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **49**, 559.
- (38) YOSHIKAWA, H. & N. SUEOKA, 1963. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **49**, 806.
- (39) SUEOKA, N. & H. YOSHIKAWA, 1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 47.
- (40) CHARGAFF, E., J. BUCHOWICZ, H. TÜRLER & H. S. SHAPIRO, 1965. *Nature*, **206**, 145.
- (41) AGENO, M., E. DORE & C. FRONTALI, 1966. *Atti Accad. Nazl. Lincei, Rend.*, **40**, 346.
- (42) AGENO, M., E. DORE & C. FRONTALI, 1966. *Atti Accad. Nazl. Lincei, Rend.*, **40**, 540.
- (43) AGENO, M., E. DORE & C. FRONTALI, 1966. *Atti Accad. Nazl. Lincei, Rend.*, **40**, 740.
- (44) AGENO, M., E. DORE & C. FRONTALI, 1966. 3° Convegno Nazionale di Biofisica e Biologia Molecolare, Roma, 6-9 luglio. Riassunti Comunicazioni, parte I, p. 2.
- (45) AGENO, M., E. DORE & C. FRONTALI, 1966. *Atti Accad. Nazl. Lincei, Rend.* (in corso di stampa).
- (46) CROTHERS, D. M. & B. H. ZIMM, 1965. *J. Mol. Biol.*, **12**, 525.
- (47) STUDIER, F. W., 1965. *J. Mol. Biol.*, **11**, 373.
- (48) LEVINTHAL, C. & H. R. CRANE, 1956. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **42**, 436.
- (49) LEVINTHAL, C., 1961. *Genetics Trans. Conf. Josiah Macy Jr. Foundation 1st Conf.*, p. 47.

On the nature of the pseudohybrids between denatured DNA and ribosomal RNA

MARIO AGENO, ELISABETTA DORE e CLARA FRONTALI

Laboratori di Fisica

Summary. — The properties of a special kind of complexes between denatured DNA and ribosomal RNA are summarized. It has been shown in previous papers that these complexes or « pseudohybrids », formed at room temperature, are partially resistant to RNAase; only one of the two DNA strands participates in their formation. The nature of the bonds and the macromolecular structure of the pseudohybrids, as well as their biological meaning, are far from being elucidated; the possibility that their formation could be due: *a*) to fortuitous complementarity of short nucleotide sequences, or, *b*) to hybridization of the DNA regions directing the ribosomal RNA synthesis, are here discussed and rejected. Making use of phage α DNA and of ribosomal RNA from its *non* infected host (*Bacillus megatherium*) it is shown that the complex formation is highly specific for only one of the two strands, and more precisely for the physiologically active strand (Fig. 1). The complex is partially resistant to RNAase, as expected (Fig. 2), and can be separated from the residual, non hybridized strands, by means of preparative CsCl density gradients (Fig. 3). The isolated complex is shown to be unable to anneal under suitable conditions (Fig. 4).

The specificity of the interaction with the heavy strand, and the fact that phage DNA should not contain the information for ribosomal RNA allow us to rule out hypothesis *a*) and *b*) respectively.

Riassunto (*Natura degli pseudoibridi tra DNA denaturato e RNA ribosomica*). — Vengono descritte alcune proprietà di un particolare tipo di complessi che si formano a temperatura ambiente tra DNA denaturato e RNA ribosomica. Tali complessi, o « pseudoibridi », sono parzialmente resistenti a RNA-asi, e interessano solo una delle due eliche del DNA. Non è nota la natura del legame, né la struttura macromolecolare degli pseudoibridi, né il loro significato biologico. Viene discussa e scartata l'ipotesi che la loro formazione dipenda dalla presenza di brevi sequenze casualmente complementari, oppure dalla ibridazione di quelle regioni del DNA che contengono l'informazione relativa alla sintesi dell'RNA ribosomico stesso. Facendo

uso del DNA estratto dal fago α e dell'RNA ribosomico estratto dal suo ospite non infettato, si dimostra che l'interazione riguarda in modo specifico una delle due eliche, e piú precisamente quella fisiologicamente attiva.

