BIANCA ZINGALES O DO NASCIMENTO

TRANSCRIÇÃO DE GENES RESPONSÁVEIS
PELA SÍNTESE DE RNA RIBOSSÔMICO
EM *Bacillus subtilis*

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

SÃO PAULO

1975

a meus pais

a Cesar

ABREVIATURAS

cpm = contagem por minuto
d = dalton
DNA = ácido desoxirribonucleico
rDNA = DNA que codifica para RNA ribossômico
DNase = desoxirribonuclease
EDTA = ácido etilenodiaminotetracético
g = tempo de geração médio
MAK = albumina metilada kieselguhr
PPO = 2,5-difeniloxazol
POPOP = 1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)benzeno
RNA = ácido ribonucleico
mRNA = RNA mensageiro
rRNA = RNA ribossômico
tRNA = RNA de transferência
RNase = ribonuclease
RNase A = ribonuclease de pâncreas bovino
RNase T₁ = ribonuclease de Aspergillus oryzae
SDS = dodecilsulfato de sódio
SSC = NaCl 0,15 M e citrato de sódio 0,015 M
TCA = ácido tricloroacético
Tris = Tris (hidroximetil)aminometano

AGRADECIMENTOS

A Walter Colli pela sua forma séria, humana e extremamente honesta de orientar e por ter me proporcionado condições de crescer em direção à independência científica. Julgo que sua confiança em mim fez com que me sentisse capaz de assumir responsabilidades. A nossa convivência me ensinou a ver a importância do espírito crítico na realização de um trabalho científico consciente.

A Hernan Chaimovich pela liberdade de diálogo que me ofereceu e por ter dividido comigo também, seus conhecimentos e sua vivência. De nossas conversas sempre surgiram sugestões valiosas.

A Erasmo G. Mendes que despertou em mim o interesse pela pesquisa científica no início de minha formação.

O desenvolvimento desse trabalho foi facilitado pela colaboração de inúmeras pessoas e Instituições, às quais expresso meus agradecimentos. Em especial:

A Shigueko Sonohara, amiga e companheira, que me auxiliou muito nas primeiras etapas experimentais.

A D. Carmem Martins Pinto, D. Mercides M. Garcia e Sr. Aparecido Martins pela colaboração e assistência técnica.

A Renata Zingales e Antonio Domingos Farah pela simpatia e ótima disposição com que enfrentaram a realização dos desenhos dessa tese.

A D. Isa Ruiz Cunha pela datilografia do rascunho final dessa dissertação.

A todos os colegas do Bloco 10 pelo ambiente de amizade e de alegria criado e pelas sugestões que ofereceram durante o desenrolar desse trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Pesquisas pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

	PÁG.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Características gerais de ribossomos de pro- cariotos	3
1.1.1. Estrutura das moléculas de rRNA em procario- tos	4
1.1.2. Proteínas ribossômicas	7
1.1.3. Interação entre rRNA e proteínas no ribosso- mo	8
1.2. Genes responsáveis pela síntese de RNA ri- bossômico	10
1.2.1. Dosagem de genes para rRNA	11
1.2.2. Mapeamento de genes para rRNA	13
1.3. Transcrição de genes para rRNA	16
1.3.1. Unidade transcripcional	16
1.3.2. Métodos de análise do mecanismo de trans- crição de genes para rRNA	18
1.3.2.1. Mapeamento transcripcional por actinomi- cina D	18
1.3.2.2. Mapeamento transcripcional por rifampicina	19
1.3.2.3. Estudos em mutantes "Stringent"	22
1.3.2.4. Mapeamento radiológico	22
1.3.2.5. Análise dos produtos de terminação de trans- crição <u>in vitro</u>	23
1.3.2.6. Síntese de rRNA em mutantes deficientes em RNase III	25
1.3.2.7. Comentários	27
1.4. Objetivos	29
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1. Material	32
2.1.1. Aparelhos	32
2.1.2. Reagentes	33
2.1.3. Material de vidro	34
2.2. Métodos	35
2.2.1. Cepas bacterianas e condições de cultura	35

	PÁG.
2.2.1.1. Cepas bacterianas	35
2.2.1.2. Condições de cultura	35
2.2.1.3. Verificação da existência de mutantes resis- tentes à rifampicina	37
2.2.1.4. Efeito bactericida da rifampicina	37
2.2.2. Preparação das soluções de rifampicina	38
2.2.3. Cinética de incorporação de uridina tritiada em ácidos nucleicos	38
2.2.4. Alongamento de cadeias de rRNA em presença de rifampicina	40
2.2.4.1. Marcação de rRNA	41
2.2.4.2. Lise das bactérias	42
2.2.4.3. Obtenção de subunidades ribossômicas em gra- diente de sacarose	43
2.2.4.4. Determinação da radiatividade e atividade específica das subunidades ribossômicas	43
2.2.4.5. Tratamento das células de <u>E. coli</u> B com EDTA	44
2.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida - Aná- lise do RNA ribossômico	45
2.2.5.1. Preparação do gel e condições de eletrofo- rese	45
2.2.5.2. Preparação das amostras	46
2.2.5.3. Determinação do perfil de absorbância e de radiatividade no gel	47
2.2.6. Hibridização competitiva	48
2.2.6.1. Isolamento, fragmentação e denaturação do DNA	48
2.2.6.2. Separação das fitas complementares de DNA	48
2.2.6.3. Purificação do rRNA radiativo	49
2.2.6.4. Purificação do rRNA competidor	50
2.2.6.5. Hibridização competitiva	51
3. RESULTADOS	53
3.1. Características da síntese de RNA em <u>Bacillus</u> <u>subtilis</u>	53
3.1.1. Incorporação de uridina tritiada em ácidos nucleicos	53
3.1.2. Inibição da síntese de RNA por rifampicina	59

	PÁG.
3.1.3. Efeito bactericida da rifampicina	67
3.1.4. Cinética de marcação de RNA em presença de rifampicina	69
3.1.5. Análise do RNA sintetizado em presença de rifampicina	72
3.2. Estudo do alongamento das cadeias de rRNA em presença de rifampicina	74
3.2.1. Iniciação sincrônica da transcrição de rRNA- Tentativa de análise	77
3.2.2. Alongamento das cadeias de rRNA em presença de rifampicina	79
3.2.2.1. Alongamento de cadeias de rRNA em presença de rifampicina em culturas de <u>B. subtilis</u> . Análise em diferentes tempos de geração	80
3.2.2.2. Alongamento de cadeias de rRNA em presença de rifampicina em culturas de <u>E. coli</u> . Aná- lise em diferentes tempos de geração	89
3.2.2.3. Análise da razão de radiatividade quando ri- fampicina e uridina são concomitantemente adicionadas	92
3.2.2.4. Análise do RNA presente nas subunidades ri- bossômicas por eletroforese em gel de poli- acrilamida	92
3.2.2.5. Análise do RNA presente nas subunidades ri- bossômicas por hibridização competitiva	100
3.2.2.6. Correção dos valores de radiatividade in- corporada nas subunidades ribossômicas 50S e 30S	103
3.3. Controles adicionais	104
3.3.1. Determinação do tempo necessário para a as- sociação entre rRNA e proteínas ribossômicas	105
3.3.2. Análise do efeito de rifampicina no proces- so de associação entre rRNA e proteínas ri- bossômicas	107
4. DISCUSSÃO	111
4.1. Cinética de marcação de RNA	111

	PÁG.
4.2. Transcrição de genes para RNA ribossômico	119
RESUMO	130
SUMMARY	132
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
6. APÊNDICE	153
6.1. Incorporação de um precursor radiativo de RNA adicionado no tempo zero	154
6.1.1. Em ausência de rifampicina	154
6.1.2. Em presença de rifampicina	156
6.2. Cinética de incorporação de radiatividade em função do tempo de exposição à rifampicina	161
6.3. Efeito do tempo de latência da rifampicina sobre as razões iniciais e sobre a cinética de incorporação	167

1. INTRODUÇÃO

O processo de expressão gênica é resultante da interação de dois mecanismos: transcrição e tradução. O mecanismo de transcrição consiste na passagem 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 (1941) e Brachet (1942) 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 uma estrutura especial, a qual se apresenta sob forma de partículas pequenas, diferenciadas das mitocôndrias por seu tamanho e composição (Claude, 1941; Hogeboom et al., 1946; Chantrenne et al., 1947; Hogeboom et al., 1948).

Claude (1946) localizou essas partículas numa fração membranosa, isolada a partir de homogeneizados de fígado de rato, à qual deu o nome de "microsossomos". Nessas

estruturas, além do componente particulado rico em RNA e proteínas, denominado mais tarde "ribossomo" (Palade e Siekevitz, 1956; Chao, 1957), encontra-se um elemento membranoso rico em fosfolipídio e proteínas, que foi chamado "retículo endoplasmático".

O envolvimento específico dos ribossomos no processo de síntese proteica foi sugerido pelos trabalhos de Littlefield et al. (1955) e Littlefield e Keller (1957). Esses autores mostraram que a incorporação de aminoácidos, in vivo, ocorre ao nível das ribonucleoproteínas (ribossomos) da fração microsomal.

As primeiras evidências da existência de ribossomos em células de procariotos derivaram da análise de micrografias eletrônicas de lisados bacterianos (Luria et al., 1943). Um estudo detalhado das propriedades físico-químicas dos ribossomos de diversos gêneros de bactérias foi realizado por meio de ultracentrifugação analítica (Schachman et al., 1946), concluindo-se que essas partículas, de coeficientes de sedimentação 40S e 29S, são encontradas em todos os grupos taxonômicos bacterianos analisados.

Os ribossomos, por serem os centros 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, destacando-se as revisões elaboradas por Osawa (1968), Schlessinger e Apirion (1969), Attardi e Amaldi (1970), Nomura (1970), Davies e Nomura (1972), Kurland (1972), Pace (1973).

Essa introdução limitar-se-á a rever os dados relativos à análise estrutural do RNA ribossômico e seus genes correspondentes, bem como aos mecanismos de transcrição dessa espécie de RNA em procariotos.

1.1. 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 (Roberts, 1958; Tissières e Watson, 1958; Tissières et al., 1959). 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+} às subunidades 50S e 30S provoca a reconstituição das partículas 70S;

- d) os pesos moleculares dessas subpartículas foram calculados como sendo, para a 50S de $1,8 \times 10^6$ d, e de $0,85 \times 10^6$ d, para a 30S;
- e) na constituição de ambas participam aproximadamente 40% de proteínas e 60% de RNA, e uma pequena fração de poliaminas, descoberta mais tarde por Spahr (1962).

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 (Mangiarotti e Schlessinger, 1967; Kaempfer et al., 1968; Subramanian et al., 1968).

1.1.1. 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, cujo 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 (Kurland, 1960; Rosset e Monier, 1963; Stanley e Bock, 1965). Pode-se estimar que a esses pesos moleculares correspondam cadeias de 3 200 nucleotídeos para rRNA 23S, 1 600 nucleotídeos para rRNA 16 S e 110 resíduos para o rRNA 5S.

Os estudos sobre rRNA voltaram-se, também, para a área da análise da composição de bases, revelando que

essa classe de ácidos nucleicos apresenta, como característica importante, uma assimetria no que diz respeito às altas quantidades de guanina em relação às baixas de citosina (Spahr e Tissières, 1959; Osawa, 1960); 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 (Miura, 1962; Midgley, 1962). Observou-se, ainda, que nas espécies de rRNA de alto peso molecular encontram-se, além dos nucleotídeos de bases naturais, nucleotídeos metilados (tanto nas bases nitrogenadas, como na porção do açúcar) e a presença de ácido pseudouridílico (Gordon et al., 1964; Hayashi et al., 1966; Dubin e Günlap, 1967; Sogin et al., 1972).

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 sequência nucleotídica do RNA (vide revisões elaboradas por Sanger e Brownlee, 1967; e por Gilham, 1970), a tarefa ainda não foi 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 (Brownlee et al., 1967) e de Pseudomonas fluorescens (DuBuy e Wissman, 1971), verificando-se que existem certas características em comum (apesar de o rRNA ter sido extraído de espécies filogeneticamente distintas). Das moléculas de rRNA 16S é conhecida, somente, a sequência nucleotídica de alguns fragmentos grandes que constituem 70% da molécula (Ehresmann

et al., 1972; Fellner et al., 1972, a, b). Recentemente, Shine e Dalgarno (1974) determinaram a sequência de um segmento da extremidade 3' (OH) do rRNA 16S de E. coli. A análise revelou que os tres nucleotídios terminais são complementares aos codons terminadores dos mRNAs. Além disso, esses autores verificaram que um outro segmento do rRNA 16S contém uma sequência 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. 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 (Boedtker e Kelling, 1967; Cantor, 1968; Lewis e Doty, 1970).

Fellner et al. (1972, b) e Shine e Dalgarno (1974) propuseram um modelo de estrutura secundária da extremidade 3' (OH) do rRNA 16S de E. coli, onde os 13 últimos resíduos estariam livres para interagir com outros polinucleotídios.

1.1.2. Proteínas Ribossômicas

O trabalho pioneiro de Waller e Harris (1961) 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 (Craven et al., 1969; Traut et al., 1969). De acordo com estudos químicos e imunológicos, foi demonstrada a não existência de proteínas em comum entre as subunidades 50S e 30S (Strand e Sypherd, 1969; Traut et al., 1969).

Durante algum tempo pensou-se que as populações de subunidades 30S e 50S fossem homogêneas quanto à sua composição proteica. Os trabalhos de Kurland et al. (1969), 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, a 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.

A importância das proteínas ribossômicas da subunidade 30S no reconhecimento de RNAs mensageiros ficou evidente pelos experimentos de Goldberg e Steitz (1974). Esses autores, baseados no fato de que os ribossomos de E. coli iniciam, in vitro, a síntese das 3 proteínas do fago R17, enquanto os de B. stearothermophilus reconhecem apenas a região da proteína A, analisaram quais os componentes da subunidade 30S responsáveis pelo reconhecimento do mRNA. 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 (Traut et al., 1969).

1.1.3. Interação entre rRNA e Proteínas no Ribossomo

Os trabalhos de Traub e Nomura (1968 a,b) 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 leva 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 (Nomura et al., 1968).

Partículas 50S de B. stearothermophilus (Fahnestock et al., 1973; Nomura e Erdmann, 1970) e de E. coli (Maruta et al., 1971), 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 (Møller et al., 1969) os quais se apresentariam, preferencialmente, como regiões de nucleotídeos não pareados (Cotter et al., 1967).

Estudos sobre a ligação e liberação do 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, nessa conformação, é incapaz de promover a síntese proteica in vitro, num sistema dependente de poli U (Sarkar e Comb, 1969).

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

1.2. GENES RESPONSÁVEIS PELA SÍNTESE DE RNA RIBOSSÔMICO

Segundo a definição de Schlessinger e Apirion (1969) um gene ribossômico estrutural é aquele que contém a informação para a síntese de uma molécula de rRNA ou de proteína 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 (Dubnau et al., 1965a; Takahashi et al., 1967).

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 (Miura, 1962; Midgley, 1962), embora a composição de bases do genoma desses organismos, refletida no seu conteúdo de G + C, seja extremamente variável (Sueoka, 1961).

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, frequentemente, muito pouca homologia de sequências nucleotídicas, como ficou definido por experimentos de hibridização DNA-RNA (apud Pace, 1973).

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 responsáveis pelos mecanismos de interação com proteínas ribossômicas e pelo papel funcional do ribossomo na síntese proteica.

1.2.1. Dosagem de Genes para rRNA

Os resultados de hibridização entre RNA ribossômico e DNA homólogo, purificados a partir de diferentes espécies bacterianas, foram de importância fundamental para o desenvolvimento do estudo de dosagem e mapeamento dos genes ribossômicos (Yankofsky e Spiegelman, 1962 a, b).

Nos estudos de Yankofsky e Spiegelman (1962 a, b) 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 (Yankofsky e Spiegelman, 1963). Essa verificação, aliada a estudos de composição de bases e de sequência 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 (Attardi et al., 1965), 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 (Smith et al., 1968).

Os dados relativos à dosagem de genes para rRNA 5S nas diferentes espécies bacterianas são bastante controversos. Zehavi-Willner e Comb (1966) estimaram em E. coli que o número de genes para rRNA 5S é o dobro do número de genes para rRNA de alto peso molecular, ao contrário dos achados para B. subtilis (Smith et al., 1968). Pace e Pace (1971) em estudos de hibridização em filtro, nos quais empregaram rRNA 5S altamente purificado, verificaram que, tanto em E. coli como em B. megaterium, os genes para rRNA 5S estão representados, no genoma, em um número de cópias igual àquele dos genes para rRNA de alto peso molecular. Os resultados obtidos anteriormente por Zehavi-Willner e Comb (1966) foram, provavelmente, ocasionados pelo uso de moléculas de rRNA 5S contaminadas por outras espécies de RNA. Os resultados de Smith et al. (1968), criticados por Pace e Pace (1971) por se originarem do uso de métodos pouco sensíveis, entretanto foram confirmados por hibridização com rRNA 5S marcado com ^{32}P de alta atividade específica (Colli, 1971).

Estudos recentes de microscopia eletrônica sobre o mapeamento de genes ribossômicos em B. subtilis (Chow e Davidson, 1973), confirmam as conclusões de Smith et al. (1968), mostrando que o número de cópias de genes para 5S, parece ser, de fato, menor que o número de genes para rRNA de alto peso molecular.

Se o número de genes para rRNA 5S é menor que o número de genes para rRNA 16S e 23S, e já que, na célula, o número de moléculas de cada espécie de rRNA é o mesmo, deve existir, provavelmente, um mecanismo de regulação, segundo o qual a velocidade de síntese da espécie 5S é maior que a das espécies para 16S e 23S (apud Chow e Davidson, 1973).

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 (Yankofsky e Spiegelman, 1962, a, b; Oishi e Sueoka, 1965; Kennel, 1968).

1.2.2. 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 pôde 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 experimentos de transformação, em células de B. subtilis, permitiu o mapeamento de genes ribossômicos no cromossomo dessa bactéria. Oishi e Sueoka (1965), Dubnau et al. (1965 b), Smith et al. (1968) por meio da germinação sincronizada de esporos de B. subtilis, em meio contendo 5-bromouracila ou D_2O , conseguiram 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 o RNA compreendidas entre os tempos de replicação do mapa genético de 74 a 77 minutos e 54 a 59 minutos (Cutler e Evans, 1967; Yu et al., 1970). Os genes para o rRNA em E. coli foram visualizados ao microscópio eletrônico (Miller et al., 1970).

Os estudos relatados acima não forneceram informação sobre as relações topológicas entre os genes para RNA ribossômico 5S, 16S e 23S.

Colli e Oishi (1969), 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+} (Nandi et al., 1965), 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 demonstrar a ligação física entre os genes para rRNA 23S e 16S (Colli e Oishi, 1969) e para purificar os genes para rRNA de B. subtilis (Colli e Oishi, 1970). Esses autores observaram, por meio de experimentos de cohibridização que, em fragmentos de DNA de fita simples de peso molecular 2×10^6 d, ocorre uma ligação entre

os genes para rRNA 23S e 16S. Concluíram que esses genes redundantes são contíguos e alternados em séries, constituídas por um gene para rRNA 23S e um para rRNA 16S. Repetindo-se os experimentos com fragmentos de peso molecular de 2 e 4×10^6 d verificou-se que, os genes para rRNA 5S também são ligados aos genes para as outras espécies de rRNA (Colli et al., 1971). Com fragmentos de peso molecular 1×10^6 d ou 3 a 5×10^5 d perde-se a ligação entre os genes para rRNA 23S e 16S, mas mantem-se, ainda, a ligação entre os genes para 23S e 5S. Tais observações levaram às conclusões: a) que os genes para rRNA, em B. subtilis, são fisicamente ligados em agrupamentos, os quais contêm um gene para cada espécie de rRNA, b) que em cada agrupamento o gene para 5S estaria mais próximo do gene para 23S que do gene para 16S. Existem, 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 (Colli et al., 1971). 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 (Droppa et al., 1974).

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 (Smith et al., 1969) e genes marcadores, representando, provavelmente, mutações para certas proteínas ribossômicas, os quais conferem resistência a antibióticos que atuam ao nível do ribossomo (Goldthwaite et al., 1970; Harford e Sueoka,

1970). No cromossomo, a proximidade entre os genes para rRNA e proteínas ribossômicas sugere um mecanismo de regulação co ordenada na biogênese do ribossomo.

Smith et al. (1971) analisaram as relações topológicas entre esses marcadores de resistência a antibióticos e os genes para rRNA. Usando o mesmo tipo de técnica desenvolvida por Colli e Oishi (1969) aqueles autores verificaram que não existe ligação física em fragmentos de DNA de fita simples de $4,5 \times 10^6$ d entre esses genes. Tais dados forneceram mais uma evidência de que os genes para rRNA não codificam para proteínas ribossômicas, como havia sido sugerido anteriormente por Otaka et al. (1964).

1.3. TRANSCRIÇÃO DE GENES PARA rRNA

1.3.1. Unidade Transcricional

Uma unidade transcricional 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 transcricional pode conter um ou mais genes e, quando possui um sítio promotor demonstrável, recebe o nome de operon (apud Pace e Pace, 1971).

A verificação da existência de uma ligação física entre os genes para rRNA ribossômico (Colli e Oishi, 1969; Colli et al., 1971) colocou a questão de como esses genes seriam transcritos. Baseando-se nos dados dos trabalhos acima

citados, podem-se construir modelos de transcrição dos genes para rRNA bacterianos (Quadro I).

QUADRO I - Modelos de transcrição dos genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico. A. Modelos de transcrição independente. B. Modelos de cotranscrição. Unidades transcricionais 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 23S pertencem a unidades transcricionais 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 transcricionais independentes; ver outras evidências a seguir). O modelo B representa o arranjo dos genes para as três espécies de rRNA na mesma unidade transcricional, 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.

1.3.2. 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, tem sido feita por meio do uso de diferentes técnicas, descritas a seguir.

1.3.2.1. Mapeamento transcricional por actinomicina D

O enfoque experimental, adotado por Bleyman e Woese (1969), 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 (Reich et al., 1962), 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 transcricional, mais sensível à inibição por actinomicina será a síntese de seu produto. Bleyman et al. (1969), por meio dessa técnica, concluíram, em B. subtilis, a) que os genes para tRNA acham-se agrupados em unidades policistrônicas (de aproximadamente 100 cistrons); b) que os genes para rRNA 16S e 23S são transcritos a partir de unidades independentes; e c) que o cistron para rRNA 5S faz parte da unidade que contém 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 modelo A-1 referente à transcrição de genes ribossômicos em B. subtilis (Quadro I).

