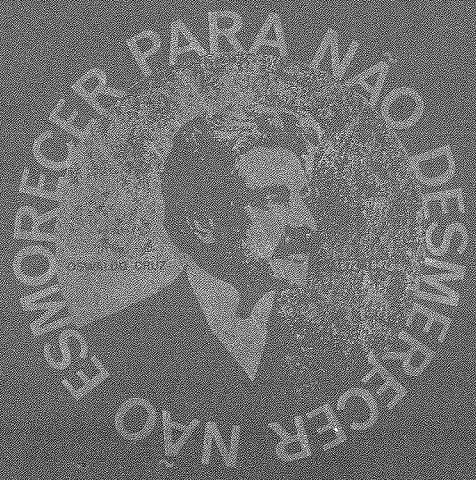
Volume 7 Número 2 Abr.–Jun. 1976

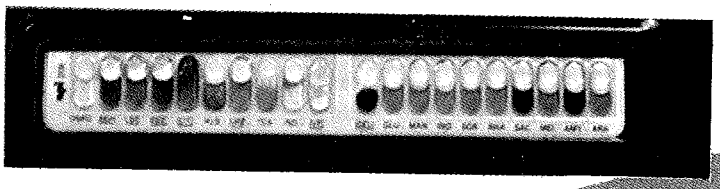
Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo – Brasil



api system

abriu o caminho da estandardização na identificação bacteriológica.

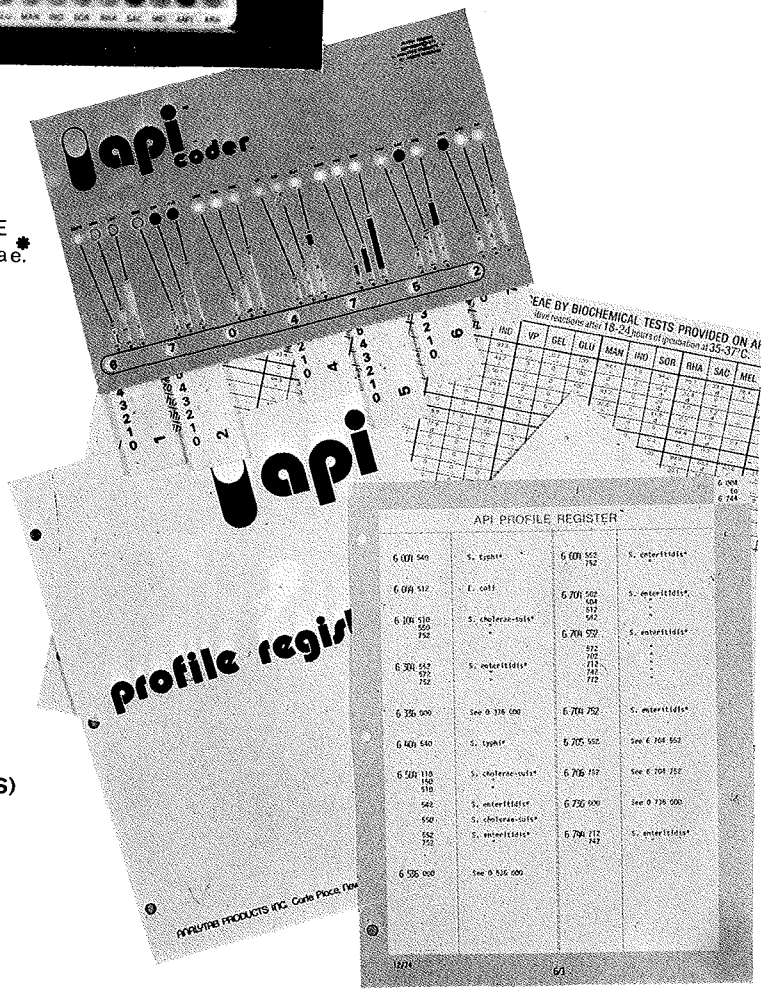


API 20 E e o SISTEMA DE LEITURA CODIFICADA põem à disposição dos laboratórios mais de 25.000 cepas registradas de ENTEROBACTERIACEAE e outros GRAM ⊖ não-Enterobacteriacea e.* Esse é o resultado de vários anos de colaboração entre utilizadores, centros de referência e os serviços de pesquisa API na França e na América. E, amanhã, esse número crescerá ainda mais com a sua participação.

*Pseudomonas, Aeromonas, Víbrio, Moraxela, etc.

Sempre com o mesmo princípio de microtécnica padronizada
API SYSTEM identifica também:

- **os germes anaeróbios (API 20 ANAERÓBIOS)**
- **os agentes das principais micoses encontradas em clínica (API 20 CÂNDIDA)**
- **germes os mais diversos (API 50 PESQUISA, API 50 LACTOBACILLUS)**
- **ou apenas as Enterobacteriaceae (API 10 SCREEN)**



BIOLAB-MÉRIEUX PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA.
Rua do Resende, 96-A – 2.° andar – Tels.: 221-4089 e 242-0050
RIO DE JANEIRO, RJ. – 20.000 – ZC-06

SÃO PAULO – BRASÍLIA – PORTO ALEGRE – RECIFE – BELO HORIZONTE

Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo – Brasil

Conselho Editorial Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo

Editor João Salvador Furtado
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Editores Associados Flavio Alterthum e Sergio O.P. da Costa

Aquisição por não-membros Assinatura anual para quatro números: Cr$ 120,00 para o Brasil; US$ 20.00 (via marítima) ou US$ 25.00 (via aérea) para o Exterior. Números avulsos: Cr$ 30,00 para o Brasil e US$ 6.50 (via aérea) ou US$ 5.00 (via marítima) para o Exterior. Cheques ou ordens de pagamento em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Editor.

Acquisition by non-members Annual subscription for four numbers: US$ 20.00 (surface mail) or US$ 25.00 (air mail). Single copies: US$ 6.50 (air mail) or US$ 5.00 (surface mail). Checks or money orders for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Editor's office.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria Gobert A. Costa, Presidente. Cláudio A. Jürgensen, Vice Presidente. Flávio Alterthum, Secretário Geral. João S. Furtado, Tesoureiro.

Conselho Científico Amadeu Cury, Augusto E. Taunay, A. Monteiro Filho, Carlos da Silva Lacaz, Ciro A. Peluffo, Dácio de A. Christóvão, Dirce Franco de Araujo, Eduardo O. Cisalpino, Gobert A. Costa, Homero S. Jobin, Jandira Planet do Amaral, João Xavier Viana, José Noronha Peres, José Oliveira de Almeida, Lúcio P. de Carvalho Lima, Luiz Siqueira Carneiro, Milton Fontes Magarão, Oswaldo G. de Lima, Otávio Barachini, Otto G. Bier, Paulo de Góes, Raymundo A.C. Moniz de Aragão, Seymor H. Hutner, Werner K. Maas.

Delegados Regionais ALAGOAS: Ayro Pontes Lima Bomfim (Maceió). AMAZONAS: Aurélia Lopes Castrillon (Manaus). BAHIA: Carlos Brenha Chaves (Salvador). CEARÁ: Eldair dos Santos Sátiro (Fortaleza). ESPÍRITO SANTO: Henrique Tommasi Netto (Vitória). GÓIAS: Maria Aparecida Muniz (Goiânia). GUANABARA: Altair Antunes Zebral (Rio de Janeiro) e Milton de Uzeda (Rio de Janeiro). MARANHÃO: Salomão Fiquene (São Luiz). MINAS GERAIS: Romain Rolland Golgher (Belo Horizonte). PARÁ: Zéa Constante Lins (Belém). PARAÍBA: Maria Marluce Melo Vasconcelos de Castro (João Pessoa). PARANÁ: Alceu Schwab (Curitiba) e Luiz Parelha Ruiz (Londrina). PERNAMBUCO: Diva Montenegro Melo de Azevedo (Recife) e Marcelo Magalhães (Recife). RIO GRANDE DO NORTE: Maria Raquel dos Santos (Natal). RIO GRANDE DO SUL: Sérgio Job Jobim (Porto Alegre), Newton Neves da Silva (Porto Alegre) e Tabajara Gaúcho da Costa (Santa Maria). RIO DE JANEIRO: Cláudio Armando Jürgensen (Niterói). SANTA CATARINA: Aquilles A. Cordova Santos (Florianópolis). SÃO PAULO: Deise Pasetto Falcão (Araraquara). Vicente Correa Miranda (Araraquara), Augusto Cezar Montelli (Botucatu), Izabel Yoko Ito (Ribeirão Preto), Antônio Walter Ferreira (São Paulo), Waldyr Giorgi (São Paulo) e Edécio Maluf (Sorocaba). SERGIPE: Raimundo Mendonça de Araujo (Aracaju).

Instruções aos autores

A Revista de Microbiologia publica trabalhos originais em todos os campos da microbiologia e da protozoologia. Revisões e atualizações serão publicadas a convite do conselho editorial.

Os manuscritos devem ser enviados em duplicata (original e uma cópia) para o Editor da Revista.

NORMAS GERAIS — Todo manuscrito submetido à Revista deve representar pesquisa original inédita e que não será publicada em outro órgão. Os trabalhos podem ser redigidos em português, espanhol ou inglês. Se aceitos pela Revista, não poderão ser reproduzidos, mesmo em partes, sem permissão oficial dos Editores.

A Revista segue, essencialmente, o "Style Manual for Biological Journals" (2ª edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (*Genetics*, 54: 61, 1966). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras da IUPAC-IUB (*J. Biol. Chem.*, 241: 527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nano (n) e pico (p), ao invés de milimicro (mμ) e micromico ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm; 10^{-6}m), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm; 10^{-9}m), ao invés de milimicro (mμ); e Angstroms (A; 10^{-10}m). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microgramos por mililitros (μg/ml) ou microlitros por litro (μ litros/litro). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA DE MICRORGANISMOS — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (7ª ed., 1957) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Bergey deverá ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo.

Quando um nome novo for proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

FORMA DO MANUSCRITO — Os trabalhos devem ser datilografados em papel branco, comum, tamanho ofício, em espaço duplo ou triplo, deixando-se o mínimo de 3 cm de margens laterais, superior e inferior. Títulos de capítulos de primeira ordem devem ser centrados, incluídos essencialmente pela ordem: **Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências Bibliográficas.** Os de subcapítulos devem ser junto à margem esquerda.

A *página-título* deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, centrado usando-se letras maiúsculas somente quando obrigatórias, (ii) o(s) nome(s) do(s) autor(es) com maiúsculas e minúsculas normalmente usadas e (iii) afiliação como nota de rodapé, indicada por asterisco.

O *resumo* não deverá ultrapassar 250 palavras. Os trabalhos redigidos em inglês devem ser acompanhados de um título e resumo em português; os redigidos em português e espanhol, de um título e resumo em inglês. O resumo na língua do trabalho e o título com resumo na outra língua devem ser datilografados em página separada do restante do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — No texto, as referências devem ser citadas por número. Os sobrenomes de dois autores devem ser separados por &; quando houver mais de dois autores, a separação é feita por ponto e vírgula e o último por &. Na secção **Referências Bibliográficas,** as citações devem ser por ordem alfabética de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas sequencialmente. Os artigos em periódicos devem ser citados na seguinte ordem: nome(s) do(s) autor(es) em maiúsculas, título do trabalho, nome do periódico (abreviado de acordo com o World Medical Periodicals), número do volume, número do fascículo (quando desejado; colocado entre parênteses), número da primeira e da última página do artigo, e ano da publicação.
Exemplo:

WEISER, O.L. & EMERSON, J.S. — Selective screening for quantitative urine cultures. *Amer. J. clin. Path.*, 45:649-650, 1966.

Quando puder ocorrer confusão com o título do periódico, o local da publicação deverá ser mencionado entre parênteses, após a abreviação. Exemplo: *Publ. Hlth Rep. (Wash.).*

Citações de livros devem ter a seguinte ordem: autor(es), título, edição, local, editores e data. Exemplo:

MILLER, S.E. — A textbook of clinical pathology. 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1960.

Citações de "resumos", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionadas no texto, mas não serão aceitas como referências bibliográficas.

TABELAS — Devem ser numeradas em arábico e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na secção correspondente.

ILUSTRAÇÕES — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no dobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com retícula devem ser feitas em papel brilhante, com contraste adequado para reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob TABELAS. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

NOTAS BREVES — Não devem exceder a 500 palavras e o respectivo resumo não mais do que 25. O(s) autor(es) deve(m) consultar um número da Revista para familiarização com a forma e o estilo.

SEPARATAS — Serão fornecidas, gratuitamente, 10 separatas por artigo. Para encomendas maiores, o(s) autor(es) deve(m) entrar em entendimento com o Editor, correndo as despesas por conta dos interessados.

Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 7 Abril-Junho 1976 Número 2

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 7(2)

CONTEÚDO – CONTENTS

Artigos originais

Comparação das propriedades de interferon de células L estimuladas por diferentes indutores. I. Cinética de liberação e sensibilidade à actinomicina D [*Comparison of the characteristics of the interferon from L cells stimulated by different inducers. I. Kinetics of the liberation and resistance to actinomycin D.*] – Romain Rolland Golgher, Maria de Lourdes Petrillo Peixoto, José Mário da Silveira Mezencio e Paulo Cesar Peregrino Ferreira... 31

A new leptospiral serotype isolated in Salvador, Bahia State – Irene Silva 35

Revisão:

RNA ribossômico em procariotos: estrutura e síntese [*Ribosomal ribonucleic acid of prokaryotes: structure and synthesis*] – Bianca Zingales e Walter Colli 38

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Sócios Patrocinadores

BIOLAB-MÉRIEUX – Produtos para Laboratórios Ltda.

Eli Lily do Brasil Ltda.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

Comparação das propriedades de interferon de células L estimuladas por diferentes indutores. I. Cinética de liberação e sensibilidade à actinomicina D*

Romain Rolland Golgher, Maria de Lourdes Petrillo Peixoto**, José Mário da Silveira Mezencio**, e Paulo Cesar Peregrino Ferreira***

Resumo

Células L, induzidas pelo complexo de ácido poliinosínico e ácido policitidílico (poli I:C), em presença de dietilaminoetil (DEAE)-dextrana, ou pelo vírus da doença de Newcastle inativado pela luz ultravioleta (NDV-UV), liberaram interferon no meio de cultura. A liberação se iniciou após quatro horas de indução e a produção máxima ocorreu 12 a 14 horas depois do estímulo, para ambos os indutores. A actinomicina D, utilizada previamente à indução, diminui a produção dos dois interferons. Com as doses de 10, 3 e 1 microgramas/ml, a inibição é quase total sendo que com 0,3 microgramas/ml, o efeito é parcial. Dados da literatura mostram que, em certos animais e cultivos celulares, os interferons induzidos por NDV-UV e poli I:C têm cinética de produção e resistência à actinomicina D diferentes, sugerindo que uma célula possa sintetizar mais de um tipo de interferon. Concluíu-se que, no entanto, na amostra de células L estudada, estas características são semelhantes, indicando um único mecanismo de síntese para ambos interferons.

Summary

Comparison of the characteristics of the interferon from L cells stimulated by different inducers. I. Kinetics of the liberation and resistance to actinomycin D.
L cells stimulated by polyinosinic-polycytidylic acid complex (poly I:C) mixed with diethyl-aminoethyl (DEAE) dextran or by ultraviolet-inactivated Newcastle disease virus (NDV-UV), started to release interferon in culture media four hours after induction, a peak of production being reached within 12 to 14 hours, with both inducers. Treatment of L cells with actinomycin D before induction inhibited production of interferon by NDV-UV or poly I:C. The effect was almost complete with 10; 3; and 1 micrograms/ml and partial with 0,3 micrograms/ml. Literature data show that in some animals and tissue cultures, NDV-UV and poly I:C-induced interferons have different production kinetics and resistance to actinomycin D, suggesting that a cell can synthesize more than one type of interferon. However, it is demonstrated in this paper that in the strain of L cell studied, both interferons showed similar characteristics, suggesting that only one pathway has been involved in the synthesis.

Introdução

Os interferons são proteínas heterogêneas, mesmo quando produzidas pela mesma espécie animal (2). Admite-se que populações celulares diferentes, "in vivo", possam ser responsáveis pelo fenômeno já que, em culturas de tecido, células de diversos órgãos de uma única espécie sintetizam interferons com propriedades distintas (2). Entretanto, a capacidade de uma célula em sintetizar mais de um tipo de interferon é assunto controvertido. Em fibroblastos humanos de prepúcio (1, 3), fibroblastos de embrião de galinha (6) e em células primárias de rim de camundongo (11), as evidências indicam a possibilidade de uma resposta celular múltipla. Em células RK-13 de coelho, embora os interferons liberados por dois indutores mostrem diferenças, estas correriam por conta dos controles de síntese, e os interferons seriam produtos do mesmo gene (7).