INTRODUCTION

The general picture of the process of RNA synthesis, as it results from the most recent works, involves a feature whose mechanism is not yet understood, namely the selection of one of the two DNA strands for the transcription into the RNA molecule, while the other strand seems, at least for our present knowledge, completely inactive.

Although this finding is reported only for some peculiar phage DNAs having an uneven distribution of the bases between the two strands (a peculiarity which makes feasible a separation of the two strands) it appears as not limited to these special cases, at least for what concerns the transcriptions of portions of the genetic message. The problem then remains of what makes one strand recognizable from the other by the RNA polymerase. What is certain is that RNA synthesized *in vivo*, and, under determined conditions also *in vitro*, is able to form hybrids with only one of the two DNA strands.

It appears relevant to this problem to note that a similar asymmetry has been observed for the formation of the « pseudo-hybrids » between ribosomal RNA and denatured DNA from several bacilli. Such complexes, described independently by ourselves (AGENO *et al.*, 1964; DORE, 1964; AGENO *et al.*, 1965; 1966) and by OPARA-KUBINSKA, KUBINSKY & SZYBALSKI (1964), are formed at room temperature by mixing solutions of ribosomal RNA and denatured DNA in 0.1M NaCl, at neutral pH.

They are revealed in CsCl density gradient by a band having a density higher than denatured DNA. Even in the presence of a large excess of RNA, only one half of the DNA strands undergoes this density shift.

The two bands, that of the complex and that of the residual denatured DNA, can be isolated, and through annealing experiments it is possible to show that the hybridizable portion corresponds to one of the two DNA strands, and the residual portion to the complementary one.

The complex is partially resistant to RNAase, whose effect is to reduce the density of the complex, without reaching the value of the non hybridized DNA strand. Several pieces of evidence suggest that the complex is formed between a rather long DNA strand and one or more RNA fragments. These are bound to the DNA strand for no more than 5-10 % of its length. RNAase probably digests the free ends of those fragments.

In contrast with the high degree of specificity in the recognition of one of the two DNA strands, it can be shown that the pseudohybrid formation

is not species-specific, since it is possible to obtain interspecific pseudohybrids among nucleic acids from several *Bacillaceae*.

The nature and the biological significance of the pseudohybrids are still obscure. The most obvious hypotheses which could be put forward to explain their existence are: a) the pseudohybrids are formed between short nucleotide sequences present in the DNA strand, which by chance correspond to sequences present in ribosomal RNA; b) the ribosomal RNA can complement at room temperature the cistrons containing the information for its own synthesis.

Furthermore it should be noted that our previous experiments do not completely rule out the possibility that messenger RNA, which could be present in small percentages in our preparations, could be responsible for the pseudohybrid formation. This latter possibility seems however unlikely since it is possible to obtain interspecific pseudohybrids.

Several arguments can immediately be found against either of the above hypotheses. First of all, it seems quite unlikely that RNA, either ribosomal or messenger, can hybridize with its DNA template in the conditions in which the pseudohybrid is formed, namely at room temperature, with an activation energy of the order of the thermal agitation energy. If this were true, the newly synthesized RNA molecule should tend to remain associated with its template, and one should postulate the existence of an *ad hoc* transport mechanism in order to detach every RNA molecule as soon as synthesized, and to allow the process of synthesis to go on.

On the other hand, the fortuitous complementation between short sequences of nucleotides of DNA and ribosomal RNA seems to be excluded, at least as a completely random phenomenon, since the pseudohybrids are formed with one of the two DNA strands only.

The present experiments provide definite evidence that the DNA strand which is involved in the formation of the pseudohybrid is the physiologically active strand. To this aim we used the DNA from phage α (active on *Bacillus megatherium*) whose strands have different buoyant densities in CsCl density gradient (AURISICCHIO *et al.*, 1961; 1962; CORDES, EPSTEIN & MARMUR, 1961) and are therefore easily resolvable in the analytical ultra-centrifuge; only the heavier strand of phage α DNA is transcribed *in vitro* (TOCCHINI-VALENTINI *et al.*, 1963). The selectivity observed is against hypothesis a) (see above). On the other hand, the use of a phage DNA which should not contain information for ribosomal RNA allows us to reject hypothesis b).