1.3.2.2. Mapeamento transcricional por rifampicina

O antibiótico rifampicina é o derivado semi-sintético da rifamicina B (Maggi et al., 1966). Estudos iniciais (Timbal, 1960) 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 rifampicina tem um efeito específico na inibição da síntese de RNA (Lancini e Sartori, 1968; Lancini et al., 1969). O isolamento da RNA polimerase bacteriana permitiu verificar que esta é o alvo do antibiótico (Hartmann et al., 1967; Sippel e Hartmann, 1968; Umezawa et al., 1968; Wehrly et al., 1968, a, b) o qual forma estequiometricamente com a enzima um complexo de baixa constante de dissociação (Wehrly et al., 1968, c).

O sítio de ligação da rifampicina está localizado na subunidade β da RNA polimerase bacteriana como observaram Zillig et al. (1970). Esses autores demonstraram 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 (Sippel e Hartmann, 1968; Pato e von Meyenburg, 1970).

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 consequência 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 frequência 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 no Quadro I, pode-se prever a razão de radiatividade incorporada nas espécies de rRNA 23S e 16S em presença do antibiótico (vide Pato von Meyenburg, 1970 e análise teórica no Apêndice deste volume).

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 (Doolittle e Pace, 1970; Pato e von Meyenburg, 1970; Bremer e Berry, 1971; Doolittle e Pace, 1971).

As mesmas conclusões chegaram Gupta e Singh (1972), que usaram a rifampicina para sincronizar o processo de transcrição.

1.3.2.3. 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% (Lazzarini e Winslow, 1970).

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 (Stamato e Pettijohn, 1971). Essa inibição é revertida pela adição de aminoácido essencial ao meio de cultura, o que resulta numa sincronia parcial da síntese de rRNA. Kossman et al. (1971) verificaram em células de E. coli, cuja transcrição foi sincronizada pela reposição do aminoácido essencial, que a síntese de rRNA 16S inicia-se antes que a síntese de rRNA 23S.

1.3.2.4. Mapeamento radiológico

Estudos baseados na técnica de mapeamento radiológico de unidades transcricionais 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 (Sibatani e Mizuno, 1963). 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 (Bleyman e Woese, 1969).

Kroes et al. (1963), Sibatani e Mizuno (1963) e, mais recentemente, Hackett e Sauerbier (1974) mediram a velocidade de inativação da síntese das espécies do rRNA 23S, 16S e 5S, após a exposição de células de E. coli a doses variáveis de luz U.V. A análise de seus resultados levou-os a concluir que as três espécies de RNA ribossômico são cotranscritas, na ordem: 16S, 23S e 5S. Hackett e Sauerbier (1974), baseados nesses dados, conseguiram atribuir à unidade transcricional um tamanho de $1,85$ a $2,1 \times 10^6$ d.

1.3.2.5. Análise dos produtos de terminação de transcrição in vitro

Pettijohn (1969) e Pettijohn et al. (1970) isolaram, de células de E. coli, complexos ("nucleoides") que contêm moléculas de RNA polimerase e cadeias de RNA nascente, as 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 $1,25 \times 10^6$ e $1,7 \times 10^6$ 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 $1,25 \times 10^6$ d, denominada p23, contém, apenas, sequências de rRNA 23S. Por outro lado, na espécie de $1,7 \times 10^6$ d, denominada p30, encontram-se sequências 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 da extração dos complexos de iniciação, os produtos p30 e p23, terminados in vitro, contêm marcação. Na espécie p30, as sequências 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 (apud Pace, 1973).

Pettijohn et al. (1970) sugeriram duas possíveis hipóteses para explicar o aparecimento in vitro dos RNAs de alto peso molecular: 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 (Roberts, 1969). 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 hipótese 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 experimentos 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.

1.3.2.6. 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 (Dunn e Studier, 1973; Nikolaev et al., 1973).

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 (Nikolaev et al., 1973).

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 vivo (Pettijohn, 1969; Pettijohn et al., 1970).

A enzima RNase III degrada, especificamente RNA de dupla fita (Robertson et al., 1968) e é incapaz de atacar híbridos DNA-RNA (Crouch, 1974). Desde que os estudos, relatados acima, foram realizados com mutantes de E. coli com lesão específica de RNase III, parece possível que tal enzima esteja envolvida no processamento do pré-RNA 30S. Nesses mutantes, os baixos níveis de RNase III provocariam o acúmulo das formas precursoras do RNA ribossômico. O envolvimento de RNase III, no processamento do precursor 30S, foi comprovado incubando-se a molécula de pré-rRNA 30S com a enzima altamente purificada, observando-se a produção de RNA 25S e 17,5S (Nikolaev et al., 1973).

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 $0,65 \times 10^6$ d (Nikolaev et al., 1974). Com base nesses dados, pode-se calcular que, na espécie de pré-rRNA 30S, existe 22% de sequência em excesso do que o 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 suscetíveis ao ataque por RNase III (Nikolaev et al., 1974).

1.3.2.7. Comentários

Torna-se claro que todas as evidências provenientes dos mais variados métodos de análise empregados, apontam ser, em E. coli, mais provável o mecanismo de cotranscrição dos genes para RNA ribossômico. A partir dos dados de terminação da transcrição in vitro, e dos estudos realizados em mutantes RNase III⁻, parece que o rRNA de E. coli é transcrito numa molécula precursora única (p30S) de peso molecular de $1,7 \times 10^6$ d segundo Pettijohn (1969) e Pettijohn et al. (1970) ou $2,1 \times 10^6$ d de acordo com Nikolaev et al. (1974). Tais dados concordam com as medidas da unidade transcripcional de 1,85 a $2,1 \times 10^6$ d, calculadas por mapeamento radiológico (Hackett e Sauerbier, 1974). A molécula precursora p30S seria clivada na espécie de 17,5S ($0,65 \times 10^6$ d), (localizada

na extremidade 5' do precursor) que originaria o rRNA 16S e na espécie p25S ($1,20 \times 10^6$ d), que daria o rRNA 23S maduro (Nikolaev et al., 1973, 1974). A espécie p23S ($1,25 \times 10^6$ d) de Pettijohn (1969), análoga à p25S, também foi obtida nas reações de terminação in vitro, a partir dos complexos iniciados in vivo. Nesse tipo de estudo não foi verificada a espécie p16S, sugerindo a necessidade de uma nuclease específica que removeu essa molécula da espécie precursora p30S. Poder-se-ia tentar adicionar RNase III aos complexos de iniciação, para verificar se é possível obter a espécie p16S in vitro.

Para B. subtilis os únicos dados existentes na literatura sugerem que os genes para RNA ribossômico são transcritos independentemente (Bleyman et al., 1969).

Deve-se comentar que as espécies de RNA ribossômico de eucariotos 18S e 28S também derivam de um precursor único, que apresenta um coeficiente de sedimentação de 45S (vide revisão elaborada por Burdon, 1971).

O processamento desse precursor é inibido pela adição de agentes intercalantes, o que poderia ser uma indicação de que os sítios de ataque nessa molécula também apresentam estrutura em dupla fita (Snyder et al., 1971).

Seria interessante verificar se enzimas, semelhantes à RNase III, desempenham algum papel no processamento de RNAs de organismos superiores e, em que grau a especificidade de clivagem se conservou durante a evolução.

1.4. OBJETIVOS

O estudo do processo de transcrição dos genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico em B. subtilis constitui o principal objetivo desse trabalho.

Os trabalhos de Colli e Oishi (1969, 1970) e Colli et al. (1971) demonstraram que os genes para rRNA estão dispostos, no cromossomo, em agrupamentos constituídos por uma cópia para cada espécie de RNA ribossômico, e que, em cada agrupamento, o gene para rRNA 5S está muito mais próximo daquele para rRNA 23S do que para 16S. Por meio da técnica utilizada pelos autores acima citados não foi possível determinar qual a ordem de disposição dos genes ribossômicos, no cromossomo bacteriano, em relação à extremidade de transcrição 5'.

Um estudo dessa natureza não apenas complementaria a literatura referente aos genes para rRNA, como, também, forneceria os elementos para a análise do processo de transcrição desses genes.

Em células de eucariotos, os genes para rRNA 18S e 28S são transcritos numa molécula precursora única, de coeficiente de sedimentação 45S, processada até originar as duas formas maduras de RNA ribossômico. A existência de tal precursor garante um mecanismo coordenado e concomitante da síntese de moléculas que devem aparecer, na célula, com a mesma frequência.

A análise do mecanismo de transcrição dos genes ribossômicos de procariotos é de extrema importância para

verificar qual o grau de conservação que a presença de um precursor comum das espécies de RNA ribossômico apresenta. A partir da análise dos resultados desse tipo de estudo, poder-se-ia passar a investigar quais os mecanismos que controlam a síntese de moléculas funcionais para o desenvolvimento celular.

O enfoque experimental adotado, inicialmente, no estudo do processo de transcrição dos genes ribossômicos, o qual daria, também, informações sobre as relações topológicas entre tais genes, consistiu numa análise temporal dos produtos transcritos, in vitro, usando-se RNA polimerase de B. subtilis^{*}, e os genes ribossômicos homólogos.

Os genes para rRNA, utilizados no ensaio de transcrição, foram reconstituídos a partir de rDNA (purificado segundo Colli e Oishi, 1970), que foi renaturado com a fita de DNA complementar. Tal precaução é necessária, uma vez que, a RNA polimerase de B. subtilis não tem afinidade por DNA de fita simples. No sistema de transcrição in vitro, assim constituído, foi impossível obter-se síntese de RNA, muito provavelmente porque os genes para rRNA não se apresentaram como um bom "template" para a enzima. Várias podem ser as explicações para esse resultado: a) os genes ribossômicos, reconstituídos a partir das fitas complementares de DNA, apresentariam uma renaturação parcial, na qual haveria algumas

porções em fita simples e outras em dupla fita; b) os genes teriam um tamanho inadequado para servir como "template" para a enzima; c) os genes ribossômicos não conteriam (ou conteriam muito poucos) sítios promotores, ou de iniciação da transcrição, nos quais a RNA polimerase poderia complexar-se.

Tendo em vista a multiplicidade de alternativas que permitiriam explicar a ausência de transcrição num sistema dessa natureza e uma série de dificuldades de natureza metodológica, abandonou-se esse enfoque experimental.

Passou-se então a analisar o processo de transcrição dos genes ribossômicos in vivo, em condições que perturbem esse processo. O antibiótico usado para essa finalidade foi a rifampicina, inibidor específico da iniciação de transcrição, característica que o apresenta como uma arma metodológica extremamente interessante.

Durante a realização desse trabalho surgiram, na literatura, dados extensamente discutidos nesta Introdução que sugerem que os genes para rRNA são cotranscritos em E. coli, numa molécula precursora única, que poderia ser análoga ao precursor ribossômico 45S de células de eucariotos.

^{*} Agradeço ao Dr. Oscar Grau da Faculdade de Ciências Exatas de La Plata (Argentina) as valiosas sugestões apresentadas para a realização desses experimentos, bem como o oferecimento de seu laboratório e por ter cedido, gentilmente, a RNA polimerase de B. subtilis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Aparelhos

As bactérias foram cultivadas em agitador rotatório da "New Brunswick Scientific Co., Inc.". O crescimento bacteriano foi seguido fazendo-se leituras de absorbância em espectrofotômetro "Coleman Junior II", modelo 6/20.

Os estudos de cinética de incorporação de uridina foram realizados incubando-se as bactérias em banho de temperatura controlada, rotatório da "New Brunswick Scientific Co., Inc."

As centrifugações em baixa rotação foram efetuadas em centrífuga "Sorvall", modelo RC2-B, ao passo que as centrifugações em gradiente foram realizadas em ultracentrífuga Spinco da "Beckman Instruments, Inc." modelos L2-65B e L3-50. Os tubos de nitrato de celulose utilizados nessas centrifugações foram fornecidos pela mesma companhia.

As medidas de absorbância foram feitas em espectrofotômetro modelo PMQ II da "Carl Zeiss", em cubetas de 1 cm de caminho óptico e em espectrofotômetro modelo 240 da "Gilford Instruments", em cubetas de 0,5 ml. de 1 cm de caminho óptico, ou de 0,1 cm de caminho óptico.

Para a determinação de radiatividade foi utilizado o espectrômetro de cintilação líquida, modelo LS-250

da "Beckman Instruments, Inc.", com eficiência de 58,5% para trítio. Os frascos de cintilação foram obtidos dessa mesma companhia.

Os perfis de absorbância das eletroforeses em gel de poliacrilamida foram efetuadas em densitômetro "Joyce Loebel" (UV Scanner); o gel foi seccionado em aparelho de mesma procedência.

2.1.2. Reagentes

Na preparação de alguns meios de cultura usou-se caldo nutritivo, hidrolisado ácido de caseína e bacto-agar da "Difco".

Rifampicina, cloranfenicol e ácido nalidíxico foram obtidos da "Calbiochem".

Desoxirribonuclease I (eletroforeticamente pura), com atividade de 2 200 U/mg, foi fornecida pela "Worthington Biochemical Corporation". Lisozima (a.e. maior que 11.100 U/mg), Ribonuclease A (a.e. 65 000 U/mg) e Ribonuclease T₁ (5 000 U/frasco), foram adquiridas da "Calbiochem".

Nas centrifugações em gradiente usaram-se soluções de sacarose da "BDH Chemicals Ltd." ou "Carlo Erba" autoclavadas a 120°C por 30 minutos ou fervidas durante 1 hora.

Nos experimentos de incorporação usou-se uridina 5,6-³H (a.e. 45,4 Ci/mmol), obtida da "New England Nuclear". A uridina não radiativa tinha procedência da "Sigma Chemical Co.".

Os filtros de nitrocelulose HA, com poros de 0,45 μ , provinham da "Millipore Corporation". Os reagentes usados na preparação dos líquidos de cintilação foram PPO (2,5-difeniloxazol) e POPOP (1,4-bis-(5-feniloxazolil-2)-benzeno), obtido da "Calbiochem". O tolueno utilizado foi da "E. Merck, Darmstadt", ou produto técnico, destilado em laboratório.

Na preparação do gel de poliacrilamida usou-se acrilamida da "BDH Chemicals Ltd." e etileno diacrilato da "Borden Chemical, Div. of Borden, Inc.". Na determinação da radiatividade das frações desse gel, a piperidina empregada foi da "Carlo Erba", o hidróxido de hiamina 10X da "Packard" e o Triton X100 da "Rohm and Haas".

Todos os outros reagentes usados na preparação de soluções foram produtos que possuíam grau analítico. As soluções foram feitas em água bidestilada e autoclavadas a 120°C por 30 minutos, para eliminar contaminação por nucleases.

2.1.3. Material de Vidro

Todo o material de vidro empregado foi previamente autoclavado a 120°C por 30 minutos, ou mantidos a 150°C por 1 hora, em forno Pasteur.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Cepas Bacterianas e Condições de Cultura

2.2.1.1. Cepas bacterianas

Uma cepa mutante de Bacillus subtilis ura⁻leu⁻, proveniente do tipo selvagem, foi usada em alguns experimentos de marcação com uridina tritiada e de sensibilidade à rifampicina. A bactéria do tipo selvagem (168 W) foi utilizada nos estudos de transcrição do RNA ribossômico.

Em alguns estudos comparativos usou-se a cepa selvagem de Escherichia coli tipo B.

2.2.1.2. Condições de cultura

B. subtilis e E. coli foram crescidos a 37°C (a não ser quando especificado) em agitador rotatório, em meio de cultura básico de Anagnostopoulos e Spizizen (1961), contendo, por litro de solução, 6 g de KH₂PO₄, 14 g de K₂HPO₄, 2 g de (NH₄)₂SO₄, 1 g de citrato de sódio e 0,2 g de MgSO₄. Esse meio foi suplementado, conforme especificado em cada experimento, com diferentes fontes de carbono. Abaixo relaciona-se, para cada meio, a nomenclatura adotada, a concentração da fonte de carbono e o tempo de geração da cultura de B. subtilis (ver, a seguir, o método de determinação desse parâmetro).

Meio de Cultura	Conc. da Fonte de C	Tempo de Geração médio
Glicerol (A)	Glicerol (6,3 g/l)	65 min.
Glicose (A)	Glicose (2 g/l)	55 min.
Glicose-aminoácidos (A)	Glicose (5 g/l), Triptofano (50 µg/ml), Hidrolisado ácido de caseína (250 µg/ml)	40 min.
Glicose-aminoácidos-uridina (A)	Glicose (5 g/l), Triptofano (50 µg/ml), Hidrolisado ácido de caseína (250 µg/ml), Uridina (10 µg/ml)	65 min.

Em alguns experimentos E. coli B foi crescida em meio de cultura mínimo de Helmstetter (1967), contendo, por litro de meio, 6 g de Na_2HPO_4 , 3 g de KH_2PO_4 , 2 g de NH_4Cl , 3 g de NaCl e 0,25 g de MgSO_4 . Nesse caso também o meio foi suplementado com diferentes fontes de carbono, especificadas em seguida.

Meio de Cultura	Conc. da Fonte de C	Tempo de Geração médio
Glicerol (B)	Glicerol (2 g/l)	55 min.
Glicose (B)	Glicose (2 g/l)	45 min.
Glicose-aminoácidos (B)	Glicose (2 g/l) Hidrolisado de caseína (250 µg/ml)	30 min.

As culturas foram feitas a partir de um inóculo de bactérias em fase estacionária, crescidas no mesmo meio e diluídas 100 vezes. O crescimento bacteriano foi seguido por meio de leituras de absorbância a 540 nm, em espectrofotômetro Coleman.

O cálculo do tempo de geração médio das culturas (g) foi obtido graficamente a partir do logaritmo de absorbância a 540 nm versus o tempo de crescimento (Davies et al., 1969). Esse parâmetro representa o tempo necessário para que a massa da cultura bacteriana duplique, e leve em consideração que a velocidade de crescimento da população aumenta com o tempo (Davies et al., 1969).

2.2.1.3. Verificação da existência de mutantes resistentes à rifampicina

Células de B. subtilis 168W em crescimento exponencial, em meio glicose-aminoácidos (A), foram diluídas convenientemente e plaqueadas em meio sólido constituído de caldo nutritivo (8 g/l) e bacto-agar (15 g/l). Permitiu-se crescimento das colônias a 37°C por 18 horas, fazendo-se, em seguida, réplicas em placas de mesma composição, sem antibiótico ou contendo diferentes concentrações de rifampicina (1 µg/ml, 15 µg/ml, 60 µg/ml e 88 µg/ml). Analisou-se o desenvolvimento de colônias após a manutenção das placas a 37°C, por 24 horas.

2.2.1.4. Efeito bactericida da rifampicina

Células de B. subtilis 168W crescidas em meio glicose-aminoácidos (A) foram expostas, por tempos diferentes,

a concentrações variadas de rifampicina, a 37°C sob agitação. Em seguida foram diluídas convenientemente e plaqueadas em bacto-agar (15 g/l) e caldo nutritivo (8 g/l). As colônias que se desenvolveram após 24 horas a 37°C foram contadas.

2.2.2. Preparação das Soluções de Rifampicina

A solução de rifampicina foi preparada logo antes do uso de acordo com Rosenthal e Reid (1973). Uma certa quantidade da droga foi triturada com um bastão de vidro de ponta redonda em um tubo de ensaio, e dissolvida em pequeno volume de água bidestilada. O material insolúvel foi sedimentado por centrifugação em baixa rotação. A concentração da rifampicina no sobrenadante foi determinada através de sua absorvidade molar a 475 nm. Adotou-se a indicação de que uma solução 1 mM de rifampicina tem absorvância de 15,4 a 475 nm (Maggi et al., 1966).

A solução de rifampicina foi protegida da luz antes de seu uso.

2.2.3. Cinética de Incorporação de Uridina Triterciada em Ácidos Nucleicos

Uma alíquota de 1 a 10 ml (conforme especificado) de uma cultura de B. subtilis em crescimento exponencial ($6,5 \times 10^7$ células/ml) foi adicionada a uma solução composta por uridina 5,6-³H (New England Nuclear - a.e. 45,4 µCi/mmol) em concentração final de 0,5 ou 1 µCi/ml, e uridina não radiativa, em concentração final especificada em cada ensaio.

Quando explicitado, adicionou-se, também, uma solução aquosa de rifampicina.

As culturas assim tratadas foram agitadas em banho rotatório a 37°C. De tempos em tempos retiraram-se alíquotas de 0,5 ml, que receberam tratamentos diferentes, a fim de determinar-se a radiatividade incorporada em ácidos nucleicos totais, em DNA ou em RNA.

A marcação em ácidos nucleicos totais foi obtida segundo a técnica de Roodyn e Mandel (1960), precipitando-se 0,5 ml de cultura bacteriana com igual volume de TCA 10% (p/v), por 30 minutos a 0°C. Em seguida, o precipitado foi coletado em membranas de nitrocelulose (de poros de 0,45 µ) e lavado com 15 ml de TCA 1% (p/v). Os filtros foram secados e colocados em frascos contendo 5 ml de líquido de cintilação A (PPO 4 g/l, POPOP 0,1 g/l e tolueno q.s.p. 1 litro). A radiatividade referente aos ácidos nucleicos totais foi determinada em espectrômetro de cintilação líquida. A incorporação em DNA foi obtida, tratando-se alíquotas de 0,5 ml da cultura bacteriana com igual volume de NaOH 1 N, permitindo-se a hidrólise do RNA por incubação a 37°C, durante 24 horas. Após a neutralização com 0,5 ml de HCl 1 N, as alíquotas foram precipitadas e contadas como descrito acima. A marcação referente ao RNA foi calculada, subtraindo-se dos valores da contagem de ácidos nucleicos totais, a respectiva incorporação em DNA.