A produção, purificação e algumas características do interferon de células L, induzido por NDV-UV foram estudadas (8), ensejando a sua comparação com o obtido após estímulo por poli I:C, em um cultivo celular homogêneo, a fim de se esclarecer se a resposta destas células à diferentes estimulações poderia dar origem a mais de um tipo de interferon.

* – Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.
** – Bolsista do CNPq.
*** – Bolsista da CAPES; Endereço atual – Departamento Autônomo de Saúde, Florianópolis, SC.

Material e Métodos

Cultivos celulares — Células L foram cultivadas em suspensão, em meio basal de Eagle (com salina para células em suspensão) adicionado de 10% de soro de cavalo ou bezerro; 0,12% de bicarbonato de sódio; 2,9% de L-glutamina, penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100 microgramas/ml).

Para experiências, 10 a 15 milhões de células L foram semeadas em garrafas redondas, de 500ml, com 50ml de meio idêntico ao acima descrito, com salina de Hanks, e as garrafas incubadas a 37°C, com 12 revoluções por hora (8).

A titulação de interferon foi feita em monocamadas de células L(MCN), multiplicadas em meio com solução de Scherer (60%), meio 199 (30%) e soro de cavalo inativado (10%). A esta mistura, acrescentava-se bicarbonato de sódio (0,03%) e antibióticos nas concentrações mencionadas (4,8).

Vírus — NDV, cepa Victoria, foi utilizado para indução de interferon. O vírus, mantido por um número desconhecido de passagens em ovo embrionado de galinha (de 11 dias), era multiplicado e titulado no mesmo hospedeiro (8).

Para a inativação de NDV por luz ultravioleta, o líquido alantóico era dialisado contra 20 volumes de salina tamponado com fosfato 0,01M, pH7,2 a 4°C, durante uma noite. Vinte ml da suspensão de vírus, em uma placa de petri de 10 cm de diâmetro, eram submetidos à luz ultravioleta, durante 20 segundos, numa dose de 5000 erg/seg. Durante a exposição, a placa era agitada mecanicamente, 90 vezes por minuto, em uma plataforma que se movia em torno de um eixo, com movimentos de amplitude de 2,5cm (4,8).

O vírus da estomatite vesicular (VSV), usado para titulação de interferon, amostra Indiana, sofreu um número não sabido de passagens em células L, sendo seu estoque também multiplicado nestas células. Para a titulação de VSV, células L(MCN), em garrafas de plástico de 25ml (Falcon Plastics Co., Los Angeles, California, EUA), drenadas, eram infetadas e, após uma hora a 37°C, as células eram cobertas com uma mistura de meio de crescimento, em concentração dupla, contendo vermelho fenol a 1:20.000 e agar 2,4% (Bacto Agar, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA), ambos a 45°C. As garrafas eram incubadas a 37°C, no escuro, e as unidades formadoras de placas (PFU) contadas após 2 a 3 dias (4,8).

Titulação de interferon (8) — A diálise dos materiais era feita contra tampão cloreto, pH2,0 e salina tamponada com fosfato, pH7,2. Adicionava-se 0,5ml de uma diluição de interferon em uma garrafa de 25ml de células L(MCN), que eram reincubadas a 37°C por 24 horas. Drenava-se o meio, e as garrafas recebiam 0,4ml de uma suspensão de VSV, contendo aproximadamente 100 PFU. A manipulação posterior era idêntica à descrita para titular o VSV.

O título de interferon era calculado como sendo a recíproca da diluição que causava 50% de redução no número de PFU do vírus. Uma unidade de interferon assim definida corresponde a 10 unidades do padrão internacional de interferon murino. Como padrão interno, toda titulação incluía uma preparação estandartizada de interferon murino, mantida a -20°C. A variação do título de um material, verificado repetidamente, na mesma partida de células, era de uma diluição.

Liberação de Interferon — Duas garrafas redondas de células L, para cada intervalo de tempo, foram drenadas e adicionou-se 0,6ml do indutor, por garrafa.

O NDV-UV foi acrescentado sem diluição logo depois do tratamento com UV; as garrafas foram incubadas a 37°C por uma hora e completava-se com meio para o volume de 10ml, procedendo-se a nova incubação a 37°C. Depois de 6 horas após a infecção, o primeiro material foi colhido, misturando-se os fluidos de duas garrafas, que eram submetidos a 500g, durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante era então dialisado e o interferon titulado. Da mesma forma, preparações foram obtidas às 8, 10, 12 horas, etc. até às 20 horas após a indução.

Com poli I:C, 100 microgramas do composto, juntamente com 5mg de DEAE-dextrana, por garrafa, foram deixadas em contacto com as células L por 4 horas, a 37°C. O líquido era desprezado, as garrafas lavadas com 25ml de solução salina de Hanks cada uma e 10ml de meio acrescentados, seguindo-se de incubação a 37°C. Os materiais foram coletados depois de 6, 8, 10, 12 e 20 horas e manipulados da forma descrita acima, sem, entretanto, serem dialisados. Em ambos os casos, a solução de Hanks e o meio eram pré-aquecidos a 37°C.

Sensibilidade à actinomicina D — Garrafas redondas de células L, em duplicata, tiveram seu meio desprezado e actinomicina D foi adicionada nas quantidades de 10; 3; 1; 0,3 e 0,1 microgramas por ml num total de, respectivamente, 50; 15; 5; 1,5 e 0,5 microgramas por garrafa. Após uma hora a 37°C, o excesso de líquido foi desprezado e as garrafas divididas em dois lotes. O primeiro foi induzido por NDV-UV e o segundo por poli I:C, misturado com DEAE-dextrana, sendo incluído controles, sem tratamento com o antimetabólito. As condições de indução foram iguais às descritas acima e o tempo de coleta de todos os materiais foi de 24 horas.

Drogas — Poli I:C foi adquirido de "Miles Laboratories", Elkhart, Indiana, EUA. Dissolvido em salina tamponada com fosfato 0,007M, pH7,0 e esterilizado

em filtro Millipore 0,45 micrômetros ("Millipore Co.," Bedford, Massachusetts, EUA). DEAE-dextrana foi fornecida por "Pharmacia Fine Chemicals", Uppsala, Suécia e dissolvido e filtrado conforme descrito acima.

A actinomicina D, estéril, era originária da "Merck, Sharp e Dohme", Rahway, Nova Jersey, EUA e dissolvida em pequeno volume de álcool etílico e depois em meio B.

Os meios e demais materiais para cultura de tecidos eram procedentes do Baltimore Biological Laboratories, Baltimore, Maryland, EUA e os soros do Grand Island Biological Laboratories, Grand Island, Nova Iorque, EUA.

Resultados

Cinética de liberação de interferon — Quantidades mensuráveis de interferon apareceram no meio de cultura seis horas após o estímulo com NDV-UV ou poli I:C (fig. 1). Tentativas de se demonstrar interferon nas células induzidas com poli I:C antes deste tempo, diminuindo-se o período de contacto do complexo com as células para duas horas e colhendo-se o meio duas horas após, deram resultados negativos.

Na curva de produção de interferon estimulado pelo vírus, depois de uma fase logarítmica, entre 6 e 10 horas após a indução, a liberação atinge níveis máximos, e se estabiliza no período de 12 a 20 horas. Com poli I:C, a cinética foi semelhante, assim como os títulos de interferon alcançados (Fig. 1).

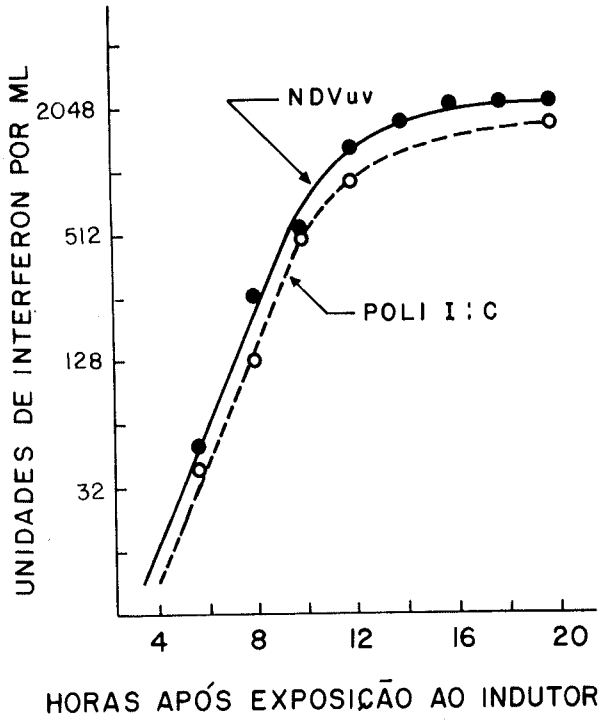


Fig. 1 — Cinética de liberação dos interferons de células L.

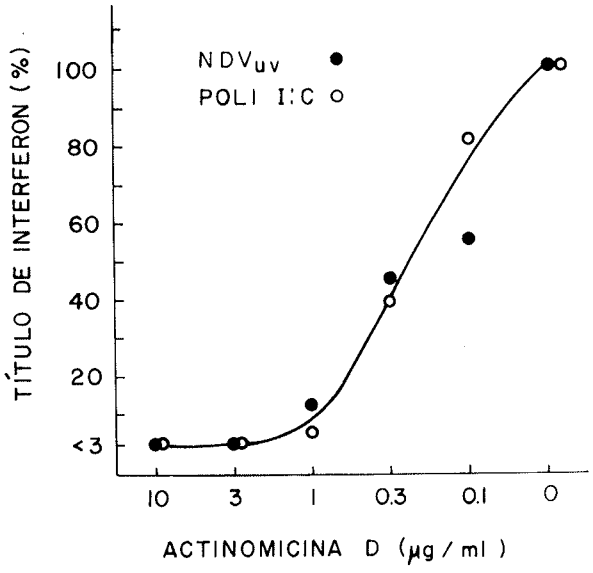


Fig. 2 — Inibição da produção de interferons induzidos por NDV-UV e poli I:C por actinomicina D.

Sensibilidade à actinomicina D — A Figura 2 representa os resultados de uma experiência típica. Com as doses de 10 e 3 microgramas/ml, a actinomicina D inibiu a produção de ambos interferons de modo praticamente total. Com 1 micrograma/ml, a diminuição dos títulos foi acentuada. Concentrações menores (0,3 e 0,1 microgramas/ml) não foram capazes de reduzir a liberação de interferon de modo constante, conforme ficou demonstrado em outros experimentos. Neste que está ilustrado, contudo, com 0,3 microgramas/ml ainda foi possível demonstrar um efeito parcial. Com 0,1 microgramas/ml, a inibição não pode ser comprovada, pois a diferença dos títulos está dentro do erro experimental da dosagem de interferon.

Conclui-se, portanto, que a actinomicina D inibe a síntese de ambos os interferons com igual eficácia.

Discussão

Ao contrário de nossos achados em células L, a exposição de populações homogêneas de células a diversos indutores leva, muitas vezes, a curvas de liberação de interferon diferentes. Em células RK-13 de coelho, quando a indução é feita por NDV, o interferon é produzido de 8 a 40 horas após o estímulo, com o máximo sendo atingido entre 10 a 25 horas; com poli I:C, o pico de liberação ocorre

entre 3 a 4 horas após o contacto com o indutor, e o aparecimento de interferon no meio cessa às 10 horas (7). Títulos mais altos de interferon de macrófagos peritoneais de camundongo e fibroblastos humanos de prepúcio, quando tratados por NDV ou statolon, ocorrem entre 20 e 24 horas, ao passo que, com poli I:C, isto se dá entre 8 e 10 horas (3).

Estas diferenças, entretanto, podem significar apenas que os níveis de controle da síntese dos interferons sejam diferentes, embora o gene ou genes a serem desreprimidos sejam os mesmos (7); ou ainda, que o processo, quando iniciado por determinados indutores, fosse mais lento, conforme ficou demonstrado em células primárias de rim de coelho. Nestas células, quando o estímulo é dado unicamente por poli I:C, o interferon é liberado no meio em maior quantidade dentro de 3 a 4 horas; misturado o complexo com DEAE-dextrana, a produção de interferon é protraída, sendo que os títulos permanecem elevados até a 30 horas (13).

A actinomicina D, posta em contacto com as células L, diminuiu a produção de interferon induzido tanto por NDV-UV como por poli I:C. Este antimetabólito inibe cerca de 98% do RNA transcrito em células normais (10), embora alguns investigadores apontem outros efeitos (4). Em conseqüência, há necessidade da síntese de RNA mensageiro para a codificação da própria molécula ou de proteína(s) ativadora(s) dos interferons estudados.

Um dos critérios para a classificação de um inibidor de vírus como interferon, é a sensibilidade de sua produção ao tratamento prévio das células com actinomicina D (5). Algumas exceções foram apontadas, em que o interferon induzido por poli I:C ou mostrou-se mais resistente que o estimulado por vírus, em fibroblastos humanos de prepúcio e macrófagos peritoneiais de camundongo (3) e em fibroblastos de embrião de galinha (6), ou ocorreu um aumento no título de interferon em células primárias de rim de coelho, tratadas com pequenas doses de actinomicina D (12). Estes achados, entre outros, estimularam autores a aceitar a hipótese que uma célula pudesse sintetizar mais de um tipo de interferon.

Não foi possível demonstrar diferenças dos interferons induzidos por NDV-UV ou poli I:C quanto à cinética de liberação e à sensibilidade à actinomicina D, utilizada previamente à indução, em células L. Isto sugere apenas um sítio codificador de interferon na amostra utilizada. Todavia, estudos mais amplos são necessários para esclarecer a questão, sobretudo aqueles relacionados com as propriedades moleculares dos interferons focalizados.

Agradecimentos

Os autores agradecem a João Rodrigues dos Santos, Maria Lúcia Trindade e Bernadete de Jesus Martins a cooperação técnica e aos prof. Zigman Brener e José Noronha Peres a revisão do manuscrito, e também à SOMAI S.A., por parte dos ovos embrionados utilizados neste trabalho.

Esta pesquisa foi auxiliada pelo CNPq (TC 10836), Conselho de Pesquisas da UFMG, Convênio BNDE/ /FUNTEC 132 e pela CAPES.

Referências Bibliográficas

1. BAUSEK, G.H. & MERIGAN, T.C. — Simultaneous viral and nonviral interferon production in human cell cultures. *Proc. Soc. Exp. Med. Biol.,* 133:982-985, 1970.
2. FANTES, K.H. — Purification and physico-chemical properties of interferons, pp-171-200 *In*: FINTER, N.B. ed. Interferon and interferon inducers, 2nd. ed. Amsterdam, North-Holland Publishing Co., 1973.
3. FINKELSTEIN, M.S.; BAUSEK, G'H. & MERIGAN, T.C. — Interferons inducers in vitro: difference in sensitivity to inhibitors of RNA and protein synthesis. *Science,* 161:465-468, 1968.
4. GOLGHER, R.R. — Efeito bloqueador do interferon de células L sobre sua síntese. Tese de doutoramento, 108 pp, 1971.
5. LOCKART, R.Z., Jr. — Criteria for acceptance of a viral inhibitor as an interferon and a general description of the biological properties of known interferons, pp-11-27. *In*: FINTER, N.B. ed. — Interferon and interferon inducers, 2nd ed. Amsterdam, North Holland Publishing Co., 1973.
6. LONG, W.F. & BURKE, D.C. — Interferon production by double stranded RNA: a comparison of induction by reovirus to that by a synthetic double-stranded polynucleotide. *J gen. Virol.,* 12:1-11, 1971.
7. MOSES, L.W. & VILCEK, J. — Interferon induction in rabbit cells irradiated with UV light. *J. Virol.,* 13:646-651, 1974.
8. PAUCKER, K.; BERMAN, B.J.; GOLGHER, R.R. & STANCEK, D. — Purification, characterization, and attempts at isotopic labeling of mouse interferon. *J Virol.,* 5:145-152, 1970.
9. REED, L.J. & MUENCH, H. — A simple method of estimating fifty percent end-points. *Amer. J. Hyg.,* 27:493-497, 1938.
10. STERN, R.; TWANMOH, A. & COOPER, H.L. — Site of actinomycin resistant RNA synthesis in animal cells. *Exper. cell. Res.,* 78:136-142, 1973.
11. STEWART, W.E., II; GOSSER, L.B. & LOCKART, R.Z., Jr. — Distinguishing characteristics of the interferon responses of primary and continous mouse cell cultures. *J. gen. Virol.,* 13:35-50, 1971.
12. VILCEK, J. — Cellular mechanisms of interferon production. *J. gen. Physiol.,* 56:76-89s, 1970.
13. VILCEK, J.; BARMAK, S.L. & HAVELL, E.A. — Control of interferon synthesis: effect of diethyl-aminoethyl-dextran on induction by polyinosinic-polycytidylic acid. *J. Virol.,* 10:614-621, 1972.