EXPERIMENTAL

The experiments consisted in the attempt to form a pseudohybrid molecule between thermally denatured α DNA (10 min at 100°C, followed by rapid cooling) and ribosomal RNA extracted from its non infected host (*Bacillus megatherium*) and partially degraded. RNA was extracted by the

method described by MONIER *et al.* (1962). It was not fractionated, since soluble RNA does not give the complex described, and messenger RNA of the host is certainly not complementary to the phage DNA. The result of an experiment of this kind is shown in Fig. 1. One can see that, when mixed at

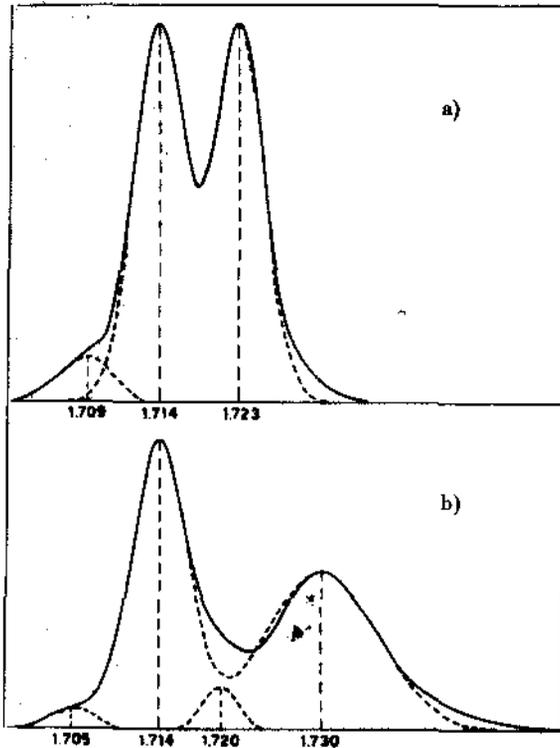


Fig. 1. — Densitometer tracings of U.V. photographs taken at equilibrium in CsCl density gradient after 24 hours at 44, 770 rpm, in the analytical ultracentrifuge Spinoz Mod. E.

a) 2 μ g DNA from phage α , thermally denatured (10 min at 100°C, quickly cooled);

b) 2 μ g denatured α DNA mixed at room temperature with 24 μ g partially degraded *B. megatherium* RNA.

(Ordinates: Arbitrary Units).

room temperature with an approximately tenfold amount of partially degraded RNA ($s = 5.4$ S), denatured α DNA shows a strongly different profile in CsCl density gradient. The peak of the heavy strand migrates at a higher density (1.730 instead of 1.723 g/cm³) becoming remarkably broader, while the peak of the light strand remains unaltered. On the basis of our previous results (ACENO *et al.*, 1964; 1965; 1966) the heavier band may be attributed to the pseudohybrid molecules. One should notice the presence of a small amount of non denatured material ($\rho = 1.705 - 1.709$ g/cm³). A minor band, probably due to a non hybridized residue of the heavy strand, is detectable at a density equal to 1.720 g/cm³, slightly lower than that of the heavy strand in the control. The existence of this latter band is revealed through the analysis of the profile into gaussian components, shown in the figures by the dotted lines.

This kind of analysis was performed by a Montecarlo method: calculations have been carried out with an IBM 7040 computer, using

the «Orango» program elaborated in our laboratory (CORTELLESA & FARCHI, 1965).

Fig. 2-a) shows the results of a similar experiment in which the proportion of RNA to DNA in the mixture had been increased.