Outra maneira de determinar-se a radiatividade consiste em medir diretamente a incorporação em RNA

(ribonucleotídeos) e em DNA, na mesma alíquota da cultura. A técnica adotada, nesse caso, foi descrita por Bremer et al. (1973). Alíquotas de 0,5 ml foram removidas da cultura após diferentes tempos de incubação e precipitadas a 0°C com 2,0 ml de TCA 0,5 M (= 8,1%, p/v). O material insolúvel em ácido foi coletado em filtros de fibra de vidro GF/C (Whatman), lavado com TCA 0,1 M e secado. Os filtros foram colocados em frascos de cintilação, em presença de 1 ml de NaOH 0,2 M, procedendo-se a hidrólise por 18 horas a 24°C. Os hidrolisados foram resfriados a 0°C e o material resistente ao álcali foi precipitado por adição de 1 ml de ácido perclórico 0,5 M. Os ribonucleotídeos foram separados do material insolúvel por filtração em membranas de nitrocelulose, medindo-se a absorbância a 260 nm dos filtrados, a fim de verificar a reprodutibilidade do método. O filtrado (1 ml), contendo os ribonucleotídeos foi coletado diretamente em 10 ml de líquido de cintilação B (PPO 5 g/l, Naftaleno 100 g/l e 1,4-Dioxano q.s.p. 1 litro). Esse procedimento exclui completamente o DNA radiativo, que, permanecendo ligado aos filtros de nitrocelulose, pode ser contado diretamente em líquido de cintilação A.

Nos experimentos de cinética de incorporação de uridina tritiada explicitar-se-á qual das duas técnicas foi empregada.

2.2.4. Alongamento de Cadeias de rRNA em Presença de Rifampicina

A metodologia empregada na marcação do RNA ribossômico de culturas bacterianas, em presença de rifampicina,

foi, basicamente, aquela adotada por Dennis e Bremer (1973). A técnica de obtenção das subunidades ribossômicas foi extraída do trabalho de Gupta e Singh (1972). No entanto, em ambos os casos introduziram-se modificações, razão pela qual a técnica será descrita integralmente.

2.2.4.1. Marcação do rRNA

B. subtilis 168W foi crescido em meio de cultura mínimo suplementado, até uma concentração de $6,5 \times 10^7$ células/ml. Aos zero segundos retirou-se uma alíquota de 5 ml da cultura, a qual foi adicionada a um erlenmeyer de 25 ml, contendo uridina não radiativa, em concentração final de 1 mmol/ml, uridina 5,6-³H, em concentração final de 5 µCi/ml, e rifampicina na concentração final especificada em cada experimento. Essa amostra, que recebeu uridina tritiada e rifampicina concomitantemente, é denominada "tempo zero".

Também aos zero segundos adicionou-se rifampicina, na mesma concentração final, ao volume restante da cultura principal. Esta foi incubada a 37°C sob agitação, e dela retiraram-se amostras de 5 ml, de tempos em tempos (tempo de exposição à rifampicina, especificado em cada resultado). Essas amostras de 5 ml foram adicionadas a erlenmeyers de 25 ml, que já continham uridina radiativa e não radiativa, na mesma concentração final da cultura "tempo zero".

Todas as amostras de 5 ml, expostas à rifampicina por tempos diferentes, receberam um pulso de radiatividade de igual duração (2 a 5 minutos, conforme explicitado em cada

experimento), sendo incubadas em banho rotatório a 37°C. O pulso de radiatividade foi terminado por adição de um excesso de uridina não marcada (1 mg/ml final), por um período de 20 a 30 minutos, a 37°C, sob agitação; esse período, denominado "caça", permite a incorporação do rRNA, marcado durante o pulso, nas subunidades ribossômicas e o esgotamento das espécies de RNA instável.

2.2.4.2. Lise das bactérias

As células de cada amostra, esgotado o período de "caça", adicionaram-se células não marcadas, que servem como "carregadoras" (aproximadamente 3×10^9 células). As bactérias foram então centrifugadas a 4°C a 8000 rpm, por 10 minutos, e lavadas duas vezes com 10 ml de tampão padrão (Tris-HCl 10^{-2} M, pH 7,5; KCl 5×10^{-2} M e acetato de magnésio 10^{-2} M). As células foram ressuspensas em 0,3 ml de tampão padrão contendo lisozima (1 mg/ml) e a lise foi efetuada por 7 congelamentos e degelamentos sucessivos em nitrogênio líquido e banho a 37°C.

Diversas condições foram previamente experimentadas para a obtenção de lisados celulares, dentre elas: variação da concentração de lisozima, variação dos volumes de lise, número de congelamentos e degelamentos, emprego de ultra-som, ruptura por French Press. O método descrito acima mostrou ser o mais eficaz.

Aos lisados adicionou-se desoxicolato de sódio e DNase I, em concentrações finais de 0,2% e 10 µg/ml,

respectivamente, incubando-se por 5 minutos à temperatura ambiente.

Os extratos celulares foram centrifugados a 30000xg, por 25 minutos a 4°C. O sobrenadante amarelado foi retirado, sendo analisado por centrifugação em gradiente de sacarose.

2.2.4.3. Obtenção de subunidades ribossômicas em gradiente de sacarose

A absorbância a 260 nm do sobrenadante de cada amostra foi determinada, a fim de poder-se carregar, em cada gradiente, quantidades iguais de material: no total 4 unidades de $A_{260 \text{ nm}}$, num volume nunca superior a 0,25 ml.

Usaram-se gradientes de 5 ml de volume total, de sacarose 10-30% (p/v), em tampão de baixo Mg^{2+} (Tris-Cl 10^{-2} M, pH 7,5; KCl 5×10^{-2} M e acetato de magnésio 2×10^{-4} M), que foram centrifugados em rotor da Spinco SW 50L ou SW 50.1, por 3,5 horas a 38 000 rpm, 4°C.

Coletaram-se frações de 0,14 ml (8 gotas) por punção do fundo do tubo, determinando-se a absorbância a 260 nm, após diluição de cada fração com 0,2 ml de tampão de baixo Mg^{2+} .

2.2.4.4. Determinação da radiatividade e atividade específica das subunidades ribossômicas

Cada fração do gradiente, relativa às subunidades 50S e 30S, foi precipitada por 30 minutos a 0°C

adicionando-se igual volume de TCA 20% (p/v) e RNA de levedura, em concentração final de 200 µg/ml. Os precipitados foram coletados em filtros de nitrocelulose, que foram lavados com 15 ml de TCA 5%. Após secagem dos filtros, a radiatividade foi determinada em espectrômetro de cintilação líquida.

A incorporação total em cada subunidade 50S ou 30S foi obtida somando-se a radiatividade incorporada em cada fração que compõe a subunidade. A atividade específica de cada partícula ribossômica foi calculada dividindo-se a radiatividade total incorporada pela absorbância total a 260 nm (soma de A_{260nm} de cada fração que compõe a subunidade).

A fim de corrigir as pequenas diferenças nas quantidades de material carregado em cada gradiente, os valores de radiatividade incorporada nas subunidades 50S e 30S, nos diferentes tempos de exposição à rifampicina, foram normalizados para um valor médio de absorbância a 260 nm das subunidades 50S e 30S. Esse valor médio foi calculado fazendo-se a média aritmética da absorbância total das subunidades ribossômicas 50S e 30S obtida nos vários gradientes, dentro do mesmo experimento. Outras correções são descritas em Resultados.

2.2.4.5. Tratamento das células de E. coli B com EDTA

No estudo do alongamento das cadeias de rRNA de E. coli B, em presença de rifampicina, usou-se, basicamente, a mesma metodologia descrita acima para B. subtilis, com a finalidade de tornar os resultados comparáveis. Uma etapa

suplementar, no entanto, foi introduzida a fim de tornar E. coli permeável ao antibiótico. Para tanto, a bactéria foi exposta a um breve tratamento com EDTA como descrito por Rose et al. (1970) e Bremer e Berry (1971).

Em alguns experimentos de análise do alongamento de rRNA em E. coli seguiu-se, na íntegra, o método descrito por Dennis e Bremer (1973).

2.2.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - Análise do RNA Ribossômico

A eletroforese do rRNA em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com Loening (1967), com algumas modificações introduzidas por Perry e Kelley (1968), por J. Mousquer Salles (comunicação pessoal)*, e por nós; razão pela qual a metodologia empregada será descrita com detalhes.

2.2.5.1. Preparação do gel e condições de eletroforese

O gel de poliacrilamida foi obtido pela polimerização de acrilamida e etileno diacrilato. Na separação de rRNA 23S e 16S usaram-se dois tipos de gel, nos quais a concentração final de acrilamida foi de 2,7% (p/v) ou de 2,4% (p/v), persulfato de amônio 0,093% (p/v) e tetrametiletilenodiamina 0,072% (p/v). O gel foi preparado a partir de uma solução estoque de acrilamida 15% e etileno diacrilato 1%.

* Agradeço ao Prof. R.R. Brentani por permitir a utilização de seu laboratório para a execução de alguns desses experimentos e a J. Mousquer Salles por facilitar o acesso à técnica por ela desenvolvida e às soluções de acrilamida.

Tanto na preparação do gel, como durante a eletroforese usou-se o tampão E (Bishop et al., 1967), constituído por Tris-Cl 4×10^{-2} M, acetato de sódio 2×10^{-2} M e EDTA 10^{-3} M, pH 7,2.

O gel, preparado em tubos de Perspex (Plexiglass) de 0,6 cm de diâmetro por 8,5 cm de comprimento, foi pré-corrido durante duas horas a 20°C, em tampão E, em presença de SDS (0,2%, p/v, final), com uma intensidade de corrente de 5 mA/tubo (50V).

Obtem-se uma boa resolução entre o rRNA 23S e 16S com 3 ou 3,5 horas de eletroforese, nas mesmas condições descritas para a pré-corrida.

2.2.5.2. Preparação das amostras

As subunidades ribossômicas 50S e 30S, extraídas de células de E. subtilis, tratadas ou não com rifampicina e cujos RNAs ribossômicos estão marcados com um pulso de uridina tritiada, foram separadas em gradiente de sacarose (nas condições descritas no item 2.2.4.3.). Após a determinação do perfil de absorbância a 260 nm, nesses gradientes, fêz-se um "pool" das frações da subunidade 50S e outro das frações da 30S, os quais foram tratados com SDS em concentração final de 0,25% (p/v), por 10 minutos, à temperatura ambiente (Zimmermann e Levinthal, 1967). As amostras (0,2 ml) foram em seguida colocadas no topo de cada gel.

O RNA ribossômico não radiativo das células "cargadoras", que foram adicionadas durante o processo de lise,

funciona como marcador óptico no gel, fornecendo a absorbância a 260 nm.

2.2.5.3. Determinação do perfil de absorbância e de radiatividade no gel

O gel de poliacrilamida foi colocado numa cubeta de quartzo, medindo-se em densitômetro a absorbância a 260 nm. O perfil foi obtido num registrador acoplado ao aparelho.

Após a determinação da absorbância, o gel foi colocado numa canaleta horizontal e congelado com gelo seco. O gel foi então cortado em secções de 1 mm de espessura.

A radiatividade das frações foi determinada de acordo com Viñuela et al. (1967), transferindo duas secções para um frasco de cintilação, que já continha 1 ml de uma solução de piperidina 1 M. O frasco foi fechado e deixado à temperatura ambiente durante a noite. A seguir, adicionou-se 0,1 ml de hidróxido de hiamina, agitando-se a solução. A radiatividade foi medida num espectrômetro de cintilação líquida após adicionar 10 ml de solução de cintilação C (PPO 6 g, POPOP 0,3 g, Triton X100 500 ml e tolueno q.s.p. 1 litro).

A área relativa à absorbância e radiatividade dos rRNAs 16S e 23S foi calculada nos gráficos com o auxílio de um planímetro e por pesagem.

2.2.6. Hibridização Competitiva

2.2.6.1. Isolamento, fragmentação e denaturação do DNA

O DNA foi isolado, a partir de células de B. subtilis, pelo método de Saito e Miura (1963), que inclui lise das células por lisozima e SDS a pH 9, seguida por extração fenólica e tratamento por RNase. A purificação do DNA foi feita por meio de precipitação por isopropanol, conforme descrito por Marmur (1961)*.

A seguir, o DNA foi fragmentado e denaturado segundo o método de Colli e Oishi (1970). Para tanto, o DNA foi dissolvido em SSC 1/10, numa concentração final de 50 µg/ml, e fragmentado em misturador mecânico da Sorvall, a 4°C, por 30 minutos. Nas condições empregadas obtem-se DNA com peso molecular médio de 3 a 5 x 10⁶d.

Adicionou-se, então, NaOH para uma concentração final de 0,1 N, permitindo-se a denaturação durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida a solução foi neutralizada com NaH₂PO₄, ajustando-se sua concentração de sal para 0,6 M de NaCl e 5 x 10⁻² M de fosfato de sódio, pH 6,7.

2.2.6.2. Separação das fitas complementares de DNA

As fitas complementares do DNA foram separadas por cromatografia em colunas de albumina metilada kieselguhr (MAK). Na preparação da coluna (2,5 cm de diâmetro,

* Agradeço a C. Carniol por ter cedido gentilmente parte do DNA utilizado nos ensaios.

por 15 cm de altura) seguiu-se integralmente o método descrito por Mandell e Hershey (1960). A eluição da coluna foi feita à temperatura ambiente, com um gradiente intermitente de NaCl 0,6 M a 1,2 M, em tampão fosfato de sódio 5 x 10⁻² M, pH 6,7, conforme descrito por Rudner et al. (1968). O volume de eluição foi de 380 ml, e o fluxo da coluna de 0,7 ml/min.

As frações de DNA (5 ml) eluídas da coluna, que possuíam capacidade de hibridizar com rRNA 23S ³H, foram reunidas, e usadas nos ensaios de hibridização.

2.2.6.3. Purificação do rRNA radiativo

RNA ribossômico marcado com trítio foi preparado de acordo com Oishi e Sueoka (1965). A cepa de B. subtilis ura⁻leu⁻ foi crescida em 20 ml de meio glicose-aminoácidos (A) e uridina-³H (100 µCi/ml). Quando o crescimento bacteriano atingiu o início da fase estacionária, as células foram centrifugadas e, posteriormente, ressuspensas em 40 ml de mesmo meio, contendo 100 µg/ml de uridina não radiativa. Nesse meio as células foram incubadas por 90 minutos, quando, então, 10 µg de actinomicina D foram adicionadas por ml de meio de cultura, processando-se a incubação por mais 10 minutos.

As células foram, em seguida, lavadas e lisadas por lisozima e sete congelamentos e degelamentos sucessivos, em presença de DNase.

O RNA foi extraído por fenol, em presença de SDS (em concentração final de 2%, p/v), e precipitado em 2,5

volumes de etanol frio, conforme descrito por Colli (1971). Duas extrações idênticas a essa descrita foram realizadas.

As espécies de rRNA 16S, 23S e 5S e o tRNA foram isoladas por dois ciclos de centrifugação em gradientes de 5 ml, de sacarose 15 a 27,5% (p/v) em Tris-Cl 5×10^{-2} M, pH 7,4, NaCl 0,1 M e EDTA 10^{-3} M, por 5 horas a 45000 rpm, em rotor SW 50L da Spinco.

A absorbância e a radiatividade das frações do gradiente foi determinada conforme descrito no item 2.2.4.4., após adicionar-se 0,45 ml de tampão citrato de sódio 10^{-3} M, pH 5,5.

A atividade específica do rRNA 23S ^3H , usado nos experimentos de hibridização competitiva, e obtido segundo esse método foi de 232000 cpm/ μg .

2.2.6.4. Purificação do rRNA competidor

Os RNAs ribossômicos 16S e 23S foram purificados, respectivamente, a partir das subunidades ribossômicas 30S e 50S, extraídas de células de *B. subtilis* 168W expostas ou não a 15 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicina nas mesmas condições empregadas nos ensaios de alongamento de cadeias de rRNA (item 2.2.4).

O procedimento adotado na purificação do rRNA é uma modificação do método descrito por Adesnik e Levinthal (1969). Para tanto as frações relativas às subunidades 30S e 50S, isoladas em gradiente de sacarose, foram reunidas em dois

"pools" separados e dialisados por 4 horas, a 4°C , contra tampão padrão (Tris-Cl 10^{-2} M, pH 7,5; KCl 5×10^{-2} M e acetato de magnésio 10^{-2} M).

As subunidades adicionou-se, então, SDS, em concentração final de 1% (p/v). O RNA foi purificado por duas extrações com igual volume de fenol 88% saturado com água, por 20 minutos a 20°C . As fases aquosas foram separadas por centrifugação a 15000 rpm, por 15 minutos a 15°C , e extraídas 3 vezes com igual volume de éter.

O rRNA contido na fase aquosa, foi então precipitado com 3 volumes de etanol frio, durante a noite, a -20°C , depois de ajustar-se a concentração de NaCl para 0,4 M final.

O rRNA foi coletado por centrifugação de 45 minutos a 17000 rpm, a 0°C , em centrífuga Sorvall, e ressuspenso em volume adequado de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0.

2.2.6.5. Hibridização competitiva

Empregou-se a técnica de hibridização em líquido descrita por Nygaard e Hall (1963). A reação de hibridização processou-se por 2,5 horas a 68°C em NaCl 0,3 M (pH 7), num volume total de 0,5 ml.

O DNA usado nos ensaios proveio do "pool" das fitas H, eluídas da coluna de MAK, que possuíam capacidade de hibridizar com rRNA (Colli e Oishi, 1970).

A concentração de rRNA 23S ^3H empregada nos ensaios de competição foi determinada em experimentos prévios de saturação com uma quantidade fixa de DNA. Em todos os casos usaram-se quantidades saturantes de rRNA 23S tritiado, da ordem de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de DNA.

Nos experimentos de competição variou-se a concentração de rRNA não radiativo, extraído das subunidades 50S ou 30S, mantendo-se fixa a quantidade de DNA e de rRNA 23S ^3H .

Após a incubação adicionou-se a cada tubo 4 μg de RNase A (préviamente aquecida 10 minutos a 80°C) e 5 unidades de RNase T_1 permitindo-se a hidrólise do RNA não hibridizado por mais 15 minutos a 37°C . Adicionaram-se então 5 ml de KCl 0,5 M e 200 μg de DNA "carregador" a cada tubo, cujas soluções foram filtradas em membranas Millipore. Os filtros foram lavados com 15 ml de KCl 0,5 M, secados e as radiatividades determinadas em espectrômetro de cintilação líquida.

A análise dos resultados de hibridização competitiva foi feita de acordo com Stubbs e Hall (1968).

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERÍSTICAS DA SÍNTESE DE RNA EM BACILLUS SUBTILIS

O estudo da transcrição dos genes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico em B. subtilis foi abordado por meio da análise do alongamento de cadeias de rRNA já iniciadas em presença de rifampicina.

Para tanto, alguns requisitos devem ser obedecidos: 1) a concentração de uridina externa deve ser suficiente para garantir uma incorporação linear em RNA durante o alongamento; 2) a uridina adicionada deve entrar em rápido equilíbrio com o "pool" interno de precursores de ácido nucleico, cuja atividade específica deve-se manter constante, durante o intervalo de tempo estudado; 3) a concentração de rifampicina usada deve ser suficiente para assegurar um máximo de inibição da iniciação do processo transcrito; 4) a análise de transcrição dos RNAs ribossômicos não deve ser complicada pela presença de RNAs instáveis; 5) o tempo de latência na ação da rifampicina deve ser mínimo.

3.1.1. Incorporação de Uridina Tritiada em Ácidos Nucleicos

A marcação de RNA bacteriano com precursores específicos, como uracila e uridina radiativos,

adicionados ao meio de cultura, é uma técnica bastante usada na determinação da velocidade de síntese de RNA e tamanho do "pool" de nucleotídeos precursores de ácidos nucleicos.

A cinética de incorporação de uridina radiativa em ácidos nucleicos foi estudada em culturas de *B. subtilis* 168W, incubadas previamente com diferentes concentrações de uridina não-radiativa (0 a 10,23 $\mu\text{moles/ml}$) (figura 1). A pré-incubação das células com uridina fria determina a inibição da síntese de pirimidinas e o estabelecimento de um "pool" interno de nucleotídeos de tamanho definido (Gerhart e Pardee, 1963; Salser et al., 1968; Bremer e Yuan, 1968 a). Ao adicionar-se, em seguida, uridina radiativa ao meio de cultura ocorre a sua diluição no "pool" interno de precursores. A marcação de ácidos nucleicos será, portanto, retardada por um breve intervalo de tempo que representará o equilíbrio do "pool" endógeno de nucleotídeos com o precursor radiativo (Salser et al., 1968). Esse período será denominado de "tempo de latência".

Na cultura que não foi incubada previamente com uridina fria, o tempo de latência na incorporação de radiatividade é extremamente curto (figura 1), indicando uma rápida expansão do "pool" interno. Nas demais culturas em que se permitiu o estabelecimento de um "pool" interno de tamanho definido (culturas pré-incubadas com diferentes concentrações de uridina fria) observa-se um tempo de latência, medido através da incorporação em ácidos nucleicos, de 10 segundos para uma concentração 1 μM e de aproximadamente 20 segundos, em todas as concentrações maiores de uridina utilizadas.

FIGURA 1 - Incorporação de uridina em ácidos nucleicos. Sub culturas de *B. subtilis* 168W ($6,5 \times 10^7$ células/ml), em crescimento exponencial em meio glicose-aminoácidos (A) foram preincubadas por 5 minutos a 37°C com diferentes concentrações de uridina não radiativa, antes de receber uridina $5,6\text{-}^3\text{H}$ ($0,5 \mu\text{Ci/ml}$). Aliquotas de 0,2 ml de cultura foram retiradas nos tempos especificados, precipitadas com volume igual de TCA 10% (p/v) e coletadas em filtros Millipore. A radiatividade incorporada em ácidos nucleicos foi medida em espectrômetro de cintilação líquida. As retas apresentadas foram determinadas por regressão. A concentração final, em $\mu\text{moles/ml}$, de uridina no meio de cultura foi de: 0 0,011; ● 0,978; □ 2,57; ▲ 5,13; △ 10,248.

Na figura 1 nota-se que com todas as concentrações de uridina fria empregada, a cinética de incorporação se mantém linear no período de tempo analisado (até 3 minutos).

Se o inverso da velocidade inicial de incorporação de uridina em ácidos nucleicos for expresso em função do inverso da concentração de uridina, obtêm-se uma linha reta, calculada a partir dos dados da figura 1.