A new leptospiral serotype isolated in Salvador, Bahia State*

Irene Silva**

Summary

Serological study of three strains of leptospires isolated from *Zygondotomys lasiurus* (Lund) and *Cavia a. aparea* (Erxleben) revealed a new serotype within the Australis group. *Leptospira interrogans serotype soteropolitana* is proposed for its designation and the epidemiologic importance emphasized.

Resumo

Novo sorotipo de leptospira isolado em Salvador, Estado da Bahia

Estudo sorológico de três linhagens de leptospiras, isoladas de *Zygondotomys lasiurus* (Lund) e *Cavia a. aperea* (Erxleben) em Salvador, Bahia revelou um novo tipo sorológico do grupo Australis, designado *Leptospira interrogans sorotipo soteropolitana.* Sua importância epidemiológica é sotolineada.

Introduction

During a survey of Leptospira from wild animals in Salvador city, several strains were isolated. Among these, the strains designated as R.68, R.93 and R.116 constituted a new serotype, by the serological tests performed. The first two strains were isolated from *Zygondontomys lasiurus* (Lund) and the third one from *Cavia a. aperea* (Erxleben). These host animals were trapped in woody areas of urban zones of the city.

Materials and Methods

The cultures were obtained from bits of kidney tissue pierced asseptically with sterile capillary pipettes and inoculated into tubes of Korthof-Babudieri's medim(1), to which 0,25% of Bacto Agar Difco was added. One week after incubation at 32°C, growth was estimated by macroscopic appearance of distinct Dinger's zone of growth which was confirmed by darkfield microscopy examination. All apparent negative cultures were also checked, during three month, at eight day intervals, by darkfield microscopy before being discarded. Positive cultures were transfered into normal liquid Korthof-Babudieri's medium and purified by Babudieri's technical procedure (2).

The identification of the three strains was made by preparing, with the strains R. 93 and R. 116, the corresponding immunesera from rabbits and comparing, by cross agglutination tests, the strains among themselves and the 18 reference strains of the pathogenic leptospiral serogroups of the collection in the WHO/FAO Leptospira Reference Laboratory, Rome (3), more precisely: M20, Veldrat Batavia 46, Celledoni, Hond Utrecht IV, Mus 127, Salimen, 3522C, Akiyami A, Ballico, Pomona, Moskva V, Hebdomadis I Pasteur, Van Tienen, Perepelicin DVAT 384, CZ 214, LT 821, I.C.F. and 3-C.

The antiserum R. 68 was not prepared because this strain was identical to the others, as shown in the Results.

Since cross agglutination tests indicated that the strains were closely related to the Australis group, cross agglutination tests with reference strains from all serotypes of this group were performed.

Cross agglutination – absorption tests were performed with the strains which showed a reciprocal antigenic affinity, which were repeated at least once.

* Study carried out under Prof. Brenno Babudier's direction, in 1972, at the WHO/FAO Leptospira Reference Laboratory (Istituto Superiore di Sanità), Rome, Italy.

** Fundação Gonçalo Moniz, Salvador, Ba. Fellow of the Istituto Superiore di Sanità, Laboratori di Microbiologia, Viale Regina Elena, 299, Roma, Italia.

Only the antiserum R. 116 was used in these tests.

The methods of the WHO/FAO Leptospira Study Group were followed (5,6).

Results

The results in Table 1 reveal a great cross reactivity among the strains studied and the members of Australis group, except for Munchen C90, Jez Bratislava and LT932. With the first two there was an insignificant antigenic relation, whereas there was none with the last strain.

The results of cross agglutinin-absorption tests in Table 2 show clearly that the strains do not belong to any serotype to which they were compared.

The WHO/FAO Leptospira Study Group establishes that "two strains are considered to belong to different serotypes if, after crossabsorption with adequate amount of heterologous antigen, 10% or more of the homologous titre regularly remains in *at least one* of the two antisera in repeated test". Consequently, strains R.68, R.93 and R.116 were recognized as a new serotype of Australis group, and the designation of *Leptospira interrogans serotype soteropolitana* proposed to name it.

Table 1

Cross-agglutination tests among strains R. 116, R. 93, R. 68 and reference strains of the Australis group.

Strains / Immunesera Titers	Ballico	Lora	München C90	Jez Bratislava	Fudge	Bangkok D92	LT 941	LT 932	Hawain (62-68)	Jalnà	LT 990	R. 116	R. 93	R. 68
Ballico 50.000	100	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	100	100
Lora 10.000	X	100	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	100	100
München C90 10.000	X	X	100	X	X	X	X	X	X	X	X	5	5	5
Jez Bratislava 500.000	X	X	X	100	X	X	X	X	X	X	X	0	0	0
Fudge 30.000	X	X	X	X	100	X	X	X	X	X	X	60	50	50
Bangkok D92 50.000	X	X	X	X	X	100	X	X	X	X	X	100	100	100
LT 941 100.000	X	X	X	X	X	X	100	X	X	X	X	100	100	100
LT 932 50.000	X	X	X	X	X	X	X	100	X	X	X	0	0	0
Hawain (62-68) 50.000	X	X	X	X	X	X	X	X	100	X	X	10	10	10
Jalnà 50.000	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	X	10	10	10
LT 990 50.000	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	20	20	10
R. 116 100.000	100	50	10	10	10	10	30	0	10	30	30	100	100	50
R. 93 100.000	100	50	10	10	10	10	30	0	10	30	30	100	100	50

The results are expressed as percentages of the titre of each immuneserum against the homologous strain, considered = 100.

Table 2

Cross agglutinin-absorption tests among strains R. 116, R. 93, R. 68 and members of the Australis group.

Immunesera	Absorbed with:	Tested with strains:			
		Ballico	R. 116	R. 93	R. 68
Ballico	R. 116	40	1	1,5	1,5
R. 116	Ballico	0	40	80	20
		Lora	R. 116	R. 93	R. 68
Lora	R. 116	40	0	1	1
R. 116	Lora	1	10	40	20
		Fudge	R. 116	R. 93	R. 68
Fudge	R. 116	40	1	1	1
R. 116	Fudge	0,625	20	40	40
		D92	R. 116	R. 93	R. 68
Bangkok D92	R. 116	40	0	0	1
R. 116	Bangkok D92	1	20	40	40
		LT 941	R. 116	R. 93	R. 68
LT 941	R. 116	40	0	0	0
R. 116	LT 941	0	1,5	1,5	1,5
		Hawain	R. 116	R. 93	R. 68
Hawain (62-68)	R. 116	80	0	0	0
R. 116	Hawain (62-68)	0,625	40	80	80
		Jalna	R. 116	R. 93	R. 68
Jalna	R. 116	20	0	0	0
R. 116	Jalna	0,625	40	40	40
		LT 990	R. 116	R. 93	R. 68
LT 990	R. 116	80	0	0	0
R. 116	LT 990	1	10	20	20

The results are reported in percentages; 100 represents the titre of pre-absorbed immuneserum against the homologous strain.

Discussion

The strains studied have great importance because they constitue a new serotype with epidemiologic implications.

The data gathered by Costa & col. (4) regarding the serological tests performed for leptospiral diagnosis in the Bacteriology Laboratory of Fundação Gonçalo Moniz (Salvador-Bahia) show that the Australis group occupies the second place concerning the positiveness of the tests.

In the leptospiral wild animals survery carried out by the author, the new serotype corresponds to 1,3% of the totality of 8,1% of positive animals and to 16,6% of the strains isolated so far.

These findings stress the epidemiologic importance of the new serotype. Its inclusion in the battery of antigens employed in leptospiral diagnosis, as well as in the future serological investigations in Bahia and in other zones of Brazil must be considered.

Acknowledgments

The host animals were classified by Doctor Luiz Carlos Souto, National Museum, Rio de Janeiro, whose help is gratefully acknowledged.

References

1. BABUDIERI, B. — Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 24:45-58, 1961.
2. BABUDIERI, B. — A new technique for the purification of newly *Leptospira* strains. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 39:939-940, 1968.
3. BABUDIERI, B. — List of Leptospira strains kept in the WHO/FAO Leptospira Reference Laboratory in Rome. *Ann. Ist. Super. Sanità*, 8:159-196, 1972.
4. COSTA, E. A. & SILVA, I. — Aspectos epidemiológicos da leptospirose em Salvador, Bahia. *Bol. Epidemiol.* 2(8):57-61, 64-68, 1970
5. JOINT WHO/FAO Expert Committee on Zoonoses. *Wld. Hlth. Org. Techn. Rep. Ser.*, No. 169, 1959.
6. Who Expert Group on Current Problems in leptospirosis Research, *Wld. Hlth. Org. Techn. Rep. Ser., No.* 380, 1967.

RNA ribossômico em procariotos: estrutura e síntese*

Bianca Zingales e Walter Colli**

Resumo

Esse artigo tem a finalidade de efetuar uma revisão sobre a estrutura e a síntese de RNAs ribossômicos em bactérias. Discutiu-se em detalhe as relações topológicas dos genes responsáveis pela síntese de rRNA no cromossomo bacteriano, bem como os mecanismos de sua transcrição pela RNA polimerase. Os mecanismos que regulam a síntese dessas moléculas foram analisados em diversas condições de crescimento e em situações que promovem a diferenciação. Analisaram-se as vias de processamento das espécies de rRNA durante a formação das subunidades ribossômicas maduras. Finalmente, incluiu-se uma comparação entre os processos de síntese e maturação dos rRNAS de procariotos e eucariotos.

Summary

Ribosomal ribonucleic acid of prokaryotes: structure and synthesis

This review deals with the structure and synthesis of rRNAs in bacteria. The topological relationships among the rRNA genes in the bacterial chromosome as well as their transcription mechanism by the RNA polymerase have been extensively discussed. The mechanisms regulating the synthesis of those molecules have been analysed under several growth and differentiation conditions. The processing pathways of the rRNA species during maturation of the ribosomal subunits have also been analysed. Finally, a comparison between synthesis and maturation of rRNAs in prokaryotes and eukaryotes was included.

Introdução

O processo de expressão gênica é resultante da interação de dois mecanismos: transcrição e tradução. O mecanismo de transcrição consiste na transmissão da informação gênica contida no DNA para moléculas de RNA, sendo mediado por uma classe especial de enzimas e regulado por fatores que governam o início e o término dessa reação. O segundo mecanismo consiste na tradução de moléculas de RNA informacional em cadeias polipeptídicas, utilizando, como intermediários, numerosos componentes pertencentes ao sistema de síntese proteica. Entre esses elementos se incluem moléculas de mRNA e tRNA, fatores de iniciação, alongamento e terminação e os ribossomos.

Caspersson (17) e Brachet (8) observaram que células ricas em RNA são ativas no processo de síntese proteica. O desenvolvimento de técnicas de centrifugação diferencial permitiu isolar, em grande quantidade, os diversos componentes celulares, facilitando sua análise. Usando-se essa técnica, concluiu-se que o RNA citoplasmático faz parte de estruturas especiais, que se apresentam sob forma de partículas pequenas, diferenciadas das mitocôndrias por seu tamanho e composição (18, 20, 59).

Claude (21) localizou essas partículas numa fração membranosa, isolada a partir de homogeneizados de fígado de rato, à qual deu o nome de "microssomos". Nessas estruturas, além do componente particulado rico em RNA e proteínas, denominado mais tarde "ribossomo" (19, 105), encontra-se um elemento membranoso rico em fosfolipídios e proteínas.

O estudo do envolvimento específico dos ribossomos no processo de síntese proteica foi iniciado no laboratório de Zamecnik na década de 1950 (74, 75). Mostrou-se que a incorporação de aminoácidos, *in vivo*, ocorre ao nível das ribonucleoproteínas (ribossomos) da fração microssomal.

As primeiras evidências da existência de ribossomos

* Com auxílio do Projeto BIOQ/FAPESP
** Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, CP 20780 Universidade de São Paulo

em células de procariotos derivaram da análise de micrografias eletrônicas de lisados bacterianos (79). Um estudo detalhado das propriedades físico-químicas dos ribossomos de diversos gêneros de bactérias foi realizado por meio de ultracentrifugação analítica (118), concluindo-se que essas partículas são encontradas em todos os grupos taxonômicos bacterianos analisados.

Os ribossomos, por serem os locais onde ocorre a síntese proteica, foram amplamente estudados. Tentou-se, primeiramente, analisar sua estrutura e composição, com a finalidade de obter-se elementos que possibilitassem o estudo do mecanismo de tradução. O campo fundamental de pesquisa revelou ser o de organismos procarióticos, já que neles não se verifica a presença de retículo endoplasmático.

A extensa revisão bibliográfica relativa à estrutura e função dos ribossomos, refere-se, sobretudo, às pesquisas realizadas em bactérias (4, 68, 96, 100, 103, 119).

Este trabalho limitar-se-á a uma revisão crítica dos dados relativos à análise estrutural do RNA ribossômico e seus genes correspondentes, bem como dos mecanismos de transcrição e processamento dessa espécie de RNA em procariotos.

CARACTERÍSTICAS GERAIS DE RIBOSSOMOS DE PROCARIOTOS

Os primeiros estudos sistemáticos sobre o isolamento e caracterização dos ribossomos foram iniciados no grupo de Watson, em Harvard e na Carnegie Institution em Washington, (112, 139, 140). Tais estudos comprovaram os seguintes aspectos:

a) Os ribossomos de procariotos, ativos na síntese proteica e isolados em concentração fisiológica de Mg^{2+}, apresentam um coeficiente de sedimentação de 70S;
b) Quando essas partículas são extraídas em baixa concentração de Mg^{2+}, observa-se sua dissociação em dois componentes menores, cujas velocidades de sedimentação são de 50S e 30S, respectivamente;
c) a adição *in vitro* de Mg^{2+} a subunidades 50S e 30S provoca a reconstituição da partícula 70S;
d) Os pesos moleculares dessas subpartículas foram calculados como sendo, para a 50S de $1,8 \times 10^6$ d, e para a 30S de $0,85 \times 10^6$ d;
e) na constituição de ambas participam, aproximadamente, 40% de proteínas e 60% de RNA, e uma pequena fração de poliaminas, descoberta mais tarde (128).

Vários autores verificaram, posteriormente, que, *in vivo*, o ribossomo também se encontra dissociado nas duas subunidades 50S e 30S, num estágio que antecede ou que sucede a um ciclo de síntese proteica (68, 83, 132).

Estrutura das moléculas de rRNA em procariotos

O tratamento das subunidades ribossômicas bacterianas 30S e 50S com agentes desproteinizantes e a análise das características hidrodinâmicas e de dispersão de luz dos produtos obtidos revelou que a primeira contém apenas uma molécula de RNA ribossômico, cujos coeficiente de sedimentação e peso molecular são, respectivamente, 16S e $0,55 \times 10^6$ d, e que a segunda contém duas espécies de rRNA, 23S e 5S, com pesos moleculares aproximados de $1,1 \times 10^6$ d, e $0,04 \times 10^6$ d, cada uma (66, 115, 130). Pode-se estimar que a esses pesos moleculares correspondam cadeias de 3200 nucleotídios para rRNA 23S, 1600 nucleotídios para rRNA 16S e 110 resíduos para o rRNA 5S.