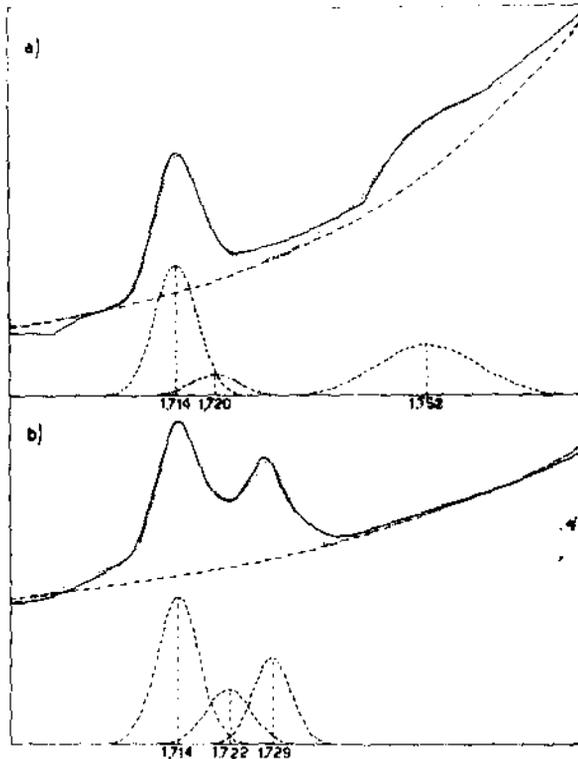


Fig. 2. — Densitometer tracings of U.V. photographs taken at equilibrium in CsCl density gradient.

a) 2 μg denatured α DNA and 110 μg partially degraded *B. megatherium* RNA, mixed at room temperature;

b) the same mixture as in a), treated with pancreatic ribonuclease (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 90 min at 37°C).

(Ordinates: Arbitrary Units).

The pseudohybrid band is still denser and broader, as expected on the basis of our previous results (AGENO *et al.*, 1964; 1965; 1966). The continuous background is due to RNA fragments not settled at their equilibrium position at the bottom of the cell because of their low molecular weight. A small, non hybridized fraction of the heavy strands is also present, at a density 1.720 g/cm^3 .

Treatment of the same mixture used in this experiment with pancreatic ribonuclease (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 90 min at 37°C) brings about a modification of the profile in CsCl density gradient, as shown in Fig. 2-b). The pseudohybrid band occupies now a position closer to that of the heavy strand of α DNA, but still significantly higher. The non hybridized residue of the heavy strand becomes more abundant, and slightly denser than in the non treated control [Fig. 2-a)].

These results could be easily explained if one considers that the strands of α DNA in our preparations are not intact. As regards the small non hybridized band with a density of 1.720 g/cm^3 , this could be due to fragments

of the heavy strand of α DNA, which do not contain hybridizable portions. The fact that its mean density is lower than that of the heavy strand in the control [Fig. 1-a)] suggests that the hybridizable portions of DNA are richer in G + C, in agreement with the finding of OPARA KUBINSKA, KUBINSKY & SZYBALSKI (1964).

As we have already pointed out, in previous papers (AGENO *et al.*, 1964; 1965; 1966), the RNAase effect probably consists in the digestion of the free ends of the RNA fragments not completely bound to the DNA strand. However the slight increase in the non hybridized component of the heavy strand indicates that a very small fraction of the pseudohybrid molecules is not resistant to RNAase.

In order to isolate the pseudohybrid band from the non hybridized DNA, preparative CsCl density gradients were used. To achieve the best resolution conditions, mixtures containing a fiftyfold excess of RNA, and not treated with RNAase, were used. Fig. 3 shows the optical density pat-