A intersecção da reta (figura 2) na ordenada de fine a velocidade máxima de marcação (numa concentração infinita de uridina) que é $10,98 \text{ pmoles/min.}/1,3 \times 10^7$ células e a intersecção na abscissa indica que, a metade da velocidade de máxima da reação, ocorre numa concentração de uridina de $5,1 \mu\text{M}$.

A cinética observada de incorporação de uridina $5,6\text{-}^3\text{H}$ em ácidos nucleicos totais de uma cultura bacteriana na realidade é a resultante de duas cinéticas superpostas: a de marcação de RNA e a de marcação de DNA, pois formam-se derivados metilados de ácido desoxiuridílico pela ação da timidilatosintetase (Friedkin et al., 1963) e de nucleotídios de citidina por aminação do carbono 4 do anel pirimidínico (Weed e Wilson, 1951).

A distribuição da marcação em ambas as espécies de ácidos nucleicos foi estudada em cinéticas mais longas do que as descritas na figura 1. A figura 3 mostra que a incorporação em DNA só começa a ser notada após 3 minutos de pulso e que procede de maneira linear, alcançando, aos 20 minutos, 5% do valor da incorporação total em ácidos

FIGURA 2 - Velocidade inicial de incorporação de uridina em ácidos nucleicos em função da concentração de uridina (em coordenadas recíprocas). A partir dos dados da figura 1 calculou-se a velocidade de incorporação de uridina tritiada em ácidos nucleicos, para cada concentração de uridina existente no meio de cultura. A concentração de uridina é expressa em μM , e a velocidade em $\text{pmoles de uridina incorporados por minuto em } 1,3 \times 10^7$ células. A reta foi calculada por regressão e é definida pela equação: $y = 0,4674 x + 0,091$.

FIGURA 3 - Cinética de marcação de ácidos nucleicos (DNA e RNA). Células de *B. subtilis* 168W em crescimento exponencial ($\mu = 40$ minutos) receberam uridina 5,6-³H (1 μ Ci/ml) e uridina não radiativa (2,05 μ moles/ml). Nos tempos especificados retiraram-se alíquotas da cultura, tratadas de maneiras distintas a fim de verificar a natureza do ácido nucleico sintetizado (Roodyn e Mandel, 1960). a) 0,5 ml foi precipitado com igual volume de TCA 10% (p/v) e coletado em filtros Millipore. Os valores de radiatividade são relativos à incorporação total em ácidos nucleicos (DNA e RNA). b) 0,5 ml da cultura foi hidrolisado com igual volume de NaOH 0,5 N por 24 horas a 37°C. Após neutralização da solução, adicionou-se igual volume de TCA 10%, procedendo-se como acima. Os valores obtidos representam a incorporação em DNA (Δ). A incorporação em RNA (O) foi calculada subtraindo-se dos valores de marcação total em ácidos nucleicos a incorporação em DNA.

nucleicos. A síntese de RNA, por outro lado, ocorre linearmente até 3 minutos, diminuindo de velocidade, provavelmente, por diminuição da quantidade de uridina no meio.

3.1.2. Inibição da Síntese de RNA por Rifampicina

Experimentos *in vitro* com a RNA polimerase de *E. coli* demonstraram claramente que essa enzima é inibida por concentrações extremamente baixas de rifampicina, da ordem de 2×10^{-8} M (Hartmann et al., 1967; Wehrli et al., 1968; Umezawa et al., 1968). Resultados semelhantes foram obtidos com RNA polimerases isoladas de *B. subtilis* (Geiduschek e Sklar, 1969), *B. stearothermophilus* (Renold-O'Donnel e Zillig, 1969), *S. aureus* (Wehrli et al., 1968 b) e de outras espécies bacterianas.

In vivo, o efeito das rifampicinas foi amplamente estudado em bactérias gram negativas e gram positivas, concluindo-se que as primeiras são menos sensíveis ao antibiótico (Timbal, 1960). *E. coli*, por exemplo, é relativamente impermeável à rifampicina (Haselkorn et al., 1969; Schleif, 1969), devendo-se empregar altas doses da droga (200 μ g/ml) para obter-se o máximo de inibição da síntese de RNA (99%). Em *B. subtilis*, por outro lado, a concentração mínima inibitória de rifampicina é de 1 μ g/ml ou até menos, como será mostrado a seguir.

A determinação da dose de rifampicina, que inibe ao máximo a síntese de RNA *in vivo*, foi realizada em culturas de *B. subtilis* ura⁻leu⁻, crescidas em meio glicose-

aminoácidos-uridina (A). Às subculturas adicionou-se uridina-³H e diversas concentrações de rifampicina, determinando-se, em diferentes tempos, a incorporação em material precipitável por ácidos (Roodyn e Mandel, 1960). Na tabela I apresentam-se as porcentagens de inibição da síntese de RNA (em relação a uma cultura controle não tratada com rifampicina, que representa 100% de síntese).

Nota-se que concentrações de rifampicina superiores a 0,1 µg/ml produzem uma inibição da síntese de RNA maior que 95%. (Resultados iguais são obtidos com a cepa selvagem de *B. subtilis*). Nunca, no entanto, consegue-se uma inibição de 100%, pois as cadeias de RNA, que estão sendo alongadas no momento da adição da droga, incorporam uridina tritiada, já que a rifampicina só bloqueia a iniciação da transcrição (Pato e von Meyenburg, 1970).

As cinéticas de incorporação de uridina tritiada em RNA (figura 4) mostram que, em altas concentrações de rifampicina, ocorre diminuição da velocidade de incorporação, logo após 2 minutos de exposição, com o aparecimento de um "plateau", indicando inibição da síntese de RNA. Nos experimentos realizados com baixas concentrações de rifampicina observa-se o interessante fenômeno da recuperação da síntese de RNA, após, aproximadamente, 30 minutos de tratamento com a droga. A inibição e a retomada da síntese de RNA são qualitativamente proporcionais à concentração da droga. Outro ponto interessante que pode ser apontado a partir desse fenômeno é o de que um "plateau" de síntese em níveis diferentes é alcançado, aproximadamente aos 5 minutos de exposição,

TABELA I

Inibição da síntese de RNA por rifampicina em *B. subtilis* ura⁻leu⁻ a

Concentração de Rifampicina µg/ml	x 10 ⁻⁸ M ^b	Tempo de Exposição (min)	Inibição da Síntese (%) ^c
0,01	1,2	5	56
		30	65
		60	47
0,02	2,4	5	73
		30	72
		60	53
0,025	3,1	5	76
		30	78
		60	63
0,1	12,4	5	90
		30	96
		60	95
1	124	5	96
		30	96
		60	96
2,5	310	5	96
		30	96
		60	96
15	1860	5	96
		30	96
		60	96

- a) Aos zero minutos adicionou-se uridina-³H (1 µCi/ml) e rifampicina nas concentrações acima a uma cultura em crescimento exponencial (g = 65 min) em meio glicose-aminoácidos-uridina (A). Nos tempos especificados acima foram retiradas alíquotas de 0,5 ml que foram precipitadas com TCA 5% (p/v) final. O material insolúvel em ácido foi coletado em filtros Millipore, que foram contados em espectrômetro de cintilação líquida, obtendo-se o valor de incorporação em RNA.
- b) A molaridade das soluções de rifampicina é calculada a partir de seu peso molecular (810,94).
- c) Uma cultura controle, que não recebeu rifampicina, representa o valor de 100% da síntese de RNA, em cada tempo de exposição ao precursor marcado.

FIGURA 4 - Inibição da síntese de RNA por diferentes concentrações de rifampicina. Células de *B. subtilis* ura⁻leu⁻, crescendo em meio glicose-aminoácidos-uridina (A), receberam aos zero minutos uridina ³H (1 µCi/ml) e rifampicina, nas concentrações especificadas abaixo. De tempos em tempos retiraram-se alíquotas de 0,5 ml, que foram precipitadas com TCA 5% (p/v) final. O material insolúvel em ácido foi coletado em filtros Millipore que foram contados em espectrômetro de cintilação líquida, obtendo-se, para cada tempo, o valor de incorporação em RNA. Concentração de rifampicina expressa em µg/ml: ○ = 0 (cultura controle); ● 0,01; △ 0,02; □ 0,025; ▲ 0,1 até 15.

com as três concentrações usadas. Após esse período, a incorporação em RNA apresenta-se sob forma estacionária, para só ocorrer a retomada aos 30 minutos.

Se, realmente, no "plateau" ocorresse uma parada da síntese de RNA em todas as células, e a retomada de incorporação representasse a reiniciação da transcrição, esse fenômeno poderia constituir-se num método interessante de sincronização das moléculas de RNA polimerase nos sítios promotores. A análise temporal do RNA transcrito, a partir da iniciação sincrônica, poderia dar uma indicação do mecanismo de transcrição do RNA ribossômico: a) se ambas as espécies de rRNA (23S e 16S) aparecessem simultaneamente, após a retomada da síntese, poderia ser sugerida uma transcrição independente, em que cada gene teria 1 ponto de iniciação próprio. Entretanto, b) se uma das espécies de RNA ribossômico surgisse antes, poder-se-ia supor que essa espécie estivesse mais próxima do sítio de iniciação e que houvesse uma cotranscrição dos dois genes.

Passou-se a investigar a natureza desse fenômeno, para verificar se esse tipo de enfoque poderia ser aplicado.

Uma possível explicação para a retomada da síntese de RNA poderia ser o aparecimento de novas RNA polimerases (codificadas por mRNAs alongados em presença de rifampicina) que escapariam da inibição, pelas baixas concentrações de rifampicina presentes. Tratando-se culturas de *B. subtilis* ura⁻leu⁻ com rifampicina (em baixa concentração) e

cloranfenicol (200 µg/ml) concomitantemente, conseguiu-se eliminar a retomada de síntese de RNA que ocorre após 30 minutos de tratamento (figura 5-A), mostrando que o fenômeno de recuperação é dependente de síntese proteica. A necessidade de novas proteínas poderia refletir-se não apenas na produção de novas RNA polimerases, como também na produção de material para o desenvolvimento e divisão celular das bactérias. Com o crescimento da população bacteriana, as células escapariam à inibição em virtude da quantidade insuficiente de rifampicina. A replicação do DNA bacteriano foi bloqueada com ácido nalidíxico (Goss et al., 1965; Cook et al., 1966; Ramareddy e Reiter, 1969) em concentração de 300 µg/ml que, adicionado concomitantemente à rifampicina, também impediu a retomada de síntese de RNA (figura 5-B). A explicação mais provável para a recuperação de transcrição após 30 minutos de exposição a baixas doses de rifampicina parece ser a de que essas concentrações são insuficientes para inibir todas as RNA polimerases bacterianas. Hartmann et al. (1967) verificaram que uma concentração de rifampicina de 2×10^{-8} M (0,016 µg/ml) inibe 50% da reação catalisada *in vitro* pela RNA polimerase de *E. coli*. Nesse caso algumas células escapariam à inibição, dividindo-se, e retomando a síntese de RNA.

Essa interpretação ficou demonstrada pelo seguinte experimento (não apresentado): bactérias que recebem baixas doses de rifampicina conseguem dividir-se durante todo o período de exposição à droga e a cultura alcança níveis de densidade celular iguais aos do controle, embora em tempo mais longo. Por outro lado, culturas que recebem cloranfenicol

FIGURA 5 - Efeitos de diferentes antibióticos na síntese de RNA bloqueada em baixa concentração de rifampicina. Células de *B. subtilis* ura⁻leu⁻, crescidas em meio glicose-aminoácidos-uridina (A), receberam uridina ^3H (1 µCi/ml) no tempo zero, concomitantemente com diferentes antibióticos. A radiatividade incorporada em RNA nos diferentes tempos de incubação foi determinada em alíquotas da cultura de 0,5 ml, segundo o método descrito na legenda da figura 4. A: O cultura controle; ● cloranfenicol (200 µg/ml); Δ rifampicina (0,02 µg/ml); ▲ rifampicina (0,02 µg/ml) + cloranfenicol (200 µg/ml). B: O cultura controle; ● ácido nalidíxico (300 µg/ml); Δ rifampicina (0,02 µg/ml); ▲ rifampicina (0,02 µg/ml) + ácido nalidíxico (300 µg/ml).

ou ácido nalidíxico, isolada ou concomitantemente com rifampicina, têm o seu crescimento reprimido.

Nem mesmo durante o "plateau" e logo após a retomada de síntese, há sincronia de transcrição, o que foi verificado por meio da seguinte observação não apresentada: uridina tritiada é adicionada em diferentes tempos durante o "plateau" observando-se, a partir do ponto de adição, um aumento da incorporação em material precipitável por ácido, indicando que no "plateau" não há uma parada de síntese de RNA mas um equilíbrio entre síntese e degradação. A adição de mais uridina radiativa no "plateau" aumenta a atividade específica do "pool" de precursores, podendo-se observar um aumento nítido na incorporação em macromoléculas. Reid e Speyer (1970) observaram um fenômeno semelhante a esse em E. coli.

Comprovou-se a ausência de células resistentes à rifampicina, na população bacteriana estudada acima, por plaqueamento de células em crescimento exponencial (ver Métodos). Após permitir-se o desenvolvimento de colônias por 18 horas a 37°C, foram feitas réplicas em placas de mesma composição, contendo, porém, rifampicina em diferentes concentrações (1 µg/ml, 15 µg/ml, 60 µg/ml e 88 µg/ml). Analisando-se o desenvolvimento de colônias após 24 horas a 37°C, notou-se não ter havido crescimento em nenhuma das placas contendo o antibiótico. Nas réplicas, feitas em placas em rifampicina, houve desenvolvimento total das colônias, indicando a eficiência da técnica, e a ausência de células resistentes ao antibiótico.

Com a comprovação de que o fenômeno de reestabelecimento da síntese de RNA, anteriormente descrito, é dependente da divisão celular e da síntese proteica de novo e não de um novo ciclo de transcrição, a partir de uma iniciação sincrônica, tornou-se impossível utilizar esse enfoque no estudo da transcrição do RNA ribossômico.

3.1.3. Efeito Bactericida da Rifampicina

O efeito bactericida de diferentes concentrações de rifampicina foi analisado em culturas de B. subtilis expostas por tempos variáveis à droga. Essas células em crescimento exponencial foram incubadas sob agitação com diferentes concentrações de rifampicina, nos períodos especificados na tabela II e em seguida as culturas foram plaqueadas em meio de cultura sólido. Permitiu-se o crescimento bacteriano determinando-se o número de colônias que se desenvolveram em cada placa. A porcentagem de células viáveis, apresentada na tabela II foi calculada em relação a uma cultura controle, não exposta à droga e plaqueada em condições idênticas.

Com apenas 1 minuto de exposição a uma dose de rifampicina de 15 µg/ml ocorre 88% de letalidade na cultura bacteriana; um efeito letal de mesma intensidade e rapidez foi descrito por Coote et al. (1973), que demonstraram que 30 µg/ml de rifampicina são suficientes para destruir 95% das células de B. subtilis em apenas 2 minutos de exposição. Com baixas concentrações da droga (da ordem de 1 µg/ml) consegue-se 96% de inibição de transcrição e 90% de células viáveis (vide tabelas I e II).

TABELA II

Efeito bactericida da rifampicina em B. subtilis 168W ^a

Concentração de Rifampicina	Tempo de Exposição	Células Viáveis ^b
(µg/ml)	(min)	(%)
0,1	2	90
0,7	2	90
1,0	2	90
15,0	1	12
15,0	20	9

a) Culturas de B. subtilis 168W em crescimento exponencial (5×10^7 células/ml) em meio glicose-aminoácidos foram incubados a 37°C sob agitação com as concentrações de rifampicina e nos períodos de tempo especificados acima. Em seguida foram diluídas convenientemente e plaqueadas em meio de cultura sólido contendo agar (15%) e caldo nutritivo (8 g/l). Foram determinadas as colônias que se desenvolveram em cada placa após 24 horas a 37°C.

b) A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação a uma cultura controle não exposta à rifampicina e plaqueada em condições idênticas. O número de colônias que se desenvolveram a partir dessa cultura representa 100% de células viáveis.

Nos estudos de transcrição de rRNA, em presença de rifampicina, mostrar-se-á que os resultados são basicamente os mesmos, empregando-se altas e baixas doses de rifampicina, sempre que estas garantam o máximo de inibição da síntese de RNA.

3.1.4. Cinética de Marcação de RNA em Presença de Rifampicina

Quando rifampicina é adicionada a bactérias juntamente com uridina-³H, todas as moléculas de RNA polimerase funcionantes originam moléculas de RNA parcialmente marcadas, cuja síntese é terminada durante os primeiros minutos de adição da droga.

Portanto, é de se esperar que seja possível visualizar o decaimento de radiatividade incorporada que reflita o turnover de macromoléculas sintetizadas a partir da adição do antibiótico. O conhecimento do turnover das várias espécies de RNA sintetizados é particularmente importante no estudo da transcrição de RNAs ribossômicos (estáveis), pois a presença de outras espécies de RNA poderia complicar a análise dos resultados.

Seguiu-se a incorporação de uridina-³H em ácidos nucleicos em culturas de B. subtilis 168W em fase exponencial de crescimento, após a adição de 15 µg/ml de rifampicina. A quantidade de RNA presente na célula foi determinada medindo-se, diretamente, a radiatividade presente em ribonucleotídeos, originados após hidrólise alcalina de alíquotas

da cultura. A radiatividade relativa ao DNA também foi de terminada na mesma alíquota de acordo com Bremer et al. (1973) (figura 6, curvas contínuas). Uma pequena fração da marcação é incorporada em material estável a álcali, isto é, em DNA, que se acumula linearmente até tornar-se uma fração significativa em tempos mais longos. Este efeito é esperado já que a síntese de DNA não é afetada diretamente pela droga. A quantidade total de RNA tritiado aumenta até aproximadamente 5 minutos (valores máximos de incorporação entre 3-5 minutos foram obtidos em outros experimentos) decaindo, a partir desse tempo, até 15 minutos, quando atinge um valor constante, que representa o RNA estável. O decaimento observado representa a degradação de espécies instáveis de RNA (mRNA e precursores de espécies maduras de RNAs estáveis).

Nesses experimentos foram realizados controles em que foi determinada a incorporação de uridina tritiada em DNA e RNA, em culturas expostas previamente à rifampicina durante 5 minutos, quando toda a transcrição sensível ao antibiótico foi terminada (cf. Tabela I e figura 4). Na figura 6 as curvas descontínuas representam a incorporação em ribonucleotídeos e DNA, obtida quando a uridina- ^3H foi adicionada 5 minutos após a adição de rifampicina. Nota-se que a incorporação no material contendo ribonucleotídeos e resistente à rifampicina alcança 22% do valor máximo de marcação obtido quando a droga e o precursor são adicionados concomitantemente. A cinética de incorporação em DNA é semelhante nos dois tipos de experimento.

No gráfico inserido na figura 6 mostra-se a cinética real de decaimento de RNA sintetizado. Os valores

FIGURA 6 - Cinética de marcação de RNA em presença de rifampicina. Adicionou-se rifampicina (15 $\mu\text{g/ml}$) e uridina 5,6- ^3H (1 μM - 5 $\mu\text{Ci/ml}$) a uma subcultura de *B. subtilis* 168W, crescendo em meio glicose-aminoácidos (A), (curvas contínuas). Ao mesmo tempo, à outra subcultura adicionou-se apenas rifampicina (15 $\mu\text{g/ml}$) durante 5 minutos, antes de administrar-se uridina tritiada, na mesma concentração acima, (curvas descontínuas). Em ambos os casos o tempo zero representa o tempo de adição de uridina radiativa. Aliquotas de 0,5 ml, retiradas de tempos em tempos, foram adicionadas a TCA, determinando-se a radiatividade de presente em ribonucleotídeos (RNA O, ●) e na porção resistente a álcali (DNA Δ, ▲), (ver Material e Métodos - técnica de Bremer et al., 1973). Nos tempos indicados por meio de setas alíquotas de 5 ml foram removidas e processadas como descrito no texto. No gráfico inserido na figura observa-se a cinética real de decaimento de RNA sintetizado. Os pontos (●) foram obtidos subtraindo-se da cinética observada de decaimento de RNA (O) os valores de incorporação em RNA, insensível à rifampicina (●).

foram obtidos subtraindo-se da cinética de decaimento observada, os valores da incorporação não sensível à rifampicina.

Essa cinética reflete a síntese e a degradação efetivas de mRNA, cuja meia vida poderia ser estimada em aproximadamente 2 minutos. O "plateau" que se atinge após o decaimento refere-se ao RNA estável sintetizado nos primeiros minutos após a adição de rifampicina e que representa 44% da radiatividade total incorporada.

3.1.5. Análise do RNA Sintetizado em Presença de Rifampicina

A natureza do RNA sintetizado em presença de rifampicina, bem como a quantidade e a estabilidade do RNA ribossômico transcrito, foram analisadas, em alíquotas de 5 ml, das culturas principais, retiradas nos tempos indicados, por meio de setas, na figura 6. Essas quatro subculturas, três delas expostas concomitantemente à rifampicina e uridina-³H por 2, 5 e 15 minutos, respectivamente, e a quarta previamente exposta à rifampicina por 5 minutos e em seguida marcada com um pulso de radiatividade de 10 minutos, foram incubadas com uridina não radiativa durante 20 minutos para permitir o processamento do rRNA e a degradação das espécies instáveis de RNA, sintetizados nos tempos acima discriminados.

Na tabela III apresentam-se os valores de radiatividade presentes em 0,5 ml de cada cultura (6×10^7 células/ml) sob a forma de ribonucleotídeos (Bremer et al., 1973), antes e depois da incubação com uridina não radiativa ("caça").

TABELA III

Incorporação de uridina-³H em RNA em presença de rifampicina

Pulso de Uridina- ³ H (minutos) ^c	Radiatividade Incorporada ^a	
	Antes da Caça	Após Caça ^b
2	17 116	8 148
5	19 500	8 200
15	10 304	8 460
10 (preincubada) ^d	4 112	5 348

a) Radiatividade incorporada em cpm/ 3×10^7 células.

b) Caça realizada com 1 mg/ml de uridina fria durante 20 minutos.

c) Condições descritas na legenda da figura 6. Os pontos 2, 5 e 15 minutos estão indicados por setas, nessa figura, e referem-se à adição concomitante de rifampicina e uridina-³H no tempo zero de observação.

d) Cultura exposta previamente à rifampicina por 5 minutos e, em seguida, submetida a um pulso de uridina-³H por 10 minutos.