Os estudos sobre rRNA voltaram-se, também, para a área da análise da composição de bases (Tabela 1) revelando que essa classe de ácidos nucleicos apresenta, como característica importante, uma assimetria no que diz respeito às altas quantidades de guanina

Tabela 1

Composição de Bases de rRNA de diferentes espécies bacterianas

Organismo	rRNA 23S Moles %					rRNA 16S Moles %					Referências	DNA % GC*
	C	A	U	G	GC	C	A	U	G	GC		
Aerobacter aerogenes	22,0	25,6	21,2	31,2	53,2	22,4	25,3	21,2	30,8	53,2	88	58
Bacillus subtilis	22,6	26,2	19,8	31,4	54,0	24,0	24,4	20,6	30,9	54,9	34	42
Diplococcus pneumoniae	19,2	25,4	24,0	31,1	50,3	18,9	25,4	24,8	30,7	49,6	152	38
Escherichia coli	21,0	25,5	21,0	32,5	53,5	22,3	24,2	21,3	32,1	54,4	130	52
Micrococcus lysodeikticus	20,8	23,0	22,7	33,3	54,1	22,1	22,0	24,1	31,5	53,6	152	72
Proteus vulgaris	21,3	26,5	20,8	31,4	52,7	23,0	24,7	20,4	31,9	54,9	88	36
Pseudomonas aeruginosa	22,1	26,3	21,5	30,0	52,1	22,5	26,1	21,1	30,3	52,8	4	66

* apud Sueoka (133)

em relação às baixas de citosina (99, 127); por outro lado, o conteúdo de G + C do RNA ribossômico apresenta um valor constante (entre 53 e 55%) para as várias espécies procarióticas estudadas (88, 90). Observou-se, ainda, que nas espécies de rRNA de alto peso molecular encontram-se, além dos nucleotídios de bases naturais, nucleotídios metilados (tanto nas bases nitrogenadas, como na porção do açúcar) e a presença de ácido pseudouridílico (38, 51, 56, 126).

A determinação da estrutura primária das classes de rRNA seria de extrema importância na compreensão de diversos problemas relativos à estrutura superior dessas moléculas, à interação com proteínas ribossômicas e à função do ribossomo. No entanto, apesar de existirem técnicas muito elegantes para a análise da seqüência nucleotídica do RNA (116), a tarefa ainda não foi totalmente cumprida, em virtude da alta complexidade das espécies de rRNA. Por essa razão, apenas conhece-se integralmente a estrutura primária do rRNA 5S de *E. coli* (14) e de *Pseudomonas fluorescens* (41), verificando-se que entre ambos existem certas características comuns. Das moléculas de rRNA 16S é conhecida, somente, a seqüência nucleotídica de alguns fragmentos grandes que constituem 70% da molécula (42, 45, 46). Recentemente, determinou-se a seqüência de um segmento da extremidade 3' (OH) do rRNA 16S de E. coli (120). A análise revelou que os três nucleotídios terminais são complementares aos codons terminadores dos mRNAs. Além disso, esses autores verificaram que um outro segmento do rRNA 16S contêm uma seqüência nucleotídica complementar a uma região constante, encontrada em vários mRNAs de bacteriófagos. Essa região participa da ligação dos mRNAs com a subunidade ribossômica 30S, o que estaria sugerindo o envolvimento do rRNA 16S durante a formação do complexo mRNA-30S.

Com base nos dados referentes à estrutura primária do rRNA tentou-se a construção de modelos de sua estrutura superior, não havendo ainda nada de conclusivo. A idéia mais aceita atualmente é a de que a cadeia polinucleotídica de rRNA em algumas regiões, dobra sobre si mesma, formando estruturas em "grampo"; em outras regiões, a cadeia estaria livre, podendo interagir com outros polinucleotídios (46, 120). A proposição dessa estrutura derivou da observação de que na molécula de rRNA 5S, 70 a 80% dos nucleotídios podem formar pontes de hidrogênio entre si (73).

Proteínas ribossômicas

O trabalho pioneiro de Waller & Harris (147) mostrou que os ribossomos bacterianos, além de rRNA, possuem muitos tipos de proteínas ribossômicas, que apresentam mobilidade eletroforética característica em gel de amido.

Embora haja certa discordância na literatura, com relação ao número de espécies proteicas que participam na composição de cada uma das subunidades ribossômicas, a maioria dos resultados parece indicar que na partícula 30S existem 19 a 22 proteínas diferentes, enquanto na partícula 50S existem aproximadamente 35 espécies distintas (27, 144). De acordo com estudos químicos e imunológicos, foi demonstrada a não existência de proteínas em comum entre as subunidades 50S e 30S (131, 144).

Durante algum tempo pensou-se que as populações de subunidades 30S e 50S fossem homogêneas quanto à sua composição proteica. Os trabalhos de Kurland & col. (67), contudo, demonstraram que tal suposição não é verdadeira. Esses autores, analisando quantitativamente as proteínas ribossômicas das subunidades 30S verificaram que nem todas as proteínas estão representadas em número equivalente a uma espécie por subunidade. Concluiu-se, então, pela existência de duas classes de proteínas ribossômicas: as unitárias, presentes em todas as partículas 30S, e as fracionárias, apenas em algumas dessas partículas. Baseando-se nessas e em outras evidências, aceita-se atualmente a idéia de ser heterogênea a população de ribossomos.

O envolvimento das proteínas ribossômicas da subunidade 30S no reconhecimento de RNAs mensageiros começa a ser comprovado (49). Os estudos baseiam-se no fato de que os ribossomos de *E. coli* iniciam, *in vitro*, a síntese das 3 proteínas do fago R 17, enquanto os de *B. stearothermophilus* reconhecem apenas a região da proteína A. Subunidades 30S, reconstituídas com rRNA 16S de uma ou outra espécie bacteriana e proteínas de *E. coli*, foram mais eficientes na ligação com RNA do fago R17 e na iniciação da síntese proteica do que subunidades reconstituídas com proteínas de *B. stearothermophilus*.

Na subunidade 50S, ao contrário do que foi descrito acima, a maioria das proteínas parece estar presente em quantidade correspondente a uma cópia por partícula (144).

Interação entre rRNA e proteínas no ribossomo

Os trabalhos de Traub & Nomura (142, 143) sobre reconstituição *in vitro* de subunidades 30S, a partir da adição de moléculas de rRNA 16S e de uma mistura de aproximadamente 20 proteínas ribossômicas isoladas, demonstraram a existência de uma interação específica entre esses componentes, numa cronologia bem determinada de eventos de associação que levam à formação de partículas 30S funcionais na síntese proteica. Na ausência de rRNA 16S bacteriano não ocorre a formação dessas partículas. Além disso,

rRNA 16S de levedura, rRNA 18S de rato, ou rRNA "16S", preparado a partir de rRNA 23S de *E. coli,* não conseguem substituir a função do rRNA 16S bacteriano no processo de reconstituição da subunidade 30S (95).

Partículas 50S de *B. stearothermophilus* (44, 97) e de *E. coli* (87), funcionais no processo de tradução *in vitro*, também foram reconstituídas a partir da adição de seus componentes isolados.

A interação entre cada proteína ribossômica e o rRNA ocorre, muito provavelmente, em sítios bem definidos deste último (91) os quais se apresentariam, preferencialmente, como regiões de nucleotídios não pareados (30).

Estudos sobre a ligação e liberação de rRNA 5S da partícula ribossômica maior demonstraram que, em presença de baixa concentração de Mg^{2+}, a subunidade 50S se desdobra, liberando-se a espécie de rRNA 5S. A subunidade ribossômica, nesta conformação, é incapaz de promover a síntese proteica *in vitro,* num sistema dependente de poli U (117).

Esses trabalhos, entre muitos outros, demonstraram que a interação entre os componentes ribossômicos é extremamente complicada e específica, e que dela depende o papel funcional dos ribossomos.

GENES RESPONSÁVEIS PELA SÍNTESE DE RNA RIBOSSÔMICO

Segundo uma definição (119), um gene ribossômico estrutural é aquele que contém a informação para a síntese de uma molécula de rRNA ou de proteina ribossômica. Nesse ensaio, tratar-se-á apenas da primeira classe de genes ribossômicos, ou seja, daqueles responsáveis pela síntese das espécies de RNA ribossômico, que serão denominados, numa forma abreviada, "genes para rRNA".

Considerações especulativas levam à suposição de que as pressões evolutivas, que atuaram sobre o genoma dos organismos, devem ter afetado, muito pouco, a composição nucleotídica dos genes para rRNA (39, 136).

Essa suposição foi formulada a partir da verificação de que o conteúdo de G + C de rRNAS, extraídos de diferentes espécies de procariotos, é constante (88, 90), embora a composição de bases do genoma desses organismos, refletida no seu conteúdo de G + C seja extremamente variável (133) (Tabela 1).

A semelhança entre composição de bases das moléculas de rRNA não reflete, necessariamente, semelhança de estrutura primária. Observou-se que rRNAS de organismos filogeneticamente distintos possuem, freqüentemente, muito pouca homologia de seqüências nucleotídicas, como ficou definido por experimentos de hibridização DNA-RNA (apud Pace (103)). Frente a isso, a característica de conservação evolutiva das moléculas de rRNA deve ser mais um reflexo da semelhança das estruturas secundária e terciária, do que da estrutura primária. Seriam, portanto, as estruturas de ordem superior do rRNA as responsáveis pelos mecanismos de interação com proteínas ribossômicas e pelo papel funcional do ribossomo na síntese proteica.

Dosagem de genes para rRNA

Os resultados de hibridização entre RNA ribossômico e DNA homólogo, (153, 154) purificados a partir de diferentes espécies bacterianas, foram de importância fundamental para o desenvolvimento do estudo de dosagem e mapeamento dos genes ribossômicos.

Determinou-se que os níveis de hibridização DNA-rRNA atingidos eram superiores àqueles esperados no caso de existir apenas um gene para cada espécie de rRNA. Admitiu-se, portanto, que esses genes seriam redundantes. A análise desses resultados permitiu constatar que existem genes distintos para as duas espécies de rRNA de alto peso molecular (155). Essa verificação, aliada a estudos de composição de bases e de seqüência nucleotídica desses rRNAS, permitiu concluir, de uma maneira definitiva, que os rRNAS 16S e 23S são espécies moleculares distintas.

Os estudos de hibridização em *E. coli* revelaram que existem 6 cópias de genes para cada espécie de rRNA de alto peso molecular (3), ao passo que em *B. subtilis* encontraram-se 9 a 10 genes para rRNA 16S e 23S e 3 a 4 genes para rRNA 5S (123).

A dosagem de genes para rRNA em todos os organismos analisados revelou que a fração do genoma bacteriano, complementar ao rRNA, é constante, e compreende 0,3 a 0,4% do DNA total (63, 98, 153, 154).

Mapeamento de genes para rRNA

A técnica mais utilizada, no campo da genética, para o mapeamento de genes no cromossomo é a da recombinação. Essa técnica, no entanto, não pode ser aplicada no caso dos genes para rRNA, em virtude da inexistência de mutantes dessa natureza. Para tal finalidade, outras técnicas tiveram que ser elaboradas, revelando-se contudo muito mais complexas.

A possibilidade de realização de experiências de transformação, em células de *B. subtilis,* permitiu o mapeamento de genes ribossômicos no cromossomo dessa bactéria. Vários autores (40, 98, 123) por meio da germinação sincronizada de esporos de *B. subtilis,* em meio contendo 5-bromouracila ou D_2O, conse-

guiram determinar a ordem de replicação de diversos genes e, portanto, sua posição no cromossomo em relação ao sítio de iniciação da duplicação.

Desses estudos concluiu-se que 60 a 80% dos genes responsáveis pela síntese de RNA 5S, 16S, 23S e de transferência localizam-se na porção inicial do cromossomo de *B. subtilis* entre os marcadores purA e purB, que regulam a síntese de purinas. O restante dos genes acha-se na porção terminal do cromossomo.

Em *E. coli*, comprovou-se também a existência de duas regiões de genes para rRNA compreendidas entre os tempos de replicação do mapa genético de 74 a 77 minutos e 54 a 59 minutos (31, 156). Os genes para rRNA em *E. coli* foram visualizados ao microscópio eletrônico (89).

Os estudos relatados acima não forneceram informação sobre as relações topológicas entre os genes para RNA ribossômico 5S, 16S e 23S. Na figura 1, apresentam-se os modelos possíveis de arranjo entre os genes para rRNA (apud Colli (24)).

Colli & Oishi (22), baseando-se nos dados de que DNA de fita simples consegue ser separado de DNA de dupla fita, por centrifugação em gradientes de densidade de Cs_2SO_4, em presença de íons de Hg^{2+} (92), verificaram que híbridos DNA-RNA também podem ser separados do DNA de fita simples, nesse tipo de gradiente. Essa propriedade dos híbridos foi usada para demonstar a ligação física entre os genes para rRNA 23S, 16S e 5S (22, 25) e para purificar os genes para rRNA de *B. subtilis* (23). Por meio de experiências de cohibridização concluiu-se que: a) os genes para rRNA, em *B. subtilis*, são fisicamente ligados em agrupamentos, os quais contêm um gene para cada espécie de rRNA, b) em cada agrupamento o gene para 5S estaria mais próximo do gene para 23S que do gene para 16S. Existiriam muito provavelmente, espaços "inertes" de DNA entre os agrupamentos de genes ribossômicos, além da possibilidade de haver outro espaço "inerte" entre um gene para 16S e outro para 23S, dentro do mesmo agrupamento (25). Utilizando-se técnica muito semelhante a essa descrita acima, concluiu-se que, em *E. coli*, os genes para rRNA 16S e 23S também são fisicamente ligados (37).

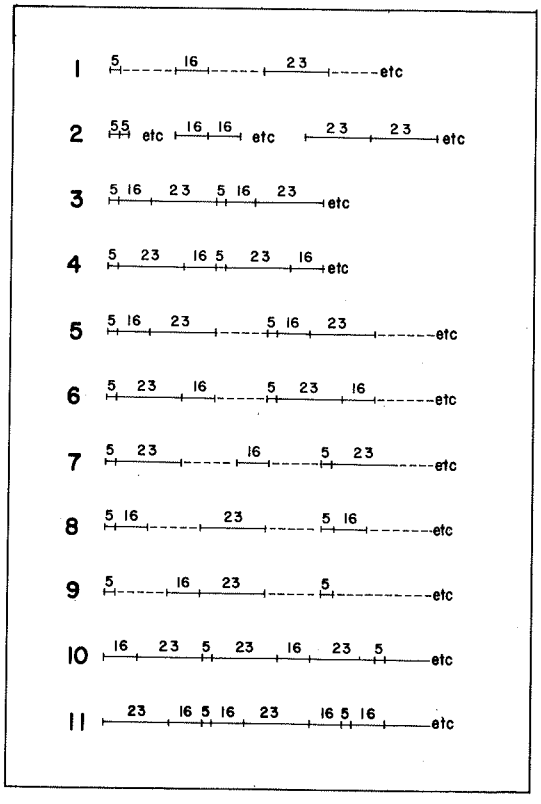


Fig. 1 — Alguns modelos possíveis de arranjo entre os genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico no cromossomo bacteriano. As linhas pontilhadas representam segmentos do cromossomo não homólogos a RNA ribossômico (apud Colli (24)).

Na região do cromossomo de *B. subtilis*, compreendida entre os genes pur A e pur B, estão situados, além dos genes para RNA ribossômico, dois genes para proteínas ribossômicas (124) e genes marcadores, representando, provavelmente, mutações para certas proteínas ribossômicas, os quais conferem resistência a antibióticos que atuam ao nível de ribossomo. No cromossomo essa proximidade poderia sugerir que os genes para rRNA ou os espaços "inertes" entre eles pudessem ser responsáveis pela síntese de proteínas ribossômicas. Analisando-se as relações topológicas entre esses marcadores de resistência e os genes para rRNA concluiu-se (125) definitivamente não ser esse o caso, como havia sido sugerido (101).

TRANSCRIÇÃO DE GENES PARA rRNA

Unidade transcripcional

Uma unidade transcripcional é definida como um segmento de DNA, delimitado por um sítio de iniciação e outro de terminação, transcrito ininterruptamente por uma molécula de RNA polimerase, que começa a síntese de RNA a partir do sítio de iniciação. A unidade transcripcional* pode conter um ou mais genes e, quando possui um sítio promotor demonstrável, recebe o nome de operon (102).

A verificação da existência de uma ligação física entre os genes para rRNA ribossômico (22, 25) colocou a questão de como esses genes seriam transcritos. Baseando-se nos dados dos trabalhos acima citados, podem-se construir modelos de transcrição para rRNA bacterianos (Figura 2).

* Para uma definição um pouco diversa daquela aqui apresentada consultar Szybalski & Col. (135) e Colli (26).