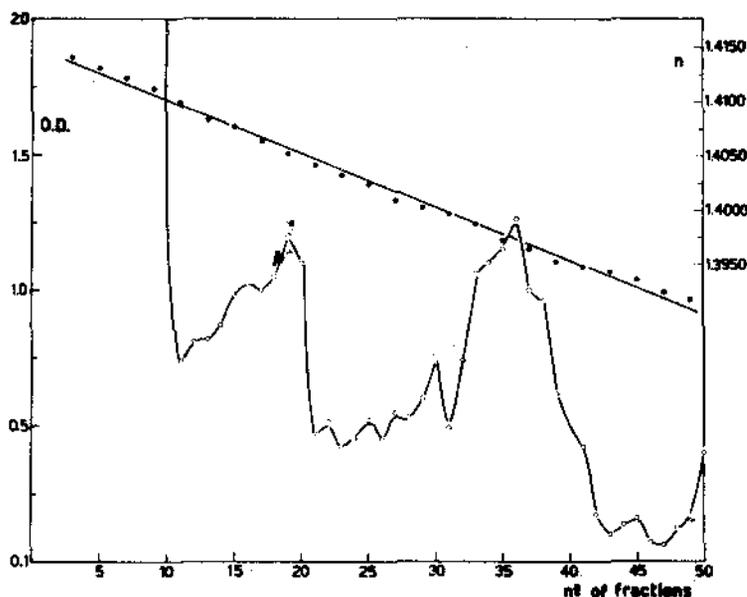


Fig. 3. — Optical density pattern of a preparative CsCl density gradient (76 hours centrifugation at 33,000 rpm in the SW 39 rotor of a Spinco L preparative ultracentrifuge); the scale on the right gives the index of refraction, the scale on the left the optical density for every fraction. Density increases to the left. The material present in fractions 15-20 corresponds to the pseudohybrid and is referred to as peak II.

tern of a preparative CsCl density gradient; two peaks, probably corresponding to the pseudohybrid and to the residual DNA, are clearly visible on a continuous background given by RNA fragments.

The fractions corresponding to the peak appearing at higher density (peak II) were collected and analysed in an analytical CsCl density gradient. Fig. 4-a) shows the profile obtained. One can see the isolated pseudo-hybrid band, completely free from residual, non hybridized DNA.

It is now possible to test directly on the isolated pseudo-hybrids the possibility that even a small fraction of them is formed with the light strand of phage α DNA. This was achieved by heating the isolated pseudo-hybrid at 65°C, in the presence of RNAase (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 4 hours at 65°C). In these conditions one should see some renatured material if complementary strands were present. The complete absence of any renatured material after such a treatment, shown in Fig. 4-b), shows that only one type of strand is present in the isolated fraction.

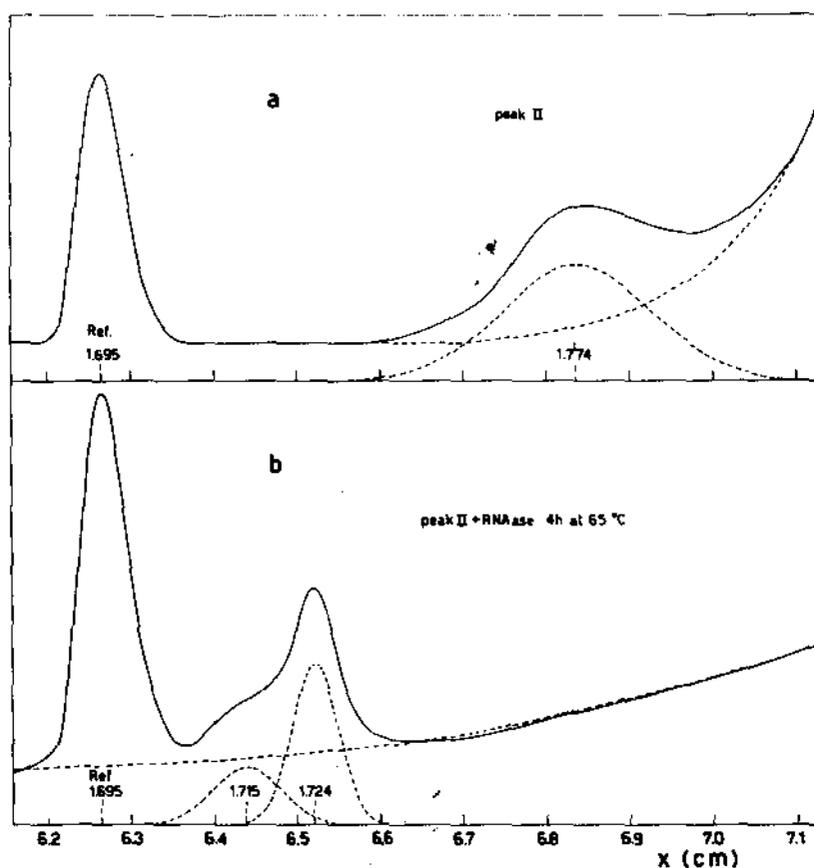


Fig. 4. — Densitometer tracings of U.V. photographs taken at equilibrium in CsCl density gradient.

a) The material of peak II (fractions 15-20 of the preparative gradient in Fig. 3) with a reference DNA (1.695 g/cm^3).

b) The same material after a 4 hours treatment at 65° C in the presence of RNAase (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$); reference DNA is *B. megatherium* DNA (1.695 g/cm^3).