Nota-se que após o período de "caça" atinge-se em cada uma das subculturas, que receberam, concomitante - mente, rifampicina e uridina-³H, um valor igual de incorporação que reflete o RNA estável. Na subcultura previamente exposta a rifampicina por 5 minutos o RNA sintetizado não é passível de "caça".

As alíquotas remanescentes do experimento anterior (4,5 ml) serviram para o isolamento das subunidades ribossômicas por centrifugação em gradientes de sacarose, analisando-se a radiatividade como descrito em Métodos. Na figura 7 observam-se os perfis de absorvância (260 nm) e de radiatividade incorporada nas subunidades ribossômicas 50S e 30S e em RNA de baixo peso molecular. Nota-se que a incorporação total em rRNA é a mesma para culturas marcadas em presença de rifampicina (tabela IV).

3.2. ESTUDO DO ALONGAMENTO DAS CADEIAS DE rRNA EM PRESENÇA DE RIFAMPICINA

Usando-se rifampicina, duas opções metodológicas podem ser tomadas no estudo do padrão de transcrição dos cistrons responsáveis pela síntese de rRNA: a) inibir a síntese de RNA com o antibiótico e então removê-lo para permitir a retomada sincrônica da síntese; b) inibir a iniciação e estudar o alongamento das cadeias já iniciadas por ocasião da adição do antibiótico.

FIGURA 7 - Análise da natureza do RNA sintetizado em presença de rifampicina, por centrifugação em gradientes de sacarose. A partir da subcultura exposta concomitantemente a rifampicina e uridina tritiada (figura 6) removeram-se alíquotas de 5 ml, nos tempos 2; 5 e 15 minutos (A, B e C, respectivamente). A partir da subcultura exposta previamente a rifampicina por 5 minutos, e, em seguida, submetida a uridina tritiada (figura 6) por 10 minutos, retirou-se outra alíquota de 5 ml (D). Essas subculturas foram incubadas com uridina não radiativa (1 mg/ml) por 20 minutos, antes de proceder-se à extração e sedimentação das subunidades ribossômicas em gradientes de sacarose (vide Material e Métodos). Observam-se os perfis de absorvância a 260 nm (O) e de radiatividade incorporada (●) nas subunidades 50S e 30S e em RNA de baixo peso molecular, (fundo dos gradientes à esquerda da figura).

TABELA IV

Incorporação de uridina-³H em rRNA em presença de rifampicina

Pulso de Uridina- ³ H (minutos) ^d	50S		30S		Razão ^c	
	cpm ^a	A.E. ^b	cpm	A.E.	(cpm)	A.E.
2	11 720	3 305	2 308	1 312	5,07	2,51
5	11 012	3 105	2 286	1 300	4,81	2,38
15	11 561	3 260	2 042	1 161	5,66	2,80
10 (preincubada) ^e	0	0	0	0	-	-

a) Os valores referem-se à radiatividade total sob cada pico da figura 7 e foram corrigidos para 15% de contaminação da subunidade 50S na 30S, como descrito no item 3.2.

b) Atividade específica (A.E.), obtida pela divisão dos valores de radiatividade pela absorbância total (260 nm) de cada pico da figura 7.

c) Obtida pela divisão dos valores de radiatividade total e de atividade específica da subunidade 50S pelos respectivos valores da subunidade 30S.

d) Condições descritas na legenda da figura 6. Os pontos de 2, 5 e 15 minutos estão indicados por setas nessa figura e referem-se à adição concomitante da rifampicina e uridina-³H no tempo zero de observação.

e) Cultura exposta previamente à rifampicina por 5 minutos e em seguida submetida a um pulso de uridina-³H por 10 minutos.

3.2.1. Iniciação Sincrônica da Transcrição de rRNA - Tentativa de Análise

Para esse estudo, culturas de B. subtilis ura⁻leu⁻ em crescimento exponencial (g = 65 min) foram incubadas com rifampicina (0,02 µg/ml), por um tempo que permite a terminação de cadeias de RNA, já iniciadas (3 minutos). Em seguida, após fixar-se as bactérias em filtros de fibra de vidro, tentou-se a remoção da droga, através de vários métodos de lavagem. A figura 8 mostra os resultados dos dois métodos de lavagem empregados. Como se vê não há retomada de síntese de RNA. Da mesma forma não foi possível remover o antibiótico numa série de experimentos (não apresentados) que incluíram lavagem das células por centrifugação com diferentes concentrações de etanol, diferentes volumes de meio, usando-se várias concentrações de rifampicina. Em nenhum dos casos citados empregando-se a cepa mutante ou a cepa tipo selvagem foi possível obter recuperação da transcrição. Esse comportamento é bem diferente daquele que se observa com E. coli, onde a simples lavagem das células com meio de cultura proporciona a remoção da droga, e retomada imediata da síntese de RNA (Gupta e Singh, 1972).

Torna-se evidente que essa opção metodológica, que tem como fundamento a reversão do efeito de rifampicina, no sentido de promover uma reiniciação sincrônica a partir dos sítios de iniciação, não pode ser aplicada em B. subtilis.

FIGURA 8 - Tentativas de desinibição da síntese de RNA em culturas de *B. subtilis ura⁻leu⁻*, expostas à rifampicina (0,02 µg/ml) por 3 minutos. 5 ml de culturas (controle 0; exposta ao antibiótico ●) foram filtradas em membranas de fibra de vidro e: A- não lavadas; B- lavadas com 10 ml de meio de cultura (glicose-aminoácidos (A)); C- lavadas com 10 ml de etanol 20%. Em seguida o filtro, contendo as células, foi colocado em igual volume de meio de cultura contendo uridina tritiada (1 µCi/ml), permitindo-se a ressuspensão das células. Aliquotas de 0,5 ml foram removidas nos intervalos de tempo especificados, determinando-se a radiatividade incorporada em material precipitável por TCA (vide Material e Métodos).

3.2.2. Alongamento das Cadeias de rRNA em Presença de Rifampicina

No item 3.1. determinaram-se alguns dos parâmetros experimentais que preenchem os requisitos impostos para o estudo do alongamento das cadeias de RNA ribossômico na presença de rifampicina. Ficou estabelecido que uma concentração externa de uridina de 1 µM garante uma incorporação linear e alta atividade específica do RNA durante o período de alongamento. Esses resultados e evidências experimentais anteriores (Gerhart e Pardee, 1963; Salser et al., 1968; Bremer e Yuan, 1968 a) fazem supor, com razoável margem de confiança, que se estabeleça um rápido equilíbrio entre a uridina externa, nessas concentrações, e o "pool" interno de precursores de RNA. Nesse caso a atividade específica do "pool" manter-se-á constante durante os curtos intervalos de tempo estudado (máximo de 3 minutos). Determinou-se ainda que em concentrações de rifampicina superiores a 1 µg/ml obtem-se o máximo de inibição do processo de transcrição; nos ensaios a serem descritos a seguir usar-se-á uma concentração da droga de 15 µg/ml (a não ser quando especificado). Nos experimentos de cinética de marcação de RNA em presença de rifampicina (item 3.1.4.) mostrou-se que toda a radiatividade incorporada, após, aproximadamente, 15 minutos de exposição à droga, em espécies de RNA instável, desaparece restando apenas RNA estável (ribossômico e de transferência). A incorporação de uridina tritiada em rRNA, em presença de rifampicina, só será analisada após um período de "caça" de 20 minutos, que garantirá o esgotamento de espécies instáveis de RNA.

3.2.2.1. Alongamento de cadeias de rRNA em presença de rifampicina em culturas de *B. subtilis*. Análise em diferentes tempos de geração

A distribuição da sedimentação em gradientes de sacarose das subunidades ribossômicas 50S e 30S de *B. subtilis*, crescido em meio de glicose-aminoácidos (A) (g = 40 minutos) é mostrada na figura 9. Uridina tritiada foi adicionada à cultura diversos tempos após a exposição à rifampicina (15 µg/ml) (entre 0 e 150 segundos), permitindo-se a incorporação em RNA por 3 minutos. Após esse tempo adicionou-se uridina não radiativa (1 mg/ml) por um período de 20 minutos. A figura 9 mostra que quanto mais tarde uridina radiativa for adicionada em relação à exposição prévia à rifampicina, menos radiatividade é incorporada nas subunidades ribossômicas. Isto porque, quanto maior o tempo de exposição ao antibiótico, menor será o número de RNA polimerases sobre os genes, até que se atinja um tempo em que não há mais incorporação de radiatividade em rRNA em virtude da completa remoção das RNA polimerases (ver Apêndice).

O tempo mínimo necessário para retirar todas as RNA polimerases dos cistrons ribossômicos foi previamente determinado no experimento descrito na figura 10. Essa figura mostra a cinética de decaimento da quantidade total de radiatividade incorporada nas subunidades 50S e 30S, obtida quando uridina-³H é adicionada após tempos crescentes de exposição à rifampicina em *B. subtilis* crescido em meio de glicose-aminoácidos (A). Nota-se que no intervalo de tempo de

FIGURA 9 - Perfis de sedimentação das subunidades 50S e 30S de *B. subtilis*, marcadas em presença de 15 µg/ml de rifampicina (adicionada aos zero segundos). Os tempos de exposição à droga, após os quais se adicionou uridina-³H (5 µCi/7 ml, 1 µM), estão indicados na porção superior de cada figura. As amostras (5 ml) receberam um pulso de radiatividade de 3 minutos seguido por caça de 20 minutos. As células foram centrifugadas, purificando-se os ribossomos por centrifugação em gradiente de sacarose, como descrito em Material e Métodos. Fundo dos gradientes à esquerda de cada figura; O absorvância a 260 nm e ● radiatividade incorporada.

FIGURA 10 - Cinética de decaimento da radiatividade incorporada nas subunidades ribossômicas, em função do tempo de exposição à rifampicina. Células de *B. subtilis* 168W, crescidas em glicose-aminoácidos (A), foram expostas a 15 µg/ml de rifampicina por tempos diferentes, antes de receberem uridina ³H (5 µCi/ml - 1 µM) por 3 minutos. As subunidades ribossômicas foram isoladas conforme Material e Métodos, determinando-se a radiatividade total incorporada nas partículas 50S (O) e 30S (●).

exposição ao antibiótico entre 2 e 3 minutos a incorporação em RNA ribossômico é desprezível.

Esse tempo de terminação da transcrição pode ser determinado com maior precisão quando os resultados da figura 9 são representados da mesma forma, o que pode ser visto na figura 11. Verifica-se que após um tempo de pré-tratamento com rifampicina de aproximadamente 80 segundos, o RNA 16S não mais pode ser marcado, o mesmo acontecendo após 120 segundos com o RNA 23S. Entretanto, esses tempos talvez não indiquem os tempos reais de terminação dos RNAs como será discutido.

O mesmo experimento foi repetido com bactérias crescidas num meio contendo glicerol (A) em que o tempo de geração foi de 65 minutos. Os resultados foram essencialmente os mesmos (figura 12).

Levando-se em consideração que os resultados com *B. subtilis* serão comparados com dados obtidos de experimentos análogos feitos com *E. coli* por outros autores (Bremer e Berry, 1972; Dennis e Bremer, 1973), que adotam uma metodologia um pouco diversa, resolveu-se realizar com *B. subtilis* um experimento idêntico aos relatados acima mas adotando a técnica de isolamento de ribossomos descrita por esses autores. Nas tabelas V e VI apresentam-se as razões de radiatividade incorporada e de atividade específica das subunidades ribossômicas isoladas de acordo com Dennis e Bremer (1973), de *B. subtilis* crescido em meio contendo glicose (g = 55 minutos) em presença de 15 µg/ml de rifampicina.

FIGURA 11 - Cinética de decaimento da radiatividade incorporada nas subunidades ribossômicas 50S (O) e 30S (●), em função do tempo de exposição à rifampicina, de culturas de *B. subtilis* 168W, crescidas em glicose-aminoácidos (A). Mesmas condições descritas na legenda da figura 10.

FIGURA 12 - Cinética de decaimento da radiatividade incorporada nas subunidades ribossômicas 50S (O) e 30S (●), em função do tempo de exposição à rifampicina, de culturas de *B. subtilis* 168W, crescidas em glicerol (A). Mesmas condições descritas na legenda da figura 10.

Os resultados foram essencialmente os mesmos das figuras 11 e 12.

Já que uma concentração de rifampicina de 15 µg/ml tem um efeito bactericida potente em culturas de B. subtilis (provocando a morte de 90% das células após períodos curtos de exposição à droga - ver tabela II), passou-se a analisar o alongamento das cadeias de rRNA em presença de concentrações mais baixas de rifampicina (0,5 a 0,7 µg/ml). Uma concentração de antibiótico desta ordem de grandeza é capaz de inibir 95% da reação de transcrição e de permitir a sobrevivência de 90% das células (vide tabelas I e II). Os resultados obtidos (analisados em seguida nas tabelas V e VI) são, basicamente, muito semelhantes àqueles que se observam em alta concentração do antibiótico. Verifica-se portanto que a sobrevivência da célula não é importante para a análise do processo transcritivo nos períodos curtos de observação utilizados neste trabalho.

As razões de radiatividade incorporada em rRNA 23S e 16S, em culturas de B. subtilis crescidas em diferentes meios de cultura e expostas a altas e baixas concentrações de rifampicina, podem ser analisados em forma comparativa na tabela V (esses dados foram extraídos dos experimentos de cinética de decaimento apresentados nas figuras 11 e 12). Na tabela VI os mesmos dados são apresentados sob forma de razão de atividade específica das subunidades ribossômicas 50S e 30S, calculada dividindo-se a incorporação de radiatividade total de cada subunidade por sua absorbância total a 260 nm.

TABELA V

Razão de radiatividade incorporada em presença de rifampicina nas subunidades ribossômicas de B. subtilis

Tempo de Exposição à Rifampicina (segundos)	Razão de Incorporação Total ^a (50S/30S)				
	(b)	(c)	(d)	(e)	
0	5,35	5,97	5,53	5,82	5,49
10	7,04	5,89	5,73	5,00	4,63
20	5,15	5,64	-	-	3,18
30	4,20	4,49	4,15	4,55	4,32
60	4,66	5,08	3,67	4,19	4,19
90	*	*	4,65	3,11	3,66

- a) Valores de incorporação foram corrigidos para 15% de contaminação conforme descrito no texto.
- b) Cultura crescida em meio de glicose-aminoácidos (A), tratada com 15 µg/ml de rifampicina conforme descrito na legenda da figura 10.
- c) Cultura crescida em meio de glicose (A), tratada com 15 µg/ml de rifampicina, conforme o método de Dennis e Bremer (1973).
- d) Cultura crescida em meio de glicerol (A), tratada com 15 µg/ml de rifampicina, conforme descrito na legenda da figura 11.
- e) Cultura crescida em meio de glicose-aminoácidos (A), tratada com 0,7 µg/ml de rifampicina, conforme descrito na legenda da figura 10.
- * Razão não calculada porque a espécie 16S apresenta um valor zero de incorporação.

TABELA VI

Razão de atividade específica das subunidades ribossômicas de E. subtilis marcadas em presença de rifampicina

Tempo de Exposição à Rifampicina (segundos)	Razão de Atividade Específica ^a (A.E. 50S/A.E. 30S)				
	(b)	(c)	(d)	(e)	
0	2,62	2,90	2,76	2,67	2,58
10	3,44	2,88	2,86	2,30	2,12
20	2,52	2,74	-	-	1,49
30	2,03	2,19	2,07	2,09	2,03
60	2,28	2,47	1,83	1,93	1,96
90	*	*	2,32	1,43	1,72

a) Atividade específica calculada pela divisão da radiatividade incorporada em cada subunidade ribossômica pela absorbância total a 260 nm.

b-e) Condições descritas na legenda da tabela V.

* Razão não calculada porque a espécie 16S apresenta valor zero de incorporação.

A partir desses dados nota-se que as razões de radiatividade total, bem como as razões de atividade específica apresentam um valor aproximadamente constante, que não varia com o tempo de exposição prévia à rifampicina, com a concentração do antibiótico, com o tempo de geração e com o método de extração dos ribossomos.

3.2.2.2. Alongamento de cadeias de rRNA em presença de rifampicina em culturas de E. coli. Análise em diferentes tempos de geração

Os mesmos tipos de experimentos descritos no item 3.2.2.1. foram conduzidos em culturas de E. coli.

Em E. coli a cinética de decaimento de radiatividade incorporada em RNA ribossômico, em função do tempo de exposição à rifampicina, já é conhecida na literatura (Bremer e Berry, 1972; Dennis e Bremer, 1973), e basicamente apresenta o mesmo perfil mostrado na figura 13 A e B. Nesta figura acham-se os dados de cinética de incorporação de uridina triada obtidos em culturas de E. coli B, crescidas em meio com glicose-aminoácidos (A) e glicose (B), e expostas a 60 µg/ml de rifampicina por tempos diferentes. Nesse estudo seguiu-se na íntegra o método descrito por Dennis e Bremer (1973) para a figura 13B e o descrito em Material e Métodos para a figura 13A.

Na tabela VII apresentam-se as razões de radiatividade incorporada e de atividade específica das subunidades ribossômicas, obtidas em experimentos de marcação em presença de rifampicina em culturas de E. coli.

FIGURA 13 - Cinética de decaimento da radiatividade incorporada nas subunidades ribossômicas 50S (O) e 30S (●) de *E. coli* B, em função do tempo de exposição à rifampicina. As células foram tornadas permeáveis à droga (60 µg/ml) por um breve tratamento com EDTA. A- células crescidas em meio glicose-aminoácidos (A) e tratadas como descrito em Material e Métodos. B- células crescidas em meio glicose (B) e tratadas como descrito por Dennis e Bremer (1973).

TABELA VII

Razão de radiatividade incorporada e de atividade específica das subunidades ribossômicas de *E. coli*, marcadas em presença de rifampicina

Tempo de Exposição à Rifampicina (segundos)	Razão (50S/30S)			
	Incorporação		Atividade Específica ^a	
	(b)	(c)	(b)	(c)
0	4,73	6,44	2,36	3,43
10	8,38	15,04	4,19	7,98
20	15,66	19,41	7,83	9,87
30	13,25	29,39	6,62	17,11
60	*	*	*	*

- a) Atividade específica obtida pela divisão dos valores de radiatividade pela absorvância total de cada subunidade.
- b) Cultura crescida em meio com glicose-aminoácidos (A) (g = 30 minutos), tratada com 60 µg/ml de rifampicina conforme descrito na legenda da figura 13A.
- c) Cultura crescida em meio com glicose (B) (g = 45 minutos), tratada com 60 µg/ml de rifampicina conforme descrito na legenda da figura 13B.
- * Não podem ser apresentadas as razões de radiatividade incorporada e de atividade específica das partículas (50S/30S) após 30 segundos de exposição à droga já que a radiatividade incorporada na subunidade 30S é igual a zero, após esse período.

3.2.2.3. Análise da razão de radiatividade quando rifampicina e uridina são concomitantemente adicionadas

Na análise do mecanismo de transcrição de genes ribossômicos os valores de radiatividade incorporada nas subunidades ribossômicas, quando a droga e a uridina tritiada são adicionadas concomitantemente, têm uma importância fundamental, já que variam com o mecanismo de transcrição dos genes ribossômicos (ver Discussão).

Na tabela VIII apresentam-se os valores da razão de radiatividade incorporada e atividade específica das subunidades ribossômicas de B. subtilis e E. coli, obtidas em diferentes condições de cultura dessas bactérias, quando uridina e rifampicina são adicionadas ao mesmo tempo.

3.2.2.4. Análise do RNA presente nas subunidades ribossômicas por eletroforese em gel de poliacrilamida

A natureza do RNA marcado isotopicamente, nos experimentos de alongamento de rRNA em presença de rifampicina, foi analisada por meio de técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (item 2.5.). Para tanto culturas de B. subtilis (g = 55 minutos) e de E. coli (g = 45 minutos), receberam rifampicina e uridina tritiada concomitantemente por um período de 3 minutos; a seguir permitiu-se a incorporação do rRNA nas subunidades ribossômicas, realizando-se "caça" em presença de excesso de uridina não radiativa. Essas subunidades foram isoladas por centrifugação em gradientes de

TABELA VIII

Razões de radiatividade e atividade específica das subunidades ribossômicas de B. subtilis e E. coli

Meio de Cultura	Incorporação		Razão (50S/30S)		Atividade Específica ^a	
	<u>B. subtilis</u>	<u>E. coli</u>	<u>B. subtilis</u>	<u>E. coli</u>	<u>B. subtilis</u>	<u>E. coli</u>
	(-) ^b	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Glicose ^c	1,81	5,53	1,96	6,44	0,95	2,76
				5,59		
Glicose-amino-ácidos ^d	1,73	5,35	1,82	4,73	0,94	2,62
		5,97				2,90
Glicerol ^e	-	5,82	-	-	-	-
					1,10	2,36

- a) Atividade específica calculada dividindo-se a incorporação total de cada subunidade ribossômica pela absorbância total a 260 nm.
b) (-) Refere-se a controles em ausência de rifampicina e (+) em presença da droga.
c) Condições descritas nas legendas das tabelas V e VI (para B. subtilis) e da figura 13B (para E. coli).
d) Condições descritas nas legendas da figura 10 (para B. subtilis) e 13A (para E. coli).
e) Condições descritas na legenda da figura 12.

sacarose, contendo baixa concentração de Mg^{2+} . As frações referentes às subunidades 50S e 30S foram reunidas em dois "pools" diferentes, que foram tratados com SDS (Zimmermann e Levinthal, 1967), a fim de permitir a separação entre rRNA e proteínas ribossômicas.

O rRNA marcado, incorporado em cada subunidade, foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida, determinando-se a radiatividade presente em cada fração do gel. O rRNA ribossômico não radiativo, contido em cada subunidade, serviu como marcador óptico para determinar-se, no gel, a posição dos rRNAs 23S e 16S. Nas figuras 14, 15 e 16 apresentam-se os resultados obtidos para *B. subtilis* e *E. coli*, isoladamente.