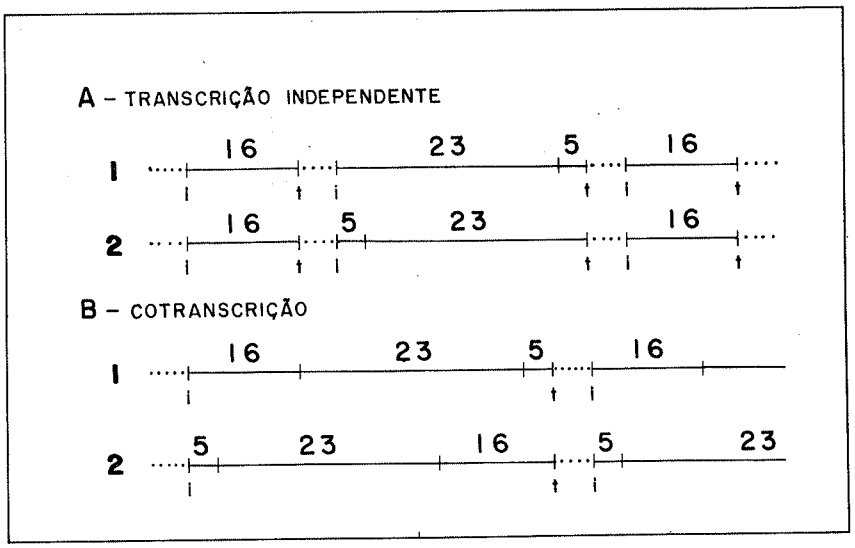


Fig. 2 — Modelos de transcrição dos genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico. A. Modelos de transcrição independente. B. Modelos de cotranscrição. Unidades transcripcionais delimitadas por i e t, onde: i = início e t = término da transcrição pela RNA polimerase.

O modelo A apresenta esquemas de transcrição independente em que os genes para rRNA 16S e 22S pertencem a unidades transcripcionais diferentes, transcritas, simultaneamente, por duas moléculas de RNA polimerase. No modelo A-1 a espécie de rRNA 5S seria transcrita depois da espécie de rRNA 23S, enquanto no modelo A-2, ocorreria o contrário (a estreita ligação física entre os genes para rRNA 23S e 5S torna bastante improvável a suposição de que essas espécies pertençam a unidades transcripcionais independentes; ver outras evidências a seguir). O modelo B representa o arranjo dos genes para as três espécies de rRNA na mesma unidade transcripcional e é, portanto, um esquema de cotranscrição, em que o gene para rRNA 16S seria transcrito antes (B-1) ou depois (B-2) do gene para rRNA 23S.

Métodos de análise do mecanismo de transcrição de genes para rRNA

A análise do mecanismo de transcrição dos genes para rRNA, no cromossomo de procariotos, foi feita por meio do uso de diferentes técnicas, descritas a seguir.

Mapeamento transcripcional por actinomicina D — O enfoque experimental adotado (5) consiste em usar actinomicina D como agente que perturba o processo de transcrição e em analisar o grau de inibição da síntese de diversas espécies de RNA, marcadas em presença de diferentes concentrações da droga. Já que a actinomicina D inibe a síntese de RNA, formando bloqueios ao longo do DNA, principalmente em regiões ricas em guanina (111), é de se esperar que, quanto maior for o gene para determinado tipo de RNA ou, então, quanto mais distante estiver, em relação ao sítio de iniciação, dentro da unidade transcripcional, mais sensível à inibição por actinomicina será a síntese de seu produto (6). Por meio dessa técnica, concluiu-se que, em *B. subtilis,* a) os genes para tRNA acham-se agrupados em unidades policistrônicas (de aproximadamente 100 cistrons); b) os genes para rRNA 16S e 23S são transcritos a partir de unidades independentes; e c) o cistron para rRNA 5S faz parte da unidade que contêm o gene para rRNA 23S. Este último estaria mais próximo do sítio de iniciação do que o gene para rRNA 5S. Os resultados desses autores, portanto, favorecem o modêlo A-1 referente à transcrição de genes ribossômicos em *B. subtilis* (Figura 2).

Mapeamento transcripcional por rifampicina — O antibiótico rifampicina é o derivado semi-sintético da rifamicina B (81). Estudos iniciais (138) mostraram que a rifamicina B, produto de fermentação de *Streptomyces mediterranei,* é um antibiótico de largo espectro de ação contra bactérias Gram positivas e negativas.

A rifamicina tem um efeito específico na inibição da síntese de RNA (69, 70). O isolamento da RNA polimerase bacteriana permitiu verificar que esta é o alvo do antibiótico (55, 122, 146, 148, 149), o qual forma estequiometricamente com a enzima um complexo de baixa constante de dissociação (150).

O sítio de ligação da rifampicina está localizado na subunidade β da RNA polimerase bacteriana (157), demonstrando-se que RNA polimerases, resistentes à

ação do antibiótico, possuem essa subunidade com mobilidade eletroforética alterada.

A ação da rifampicina na reação de transcrição é também altamente específica pois a droga inibe apenas a etapa de iniciação sem impedir o alongamento de cadeias de RNA já iniciadas no momento da adição da droga (106, 122).

As propriedades descritas acima apresentam a rifampicina como uma droga particularmente interessante na investigação de numerosos fenômenos celulares, dentre os quais, o estudo do mecanismo de transcrição gênica.

Quando se expõe uma cultura de bactérias, concomitantemente à rifampicina e a um precursor radiativo da síntese de RNA, a quantidade de marcação, que aparecerá em determinada espécie de RNA, é conseqüência do tamanho da molécula sintetizada e do número de RNA polimerases que transcrevem esse gene, após a adição da droga.

Ao analisar a organização transcripcional dos genes para rRNA certas premissas devem ser levadas em consideração: a) existe um número igual de genes para rRNA 16S e 23S; b) o gene para 16S tem a metade do tamanho do gene para 23S; c) as RNA polimerases, localizadas sobre os genes, estão igualmente espaçadas, donde se conclui que, sobre os genes para 23S existe o dobro de polimerases que existem sobre os genes para 16S; d) a velocidade de alongamento das cadeias de rRNA 16S e 23S é a mesma, deduzindo-se, portanto, que a freqüência de transcrição de seus genes é, também, a mesma.

Torna-se claro, a partir dessas premissas, que os valores de incorporação, encontrados em qualquer um dos componentes de rRNA após a síntese residual de RNA em presença de rifampicina, variam de acordo com o mecanismo de transcrição de tais genes. Para cada um dos modelos de transcrição, apresentados na Fig. 2, pode-se prever a razão de radiatividade incorporada nas espécies de rRNA 23S e 16S em presença do antibiótico (vide Pato & von Meyenburg (106)).

Usando rifampicina, para bloquear reiniciação da transcrição, e analisando as cadeias de RNA formadas após o bloqueio, vários autores obtiveram evidências de que, em *E. coli,* as espécies de rRNA 16S, 23S e 5S são cotranscritas nessa ordem pela mesma molécula de RNA polimerase, a partir de uma única unidade transcripcional (10, 35, 36, 106). Às mesmas conclusões chegou-se (52) usando a rifampicina para sincronizar o processo de transcrição em *E. coli.*

Estudos sobre a síntese de RNA em células de *B. subtilis,* realizados em presença de rifampicina, revelaram que, nessa espécie bacteriana, doses extremamente baixas do antibiótico são capazes de inibir ao máximo o processo de transcrição (29, 159). Inibindo-se a iniciação da transcrição e analisando-se o alongamento das cadeias de rRNA 16S e 23S em presença de rifampicina, em culturas crescidas em diferentes meios e temperaturas, Zingales (159) concluiu que em *B. subtilis* os genes ribossômicos são cotranscritos a partir de uma mesma unidade transcripcional, na qual o gene para 16S estaria em posição proximal em relação ao sítio de iniciação para a RNA polimerase. Nesses estudos, demonstrou-se ainda que a rifampicina não afeta o processo de associação entre o rRNA e as proteínas ribossômicas, e nem promove a degradação das espécies de rRNA recém-sintetizadas, ao contrário do que se verifica em presença de actinomicina D (1). Frente a esses resultados, o mecanismo de transcrição independente proposto por Bleyman & col. (6) para os genes ribossômicos de *B. subtilis* parece altamente improvável.

Estudos em mutantes "stringent" — Cepas de *E. coli,* com controle "stringent", limitam a transcrição de rRNA durante a remoção de determinado aminoácido do meio de cultura. A síntese de rRNA é reduzida a 10% e, a de mRNA, a 40%, daquela em condições normais de crescimento. Cepas de *E. coli* "relaxed", quando privadas de determinado aminoácido, apresentam uma redução da síntese de RNA total de, no máximo, 25% (71).

Outro tipo de análise corroborou os resultados obtidos com rifampicina para *E. coli.* Quando cepas "stringent" são privadas de um aminoácido essencial, ocorre uma diminuição intensa da velocidade de síntese de RNA, verificando-se, entre outros eventos, um bloqueio específico da etapa da iniciação da transcrição de genes para rRNA (129). Essa inibição é revertida pela adição do aminoácido essencial ao meio de cultura, o que resulta numa sincronia parcial da síntese de rRNA. Em células de *E. coli.* cuja transcrição foi sincronizada pela reposição do aminoácido essencial, verificou-se (64) que a síntese de rRNA 16S inicia-se antes que a síntese de rRNA 23S.

Mapeamento radiológico — Estudos baseados na técnica de mapeamento radiológico de unidades transcripcionais confirmam, também, todos os dados obtidos para *E. coli,* por outros métodos. Essa técnica fundamenta-se na observação de que, certas lesões provocadas no DNA por exposição à luz ultravioleta, causam a terminação prematura da transcrição no sítio da lesão (121). Nesse caso, a reiniciação só ocorre ao nível do próximo gene promotor.

Esse enfoque experimental é, basicamente, análogo àquele em que se usa actinomicina D para formar bloqueios no DNA e impedir a passagem da RNA polimerase (5).

Vários autores (53, 65, 121) mediram a velocidade de inativação da síntese das espécies de rRNA 23S, 16S e 5S, após a exposição de células de *E. coli* a doses variáveis de luz U.V. A análise de seus resulta-

dos levou-os a concluir que as três espécies de RNA ribossômico são cotranscritas, na ordem: 16S, 23S e 5S. Com base nesses dados, atribuiu-se (53) à unidade transcripcional um tamanho de 1,85 a 2,1 X 10^6 d.

Análise dos Produtos de Terminação da Transcrição "in vitro"

Foram isolados (107, 108), a partir de células de *E. coli*, complexos ("nucleóides") que contêm moléculas de RNA polimerase e cadeias de RNA nascente, associadas ao DNA "template". Quando esses complexos são transferidos para um sistema de transcrição *in vitro*, as RNA polimerases alongam as cadeias de RNA já iniciadas, liberando-as para o meio.

A natureza das classes de RNA sintetizadas *in vitro* foi analisada por hibridização, demonstrando-se serem predominantemente espécies ribossômicas. Quando essas espécies foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, verificou-se a existência de três tipos de moléculas distintas: uma delas, de peso molecular inferior ao da espécie madura de rRNA 16S e, duas outras, de peso molecular 1,25 e 1,7 X 10^6 d, superiores ao do precursor da espécie de rRNA 23S.

Por experimentos de hibridização competitiva, concluiu-se que a molécula de RNA de peso molecular 1,25 X 10^6 d, denominada p23, contém, apenas, seqüências de rRNA 23S. Por outro lado, na espécie de 1,7 X 10^6 d, denominada p30, encontram-se seqüências nucleotídicas complementares aos genes para rRNA 16S e 23S. Essa espécie possui a mobilidade eletroforética esperada para uma molécula que contenha ambas as espécies de rRNA de alto peso molecular. É interessante salientar que, na reação *in vitro*, não se forma RNA de tamanho igual ao do rRNA 16S ou de seu precursor.

Quando as células de *E. coli* são marcadas radioisotopicamente *in vivo*, antes de extração dos complexos de iniciação, os produtos p30 e p23, terminados *in vitro*, contêm marcação. Na espécie p30, as seqüências que apresentam maior atividade específica são, predominantemente, de rRNA 16S. Desde que a espécie 16S só está representada no produto p30, e sua síntese foi iniciada *in vivo*, essa espécie deve ocupar, necessariamente, a extremidade 5′ da molécula p30.

Duas possíveis hipóteses para explicar o aparecimento *in vitro* dos RNAs de alto peso molecular foram propostas (108): a) Entre os genes ribossômicos para 16S e 23S poderia existir um sítio específico, que seria reconhecido por um fator de terminação do tipo ro (113). Tal fator, acoplado à RNA polimerase, permitiria a liberação da espécie de rRNA 16S, antes do início da transcrição da espécie de 23S. *In vitro*, na ausência desse fator, as polimerases continuariam a transcrever os genes para rRNA contíguos, originando-se uma molécula única, que contém ambas as espécies de rRNA — (não foi testada essa hipótose adicionando-se o fator ro ao complexo de transcrição); b) *in vivo*, poderia ocorrer a cotranscrição dos genes para rRNA 16S e 23S, num precursor de alto peso molecular (p30). Em experiências de marcação *in vivo*, no entanto, não se detecta a espécie p30. Talvez nucleases celulares específicas clivem o produto antes de sua total transcrição, isto é, o rRNA 16S seria liberado logo após sua síntese da molécula precursora, antes que a RNA polimerase comece a sintetizar a espécie de rRNA 23S.

As evidências experimentais, relatadas nos itens anteriores, e aquelas que serão descritas a seguir, parecem indicar que a hipótese b) é a verdadeira.

Síntese de rRNA em mutantes deficientes em RNase III

Em mutantes de *E. coli*, deficientes em RNase III, acumula-se, *in vivo*, uma espécie de RNA cuja mobilidade eletroforética corresponde, aproximadamente, a 30S (42, 93).

Adicionando-se rifampicina a essas culturas foi possível analisar o destino do RNA marcado por pulsos curtos de uridina tritiada. Nesses estudos, verificou-se que a radiatividade aparece antes numa espécie de RNA 30S, em seguida, é transferida para espécies de RNA 25S e 17,5S, e, finalmente surge nas espécies maduras de rRNA 23S e 16S (93).

Esses resultados parecem sugerir que a espécie 30S (pré-rRNA) é clivada, inicialmente, nos produtos 25S e 17,5S, que originam, respectivamente, os rRNAS 23S e 16S. A espécie 30S, precursora dos RNAs ribossômicos, seria análoga ao RNA 30S, obtido *in vitro*, por alongamento das cadeias de RNA iniciadas *in vitro* (107, 108). Estudos recentes parecem sugerir que na espécie precursora de rRNA, além das seqüências primárias de rRNA 23S e 16S, estaria contida a seqüência do rRNA 5S (57).

A enzima RNase III degrada especificamente RNA de dupla fita (114) e é incapaz de atacar híbridos DNA-RNA (28). Desde que os estudos, relatados acima, foram realizados com mutantes de *E. coli* deficientes em RNase III, parece possível que tal enzima esteja envolvida no processamento do pré-rRNA 30S com a enzima altamente purificada, observando-se a produção de RNA 25S e 17,5S (93).

Os pesos moleculares das espécies precursoras de rRNA: 30S, 25S e 17,5S, isolados de mutantes RNase III, foram analisados por eletroforese em presença de formamida, mostrando serem, respectivamente: 2,10; 1,20; e 0,65 X 10^6 d. (94). Com base nesses dados, pode-se calcular que, na espécie de

pré-rRNA 30S existe 22% de seqüência em excesso em relação ao esperado para uma molécula constituída por rRNA 16S e 23S.

Micrografias eletrônicas de moléculas de pré-rRNA 30S mostram a presença de algumas estruturas em "grampo" (regiões de dupla fita) que poderiam ser susceptíveis ao ataque por RNase III (94).

Síntese de RNA ribossômico

Em células de *E. coli*, em crescimento exponencial rápido, 40 a 50% do RNA, sintetizado em qualquer instante, é RNA ribossômico (109). A partir dessa observação, deve-se deduzir que as 6 unidades transcripcionais de genes para rRNA, que constituem apenas 0,4% do genoma, devam ser transcritas com uma freqüência 50 a 100 vezes maior que a da síntese das várias espécies de mRNA.

Usando-se um método inteiramente diferente (158), verificou-se que a síntese da espécie 16S de *B. subtilis* demora 18 segundos, o que implicaria numa velociade de síntese de RNA ribossômico, de 80 a 90 nucleotídios/segundo.