Ordinates: Arbitrary Units).

DISCUSSION

The results reported above allow us to draw some conclusions concerning the nature of the pseudohybrid. They confirm in an unequivocal and direct way that only one of the two DNA strands is involved in the pseudohybrid formation, more precisely the strand which is transcribed *in vivo*.

This result rules out the possibility of a fortuitous complementarity between short nucleotide sequences in DNA and ribosomal RNA. Such sequences should in effect be randomly distributed on the two strands. Here a strong deviation from randomness is evident.

Furthermore, since the pseudohybrid is formed between denatured DNA from a bacteriophage, and ribosomal RNA from its non infected host, it seems very difficult to believe to the second of the hypotheses mentioned at the beginning, namely to the possibility that the pseudohybrids are due to ribosomal RNA binding those regions of the biologically active strand which function as template for the same RNA.

It would be difficult to understand, in effect, why a phage DNA should contain the information for the synthesis of the host ribosomal RNA, since it is well known that the phage reproduces itself utilizing all the biochemical machinery already present in the cell, and in particular the ribosomes pre-existing to infection.

One is therefore led to conclude that the sites on DNA on which the pseudohybrids are formed at room temperature, do not correspond to the cistrons directing the synthesis of the ribosomal RNA.

The biological meaning of the pseudohybrid is still an open problem. We would like to conclude by pointing out that a pseudohybrid of the type that had been described in the case of the nucleic acids from several bacilli, can be formed also between the biologically active strand of a phage DNA and the ribosomal RNA extracted from its non infected host. This finding suggests carefulness in the interpretation of those experiments in which the phage messenger RNA is defined only on the basis of its ability to hybridise with denatured DNA.

This work is a part of the research program in progress at the Physics Laboratory of the Istituto Superiore di Sanità with the support of the Consiglio Nazionale delle Ricerche.

21 settembre 1966.

REFERENCES

AGENO, M., M. ARCA, E. DORE, C. FRONTALI, L. FRONTALI & G. TECCE, 1964. *Rapporti Lab. Fisica Ist. Super. Sanità*, ISS 64/67.
 AGENO, M., E. DORE, C. FRONTALI, M. ARCA, L. FRONTALI & G. TECCE, 1965. *Atti Accad. Naz. Lincei, Rend. Classe Sci. Fis. Mat. Nat.*, 30, 325.

- AGENO, M., E. DORE, C. FRONTALI, M. ARCÀ, L. FRONTALI & G. TECCE, 1966. *J. Mol. Biol.*, **15**, 555.
- AURISICCHIO, S., A. COPPO, P. DONINI, C. FRONTALI, F. GRAZIOSI & G. TOSCHI, 1961. *Rapporti Lab. Fisica Ist. Super. Sanità*, ISS 61/33.
- AURISICCHIO, S., C. FRONTALI, F. GRAZIOSI & G. TOSCHI, 1962. *Nuovo Cimento Suppl.*, **25**, 35.
- CORTELESSA, G. & G. FARCHI, 1965. *Rapporti Lab. Fisica Ist. Super. Sanità*, ISS 65/10.
- CORDES, S., H. EPSTEIN & J. MARMUR, 1961. *Nature*, **191**, 1097.
- DORE, E., 1964. *Rapporti Lab. Fisica Ist. Super. Sanità*, ISS 64/48.
- MONIER, R., S. NAONO, D. HAYES, F. HAYES & F. GROS, 1962. *J. Mol. Biol.*, **5**, 311.
- OPARA KUBINSKA, E., M. KUBINSKY & W. SZYBALSKI, 1964. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **52**, 923.
- TOCCHINI VALENTINI, G. P., M. STODOLSKY, A. AURISICCHIO, M. SARNAT, F. GRAZIOSI, S.B. WEISS & E.P. GEIDUSCHEK, 1963. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **50**, 935.