Na figura 14 A e B analisa-se, em gel de poliacrilamida 2,7%, a natureza do rRNA presente nas subunidades 50S e 30S, respectivamente; na 14C o rRNA presente em ambas as subunidades de *B. subtilis*. Nota-se uma baixa degradação do rRNA 23S (figura 14A) em dois componentes menores, um deles, provavelmente de tamanho próximo a 16S. Na figura 14C mostra-se que, com essa metodologia, ocorre uma boa separação entre rRNA 23S e 16S, originados das subunidades 50S e 30S, quando colocadas concomitantemente no gel; no entanto, o pico referente ao rRNA 16S apresenta-se mais largo que o esperado (tendo por base a relação teórica de absorbância $23S/16S = 2/1$), sugerindo uma degradação parcial do rRNA 23S em espécie com tamanho "16S".

A figura 14B mostra uma distribuição assimétrica de radiatividade, com assimetria voltada para a região do

FIGURA 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida do rRNA extraído das subunidades 50S e 30S de *B. subtilis*. As células, crescidas em glicose-aminoácidos (A), foram expostas concomitantemente a rifampicina (15 µg/ml) e uridina 3H (5 µCi/ml - 1 µM), por 3 minutos. Após receberem caça de 20 minutos, foram centrifugadas, purificando-se as subunidades ribossômicas em gradiente de sacarose, como descrito em Material e Métodos. O rRNA foi extraído dessas partículas com SDS 0,2% (p/v). A eletroforese processou-se em gel de poliacrilamida 2,7% (p/v), por 3 horas a 20°C, com uma intensidade de corrente de 5 mA/gel, em Tampão E contendo 0,2% de SDS. O gel foi analisado como descrito em Material e Métodos (O radiatividade incorporada). A- rRNA da subunidade 50S; B- rRNA da subunidade 30S; C- rRNAs das subunidades 50S e 30S foram misturados na proporção 1:1 e submetidos à eletroforese. As setas indicam os marcadores ópticos.

gel onde se posiciona o rRNA 23S. De fato, o perfil de absorvância mostra um pequeno pico na região de rRNA 23S que corresponde a, aproximadamente, 5% da área total do gráfico. Entretanto, a assimetria no pico de radiatividade não coincide com esse possível contaminante, localizando-se mais próxima do rRNA 16S. Um cálculo de área pelo método de pesagem mostra que o ombro corresponde a aproximadamente 18 a 20% da radiatividade total. É possível que essa assimetria contenha espécies de rRNA 23S ou produtos de sua degradação, provenientes de partículas precursoras da subunidade 50S, que tenham migrado com a subunidade 30S. No entanto, é também possível que parte dessa radiatividade seja reflexo de precursores de rRNA 16S.

A fim de verificar qual dessas alternativas é a correta, resolveu-se: a) utilizar um gel de poliacrilamida 2,4%, adotado por Hecht e Woese (1968) para demonstrar a presença de precursores para rRNA 16S; esse gel permite maior resolução entre rRNAs de peso molecular próximo e b) submeter a um segundo ciclo de centrifugação em gradiente de sacarose 10-30% (p/v), independentemente, os "pools" das subunidades 50S e 30S, isoladas em gradientes de mesma natureza, como descrito em Material e Métodos.

Na figura 15 analisa-se em gel de poliacrilamida 2,4% os rRNAs provenientes das subunidades 50S e 30S, após a primeira e a segunda centrifugação em gradiente de sacarose. Com base nesses experimentos fica claro que as espécies de rRNA radiativas, existentes na partícula 50S, são produtos de degradação do rRNA 23S, já que persistem após a segunda

FIGURA 15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida do rRNA extraído das subunidades 50S e 30S de *B. subtilis*. As células, crescidas em glicose-aminoácidos (A), foram marcadas com uridina ^3H (5 $\mu\text{Ci/ml}$ - 1 μM) por uma geração, em seguida receberam caça de 20 minutos. As subunidades 50S e 30S, e os rRNAs foram extraídos como descrito em Material e Métodos. A eletroforese processou-se em gel de poliacrilamida 2,4% (p/v), por 3,5 horas a 20°C, com 5 mA/gel, em tampão E contendo 0,2% de SDS. A absorvância e a radiatividade (O) foram determinadas como descrito no texto. A e C- rRNA da subunidade 50S; B e D- rRNA da subunidade 30S; A e B- após um ciclo de centrifugação em gradiente de sacarose; C e D- após dois ciclos de centrifugação em gradiente de sacarose. As setas indicam a posição de marcadores ópticos.

reciclagem em gradiente de sacarose. Por outro lado parece que nenhum deles tem um tamanho análogo ao rRNA 16S, visto que, nesse tipo de gel, esses rRNAs migram em posições diferentes do rRNA 16S. Essa observação é uma evidência de que o rRNA isolado das subunidades 50S de *B. subtilis* é realmente rRNA 23S e não existe contaminação por rRNA 16S.

Na subunidade ribossômica 30S nota-se a presença de duas espécies de rRNA, de tamanho 16S e 23S (figura 15B). Essas duas espécies puderam ser melhor individualizadas em gel 2,4% de poliacrilamida em relação a um gel de 2,7%, como foi visto na figura 14B. A partir da análise dos dois picos bem definidos de radiatividade, cujo tamanho pode ser estimado em base à posição de marcadores ópticos de rRNA 16S e 23S, pode-se afastar a presença de precursores de rRNA 16S, hipótese aventada antes.

Ao contrário do que foi visto para a subunidade de 50S, a espécie de rRNA 23S desaparece das partículas 30S, após a segunda reciclagem por gradiente. Esses dados confirmam a suposição de que existe uma contaminação de subunidade 50S no "pool" de partículas 30S, após a primeira centrifugação em gradiente de sacarose. Essa contaminação, nesse experimento, pode ser estimada em 11% em radiatividade. No estudo da transcrição de rRNA em presença de rifampicina não é aconselhável a realização de dois ciclos de centrifugação em gradiente em virtude das perdas de material que se verificam durante o processo.

Na figura 16 A e B analisa-se a natureza do rRNA presente nas partículas 50S e 30S de *E. coli*. Verifica-se que

FIGURA 16 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (2,7%) do rRNA extraído das subunidades ribossômicas de *E. coli*. As condições são idênticas às descritas na legenda da figura 14. A- rRNA da subunidade 50S; B- rRNA da subunidade 30S.

o rRNA 23S, originado da subunidade 50S, apresenta um pico nítido de absorvância e de radiatividade. Muito provavelmente, em E. coli, existem RNases menos ativas que aquelas de B. subtilis mantendo-se a integridade do rRNA 23S. Outra evidência que diferencia essas duas bactérias nesse tipo de análise, é o fato de que a contaminação por rRNA 23S nas partículas 30S é desprezível para E. coli, observando-se apenas rRNA 16S (figura 16B).

3.2.2.5. Análise do RNA presente nas subunidades ribossômicas por hibridização competitiva

A técnica de hibridização competitiva permite reconhecer numa mistura de classes de RNA a proporção em que cada espécie de RNA está representada na mistura (Bolle et al., 1968; Lavallé e Hawer, 1968; Stubbs e Hall, 1968; Sederoff et al., 1971).

Nesse trabalho essa técnica foi aplicada com o intuito de detectar a natureza do rRNA presente nas subunidades ribossômicas 50S e 30S, isoladas em gradiente de sacarose, após a exposição de células de B. subtilis a 15 µg/ml de rifampicina, como descrito no item 3.2.

Os experimentos de hibridização competitiva foram desenvolvidos em líquido, utilizando-se DNA de fita simples (H) que contem os genes para rRNA. Tomou-se essa precaução para minimizar a reação de reassociação DNA-DNA, que poderia ocorrer durante o processo de hibridização DNA-RNA. O rRNA marcado, utilizado nos ensaios, foi o rRNA 23S tritiado

(232 000 cpm/µg), isolado a partir de células de B. subtilis marcadas extensivamente com uridina tritiada. Esse rRNA 23S figurou em quantidade saturante em relação ao DNA empregado em cada ensaio (0,1 µg/µg de DNA). Os rRNAs não marcados, utilizados como competidores, foram extraídos, independentemente, das subunidades ribossômicas 50S ou 30S.

Nos experimentos de hibridização competitiva variou-se a quantidade de rRNA não marcado, analisando-se os efeitos provocados sobre a formação do híbrido DNA-rRNA 23S ³H. Um estudo dessa natureza é possível, já que foi demonstrado que as espécies de rRNA 23S e 16S hibridizam independentemente com o DNA, sem possibilidade de hibridização cruzada (Yankofsky e Spiegelman, 1963; Doi e Igarashi, 1966; Avery e Midgley, 1969).

No gráfico inserido na figura 17 mostram-se as curvas de competição obtidas num experimento dessa natureza. O grau de competição dos dois competidores é bastante diferente. O rRNA extraído da subunidade 50S compete totalmente com o rRNA 23S radiativo. Com razoável margem de segurança pode-se supor que não existe contaminação por rRNA 16S nas partículas 50S, demonstrado pelo tipo de curva de hibridização competitiva e pela análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (figuras 14 e 16A). O rRNA extraído da subunidade 30S compete parcialmente com o rRNA 23S ³H, demonstrando possuir, em sua composição, rRNA 23S.

A análise da proporção de rRNA 23S, contaminante do rRNA 16S, foi efetuada comparando-se a competição

FIGURA 17 - Competição entre rRNA não radiativo extraído das subunidades ribossômicas e rRNA 23S ^3H , pelo DNA de *B. subtilis* (fita H). Para cada ponto do gráfico inserido na figura a hibridização foi efetuada usando-se 1 μg de DNA, 0,1 μg de rRNA 23S ^3H (232 000 cpm/ μg) e quantidades variáveis de rRNA extraído da subunidade 50S (O) e 30S (●). A hibridização processou-se num volume de 0,5 ml, em NaCl 0,3 M (pH 7), por 3,5 horas a 68°C. O rRNA não hibridizado foi hidrolisado por RNase, como descrito em Material e Métodos. A radiatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida. O valor 100% corresponde à hibridização máxima, em ausência de competidor (1 200 cpm). Na amostra que não contém DNA o valor do "background" foi 50 cpm. O poder competidor dos rRNAs é comparado na figura principal onde: Q^0 = radiatividade no híbrido em ausência de competidor; Q^c = radiatividade no híbrido em presença de competidor. A concentração das espécies de rRNA foi medida por espectrofotometria a 260 nm, considerando-se 1 μg = 0,024 A_{260} .

provocada pelo rRNA extraído da subunidade 30S, em relação à competição obtida com o rRNA 23S, extraído da subunidade 50S. As inclinações iniciais das curvas de competição obtidas no gráfico inserido na figura 17 foram tratadas de acordo com Stubbs e Hall (1968), obtendo-se, estatisticamente, as retas da figura 17. Nessa figura o parâmetro $Q^0 - Q^c/Q^c$ (onde Q^0 = hibridização em ausência de RNA competidor e Q^c = hibridização em presença de competidor) mede a competição relativa de cada espécie de rRNA não marcado. A comparação dos coeficientes angulares dessas retas de competição permite estimar a proporção de rRNA 23S que contamina o rRNA 16S, originado das subunidades 30S. Em cinco determinações independentes, de subunidades ribossômicas isoladas a partir de células expostas ou não à rifampicina, os valores de contaminação de rRNA 23S na subunidade 30S oscilaram entre 11 e 19%.

Infelizmente não foi possível a realização de experimentos inversos a esses relatados acima, nos quais se manteria constante a quantidade de rRNA 16S ^3H e se variaria a derRNAs não marcados, pois, ensaios prévios de competição revelaram que o rRNA 16S tritiado estava, ele próprio, contaminado com rRNA 23S ^3H .

3.2.2.6. Correção dos valores de radiatividade incorporada nas subunidades ribossômicas 50S e 30S

Com base nos valores de contaminação de rRNA 23S nas subunidades ribossômicas 30S, obtidos a partir de estudos: a) de eletroforese em gel de poliácridamida (entre 10 a 20%) e b) de hibridização competitiva (entre 11 a 19%),

adotou-se o valor médio de contaminação de 15% para corrigir a incorporação total de uridina tritiada nas subunidades ribossômicas 50S e 30S.

Como o valor de 15% representa contaminação efetiva de uma espécie molecular na outra calculou-se para a subunidade 30S qual o valor em absorbância a 260 nm que representa o rRNA 23S. A massa de rRNA 23S contaminante foi, então, multiplicada pela atividade específica ($\text{cpm}/A_{260\text{nm}}$) do rRNA 23S, na subunidade 50S, obtendo-se o valor real de radiatividade contaminante. Esse valor foi subtraído do valor de incorporação total na subunidade 30S e foi acrescido à radiatividade total da subunidade 50S.

O cálculo de atividade específica de cada subunidade foi obtido dividindo-se a radiatividade total incorporada pela absorbância a 260 nm. São esses valores assim corrigidos que aparecem nas tabelas apresentadas.

Deve-se ressaltar que a adoção de tal valor de contaminação em massa transforma a razão obtida experimentalmente $A_{260\text{nm}}^{50\text{S}}/A_{260\text{nm}}^{30\text{S}}$ de 1,7 para 2,0, dado que concorda com os valores existentes na literatura.

3.3. CONTROLES ADICIONAIS

O estudo da transcrição dos genes para RNA ribossômico em B. subtilis foi abordado por meio de uma técnica indireta, que se baseia na análise do alongamento de cadeias de rRNA, já iniciadas na presença de rifampicina. Nessas condições a razão de uridina tritiada incorporada em

rRNA 23S e 16S, analisada nas subunidades ribossômicas 50S e 30S, prediz o mecanismo de transcrição dos genes para rRNA 23S e 16S.

Os resultados obtidos nesses experimentos só podem ser analisados adequadamente, se se demonstrar que: 1) nas subunidades ribossômicas realmente se está medindo apenas RNA ribossômico; 2) todo o rRNA transcrito em presença de rifampicina é incorporado nas subunidades ribossômicas; 3) o antibiótico não perturba o processo de associação entre rRNA e proteínas ribossômicas.

3.3.1. Determinação do Tempo Necessário Para a Associação Entre rRNA e Proteínas Ribossômicas

Em B. subtilis 168W analisou-se a incorporação de rRNA marcado em subunidades ribossômicas, após diferentes períodos de caça, realizados em presença de excesso de uridina fria. Na tabela IX esses resultados são apresentados sob forma de atividade específica das subunidades 50S e 30S, isoladas por centrifugação em gradientes de sacarose. Nota-se que a atividade específica de cada subunidade não varia com os períodos de caça analisados (20 a 60 minutos). Desse resultados pode-se concluir que as subunidades ribossômicas atingiram um nível de atividade específica constante, indicando que todo o rRNA transcrito durante o período de pulso foi incorporado nos ribossomos. Ainda pode-se concluir que um tempo de caça de 20 minutos é suficiente para a total associação entre rRNA e proteínas ribossômicas, na formação de

TABELA IX

Análise do período de caça na incorporação de rRNA marcado em subunidades ribossômicas maduras^a

Período de Caça (minutos)	Atividade Específica ^b (cpm/A ₂₆₀) ^c		Razão de Atividade Específica (A.E.50S/A.E.30S)
	50S	30S	
20	30 763	32 914	0,9346
40	30 985	32 396	0,9564
60	31 781	33 279	0,9549

- a) Células de *B. subtilis* 168W (g = 40 minutos) foram marcadas com uridina tritiada (5 µCi/ml) durante 3 minutos; após esse período receberam uridina não radiativa (1 mg/ml final) por diferentes intervalos de tempo, denominado "caça". As subunidades ribossômicas foram isoladas e analisadas como descrito em Material e Métodos.
- b) Atividade específica obtida pela divisão dos valores de radiatividade pela absorbância total de cada subunidade.
- c) Os valores não foram corrigidos para a contaminação média de 15%.

ribossomos maduros, e que essas partículas são estáveis durante o período analisado.

Note-se que a atividade específica da subunidade 30S é sempre maior que a atividade específica da subunidade 50S, o que indica, uma vez mais, a presença de contaminante 50S na subpartícula 30S.

3.3.2. Análise do Efeito de Rifampicina no Processo de Associação Entre rRNA e Proteínas Ribossômicas

As rifampicinas foram usadas como instrumento de análise do papel da RNA polimerase bacteriana no desenvolvimento de diversos bacteriófagos, já que esses antibióticos são inibidores potentes dessa enzima. Verificou-se que o crescimento de muitos fagos de DNA, tais como SP01, ϕ 22, T₄ (ver revisão elaborada por Wehrli e Staehelin, 1971) é inibido por rifampicina. Em bactérias resistentes à droga os fagos desenvolvem-se normalmente, mesmo em presença do antibiótico. Esses resultados forneceram indicação de que a parte sensível à rifampicina da RNA polimerase hospedeira é necessária para a transcrição do genoma (ou pelo menos de parte dele) do bacteriófago.

A descoberta de que o Pox vírus (vírus de células de mamífero) carrega sua própria RNA polimerase (Kates e McAuslan, 1967) levou muitos investigadores a estudar o efeito da rifampicina no crescimento, *in vitro*, dessa classe de vírus, verificando-se que altas concentrações da droga inibem o processo. O antibiótico, no entanto, ao contrário do que ocorre para bactérias, não age sobre a RNA polimerase, mas no processo

de associação entre DNA viral e proteínas, impedindo a formação do envelope do vírus (Moss et al., 1969). Uma análise mais detalhada demonstrou que a rifampicina não permite o processamento de duas proteínas, componentes do "core" do vírus, as quais se acumulam sob forma de precursores de alto peso molecular (Moss e Rosenblum, 1973). O mecanismo específico da ação do antibiótico, nesse processo, ainda não é conhecido.

A partir dessas observações passou-se a investigar se a rifampicina, adicionada às culturas de *B. subtilis*, poderia alterar o mecanismo de associação entre rRNA (recém sintetizado) e proteínas ribossômicas, na formação de ribossomos maduros. Se tal acontecesse a radiatividade incorporada em rRNA 23S e 16S (subunidades 50S e 30S) não poderia ser utilizada como elemento de análise do processo de transcrição dos genes ribossômicos.

Na tabela X mostra-se o estudo do efeito da rifampicina no processo de formação do ribossomo. Culturas de *B. subtilis* receberam uridina tritiada durante 3 minutos, a seguir adicionou-se um excesso de uridina não radiativa e de rifampicina, realizando-se "caça" por um período de 20 minutos. As razões de radiatividade e de atividade específica das subunidades ribossômicas 50S e 30S, obtidas nesse experimento, são comparadas com os valores de culturas controle não expostas à rifampicina ou expostas à droga durante o período de pulso e "caça".

Nota-se que a razão de incorporação de radiatividade nas subunidades ribossômicas da cultura que recebeu

TABELA X

Efeito da rifampicina no processo de associação do ribossomo

	Razão (50S/30S)	
	Incorporação	Atividade Específica ^d
Controle ^a	1,73	0,94
+ Rifampicina na caça ^b	1,89	1,10
+ Rifampicina no pulso e na caça ^c	5,20	2,60

Culturas de *B. subtilis* 168W em crescimento exponencial (g = 40 minutos) receberam uridina tritiada (5 µCi/ml) e uridina não radiativa (1 µM) durante 3 minutos (pulso); em seguida adicionou-se uridina não marcada (1 mg/ml) por um período de 20 minutos (caça). As subunidades ribossômicas foram isoladas e analisadas como descrito em Material e Métodos.

- a) Cultura não exposta à rifampicina.
- b) Cultura que recebeu rifampicina (15 µg/ml) durante o período de caça.
- c) Cultura exposta à rifampicina (15 µg/ml) durante o período de pulso e caça.
- d) Atividade específica obtida pela divisão da incorporação total de cada subunidade por sua absorbância a 260 nm.

rifampicina apenas durante o período de "caça" apresenta um valor semelhante àquele da cultura não exposta à droga. Esse valor, no entanto, é diferente daquele obtido quando rifampicina e uridina tritiada são adicionadas concomitantemente às células bacterianas.

Esses resultados sugerem que o antibiótico não afeta o processo de associação do ribossomo, e que sua atuação é realmente ao nível da transcrição.

4. DISCUSSÃO

4.1. CINÉTICA DE MARCAÇÃO DE RNA

Quando um precursor radiativo de ácidos nucleicos é adicionado ao meio de cultura, ele penetra para dentro da célula e dilui-se no "pool" intracelular de precursores não radiativos. Deve existir, portanto, um tempo de latência na incorporação de radiatividade em RNA e DNA, em virtude da diluição e da remoção de nucleotídeos não marcados do "pool" ácido-solúvel celular. Observou-se, contudo, (figura 1), que não existe um tempo de latência detectável na incorporação em RNA, quando se adiciona uridina a células que estão crescendo em ausência desse nucleosídeo. Isso pode ser explicado pelo fato de que o "pool" interno de nucleotídeos pirimídicos não esteja saturado, expandindo-se rapidamente às custas da uridina adicionada. Como essa uridina é de alta atividade específica, segue-se uma rápida marcação do "pool" interno. Interpretação semelhante foi dada por Salser et al. (1968), estudando a incorporação de guanina em RNA e por Nierlich e Vielmetter (1968) para a incorporação de uracila.

Nos estudos de síntese de RNA, entretanto, há necessidade de se usar uma atividade específica mensurável do precursor radiativo, para evitar seu rápido esgotamento do meio externo, com consequente diminuição da atividade específica do "pool". Por essa razão realizaram-se medidas da expansão do "pool" provocada pela variação da concentração de

uridina externa. Incubando-se previamente as células com uridina não radiativa inibe-se a síntese de pirimidinas e permite-se o estabelecimento de um "pool" interno de tamanho definido (Gerhart e Pardee, 1963; Bremer e Yuan, 1968 a; Salser et al., 1968).

O tempo de latência na marcação de ácidos nucleicos, resultante da utilização de precursores não marcados de UTP e UDP, mede o tempo de síntese total que pode ser suprida por esses "pools" (Salser et al., 1968). Essa latência será, portanto, proporcional ao tamanho do "pool" interno de nucleotídeos.

Demonstrou-se (figura 1) que a preincubação com uridina 1 μM não radiativa provoca um tempo de latência de 10 segundos na marcação de ácidos nucleicos após a adição de uridina radiativa, ao passo que a preincubação com concentrações maiores de uridina (até 10 μM) determina o mesmo tempo de latência de 20 segundos. A partir desse resultado deve-se concluir que com concentrações superiores a aproximadamente 1 μM atinge-se o mesmo tamanho do "pool" intracelular em B. subtilis, dado que concorda integralmente com as observações de Nierlich e Vielmetter (1968). Essas conclusões são ainda consistentes com as observações de Bremer e Yuan (1968 a) que verificaram que em concentrações superiores a 3 μM de uridina no meio de cultura o "pool" de nucleotídeos de pirimidina em E. coli atinge seu valor máximo, observando-se o máximo de velocidade de tomada desse precursor do meio e de marcação de ácidos nucleicos. Estudos análogos por Salser et al. (1968) mostraram que o "pool" de nucleotídeos de guanina,

em B. subtilis, não se expande mais se a concentração dessa base no meio for maior que 2 μM .