Os dados apresentados acima mostram que a velocidade de polimerização de cadeias de mRNAs é menor que a de rRNAS. Esse fato poderia ser explicado supondo-se que, os ribossomos, que se associam a cadeias nascentes de RNA mensageiro (89), diminuem, por impedimento estérico, a velocidade do processo de transcrição mediado pelas RNA polimerases. As cadeias de rRNA nascentes, por não se associarem a ribossomos não têm sua transcrição retardada, sendo, portanto, sintetizadas normalmente.

As diferenças existentes quanto aos valores de velocidade de síntese das duas espécies de RNA (ribossômico e mensageiro), no entanto, são insuficientes para explicar as grandes diferenças quantitativas observadas em condições de crescimento rápido.

Regulação da síntese de rRNA

A disponibilidade de nutrientes determina a potencialidade de crescimento de qualquer população de organismos. Como resultado de uma evolução processada num meio que se apresenta ora rico, ora pobre em alimentos, os procariotos desenvolveram mecanismos de regulação da produção de suas macromoléculas, em relação às características nutricionais do meio (apud Pace (103)).

Os estudos sobre variação dos componentes celulares, em função da velocidade de crescimento bacteriano, mostram que a quantidade de RNA e o número de ribossomos por célula é proporcional à velocidade de síntese proteica e à taxa de crescimento da população (vide Maale & Kjeldgaard (80)).

No item anterior, os dados mostram que, em determinada condição de crescimento, a velocidade de síntese de rRNA é superior àquela de mRNA. A noção de existência de um controle não-coordenado da síntese de rRNA e mRNA tornou-se clara a partir de estudos realizados em culturas bacterianas cujo crescimento balanceado foi reduzido bruscamente por mudanças nutricionais, por remoção de um aminoácido, ou por processos de diferenciação celular.

A alta freqüência de síntese das classes de RNA ribossômico pode ser explicada de dois modos, que não são mutuamente exclusivos. O primeiro prevê que as cadeias de RNA ribossômico são sintetizadas com uma velocidade superior àquela de outras classes de RNA. Supõe-se, no segundo, que exista uma alta densidade de moléculas de RNA polimerase sobre os genes ribossômicos talvez como conseqüência de uma maior afinidade pelas regiões iniciadoras desses genes. Essas enzimas, porém, alongariam as cadeias de rRNA com a mesma velocidade com que são sintetizadas cadeias de outras espécies de RNA.

Velocidade de síntese de rRNA

Em diversas espécies bacterianas, crescidas sob condições de temperatura e nutrientes, foi analisada a velocidade com que as cadeias de RNA são sintetizadas *in vivo*.

Em *E. coli*, a velocidade de alongamento das cadeias de RNA é de 0,07 nucleotídios/segundo, para células crescidas a 0°C; para culturas desenvolvidas a 30°C e 37°C, a velocidade é, respectivamente, de 27 e 50 nucleotídios/segundo (9, 50, 86, 151). Obtiveram-se tais estimativas medindo-se o tempo de transcrição de mRNAs de tamanho definido, em presença ou em ausência de rifampicina ou, ainda, por meio de estudos cinéticos de marcação de "pool" de precursores de ácidos nucleicos.

Admitindo-se que a velocidade de polimerização para RNA é de 50 nucleotídios/segundo, a 37°C, o tempo necessário para a síntese de rRNA 16S (1 600 nucleotídios) e 23S (3 200 nucleotídios) seria, respectivamente, de 30 e 60 segundos.

Contrariando essas estimativas, as primeiras evidências sugeriram que o tempo de síntese (aproximadamente 2 minutos) das duas espécies de RNA ribossômico é o mesmo (2, 84). No entanto as bases teóricas de seus experimentos eram incorretas como já discutido (42, 93).

Analisando-se o tempo de terminação da transcrição das espécies de rRNA, em presença de rifampicina, verificou-se que a síntese de rRNA 16S e

23S ocorria em 20 e 40 segundos, respectivamente, em culturas de *E. coli* (10). A partir desses dados concluiu-se que a velocidade de síntese de RNA ribossômico é de 75 nucleotídios/segundo, a 37°C, e, que deve existir o dobro de moléculas de RNA polimerase sobre os genes para rRNA 23S, em relação aos genes para rRNA 16S, já que, na célula, a freqüência de aparecimento de ambas as espécies ribossômicas é a mesma. Um estudo análogo em *B. subtilis* sugeriu tempos máximos de transcrição de 60 segundos e 30 segundos para os genes responsáveis pela síntese de rRNA 23S e 16S, respectivamente (159).

Lazzarini & Winslow (71) mostraram que a transferência de células de *E. coli*, de um meio de glicose para um de lactato, resulta na redução de 75% da velocidade instantânea de síntese de rRNA e de apenas 25% da produção de mRNA. De maneira análoga. quando se transfere uma cultura de um meio pobre, para outro, rico em nutrientes, a razão RNA estável/RNA instável, torna-se característica de condição de crescimento rápido (106).

Bremer & col. (11) e Dennis & Bremer (33) analisaram os possíveis fatores que provacariam o aumento da síntese de RNA ribossômico, verificado após a transferência da cultura para um meio rico. Esses autores concluiram que tal fenômeno ocorre em virtude do aumento da velocidade e polimerização das cadeias de rRNA, e do deslocamento das RNA polimerases de genes de RNA instável, para genes ribossômicos. Em culturas em crescimento rápido foi possível calcular que os genes para rRNA estão saturados por moléculas de RNA polimerase, e que a densidade de enzimas, sobre esses genes, diminui com a velocidade de crescimento bacteriano.

A redução não coordenada da síntese de rRNA e mRNA também se verifica após a remoção de um aminoácido essencial de culturas auxotróficas. Nesse caso, também, a redução da síntese de rRNA é mais drástica que a de mRNA (71).

Outro exemplo da existência de controles independentes, regulando a velocidade de síntese das espécies instáveis e estáveis de RNA, é encontrado no fenômeno de esporulação, verificado em certos gêneros bacterianos. Em células de *B. subtilis,* que entram em fase de esporulação, observa-se a parada da síntese de RNA ribossômico e de certas classes específicas de mRNAs (34, 60).

Losick & Sonenshein (77) demonstraram que a inibição da síntese de rRNA é conseqüência de alguns mecanismos de regulação, que alteram a afinidade da RNA polimerase bacteriana pelos genes para rRNA. Entre essas alterações inclui-se a modificação da subunidade β da enzima e a perda do fator σ (76, 78, 82). De fato, as RNA polimerases, isoladas de células em fase de esporulação, são incapazes de transcrever RNA ribossômico *in vitro*, ao contrário do que ocorre para enzimas de fase vegetativa (61). Mais recentemente, sugeriu-se que as modificações que se observavam na subunidade β eram artefatos e que a perda de atividade do fator σ é a responsável pela mudança de "template" por parte da enzima (12).

Com base nesse último exemplo surgem evidências de que o mecanismo regulador da transcrição de genes ribossômicos poderia, também, ser resultante de alguma propriedade específica da RNA polimerase, que, acoplada a determinado fator, em certas condições de crescimento, poderia adquirir maior afinidade pelo sítio de iniciação dos genes para rRNA.

Travers & col. (145-A) verificaram que a adição do fator proteico, denominado ψ r, estimula a síntese de RNA ribossômico *in vitro;* na ausência desse fator de controle positivo da transcrição os genes para rRNA não são expressos.

As conclusões acima foram postas em dúvida quando Pettijohn (110) e Hussey & col. (61) demonstraram que holoenzimas de *E. coli* e *B. subtilis*, altamente purificadas, são capazes de sintetizar, sem adição de qualquer fator proteico, RNA ribossômico. Os resultados de Travers & col. (145-A) derivaram, provavelmente, do emprego de um DNA "template" bastante danificado, no qual a transcrição poderia iniciar-se inespecificamente em sítios de ruptura, e do uso de técnicas de hibridização pouco sensíveis para a detecção do produto sintetizado. Essas imperfeições foram sanadas nos trabalhos descritos acima.

O envolvimento do fator ψ r na regulação da síntese de rRNA, no entanto voltou à tona recentemente, num modelo apresentado por Travers & Buckland (145-B). Segundo esses autores, existiriam dois tipos de RNA polimerases celulares: uma, que transcreveria os genes para RNA instável e, outra, os genes para rRNA e tRNA. O segundo tipo de enzima seria estabilizada pelo fator ψ r. A base desse modelo derivou de observação de que existe uma heterogeneidade quanto ao coeficiente de sedimentação das RNA polimerases isoladas de células de *E. coli.* As enzimas de coeficiente de sedimentação 16S sintetizam *in vitro* 10 a 15% de rRNA, sendo inibidas pelo nucleotídio ppGpp (esse nucleotídio acumula-se em cepas restritivas — "stringent" — cuja síntese de rRNA foi bloqueada por remoção de um aminoácido específico do meio de cultura (16). As RNA polimerases, de coeficiente de sedimentação mais alto, são insensíveis à ação desse nucleotídio e transcrevem menos de 2% de rRNA, *in vitro.* A atividade relativa dessas duas classes de enzimas seria controlada pelas condições de crescimento da bactéria.

Os dados acima citados mostram que o mecanismo regulador da transcrição de genes ribossômicos ainda não é conhecido em sua totalidade.

PROCESSAMENTO DE RNA RIBOSSÔMICO E FORMAÇÃO DE RIBOSSOMOS

O processo que leva à formação de RNA ribossômico maduro envolve uma etapa de transcrição e uma etapa de modificações pós-transcripcionais. Essas modificações, representadas por clivagens específicas das moléculas de rRNA e metilações de seus nucleotídios, podem ter lugar nas cadeias nascentes de rRNA e prosseguir nas cadeias completas. Paralelamente a esses processos, as moléculas de rRNA adquirem estruturas secundárias e terciárias características, associando-se a proteínas ribossômicas.

Os primeiros estudos sistemáticos sobre a formação de ribossomos em culturas bacterianas iniciaram-se na Carnegie Institution (13, 112).

O método experimental, usado nesses estudos, foi o de marcar o RNA com pulsos de uridina radiativa, e de analisar a cinética de fluxo de radiatividade em partículas ribonucleoproteicas, que originam as subunidades ribossômicas maduras. Em alguns desses estudos usou-se ainda cloranfenicol, agente inibidor da síntese proteica, que provoca o acúmulo de certas ribonucleoproteínas, as quais, dessa forma, puderam ser melhor analisadas (Figura 3).

Os resultados sugerem que a formação das subunidades ribossômicas maduras ocorre através de uma série de etapas intermediárias, em que o rRNA se associa a proteínas específicas (84) e é paralelamente metilado.

Ribonucleoproteínas 22S e 26S seriam as precursoras da subunidade 30S, ao passo que ribonucleoproteínas 30S, 43S, 40S e "50S" seriam os intermediários da via de biossíntese da subunidade 50S (100, 141).

Os rRNAs 16S e 23S nascentes, isolados a partir das ribonucleoproteínas, são diferentes do rRNAS encontrados nas subunidades ribossômicas maduras, não apenas quanto ao seu grau de metilação, mas também quanto ao seu tamanho molecular.

Inibindo-se a síntese proteica ou marcando-se RNA por pulsos de radiatividade, demonstrou-se que os rRNAS maduros 16S e 23S (m16 e m23) eram sintetizados sob a forma de moléculas precursoras (p16 e p23). Esses precursores possuem coeficiente de sedimentação mais alto que o das espécies ribossômicas maduras e comportamento anormal em colunas de albumina metilada-kieselguhr (38, 134). Atualmente, parece ser aceito que ambas as espécies precursoras derivam de uma molécula precursora maior, de coeficiente de sedimentação 30S (42, 93). Análises realizadas em gel de poliacrilamida (2, 32, 58) sugerem que as formas p16 e p23 sejam 10 e 5% maiores que as respectivas formas m16 e m23.

A importância das proteínas ribossômicas no processo de maturação dos precursores de rRNA começa a ser estudada. Tokuda & Mizushima (141) demonstraram que o p23, constituinte da ribonucleoproteína "50S", é transformado na forma madura de rRNA 23S, em presença de proteínas ribossômicas isoladas a partir do monossomo 70S ou da subunidade 50S (Fig. 3). Mangiarotti & col. (85) comprovaram que nas subunidades 30S maduras, ativas na tradução *in vitro*, encontra-se ainda a forma precursora p16. Essa molécula é processada e adquire as características da forma m16S, durante o ciclo de síntese proteica. Nesse processo de maturação, parece que o mRNA desempenha um papel importante.

A existência de etapas pós-transcripcionais parece ser uma característica geral do processo de maturação das espécies de rRNA. A molécula madura de rRNA 5S bacteriana também deriva de um precursor, que possui peso molecular maior (47, 48, 104).

Borek & Srinivasan (7) e Hall (54) discutem extensamente a metilação de rRNA 16S e 23S durante o processamento. A análise específica da metilação da molécula de rRNA foi publicada por Thammana & Held (137) que verificaram a necessidade de o rRNA ser incorporado em ribonucleoproteínas a fim de ser metilado.

Comentário

À guisa de comentário final, gostaríamos de traçar certos paralelos entre organismos procarióticos e eucarióticos, no que se refere à estrutura e síntese

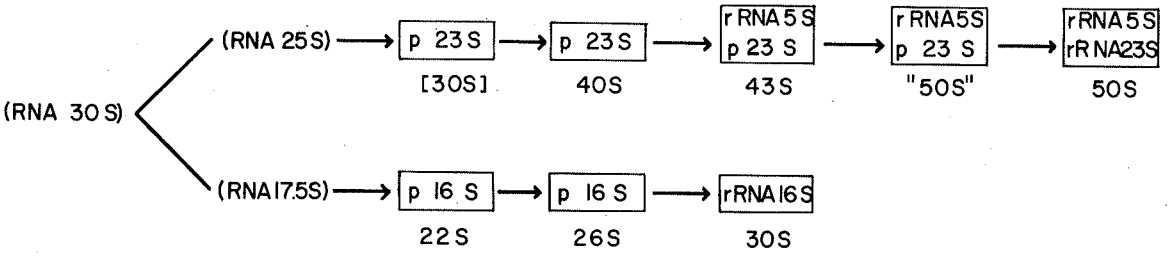


Fig. 3 — Esquema do processamento do RNA ribossômico e formação de subunidades ribossômicas em bactéria. RNAs entre parênteses representam as espécies encontradas em mutantes de *E. coli* deficientes em RNase III (42, 93). RNAs nos retângulos representam as espécies em processo de maturação. Os valores colocados sob os retângulos são relativos aos coeficientes de sedimentação das partículas ribossômicas. As setas representam o fluxo da maturação das partículas ribossômicas. (cf. 85, 100, 137, 141)

de RNA ribossômico. De um modo geral, torna-se aparente o caráter conservado ao longo da evolução de certas propriedades estruturais das moléculas de rRNA que constituem as subunidades ribossômicas de bactérias e organismos superiores. Essas semelhanças sugeririam que as moléculas de rRNA não desempenhariam apenas um papel meramente estrutural no ribossomo, mas poderiam estar envolvidas ativamente no processo de síntese proteica.

Outro caráter que parece haver-se mantido durante a evolução é a presença de redundância nos genes para RNA ribossômico, e o agrupamento desses genes em sítios específicos dos cromossomos. Em eucariotos, no entanto, os genes para rRNA 5S encontram-se distanciados dos genes para rRNA de alto peso molecular, os quais estão agrupados na região organizadora do nucléolo.

Uma vez que as três espécies de RNA ribossômico encontram-se em quantidade estequiométrica no interior da célula, e tendo em vista que essas espécies são codificadas por genes distintos, surge a necessidade da proposição de um mecanismo de regulação de sua síntese. Em bactéria, a maioria dos dados aponta para o fato de os genes para rRNA 16S, 23S e 5S pertencerem à mesma unidade transcripcional, sendo, portanto, expressos pela mesma molécula de RNA polimerase. Esse processo garantiria seu aparecimento concomitante na célula. As evidências de presença, em certos mutantes de *E. coli*, de uma molécula de RNA 30S, precursora das três espécies de rRNA vem reforçar os dados acima.

A existência de um precursor de moléculas de RNA ribossômico maduras parece ser mais uma característica que se manteve ao longo da evolução, isto é, a preservação do mecanismo de cotranscrição. Na maioria dos organismos eucarióticos estudados, nota-se a presença de um precursor de alto peso molecular, que origina as moléculas de rRNA 18S e 28S: em inseto, tal precursor apresenta um coeficiente de sedimentação de 38S; em *Xenopus*, de 40S, e, finalmente, em mamífero, de 45S (ver Burdon (15)). A análise desse precursor revela uma relativa conservação do tamanho de moléculas de rRNA que ele contém e uma rápida evolução das partes não conservativas que ele codifica. Muito provavelmente, essas regiões não conservativas, surgidas talvez por deslocamento dos sítios de iniciação e terminação da unidade transcripcional de rDNA, desempenham alguma função regulatória, ou no próprio sistema dos ribossomos, ou em outros sistemas. A análise da cinética de aparecimento das espécies ribossômicas sugere que, na molécula de RNA precursor, o rRNA 16S, em procariotos e, 18S em eucariotos, ocupa a posição proximal em relação ao sítio de iniciação da transcrição, sendo seguidos pelo rRNA 23S ou rRNA 28S.

No genoma de eucariotos, verifica-se o distanciamento dos genes para rRNA 5S em relação à disposição dos genes para rRNA 28S e 18S. Nesses organismos, mecanismos mais complexos de regulação devem ser preconizados, a fim de garantir-se a síntese concomitante e de manter-se a estequiometria celular das três espécies de rRNA.

Apesar do número considerável de informações que se têm acumulado, relativas à estrutura e mecanismos de transcrição do RNA ribossômico em procariotos e eucariotos, ainda estamos longe da compreensão do papel que essas moléculas desempenham na síntese proteica, e dos processos que regulam sua formação e processamento.

Referências Bibliográficas

1. ACS, G., REICH, E. & VALANJU, S. — RNA metabolism of *B. subtilis*, effects of Actinomycin. *Biochim. Biophys. Acta*, 76:68-79, 1963.
2. ADESNIK, M. & LEVINTHAL, C. — Synthesis and maturation of ribosomal RNA in *E. coli*. *J. Mol. Biol.*, 46:281-303, 1969.
3. ATTARDI, G., HUANG, P.C. & KABAT, S. — Recognition of ribosomal RNA sites in DNA. I Analysis of the *E. coli* system. *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 53:1490-1498, 1965.
4. ATTARDI, G. & AMALDI, F. — Structure and synthesis of ribosomal RNA. *Annu. Rev. Biochem.*, 39:183-226, 1970.
5. BLEYMAN M. & WOESE, C.R., — "Transcriptional mapping". I. Introduction to the method and the use of actinomycin D as transcriptional mapping agent. *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 63:532-539, 1969.
6. BLEYMAN, M., KONDO, M., HECHT, N. & WOESE, C.R. — Transcriptional mapping: functional organization of ribosomal and transfer ribonucleic acid cistrons in *B. subtilis* genome. *J. Bacteriol.*, 99:535-543, 1969.
7. BOREK, E. & SRINIVASAN, P.R. — The methylation of nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.*, 35:275-298, 1966.
8. BRACHET, J. — La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissues animaux et les oeufs d'amphibiens en voie de développement. *Arch. Biol. (Paris)*, 53:207-257, 1942.
9. BREMER, H. & YUAN, D. — RNA chain growth rate in *E. coli*. *J. Mol. Biol.*, 38:163-180, 1968.
10. BREMER, H. & BERRY, L. — Co-transcription of 16S and 23S ribosomal RNA in *E. coli*. *Nature New Biol.*, 234:81-83, 1971.

11. BREMER, H., BERRY, L. & DENNIS, P.P. — Regulation of ribonucleic acid synthesis in *E. coli* B/r: an analysis of a shift-up. II — Fraction of RNA polymerase engaged in the synthesis of stable RNA at different steady-state growth rates. *J. Mol. Biol.,* 75:161-179, 1973.

12. BREVET, J. — Direct assay for sigma factor activity and demonstration of the loss of this activity during sporulation of *B. subtilis. Mol. Gen. Gen.,* 128:223-231, 1974.

13. BRITTEN, R.J. & MCCARTHY, B.J. — The synthesis of ribosomes in *E. coli.* II Analysis of the kinetics of tracer incorporation in growing cells. *Biophys. J.,* 2:49-55, 1962.

14. BROWNLEE, G.G., SANGER, F. & BARRELL, B.G. — Nucleotide sequence of 5S — ribosomal RNA from *E. coli. Nature,* 215:735-736, 1967.

15. BURDON, R.H. — Ribonucleic acid maturation in animal cells. *Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.,* 11:33-79, 1971.

16. CASHEL, M. & KALBACHER, B. — The control of ribonucleic acid synthesis in *E. coli.* V. Characterization of the nucleotide associated with the stringent response. *J. Biol. Chem.,* 245:2309-2318, 1970.

17. CASPERSSON, T. — Studies über den eiwei β umsatz der zelle. *Die Naturwissenschaften,* 29:33-43, 1941.

18. CHANTRENNE, H. — Hétérogénéité des granules cytoplasmiques du fois des souris. *Biochim. Biophys. Acta,* 1:437-448, 1947.

19. CHAO, F.C. — Dissociation of macromolecular ribonucleoprotein of yeast. *Arch. Biochem. Biophys.,* 70:426-431, 1957.

20. CLAUDE, A. — Particulate components of cytoplasm. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.,* 9:263-271, 1941.

21. CLAUDE, A. — Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation. I. Experimental procedures and results. *J. Exptl. Med.,* 84:61-89, 1946.

22. COLLI, W. & OISHI, M. — Ribosomal RNA genes in bacteria: evidence for the nature of the physical linkage between 16S and 23S RNA genes in *B. subtilis. Proc. Nat. Acad. Sci. US,* 64:642-649, 1969.

23. COLLI, W. & OISHI, M. — A procedure for gene purification: the purification of the ribosomal RNA genes of *B. subtilis* as DNA-RNA hybrids. *J. Mol. Biol.,* 51:657-669, 1970.

24. COLLI, W. — Genes redundantes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico em *B. subtilis.* Tese — Universidade de São Paulo, 1971.

25. COLLI, W.; SMITH, I. & OISHI, M. — Physical linkage between 5S, 16S and 23S ribosomal RNA genes in *B. subtilis. J. Mol. Biol.,* 56:117-127, 1971.

26. COLLI, W. — Transcrição gênica em bactérias. *Rev. Microbiol.* (*S. Paulo*) 3:191-198, 1972.

27. CRAVEN, G.R.; VOYNOW, P.; HARDY, S.J.S. & KURLAND, C.G. — The ribosomal proteins of *E. coli.* II Chemical and physical characterization of the 30S ribosomal proteins. *Biochem.,* 8:2906-2915, 1969.

28. CROUCH, R.J. — RNAse III does not degrade DNA--RNA hybrids. *J. Biol. Chem.,* 249:1314-1316, 1974.

29. COOTE, J.G.; WOOD, D.D. & MANDELSTAM, J. — Lethal effect of rifampicin in *B. subtilis* as a complicating factor in the assessment of the lifetime of messenger ribonucleic acid. *Biochem. J.,* 134:263-270, 1973.

30. COTTER, R.I.; MCPHIE, P. & GRATZER, W.B. — Internal organization of ribosome. *Nature,* 216:864-868, 1967.

31. CUTLER, R.G. & EVANS, J.E. — Relative transcription activity of different segments of the genome throughout the cell division cycle of *E. coli.* The mapping of ribosomal and transfer RNA and the determination of the direction of replication. *J. Mol. Biol.,* 26:91-105, 1967.

32. DAHLBERG, A.E. & PEACOCK, A.C. — Studies of 16S and 23S ribosomal RNA of *E. coli* using composite gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.,* 55:61-74, 1971.

33. DENNIS, P.P. & BREMER, H. — Regulation of the ribonucleic acid synthesis in *E. coli* B/r: an analysis of a shift up. I — Ribosomal RNA chain growth rates. *J. Mol. Biol.,* 75:145-159, 1973.

34. DOI, R.H. & IGARASHI, R.T. — Ribonucleic acids of *B. subtilis* spores and sporulating cells. *J. Bacteriol.,* 87:323-328, 1964.

35. DOOLITTLE, W.F. & PACE, N.R. — Synthesis of 5S ribosomal RNA in *E. coli* after rifampicin treatment. *Nature,* 228:125-129, 1970.

36. DOOLITTLE, W.F. & PACE, N.R. — Transcriptional organization of the ribosomal RNA cistrons in *E. coli. Proc. Nat. Acad. Sci. US,* 68:1786-1790, 1971.

37. DROPPA, M.; UDVARDY, A. & VENETIANER, P. — Physical evidence for the linkage of 16S and 23S rRNA cistrons in *E. coli. Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.,* 8:133-134, 1973.

38. DUBIN, D.T. & GÜNLAP, A. — Minor nucleotide composition of ribosomal precursor and ribosomal ribonucleic acid in *E. coli. Biochim. Biophys. Acta.,* 134:106-123, 1967.

39. DUBNAU, D.; SMITH, I.; MORELL, P. & MARMUR, J. — Gene conservation in *Bacillus* species. I. Conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies. *Proc. Nat. Acad. Sci. US,* 54:491-498, 1965.

40. DUBNAU, D.; SMITH, I. & MARMUR, J. — Gene conservation in *Bacillus* species. II. The location of genes concerned with the synthesis of ribosomal components and soluble RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. US,* 54:724-730, 1965.

41. DUBUY, B. & WISSMAN, S.M. — Nucleotide sequences of *P. fluorescens* 5S ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.,* 246:747-761, 1971.

42. DUNN, J.J. & STUDIER, F.W. — T_7 early RNAs and *E. coli* ribosomal RNAs are cut from large precursor RNAs *in vivo* by ribonuclease III. *J. Mol. Biol.,* 70:3296-3300, 1973.

43. EHRESMANN, C.; STIEGER, P.; FELLNER, P. & EBEL, J.P. — The determination of the primary structure of the 16S ribosomal RNA of *E. coli.* II. Nucleotide sequences of products from the partial enzymatic hydrolysis. *Biochemie,* 54:901-967, 1972.

44. FAHNESTOCK, S.; ERDNMANN, V. & NOMURA, M. — Reconstitution of 50S ribosomal subunits from protein-free ribonucleic acid. *Biochem.,* 12:220-224, 1973.

45. FELLNER, P.; EHRESMANN, C. & EBEL, J.P. — The determination of the primary structure of the 16S ribosomal RNA of *E. coli*. I. Nucleotide sequence analysis of T_1 and pancreatic ribonuclease digestion products. *Biochemie*, 54:853-900, 1972.

46. FELLNER, P.; EHRESMANN, C.; STIEGLER, P. & EBEL, J.P. — Partial nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA from *E. coli*. *Nature New Biol.*, 239:1-5, 1972.

47. FEUNTEN, J.; JORDAN, B.R. & MONIER, R. — Study of the maturation of 5S RNA precursors in *E. coli*. *J. Mol. Biol.*, 70:465-474, 1972.

48. FORGET, B.G. & JORDAN, B. — 5S RNA synthesized by *E. coli* in the presence of chloramphenicol: different 5'-terminal sequence. *Science*, 167:382-384, 1970.

49. GOLDBERG, M.L. & STEITZ, J.A. — Cistron specificity of 30S ribosomes heterologously reconstituted with components from *E. coli* and *B. stearothermophilus*. *Biochem.*, 13:2123-2128, 1974.

50. GOLDSTEIN, A.; KIRSCHBAUM, J.B. & ROMAN, A., — Direction of synthesis of messenger RNA in cells of *E. coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 54:1669-1675, 1965.

51. GORDON, J.; BOMAN, H.G. & ISAKSSON, L.A. — *In vivo* inhibition of RNA methylation in the presence of chloramphenicol. *J. Mol. Biol.*, 9:831-833, 1964.

52. GUPTA, R.S. & SINGH, U.N., — Initiation of transcription and sequential synthesis of 16S and 23S ribosomal RNA in *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 277:567-575, 1972.

53. HACKETT, P.B. & SAUERBIER, W., — Radiological mapping of the ribosomal RNA transcription unit in *E. coli*. *Nature*, 251:639-641, 1974.

54. HALL, H., — The modified nucleosides in nucleic acids, Columbia University Press, New York, 1971.

55. HARTMANN, G.; HONIKEL, K.O.; KNÜSEL, F. & NÜESCH, J. — The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochim. Biophys. Acta*, 145:843-844, 1967.

56. HAYASHI, Y.; OSAWA, S. & MIURA, K., — The methyl groups of ribosomal RNA from *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 129:519-531, 1966.

57. HAYES, F.; VASSEUR, M.; NIKOLAEV, N.; SCHLESSINGER, D.; WIDADA, J.R.; KROL, A. & BRANLANT, C., — Structure of a 30S pre-ribosomal RNA of *E. coli*, *FEBS Lett.*, 56:85-91, 1975.

58. HECHT, N.B. & WOESE C.R., — Separation of bacterial ribosomal ribonucleic acid from its macromolecular precursors by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.*, 95:986-990, 1968.

59. HOGEBOOM, G.H.; SCHNEIDER, W.C. & PALADE, G.E. — Cytochemical studies of mammalian tissues. Isolation of intact mitochondria from rat liver: some biochemical properties of mitochondrial and submicroscopic particulate material. *J. Biol. Chem.*, 172:619-636, 1948.

60. HUSSEY, C.; LOSICK, R. & SONNENSHEIN, A.L. — Ribosomal RNA synthesis is turned off during sporulation of *B. subtilis*. *J. Mol. Biol.*, 57:59-70, 1971.

61. HUSSEY, C.; PERO, J., SHORENSTEIN, R. & LOSICK, R. — *In vitro* synthesis of ribosomal RNA by *B. subtilis* RNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 69:407-411, 1972.

62. KAEMPFER, R.O.R.; MESELSON, M. & RASKAS, H.J., — Cyclic dissociation into stable subunits and re-formation of ribosomes during bacterial growth. *J. Mol. Biol.*, 31:277-289, 1968.

63. KENNEL, D. — Titration of the gene sites on DNA by DNA-RNA hybridization. *J. Mol. Biol.*, 34:85-103, 1968.

64. KOSSMAN, C.R.; STAMATO, T.D. & PETTIJOHN, D.E. — Tandem synthesis of the 16S and 23S ribosomal RNA sequences of *E. coli*. *Nature New Biol.*, 234:102-104, 1971.

65. KROES, H.H.; SCHEPMAN, N.M. & RÖRSCH, S. — The synthesis of ribosomal RNA in ultraviolet-irradiated *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 76:201-208, 1963.

66. KURLAND, C.G. — Molecular characterization of ribonucleic acid from *E. coli*. I. Isolation and molecular weight. *J. Mol. Biol.*, 2:83-91, 1960.

67. KURLAND, C.G.; VOYNOW, P.; HARDY, S.J.S.; RANDALL, L. & LUTTER, L. — Physical and functional heterogeneiry of *E. coli* ribosomes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 34:17-24, 1969.

68. KURLAND, C.G. — Structure and function of the bacterial ribosome. *Annu. Rev. Biochem.*, 41:377-408, 1972.

69. LANCINI, G.C. & SARTORI, G. — Rifamycins LXI: *in vivo* inhibition of RNA synthesis by rifamycins. *Experimentia*, 24:1105-1106, 1968.

70. LANCINI, G.; PALLANZA, R. & SILVESTRI, L.G. — Relationship between bactericidal effect and inhibition of ribonucleic acid nucleotidyl-transferase by rifampicin in *E. coli* K12. *J. Bacteriol.*, 97:761-768, 1969.

71. LAZZARINI, R.A. & WINSLOW, R.M. — The regulation of RNA synthesis during growth rate transitions and aminoacid deprivation in *E. coli*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 35:383-390, 1970.

72. LEIGHTON, T.J. & DOI, R.H. — The stability of messenger RNA during sporulation in *B. subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 246:3189-3195, 1971.

73. LEWIS, J.B. & DOTY, P. — Derivation of the secondary structure of 5S RNA from its binding of complementary oligonucleotides. *Nature*, 225:510-512, 1970.

74. LITTLEFIELD, J.W.; KELLER, E.B.; GROSS, J. & ZAMECNIK, P.S. — Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. *J. Biol. Chem.*, 217:111-124, 1955.

75. LITTLEFIELD, J.W. & KELLER, E.B. — Incorporation of C^{14}-amino acids into ribonucleoproteins particles from the Ehrlich mouse ascites tumor. *J. Biol. Chem.*, 224:13-30, 1957.

76. LINN, T.G.; GREENLEAF, A.L.; SHORENSTEIN, R.G. & LOSICK, R. — Loss of sigma activity of RNA polymerase of *B. subtilis* during sporulation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 70:1865-1869, 1973.