Adotou-se nos experimentos de alongamento das cadeias de rRNA em presença de rifampicina a concentração de 1 μM de uridina, pois essa concentração permitiu alta marcação das espécies de RNA sintetizadas, com um mínimo de tempo de latência, o qual é consistentemente menor que 10 segundos quando em presença de rifampicina. A razão pela qual a rifampicina diminui o tempo de latência na penetração do precursor é desconhecida, mas já foi verificada por outros autores em E. coli (Bremer et al., 1973). Além disso essa concentração assegura uma velocidade constante e suficientemente baixa de tomada de uridina, fato esse reforçado pela baixa densidade de bactérias empregadas, mantendo o suprimento exógeno praticamente inalterado durante o período de observação. Em virtude da cinética linear de incorporação observada nessa concentração, pode-se supor que qualquer variação da atividade específica do "pool" não influencia apreciavelmente a síntese de RNA.

A baixa velocidade de utilização de uridina exógena (1 μM) é assegurada pela determinação do K_m aparente (5,1 μM) para esse sistema (figura 2).

Por meio da técnica de Roodyn e Mandel (1960) discriminou-se a natureza e a porcentagem com que as duas classes de ácidos nucleicos são marcadas com uridina tritiada (ou seus derivados radiativos). Determinou-se que após 20 minutos de marcação apenas 5% da incorporação total

encontra-se em DNA e que essa espécie só começa a ser notada a pós 3 minutos de marcação. Esse resultado concorda com as observações de Stuy (1958) e Chantrenne e Devreux (1959) que mostram que em células de B. cereus, em crescimento exponencial, a relação de síntese RNA/DNA é 10 a 15/1 e com os dados de Schwartz et al. (1970) para E. coli.

A cinética de marcação de RNA total estudada em períodos curtos, na realidade, é a resultante de duas cinéticas superpostas: a de marcação de RNA estável e a de RNA instável. Experimentalmente observa-se diretamente apenas a cinética de marcação de RNA total.

Várias metodologias podem ser adotadas para medir qual a porcentagem do RNA total que é representada por RNA instável (principalmente mRNA). Uma delas é estimar qual a proporção do RNA total que é suscetível de degradação intracelular rápida, após bloquear a síntese de RNA por actinomomicina D. Essa técnica foi adotada por diversos autores (Levinthal et al., 1962; Kennel, 1964; Leive, 1965; Zimmermann e Levinthal, 1967) e demonstrou que a fração de RNA instável varia entre 1,5 a 9% do RNA total, em diferentes sistemas bacterianos. No entanto, estudos dessa natureza podem ser criticados pelo fato de envolverem o uso de um inibidor metabólico que tem afinidade diferente para certos genes (Reich et al., 1962) e que provoca a degradação preferencial de certas classes de RNA (Kennel, 1964; Zimmermann e Levinthal, 1967). Outro tipo de antibiótico pode ser utilizado para essa análise: a rifampicina, que tendo como alvo a RNA polimerase (Hartmann et al., 1967;

Sippel e Hartmann, 1968; Umezawa et al., 1968; Wehrly et al., 1968 a, b) e não o DNA, inibe de maneira igual a iniciação da transcrição em qualquer gene. Além disso os resultados aqui apresentados sugerem que a rifampicina não tenha efeito sobre a degradação preferencial de certas espécies de RNA.

Quando se adiciona rifampicina e uridina tritiada a bactérias, ocorre a incorporação desse precursor em moléculas de RNA que estão sendo alongadas (Mosteller e Yanofsky, 1970; Pato e von Meyenburg, 1970; Rose et al., 1970). A síntese dessas moléculas é terminada durante os primeiros minutos de adição da droga, sem ocorrer reiniciação da transcrição. É de se esperar, portanto, que seja possível visualizar o decaimento da radiatividade incorporada, que reflita a degradação de espécies de RNA sintetizadas em presença da droga.

Realmente a cinética de marcação de ácidos nucleicos de B. subtilis, em presença de rifampicina, é complexa (figura 6), como foi observado anteriormente para E. coli por Pato e von Meyenburg (1970) e por Bremer et al., (1973). Dessa cinética, resultante da superposição da cinética de marcação de DNA e RNA (analisadas aqui independentemente) pode-se depreender que a incorporação em RNA total procede linearmente por aproximadamente 2 minutos, decaindo em seguida, por efeito de degradação de espécies instáveis de RNA (mRNA e precursores de tRNA e rRNA). Após 15 minutos de marcação, em presença de rifampicina, atinge-se um plateau relativo ao RNA estável (rRNA e tRNA). A cinética de marcação de DNA, por outro lado, procede linearmente a partir de

aproximadamente 2 minutos, como esperado, já que a droga não afeta a síntese de DNA.

A partir da cinética de incorporação em RNA total pode-se determinar a fração de radiatividade incorporada em RNA instável em relação ao RNA total. Essa fração Q, definida por Pato e von Meyenburg (1970) é obtida dividindo-se a diferença entre o máximo de radiatividade incorporada em RNA total (aos 2,5 minutos) e a radiatividade em RNA estável (aos 15 minutos), pela radiatividade em RNA total. Nesse experimento $Q = 0,56$ e a fração de RNA estável será, por conseguinte, $1 - Q = 0,44$. Bremer et al. (1973) relataram valores de $1 - Q$ de 0,48; 0,28 e 0,19 para células de E. coli crescidas, respectivamente, em meio de glicose-aminoácidos, glicose e succinato. Esses valores são um pouco menores do que aqueles observados por Pato e von Meyenburg (1970) (respectivamente, 0,63; 0,38 e 0,23) e por Winslow e Lazzarini (1969). O valor aqui obtido para B. subtilis, crescido em glicose-aminoácidos, é menor que aqueles descritos para E. coli. Essa parece ser, no entanto, uma característica inerente ao sistema bacteriano em estudo. A análise em presença de actinomicina D, revelou que, em B. subtilis 64% da radiatividade incorporada inicialmente aparece em mRNA (Zimmermann e Levinthal, 1967). Os dados aqui apresentados mostram que a fração de radiatividade incorporada em RNA instável, maior para B. subtilis em relação a E. coli, são coerentes com os dados existentes na literatura que indicam que, em B. subtilis, a fração de RNA instável é 8% do RNA total (Kennel, 1964; Zimmermann e Levinthal, 1967; Salser et al., 1968) ao passo que E. coli é apenas 3% (Salser et al., 1968; Kennel, 1968).

Estudos sobre cinética de decaimento de radiatividade incorporada em presença de rifampicina têm sido de extrema utilidade na determinação da meia vida de mRNAs bacterianos, e do tempo de transcrição de operons. Rose et al. (1970) determinaram que o operon do triptofano é transcrito em 2,5 a 5 minutos. Pato e von Meyenburg (1970) calcularam que a meia vida de mRNAs de E. coli é, aproximadamente, 1,5 minutos. A valor muito semelhante chegaram Schwartz et al. (1970) determinando, que a meia vida funcional do mRNA do operon da lactose é 1 minuto e 40 segundos, dado que concorda com estimativas feitas segundo outras metodologias. Dentro dessa mesma linha, estudos mais recentes (Toivonen e Niehrlich, 1974) demonstram que o tempo médio de decaimento de mRNAs é 3,4 minutos.

Curvas de cinéticas de decaimento para RNA mensageiro, em presença de rifampicina, não foram descritas para B. subtilis. A cinética aqui apresentada mostra uma média para o RNA instável de 3 minutos, que corresponde a uma meia vida de $3 \ln 2 = 2,08$ minutos, valor esse que concorda com os dados existentes para mRNAs bacterianos. O decaimento lento da radiatividade incorporada em B. subtilis, quando comparado com E. coli, poderia estar relacionado com a heterogeneidade da meia vida de mensageiros nessa bactéria. Salser et al. (1968) mostraram, para essa mesma espécie bacteriana, que o tempo de decaimento funcional para mRNAs que codificam para diferentes proteínas varia entre 2 a 9 minutos.

A concentração de rifampicina usada nos experimentos aqui descritos foi de 15 µg/ml, o que garante a

inibição de 96%, da síntese de RNA. Quando a uridina tritiada foi adicionada às culturas 5 minutos após a exposição ao antibiótico verificou-se sua incorporação num material precipitável por TCA e cuja hidrólise alcalina forneceu ribonucleotídeos. Esse material atinge, após 20 minutos, 22% do valor máximo de marcação que se obtém quando a droga e o precursor são adicionados concomitantemente. Esse material parece ser RNA de baixo peso molecular, cuja síntese é insensível à ação da rifampicina. Em experimentos, não apresentados nesse trabalho, demonstrou-se que a síntese desse RNA é independente da concentração de rifampicina (1 a 50 µg/ml) e do tempo de exposição à droga (3 a 20 minutos). Além disso, a quantidade de produto formado é proporcional à concentração de células e de substrato radiativo adicionado, demonstrando que esse fenômeno é inerente ao sistema e não reflete um processo inespecífico. A natureza desse material não está clara, mas parece ser semelhante ao material residual descrito por Pato e von Meyenburg (1970) como sendo sintetizado em células tratadas com ácido nalidíxico e rifampicina por 5 minutos. Bremer et al. (1973), tentando caracterizar esse produto, verificaram que, à maneira de ácidos nucleicos, não é extraído por fenol, é sensível à hidrólise alcalina e RNase, e que, finalmente, não é observado em gradientes de sacarose na região entre 0 e 70S. Contrariamente a esse último resultado, verificou-se no presente trabalho que esse RNA localiza-se na porção superior dos gradientes de sacarose, como esperado de acordo com seu baixo peso molecular; verificou-se, ainda, que esse material, aparentemente, não é suscetível à caça com excesso de uridina fria (tabela III). Supõe-se que ele seja

originado pela polinucleotídeo fosforilase não inibível por rifampicina (Bremer et al., 1973), não podendo ser descartada a hipótese de uma síntese residual, normal de RNA, que escapa à inibição por rifampicina.

O antibiótico rifampicina parece não exercer um efeito na degradação de espécies de RNA estável, ao contrário do que foi visto para a actinomicina D. Essa afirmação surge da análise dos resultados de incorporação em rRNA, em presença de rifampicina (2; 5 e 15 minutos) após caça com uridina não radiativa. Observa-se que, após esse período, atinge-se nos três pontos experimentais o mesmo valor de marcação, que deve ser relativo ao RNA estável. Esse material (rRNA e tRNA) foi caracterizado por centrifugação em gradientes de sacarose (tabelas III e IV).

4.2. TRANSCRIÇÃO DE GENES PARA RNA RIBOSSÔMICO

Como foi descrito na Introdução várias metodologias podem ser adotadas na análise do mecanismo de transcrição de genes para RNA ribossômico. A primeira abordagem tentada, transcrição in vitro dos genes para rRNA, foi infrutífera pelas razões expostas anteriormente.

A segunda metodologia, que envolvia a reiniciação sincrônica da transcrição após a inibição por rifampicina, também não deu resultados, em virtude da impossibilidade da reversão da inibição pela droga. Várias hipóteses podem ser levantadas para a explicação desse fenômeno. Em B. subtilis a não desinibição da ação da rifampicina poderia

estar relacionada com a alta permeabilidade celular à droga. De fato, nessa bactéria observa-se que o máximo de inibição da síntese de RNA é atingido com doses extremamente baixas de rifampicina (1 µg/ml), ao passo que, em E. coli, doses de 60 µg/ml ainda permitem a transcrição residual da ordem de 10% (Gupta e Singh, 1972). Em E. coli, além disso, a fim de tornar a bactéria permeável ao antibiótico deve-se expô-la a um breve tratamento por EDTA (Haselkorn et al., 1969; Reid e Speyer, 1970). Uma outra possível explicação daquele fenômeno seria a formação de um complexo altamente estável entre o antibiótico e a RNA polimerase de B. subtilis, talvez mais estável que aquele formado com a enzima de E. coli (Wehrly et al., 1968, c).

A terceira metodologia experimentada consistia em analisar-se a transcrição de genes para RNA ribossômico durante o processo de recuperação da síntese de RNA, que se verifica em presença de baixas concentrações de rifampicina. Esse processo e suas possíveis causas foram analisadas, em detalhe, na parte de Resultados, concluindo-se que não se verifica uma sincronia na iniciação da transcrição, fato imprescindível para uma abordagem dessa natureza.

Adotou-se, finalmente, para o estudo de transcrição de genes para rRNA a análise do alongamento de cadeias de RNA ribossômico já iniciadas em presença de rifampicina. Essa abordagem, apesar de ser indireta, tem a vantagem de processar-se num sistema in vivo, em condições de transcrição. Os possíveis efeitos do antibiótico serão discutidos.

Uma série de observações sugere que os genes para rRNA em bactérias estão organizados em agrupamentos, que contêm uma cópia de cada gene para rRNA 16S, 23S e 5S (Colli e Oishi, 1969; Colli et al., 1971). Em E. coli todas as evidências sugerem a hipótese de que cada agrupamento forma uma unidade transcricional, transcrita a partir de um único sítio de iniciação (Pato e von Meyenburg, 1970; Bremer e Berry, 1971; Doolittle e Pace, 1970, 1971; Gupta e Singh, 1972; Dennis e Bremer, 1973).

Ao se adicionar uridina ³H e rifampicina concomitantemente, supondo-se que a atividade específica do "pool" se mantenha constante durante o período de observação, a razão teórica de radiatividade incorporada rRNA 23S/rRNA 16S é 8/1, admitindo-se o modelo de cotranscrição B-1; 4/5 no modelo de cotranscrição B-2 e 4/1 no modelo, de transcrição independente (ver Quadro I e análise teórica no Apêndice). O problema relativo à atividade específica do "pool" de precursores já foi discutido anteriormente.

As relações de radiatividade incorporada (rRNA 23S/rRNA 16S) obtidas experimentalmente no tempo zero de reação foram 5,35; 5,53 e 5,82 para B. subtilis crescido, respectivamente, em meio de glicose-aminoácidos (A), glicose (A) e glicerol (A). Uma análise paralela para E. coli, realizada com o intuito de verificar se a metodologia aqui empregada reproduzia os dados existentes na literatura para essa última espécie bacteriana, revelou relações de 4,73 e 6,44 em meio glicose-aminoácidos (A) e glicose (B). Dennis e Bremer (1973) relataram razões experimentais de incorporação de 5,8;

6,4 e 6,8 para E. coli crescida em glicose-aminoácidos, glicose e succinato, nessa ordem. Esses resultados afastam definitivamente a hipótese de cotranscrição B-2.

Na hipótese de cotranscrição B-1 vários são os fatores que podem abaixar a relação teórica inicial. Um tempo de latência na ação da rifampicina resultará na síntese de espécies de rRNA 23 S e 16S segundo o mesmo esquema de transcrição em ausência de antibiótico (ver Apêndice). Durante esse período de latência a relação de incorporação rRNA 23S/rRNA 16S = 2/1, o que diminuirá a relação 8/1 esperada. O tempo de latência na ação da rifampicina foi estimado por meio do ensaio da indução da β -galactosidase, como sendo de 3,5 a 5,5 segundos (Pato e von Meyenburg, 1970; Bremer et al., 1974). Dados mais recentes mostram tempos de latência maiores, da ordem de 10 segundos (Rogerson e Ezekiel, 1974), a 15 segundos (Toivonen e Nierlich, 1974), para E. coli.

No Apêndice desse volume (figura 22) faz-se uma análise teórica da influência do tempo de latência na ação da rifampicina sobre as relações iniciais de radiatividade. Pode-se verificar que um tempo de latência de 5 segundos leva essa relação de 8 para 6,5, considerando-se um tempo de transcrição de 30 segundos para o rRNA 16S. Para uma latência de 15 segundos essa relação torna-se igual a 5. Uma diminuição da relação teórica 4, esperada para o modelo de transcrição independente, também se verifica (figura 22).

Um efeito semelhante também poderia ser provocado se existisse uma síntese residual de RNA, que escapasse

à inibição por rifampicina. As polimerases resistentes ao antibiótico transcreveriam normalmente os genes para 23S e 16S, sem restrições. A concentração de rifampicina adotada na maioria dos ensaios foi de 15 μ g/ml, o que garante 96% da inibição da síntese de RNA. Essa síntese residual (4%) poderia ser atribuída à incorporação em cadeias que estavam sendo alongadas no momento de adição da droga ou a uma síntese resistente à rifampicina, este último contribuiria para a diminuição da relação de radiatividade inicial.

A concentração de rifampicina adotada apresenta um efeito bactericida potente (88% de letalidade em culturas expostas à droga durante 1 minuto), dado que coincide com os resultados de Coote et al., (1973). O efeito letal de altas doses de rifampicina não invalida, contudo, estudos de natureza bioquímica realizados in vivo, principalmente por períodos de curta duração, já que os processos continuam a ocorrer na célula. Leighton e Doi (1971) demonstraram a existência de mRNAs estáveis, durante a esporulação de B. subtilis, após inibir a síntese de RNA com 30 μ g/ml de rifampicina. Esses mRNAs são alongados e traduzidos normalmente em presença da droga.

Outra evidência de que a alta concentração de rifampicina adotada não perturba os resultados de transcrição de genes para rRNA decorre da verificação de que, as razões iniciais de radiatividade incorporada em rRNA 23S/rRNA 16S (tabela V) também são de 5,49, quando B. subtilis é exposto a 0,5 ou 0,7 μ g/ml de rifampicina (doses que inibem 95% da síntese de RNA, com apenas 10% de letalidade).

A análise por eletroforese em gel de poliacrila mida e por hibridização competitiva dos rRNAs extraídos das subunidades ribossômicas 50S e 30S (isoladas em gradientes de sacarose) demonstram contaminação na subunidade 30S de rRNA 23S. Em diversos experimentos essa contaminação foi calculada como variando entre 10 e 20%. Níveis de contaminação dessa natureza também tendem a abaixar a razão inicial da incorporação.

Esse fator de erro na análise das relações iniciais, bem como da cinética de decaimento da radiatividade em presença de rifampicina (discutido mais abaixo), foi corrigido para uma contaminação média de 15% em massa da subunidade 30S pelo rRNA 23S. Uma evidência circunstancial de que o valor médio de contaminação tenha sido corretamente estimado provém do fato de que após a correção a razão $A_{260}^{50S}/A_{260}^{30S}$ é próxima de 2, como esperado teoricamente. No entanto esse valor ainda poderia ser subestimado já que ao analisar-se a relação de radiatividade incorporada em culturas controle, não expostas à rifampicina, obtêm-se valores que oscilam entre 1,73 e 1,89.

É necessário salientar que o valor médio de 15% de contaminação, utilizado para corrigir os resultados experimentais, está sujeito a erros maiores nas porções terminais das curvas, onde a radiatividade medida é consideravelmente mais baixa que nas porções iniciais. Esse argumento, a possibilidade de síntese residual e o tempo de latência da rifampicina (figura 22) talvez expliquem porque as curvas se prolongam demasiadamente antes de tocar a abscissa. Esse

fenômeno é mais evidente para o rRNA 16S do que para o rRNA 23S. Dennis e Bremer (1973) observaram fato semelhante ("trailing") para E. coli. Esse prolongamento relativo à curva do rRNA 16S complica o cálculo do tempo de terminação da transcrição do gene correspondente, o que será discutido mais adiante.

Ao interpretar os dados de cinética de decaimento de radiatividade incorporada em função do tempo de exposição à rifampicina deve-se admitir que todas as moléculas de rRNA transcritas são incorporadas nas subunidades ribossômicas 30S e 50S. Em experimentos aqui relatados demonstrou-se que a razão de atividade específica das subunidades 50S e 30S mantém-se constante entre 20 e 60 minutos de caça em presença de excesso de uridina fria, e que não se observa rRNA 23S ou 16S livre nos perfis de sedimentação. A partir desses resultados deve-se concluir que todo o rRNA transcrito é incorporado nos ribossomos, que esse rRNA se mantém estável e que um tempo de caça de 20 minutos garante a associação entre rRNA e proteínas ribossômicas. Esse dado concorda com a análise de Van Dijk-Salkinoja e Planta (1970) para ribossomos de B. licheniformis. Zimmermann e Levinthal (1967), analisando o tempo de formação de ribossomos de E. coli, encontraram um valor de 20 minutos. Por outro lado Bremer et al. (1973) afirmam que a radiatividade incorporada em 30S e 50S permanece constante entre 5 e 20 minutos após a adição concomitante de rifampicina e uridina tritiada. No presente trabalho poderiam ter sido investigados períodos de caça mais curtos que 20 minutos. Entretanto, tal período garante uma total

maturação das espécies ribossômicas e o total decaimento das espécies instáveis de RNA. Essa última premissa é imprescindível para a análise acurada da atividade específica de 50S e 30S.

Outro ponto importante analisado foi o de que a presença de rifampicina não altera o processo de associação dos ribossomos (tabela X), o que foi verificado administrando-se rifampicina durante o período de caça.

A partir dos dados de cinética de decaimento de radiatividade incorporada em presença de rifampicina deveria ser possível poder-se calcular o tempo de terminação de transcrição dos genes para 16S e para 23S (ver Apêndice). Dessa forma, o tempo de síntese para o rRNA 23S pode ser obtido a partir da porção linear inicial da curva para 50S. Por outro lado o tempo de transcrição do gene para 16S corresponderia ao ponto onde a curva para 30S toca a abscissa ($\text{Prod}(16) = 0$). É evidente ainda, que o tempo de terminação da transcrição da unidade transcripcional para rRNA pode ser diretamente determinado a partir do tempo em que a porção parabólica da curva de 50S toca a abscissa ($\text{Prod}(23) = 0$); esse ponto é igual a $3u$, sendo u o tempo de transcrição do rRNA 16S (figura 22). Os valores calculados tendo-se por base os pontos onde as parábolas tocam o eixo do tempo são difíceis de serem determinados acuradamente devido ao formato da curva, e ao tempo de latência da rifampicina, como discutido anteriormente.