77. LOSICK, R. & SONENSHEIN, A.L. — Change in the template specificity of RNA polymerase during sporulation of *B. subtilis*. *Nature*, 224:35-37, 1969.

78. LOSICK, R.; SHORENSTEIN, R.G. & SONENSHEIN,

A.L. — Structural alteration of RNA polymerase during sporulation. *Nature,* 227:910-913, 1970.

79. LURIA, S.E.; DELBRÜCK, M. & ANDERSON, T.F. — Electron microscope studies of bacterial viruses. *J. Bacteriol.,* 46:57-78, 1943.

80. MAALE, O. & KJELDGAARD, N.O. — Control of macromolecular synthesis. W.A. Benjamin, Inc. New York, 1966.

81. MAGGI, N.; PASQUALUCCI, C.R.; BALLOTA, R. & SENSI, P. — Rifampicin, a new orally active rifamycin. *Chemotherapia,* 11:285-292, 1966.

82. MAIA, J.C.C.; KERJAN, P. & SZULMAJSTER, J. — DNA-dependent RNA polymerase from vegetative cells and from spores of *B. subtilis. FEBS Lett.,* 13:269-272, 1971.

83. MANGIAROTTI, G. & SCHLESSINGER, D. — Polyribosome metabolism in *E. coli.* II. Formation and lifetime of mRNA molecules, ribosomal subunits couples and polyribosomes. *J. Mol. Biol.,* 29:395-418, 1967.

84. MANGIAROTTI, G.; APIRION, D.; SCHLESSINGER, D. & SILENGO, L. — Biosynthetic precursors of 30S and 50S ribosomal particles in *E. coli. Biochem.,* 7:456-472, 1968.

85. MANGIAROTTI, G.; TURCO, E.; PONZETTO, A. & ALTRUDA, F. — Precursor 16S RNA in active 30S ribosomes. *Nature,* 247:147-148, 1974.

86. MANOR, H.; GOODMAN, D. & STENT, G. — RNA chain growth rates in *E. coli. J. Mol. Biol.,* 39:1-29, 1969.

87. MARUTA, H.; TSUCHIYA, T. & MIZUNO, D. — *In vitro* reassembly of functionally active 50S ribosomal particles from ribosomal proteins and RNA of *E. coli. J. Mol. Biol.,* 61:123-134, 1971.

88. MIDGLEY, J.E.M. — The nucleotide base composition of ribonucleic acid from several microbial species. *Biochim. Biophys. Acta.,* 61:513-525, 1962.

89. MILLER, O.L.; BEATTY, B.R.Jr.; HAMKALO, B.A. & THOMAS, C.A. — Electron microscope visualization of transcription. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.,* 35:505-512, 1970.

90. MIURA, K. — The nucleotide composition of ribonucleic acids of soluble and particle fractions in several species of bacteria. *Biochim. Biophys. Acta,* 55:62-70, 1962.

91. MÖLLER, W.; AMONS, R.; GROENE, J.C.L.; GARRET, R.A. & TERHORST, C.P. — Protein-ribonucleic acid interactions in ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta,* 190:381-390, 1969.

92. NANDI, U.S.; WANG, J.C. & DAVIDSON, N. — Separation of deoxyribonucleic acids by Hg (II) binding and Cs_2SO_4 density gradient centrifugation. *Biochem.,* 4:1687-1669, 1965.

93. NILOLAEV, N.; SILENGO, S. & SCHLESSINGER, D. — Synthesis of a large precursor to ribosomal RNA in a mutant of *E. coli. J. Mol. Biol.,* 70:3361-3365, 1973.

94. NIKOLAEV, N.; SCHLESSINGER, D. & WELLAUER, P.K. — 30S-pre-ribosomal RNA of *E. coli* and products of cleavage by ribonuclease III: Lenght and molecular weight. *J. Mol. Biol.,* 86:741-747, 1974.

95. NOMURA, M., TRAUB, P. & BECHMANN, H. — Hybrid 30S ribosomal particles reconstituted from components of different bacterial origins. *Nature,* 219:793-799, 1968.

96. NOMURA, M. — Bacterial ribosome. *Bacteriol. Rev.,* 34:228-277, 1970.

97. NOMURA, M. & ERDMANN, V.A. — Reconstitution of 50S ribosomal subunits from dissociated molecular components. *Nature,* 228:744-748, 1970.

98. OISHI, M. & SUEOKA, N. — Location of genetic loci of ribosomal RNA on *B. subtilis* chromosome. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.,* 54:483-491, 1965.

99. OSAWA, S. — The nucleotide composition of ribonucleic acids from subcellular components of yeast, *E. coli* and rat liver, with special reference to the occurrence of pseudouridylic acid in soluble ribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta,* 42:244-254, 1960.

100. OSAWA, S. — Ribosome formation and structure. *Annu. Rev. Biochem.,* 37:109-130, 1968.

101. OTAKA, E.; OSAWA, S. & SIBATANI, A. — Stimulation of C^{14}-leucine incorporation into protein *in vitro* by ribosomal RNA of *E. coli. Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 15:568-574, 1964.

102. PACE, B. & PACE, N.R. — Gene dosage for 5S ribosomal ribonucleic acid in *E. coli* and *B. megaterium. J. Bacteriol.,* 105:142-149, 1971.

103. PACE, N.R. — Structure and synthesis of the ribosomal ribonucleic acid of prokariotes. *Bacteriol. Rev.,* 37:562-603, 1973.

104. PACE, N.R.; PATO, M.L.; MCKIBBIN, J. & RADCLIFFE, C.W. — Precursors of 5S ribosomal RNA in *B. subtilis. J. Mol. Biol.,* 75:619-631, 1973.

105. PALADE, G.E. & SIEKEVITZ, P. — Liver microsomes — an integrated morphological and biological study. *J. Biophys. Biochem. Cytol.,* 2:171-200, 1956.

106. PATO, M.L. & VON MEYENBURG, K. — Residual RNA synthesis in *E. coli* after inhibition of initiation of transcription by rifampicin. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.,* 35:497-504, 1970.

107. PETTIJOHN, D.E. — Transcription of an RNA polymerase-DNA complex from *E. coli* — Evidence for *in vitro* synthesis of rRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 34:541-547, 1969.

108. PETTIJOHN, D.E.; STONINGTON, O.G. & KOSSMAN, C.R. — Chain termination of ribosomal RNA synthesis *in vitro. Nature,* 228:235-239, 1970.

109. PETTIJOHN, D.E.; CLARKSON, K.; KOSSMAN, C.R. & STONINGTON, O.G. — Synthesis of ribosomal RNA on a protein-DNA complex isolated from bacteria: a comparison of ribosomal RNA synthesis *in vitro* and *in vitro. J. Mol. Biol.,* 52:281-300,1970.

110. PETTIJOHN, D.E. — Ordered and preferential initiation of ribosomal RNA synthesis *in vitro. Nature New Biol.,* 235:204-206, 1972.

111. REICH, E.; GOLDBERG, I.H. & RABINOWITZ, M. — Structure activity correlations of actinomycins and their derivatives. *Nature,* 196:743-748, 1962.

112. ROBERTS, R.B. — Microsomal particles and protein synthesis. Pergamon Press, N. York, 1958.

113. ROBERTS, J.W. — Termination factor for RNA synthesis. *Nature,* 224:1168-1174, 1969.

114. ROBERTSON, H.D.; WEBSTER, R.D. & ZINDER, N.D. — Purification and properties of ribonuclease III from *E. coli. J. Biol. Chem.,* 243:82-91, 1968.

115. ROSSET, R. & MONIER, R. — A propos de la présence d'ácide ribonucléique de faible poids moléculaire dans les ribosomes d'*E. coli. Biochim. Biophys. Acta,* 68:653-656, 1963.

116. SANGER, F. & BROWNLEE, G.G. — Two dimensional fractionation method for radioactive nucleotides, p. 361-381. em Methods in Enzymology vol. 12 (A) Acad. Press Inc. N. York, 1967.

117. SARKAR, N. & COMB, D.G. — A study on the attachment and release of 5S ribosomal RNA from the large ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.,* 39:31-44, 1969.

118. SCHACHMAN, H.K., PARDEE, A.B. & STANIER, R.Y. — Studies on the macromolecular organization of microbial cells. *Arch. Biochem. Biophys.,* 38:245-260, 1946.

119. SCHLESSINGER, D. & APIRION, D. — *E. coli* ribosomes: recent developments. *Annu. Rev. Microbiol.,* 23:387-426, 1969.

120. SHINE, J. & DALGARNO, L. — The 3'-terminal sequence of *E. coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.,* 71:1342-1346, 1974.

121. SIBATANI, A. & MIZUNO, N. — Synthesis of RNAs in *E. coli* irradiated with ultraviolet light. *Biochem. Biophys. Acta,* 76:188-200, 1963.

122. SIPPLE, A. & HARTMANN, G. — Mode of action of rifamycin on the RNA polymerase reaction. *Biochim. Biophys. Acta,* 157:218-219, 1968.

123. SMITH, I.; DUBNAU, D.; MORELL, P. & MARMUR, J. — Chromosomal location of DNA base sequences complementary to transfer RNA and to 5S, 16S and 23S ribosomal RNA in *B. subtilis. J. Mol. Biol.,* 33:123-140, 1968.

124. SMITH, I.; GOLDTHWAITE, C. & DUBNAU, D. — The genetic of ribosomes in *B. subtilis. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.,* 34:85-89, 1969.

125. SMITH, I.; COLLI, W. & OISHI, M. — Studies on physical linkage of antibiotic resistance markers to ribosomal RNA genes. *J. Mol. Biol.,* 62:111-119, 1971.

126. SOGIN, M.L.; PECHMAN, K.J.; ZABLEN, L.; LEWIS, B.J. & WOESE, C.R. — Observation on the post-transcriptionally modified nucleotides in the 16S ribosomal ribonucleic acid. *J. Bacteriol.,* 112:13-16, 1972.

127. SPAHR, P.E. & TISSIÈRES, A. — Nucleotides composition of ribonucleoprotein particles from *E. coli. J. Mol. Biol.,* 1:237-239, 1959.

128. SPAHR, P.E. — Amino acid composition of ribosomes from *E. coli. J. Mol. Biol.,* 4:395-406, 1962.

129. STAMATO, T.D. & PETTIJOHN, D.E. — Regulation of ribosomal RNA synthesis in stringent bacteria. *Nature New Biol.,* 234:99-102, 1971.

130. STANLEY, W.M.JR. & BOCK, R.M. — Isolation and physical properties of the ribosomal ribonucleic acid of *E. coli. Biochem.,* 4:1302-1311, 1965.

131. STRAND, B.C. & SYPHERD, P.S. — Unique protein moieties for 30S and 50S ribosomes of *E. coli. J. Bacteriol.,* 98:1080-1086, 1969.

132. SUBRAMANIAN, A.B.; RON, E.Z. & DAVIS, B.D. — A factor required for ribosome dissociation in *E. coli. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.,* 61:761-767, 1968.

133. SUEOKA, N. — Variation and heterogeneity of base composition of deoxyribonucleic acids: a compilation of old and new data. *J. Mol. Biol.,* 3:31-40, 1961.

134. SYPHERD, P.S. & FANSLER, B.S. — Structural transition in ribonucleic acid during ribosome development. *J. Bacteriol.,* 93:920-929, 1967.

135. SZYBALSKI, W.; BOVRE, K.; FIANDR, M.; HAYES, S.; HRADECNA, Z.; KUMAR, S.; LOZERON, H.P.; NIJKAMP, H.J.J. & STEVENS, W.F. — Transcriptional units and their controls in *E. coli* phage λ: Operon and Scriptons. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.,* 35:341-353, 1970.

136. TAKAHASHI, H.; SAITO, H. & IKEDA, Y. — Species specificity of the ribosomal RNA cistrons in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta,* 134:124-133, 1967.

137. THAMMANA, P. & HELD, W.A. — Methylation of 16S RNA during ribosomes assembly *in vitro. Nature,* 251:682-686, 1974.

138. TIMBAL, M.T., — Rifomycin. II. Antibacterial activity of rifomycin B. *Antib. Annu.* 1959-1960:271-276, 1960.

139. TISSIÈRES, A. & WATSON, J.D. — Ribonucleoprotein particles from *E. coli. Nature,* 182:778-780, 1958.

140. TISSIÈRES, A.; WATSON, J.D.; SCHLESSINGER, D. & HOLLING-WORTH, B.R. — Ribonucleoprotein particles from *E. coli. J. Mol. Biol.,* 1:221-233, 1959.

141. TOKUDA, H. & MIZUSHIMA, S. — A novel salt-unstable "50S" particle in *E. coli.* A possible ribosomal precursor for the 50S subunit. *Biochim. Biophys. Acta,* 340:183-193, 1974.

142. TRAUB, P. & NOMURA, M. — Structure and function of *E. coli* ribosomes. Partial fracionation of the functionally active proteins and reconstitution of artifical sub-ribosomal particles. *J. Mol. Biol.,* 34:575-593, 1968.

143. TRAUB, P. & NOMURA, M. — Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.,* 59:777-784, 1968.

144. TRAUT, R.R.; DELMIS, H.; AHMAD-ZAHED, C.; BICKLE, T.A.; PEARSON, P. & TISSIÈRES, A. — Ribosomal proteins of *E. coli. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.,* 34:25-38, 1969.

145.A. TRAVERS, A.A.; KAMEN, R.I. & SCHLEIF, R.F. — Factor necessary for ribosomal RNA synthesis. *Nature,* 228:748-751, 1970.

145.B. TRAVERS, A. & BUCKLAND, R. — Heterogeneity of *E. coli* RNA polymerase. *Nature New Biol.,* 243:257-260, 1973.

146. UMEZAWA, H.; MIZUNO, S.; YAMAZAKI, H. & NITTA, K. — Inhibition of DNA-dependent RNA synthesis by rifamycins. *J. Antibiot.,* 21:234-236, 1968.

147. WALLER, J.P. & HARRIS, J.I. — Studies on the composition of the protein from the *E. coli* ribosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.,* 47:18-23, 1961.

148. WEHRLY, W.; NÜESCH, J.; KNÜSEL, F. & STAEHELIN, M. — Action of rifamycins on RNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta,* 157:215-217, 1968.

149. WEHRLY, W.; KNÜSEL, F. & STAEHELIN, M. — Action of rifamycin on RNA polymerase from sensitive and resistant bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 32:284-288, 1968.

150. WEHRLY, W.; KNÜSEL, F.; SCHMID, K. & STAEHELIN, M. — Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. Proc. *Nat. Acad. Sci. U.S.,* 61:667-673, 1968.

151. WINSLOW, R.M. & LAZZARINI, R.A. — Amino acid regulation of the rates of synthesis and chain elongation of ribonucleic acid in *E. coli. J. Biol. Chem.,* 244:3387-3392, 1969.

152. WOESE, C.R. — Composition of various ribonucleic acid fractions from microorganisms of different deoxyribonucleic acid composition. *Nature,* 189:920-921, 1961.

153. YANKOFSKY, S.A. & SPIEGELMAN, S. — The identification of the ribosomal RNA cistron by sequence complementarity. I, Specificity of complex formation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.,* 48:1069-1072, 1962.

154. YANKOFSKY, S.A. & SPIEGELMAN, S. — The identification of the ribosomal RNA cistron by sequence complementarity. II. Saturation of and competitive interaction at the RNA cistron. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.,* 48:1466-1472, 1962.

155. YANKOFSKY, S.A. & SPIEGELMAN, S. — Distinct cistrons for the two ribosomal RNA components. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.,* 49:538-544, 1963.

156. YU, M.T.; VERMEULEN, C.W. & ATWOOD, K.C. — Location of the genes for 16S and 23S ribosomal RNA in the genetic map of *E. coli. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.,* 67:26-31, 1970.

157. ZILLIG, W.; ZECHEL, K.; RABUSSAY, D.; SCHACHNER, M.; SETHI, V.S.; PALM, P.; HEIL, A. & SEIFERT, W. — On the role of different subunits of DNA-dependent RNA polymerase from *E. coli* in the transcription process. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.,* 35:47-58, 1970.

158. ZIMMERMANN, R.A. & LEVINTHAL, C. — Messenger RNA and RNA transcription time. *J. Mol. Biol.,* 30:349-370, 1967.

159. ZINGALES, B.O.N. — Transcrição de genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico em *B. subtilis.* Tese Universidade de São Paulo, 1975.