A partir do prolongamento da porção linear das curvas de 50S foi possível determinar-se que a transcrição do

gene para rRNA 23S ocorre em 55 a 60 segundos, para B. subtilis ($g = 40$ minutos) e em 40 segundos para E. coli ($g = 30$ minutos). Esses valores na realidade são provavelmente mais baixos, pois deles não foi descontado o tempo de latência da rifampicina. O cálculo do tempo de transcrição do gene para 16S a partir da curva do 30S é impossível de ser realizado pelas razões expostas antes. Já que a velocidade de alongamento da RNA polimerase é a mesma para ambos os genes ribossômicos, poder-se-ia prever que o tempo de síntese do gene para 16S seja 30 segundos e 20 segundos para B. subtilis e E. coli, respectivamente.

Os dados obtidos aqui para E. coli concordam com a maior parte das estimativas existentes na literatura (Bremer e Berry, 1971; Dennis e Bremer, 1973; Bremer et al., 1974). No entanto discordam dos resultados de Mangiarotti et al. (1968) e Adesnik e Levinthal (1969) que apresentam evidências de que o tempo de síntese de ambas as espécies de rRNA é o mesmo, de aproximadamente 2 minutos. Avery (1969) estimou também, tempos de síntese longos para o rRNA 16S e 23S de B. subtilis, crescido a 37°C , como sendo 1,3 e 2,4 minutos, respectivamente. Esses resultados são discutidos por Nikolaev et al. (1973), que apontam as possíveis causas de erro na sua interpretação.

Admitindo-se que o gene para 23S tenha 3 200 nucleotídeos, a velocidade de alongamento da cadeia de rRNA seria de 53 nucleotídeos por segundo para B. subtilis e 80 nucleotídeos por segundo para E. coli, tendo por base os tempos de transcrição desse gene em ambas as bactérias.

Esses resultados são consistentes com as medi-
das de velocidade de alongamento de RNA realizadas anterior-
mente. Em E. coli essa velocidade, dependente das condições
de crescimento, varia desde 0,07 nucleotídeos/segundo, para
células crescidas a 0°C, até 27 a 50 nucleotídeos/segundo para
culturas a 30°C e 37°C, respectivamente (Goldstein et al.,
1965; Bremer e Yuan, 1968, b; Manor et al., 1969; Winslow e
Lazzarini, 1969; Rose et al., 1970). Medidas específicas da
velocidade de síntese de rRNA forneceram valores mais altos:
75 a 100 nucleotídeos/segundo (Zimmermann e Levinthal, 1967;
Bremer e Berry, 1971; Dennis e Bremer, 1973; Bremer et al.,
1974).

As considerações feitas a respeito das rela-
ções iniciais de radiatividade, isto é, quando rifampicina
e uridina são adicionadas concomitantemente, bem como aque-
las relativas à cinética de decaimento em presença do anti-
biótico, sugerem que em Bacillus subtilis a síntese de RNA ri-
bossômico obedeça ao mecanismo de cotranscrição, sendo que o
gene para rRNA 16S precede o gene para rRNA 23S. O fato de
que as relações de radiatividade, calculadas para cada ponto
das parábolas, não aumentam como para E. coli (Tabela VII), po-
de ser explicado pelo prolongamento excessivo da curva relati-
va ao rRNA 16S, cujas prováveis causas já foram exaustivamen-
te discutidas.

A existência de um mecanismo de cotranscrição pa-
ra os genes ribossômicos em B. subtilis está de acrd com os
resultados de Colli e Oishi (1969) e Colli et al. (1971), que

demonstraram ligação física entre esses genes. Bleyman et al.
(1969), propuseram um esquema de transcrição independente pa-
ra os rRNAs 16S e 23S, nessa mesma bactéria. Entretanto, es-
ses autores se basearam na análise da sensibilidade diferen-
cial dos genes ribossômicos à actinomicina D, sem levar em
consideração uma possível degradação preferencial da espê-
cie 23S, que contaminaria a espécie 16S. Esse fato, porém, não
invalida suas conclusões, basicamente corretas, de que os
rRNAs 23S e 5S são cotranscritos, nessa ordem.

Esse resultado e o fato conhecido de que a RNA
polimerase transcreve no sentido 5' + 3' faz supor que em
B. subtilis uma unidade transcripcional seria estruturada na
seguinte ordem:

As conclusões do presente trabalho basearam-se
numa análise indireta, que necessita, para sua comprovação fi-
nal, o isolamento de mutantes deficientes em RNase, análogos à
queles descritos para E. coli (Dunn e Studier, 1973; Nikolaev
et al., 1973), a fim de se poder detectar a existência de
um precursor único para as 3 espécies de rRNA.

Essas conclusões parecem confirmar que os RNAs
ribossômicos de eucariotos (ver Burdon, 1971) e procario-
tos possuem um mecanismo semelhante de síntese. Esse proces-
so deve ser tão fundamental para o funcionamento do organis-
mo que se estabeleceu precocemente e foi mantido durante a
evolução.

RESUMO

O estudo sobre a cinética de incorporação de uridina em ácidos nucleicos permitiu estabelecer que o tamanho do "pool" de precursores permanece constante na presença de concentrações de uridina exógena acima de aproximadamente 1 μ M. Concluiu-se ainda que todo o sistema de tomada de uridina, medido pela sua incorporação em ácidos nucleicos, apresenta um K_m de 5,1 μ M e opera a uma velocidade máxima de 11 pmoles/min/1,3 x 10⁷ células.

Um estudo análogo, em presença de rifampicina, possibilitou calcular que a meia vida de RNAs mensageiros em B. subtilis é de 2 minutos e que 44% da radiatividade incorporada em RNA num determinado instante se encontra na fração de RNA estável (ribossômico e de transferência).

A análise do mecanismo de transcrição dos genes para RNA ribossômico foi abordada por meio do estudo do alongamento de cadeias de rRNA já iniciadas, em presença de rifampicina. As relações iniciais de radiatividade incorporada em rRNA 16S e 23S, quando rifampicina e uridina tritiada são adicionadas concomitantemente, bem como a cinética de decaimento de marcação presente em ambas as espécies de rRNA sugerem que os genes para RNA ribossômico 16S e 23S são cotranscritos nessa ordem, em B. subtilis. Levando-se em consideração essas e outras evidências, propõe-se o seguinte relacionamento estrutural para a unidade de transcrição:

-131-

Os resultados experimentais foram comparados com modelos teóricos descritos no Apêndice.

A existência de um mecanismo de cotranscrição para os genes responsáveis pela síntese de rRNA em procariontes e eucariontes parece sugerir que esse mecanismo, de fundamental importância, instalou-se precocemente e foi mantido durante a evolução.

SUMMARY

The kinetics of uridine incorporation into nucleic acids has shown that the precursor pool size remains constant in the presence of exogenous uridine concentrations above 1 μ M, approximately. It has also been shown that the whole system of uridine uptake, as measured by the incorporation of uridine into nucleic acids, has an apparent K_m of 5.1 μ M and operates at a maximal rate of 11 pmoles/min/ 1.3×10^7 cells.

The incorporation, in the presence of rifampicin, made it possible to calculate the half life of the messenger RNA's in *B. subtilis* as being 2 minutes. In any given instant, 44% of the radioactivity incorporated into RNA belongs to the stable RNA fraction (ribosomal and transfer).

The analysis of the ribosomal RNA genes transcription mechanism was undertaken by a study of the rRNA chain elongation in the presence of rifampicin. The initial ratios of radioactivity incorporated in 16S and 23S rRNA's, when rifampicin and tritiated uridine are concomitantly added, and the decay kinetics of the radioactivity present in both rRNA species, suggest that the 16S and 23S rRNA genes are cotranscribed, in that order, in *B. subtilis*. Taking into consideration these and other evidences, the following structural relationships are proposed for the transcriptional unit:

The experimental results were compared with theoretical models described in the Appendix.

The existence of a cotranscription mechanism for the rRNA genes in prokaryotes and eukaryotes seems to suggest that such mechanism, being of fundamental importance, established itself very early and was maintained through evolution.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adesnik, M. & Levinthal, C., 1969 - Synthesis and maturation of ribosomal RNA in E. coli. J. Mol. Biol., 46: 281-303.
- Anagnostopoulos, C. & Spizizen, J., 1961 - Requirements for transformation in B. subtilis. J. Bacteriol., 81: 741-746.
- Attardi, G., Huang, P.C. & Kabat, S., 1965 - Recognition of ribosomal RNA sites in DNA. I. Analysis of the E. coli system. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 53: 1490-1498.
- Attardi, G. & Amaldi, F., 1970 - Structure and synthesis of ribosomal RNA. Ann. Rev. Biochem., 39: 183-226.
- Avery, R.J., 1969 - Measurements of the rate of growth of the polynucleotide chains of ribosomal RNA in B. subtilis. Carnegie Institution 1969-1970: 521-528.
- Avery, R.J. & Midgley, J.E.M., 1969 - A new approach to the analysis of hibridization of bacterial nucleic acids. Analysis of the ribosomal ribonucleic acids of B. subtilis. Biochem. J., 115: 383-394.
- Bishop, D.H.L., Claybrook, J.R. & Spiegelman, S., 1967 - Electrophoretic separation of viral nucleic acids on poly acrylamide gels. J. Mol. Biol., 26: 373-387.
- Bleyman, M. & Woese, C.R., 1969 - "Transcriptional mapping". I. Introduction to the method and the use of actinomycin D as a transcriptional mapping agent. Proc. Nat. Acad. Sci. US., 63: 532-539.
- Bleyman, M., Kondo, M., Hecht, N. & Woese, C.R., 1969 - Transcriptional mapping: functional organization of ribosomal and transfer ribonucleic acid cistrons in B. subtilis genome. J. Bacteriol., 99: 535-543.
- Boedtker, H. & Kelling, D.G., 1967 - The ordered structure of 5S RNA. Biochem. Biophys. Res. Commun., 29: 758-766.
- Bolle, A., Epstein, R.H. & Salser, W., 1968 - Transcription during bacteriophage T₄ development: synthesis and relative stability of early and late RNA. J. Mol. Biol., 31: 325-348.
- Brachet, J., 1942 - La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les oeufs d'amphibiens en voie de développement. Arch. Biol. (Paris), 53: 207-257.
- Bremer, H. & Yuan, D., 1968 a - Uridine transport and incorporation into nucleic acids in E. coli. Biochim. Biophys. Acta, 169: 21-34.
- Bremer, H. & Yuan, D., 1968 b - RNA chain growth rate in E. coli. J. Mol. Biol., 38: 163-180.
- Bremer, H. & Berry, L., 1971 - Co-transcription of 16S and 23S ribosomal RNA in E. coli. Nature New Biol., 234: 81-83.
- Bremer, H., Berry, L. & Dennis, P.P., 1973 - 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.
- Bremer, H., Hymes, J. & Dennis, P.P., 1974 - Ribosomal RNA chain growth rate and RNA labeling patterns in E. coli B/r. J. theor. Biol., 45: 379-403.
- Britten, R.J. & McCarthy, B.J., 1962 - The synthesis of ribosomes in E. coli. II. Analysis of the kinetics of tracer incorporation in growing cells. Biophys. J., 2: 49-55.
- Brownlee, G.G., Sanger, F. & Barrell, B.G., 1967 - Nucleotide sequence of 5S-ribosomal RNA from E. coli - Nature, 215: 735-736.
- Burdon, R.H., 1971 - Ribonucleic acid maturation in animal cells. Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol., 11: 33-79.

- Calvori, C., Frontali, L., Leoni, L. & Tecce, G., 1965 - Effect of rifamycin on protein synthesis. *Nature*, 207: 417-418.
- Cantor, C.R., 1968 - The extent of base pairing in 5S ribosomal RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*, 59: 478-483.
- Caspersson, T., 1941 - Studien über den Eiweißumsatz der Zelle. *Die Naturwissenschaften*, 29: 33-43.
- Chantrenne, H., 1947 - Hétérogénéité des granules cytoplasmiques du foie des souris. *Biochim. Biophys. Acta*, 1: 437-448.
- Chantrenne, H. & Devreux, S., 1959 - Dissociation of the synthesis of the nucleic acid from the synthesis of protein by a purin analog. *Exptl. Cell. Research, Suppl.*, 6: 152-160.
- Chao, F.C., 1957 - Dissociation of macromolecular ribonucleoprotein of yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, 70: 426-431.
- Chow, L.T. & Davidson, N., 1973 - Electron microscope mapping of the distribution of the rRNA genes of the *B. subtilis* chromosome. *J. Mol. Biol.*, 75: 265-279.
- Claude, A., 1941 - Particulate components of cytoplasm. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 9: 263-271.
- Claude, A., 1946 - Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation. I. Experimental procedures and results. *J. Exptl. Med.*, 84: 61-89.
- Colli, W. & Oishi, M., 1969 - 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.
- Colli, W. & Oishi, M., 1970 - 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.
- Colli, W., 1971 - Genes redundantes responsáveis pela síntese de RNA ribossômico em *B. subtilis*. Tese - Universidade de São Paulo.

- Colli, W., Smith, I. & Oishi, M., 1971 - Physical linkage between 5S, 16S and 23S ribosomal RNA genes in *B. subtilis*. *J. Mol. Biol.*, 56: 117-127.
- Craven, G.R., Voynow, P., Hardy, S.J.S. & Kurland, C.G., 1969 - The ribosomal proteins of *E. coli*. II. Chemical and physical characterization of the 30S ribosomal proteins. *Biochem.*, 8: 2906-2915.
- Crouch, R.J., 1974 - RNase III does not degrade DNA-RNA hybrids. *J. Biol. Chem.*, 249: 1314-1316.
- Cook, T.M., Brown, K.G., Boyle, J.V. & Goss, W.A., 1966 - Bactericidal action of nalidixic acid on *B. subtilis*. *J. Bacteriol.*, 92: 1510-1514.
- Coote, J.G., Wood, D.D. & Mandelstam, J., 1973 - 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.
- Cotter, R.I., McPhie, P. & Gratzner, W.B., 1967 - Internal organization of ribosome. *Nature*, 216: 864-868.
- Cutler, R.G. & Evans, J.E., 1967 - 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.
- Davies, B.D., Dulbecco, R. Ginsberg, H.S. & Wood, W.B., 1969 - Microbiology - Hoeber Medical Division - Harper & Row New York.
- Davies, J. & Nomura, M., 1972 - The genetics of bacterial ribosomes. *Annu. Rev. Genetics*, 6: 203-204.
- Dennis, P.P. & Bremer, H., 1973 - 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.
- Doi, R.H. & Igarashi, R.T., 1966 - Heterogeneity of the conserved ribosomal ribonucleic acid sequences of *B. subtilis*. *J. Bacteriol.*, 92: 88-96.

- Doolittle, W.F. & Pace, N.R., 1970 - Synthesis of 5S ribosomal RNA in E. coli after rifampicin treatment. *Nature*, **228**: 125-129.
- Doolittle, W.F. & Pace, N.R., 1971 - Transcriptional organization of the ribosomal RNA cistrons in E. coli. *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*, **68**: 1786-1790.
- Droppa, M., Udvardy, A. & Venetianer, P., 1974 - Physical evidence for the linkage of 16S and 23S rRNA cistrons in E. coli. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **8**: 133-134.
- Dubin, D.T. & Günlap, A., 1967 - Minor nucleotide composition of ribosomal precursor and ribosomal ribonucleic acid in E. coli. *Biochim. Biophys. Acta*, **134**: 106-123.
- Dubnau, D., Smith, I., Morell, P. & Marmur, J., 1965 a - Gene conservation in Bacillus species. I. Conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies. *Proc. Nat. Acad. Sci., US.*, **54**: 491-498.
- Dubnau, D., Smith, I. & Marmur, J., 1965 b - 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.
- DuBuy, B. & Wissman, S.M., 1971 - Nucleotide sequences of P. fluorescens 5S ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, **246**: 747-761.
- Dunn, J.J. & Studier, F.W., 1973 - T₇ early RNAs and E. coli ribosomal RNAs are cut from large precursor RNAs in vivo by ribonuclease III. *J. Mol. Biol.*, **70**: 3296-3300.
- Ehresmann, C., Stiegler, P., Fellner, P. & Ebel, J.P., 1972 - 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.
- Fahnestock, S., Erdmann, V. & Nomura, M., 1973 - Reconstitution of 50S ribosomal subunits from protein-free ribonucleic acid. *Biochem.*, **12**: 220-224.

- Fellner, P., Ehresmann, C. & Ebel, J.P., 1972 a - The determination of the primary structure of the 16S ribosomal RNA of E. coli. I. Nucleotide sequence analysis of T₁ and pancreatic ribonuclease digestion products. *Biochemie*, **54**: 853-900.
- Fellner, P., Ehresmann, C., Stiegler, P. & Ebel, J.P., 1972 b - Partial nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA from E. coli. *Nature New Biol.*, **239**: 1-5.
- Friedkin, M., 1963 - Enzymatic aspects of folic acid. *Annu. Rev. Biochem.*, **32**: 185-214.
- Geiduschek, E.P. & Sklar, J., 1969 - Continual requirement for a host RNA polymerase component in bacteriophage development. *Nature*, **221**: 833-836.
- Gerhart, J.C. & Pardee, A.B., 1963 - The effect of the feedback inhibition CTP, on subunit interaction in aspartate transcarbamylase. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **28**: 491-496.
- Gilham, P.T., 1970 - RNA sequence analysis. *Annu. Rev. Biochem.*, **39**: 227-250.
- Goldberg, M.L. & Steitz, J.A., 1974 - Cistron specificity of 30S ribosomes heterologously reconstituted with components from E. coli and B. stearothermophilus. *Biochem.*, **13**: 2123-2128.
- Goldstein, A., Kirschbaum, J.B. & Roman, A., 1965 - Direction of synthesis of messenger RNA in cells of E. coli. *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*, **54**: 1669-1675.
- Goldthwaite, C., Dubnau, D. & Smith, I., 1970 - Genetic mapping of the antibiotic resistance markers in B. subtilis. *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*, **65**: 96-103.
- Gordon, J., Boman, H.G. & Isaksson, L.A., 1964 - In vivo inhibition of RNA methylation in the presence of chloramphenicol. *J. Mol. Biol.*, **9**: 831-833.
- Goss, W.A., Deitz, W.H. & Cook, T.M., 1965 - Mechanism of action of nalidixic acid on E. coli. II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Bacteriol.*, **89**: 1068-1074.

- Gupta, R.S. & Singh, U.N., 1972 - Initiation of transcription and sequential synthesis of 16S and 23S ribosomal RNA in E. coli. Biochim. Biophys. Acta, 277: 567-575.
- Hackett, P.B. & Sauerbier, W., 1974 - Radiological mapping of the ribosomal RNA transcription unit in E. coli. Nature, 251: 639-641.
- Harford, N. & Sueoka, N., 1970 - Chromosomal location of the antibiotic resistance markers in B. subtilis. J. Mol. Biol., 51: 267-286.
- Hartmann, G., Honikel, K.O., Knüsel, F. & Nüesch, J., 1967 - The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. Biochim. Biophys. Acta, 145: 843-844.
- Haselkorn, R., Vogel, M. & Brown, R.D., 1969 - Conservation of the rifamycin sensitivity of transcription during T₄ development. Nature, 221: 836-838.
- Hayashi, Y., Osawa, S. & Miura, K., 1966 - The methyl groups of ribosomal RNA from E. coli. Biochim. Biophys. Acta, 129: 519-531.
- Hayward, W.S. & Green, M.H., 1970 - Properties of phage lambda DNA-RNA polymerase complexes isolated from E. coli. Biochim. Biophys. Acta, 209: 58-74.
- Hecht, N.B. & Woese, C.R., 1968 - Separation of bacterial ribosomal ribonucleic acid from its macromolecular precursors by polyacrylamide gel electrophoresis. J. Bacteriol., 95: 986-990.
- Helmstetter, C.E., 1967 - Rate of DNA synthesis during the division cycle of E. coli B/r. J. Mol. Biol., 24: 417-427.
- Hogeboom, G.H., Claude, A. & Hotchkiss, R.D., 1946 - The distribution of cytochrome oxidase and succinoxidase in the cytoplasm of the mammalian liver cell. J. Biol. Chem., 165: 615-629.
- Hogeboom, G.H., Schneider, W.C. & Palade, G.E., 1948 - 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.

- Kaempfer, R.O.R., Meselson, M. & Raskas, H.J., 1968 - Cyclic dissociation into stable subunits and re-formation of ribosomes during bacterial growth. J. Mol. Biol., 31: 277-289.
- Kates, J.R. & McAuslan, B.R., 1967 - Pox virus DNA-dependent RNA polymerase. Proc. Nat. Acad. Sci. US., 58: 134-141.
- Kennel, D., 1964 - Persistence of messenger RNA activity in B. megaterium treated with actinomycin D. J. Mol. Biol., 9: 789-800.
- Kennel, D., 1968 - Titration of the gene sites on DNA by DNA-RNA hybridization. J. Mol. Biol., 34: 85-103.
- Koschel, K., Hartmann, G., Kersten, W. & Kersten, H., 1966 - Die Wirkung des Chromomycins und einiger Anthracyclin-Antibiotica auf die DNS-abhängige Nucleinsäure-Synthese. Biochem. Z., 344: 76-86.
- Kossman, C.R., Stamato, T.D. & Pettijohn, D.E., 1971 - Tandem synthesis of the 16S and 23S ribosomal RNA sequences of E. coli. Nature New Biol., 234: 102-104.
- Kroes, H.H., Schepman, A.M. & Rörsch, A., 1963 - The synthesis of ribosomal RNA in ultraviolet-irradiated E. coli. Biochim. Biophys. Acta, 76: 201-208.
- Kurland, C.G., 1960 - Molecular characterization of ribonucleic acid from E. coli ribosomes. I. Isolation and molecular weights. J. Mol. Biol., 2: 83-91.
- Kurland, C.G., Voynow, P., Hardy, S.J.S., Randall, L. & Lutter, L., 1969 - Physical and functional heterogeneity of E. coli ribosomes. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 34: 17-24.
- Kurland, C.G., 1972 - Structure and function of the bacterial ribosome. Annu. Rev. Biochem., 41: 377-408.
- Lancini, G.C. & Sartori, G., 1968 - Rifamycins LXI - in vivo inhibition of RNA synthesis by rifamycins. Experientia, 24: 1105-1106.

- Lancini, G., Pallanza, R. & Silvestri, L.G., 1969 - Relationship between bactericidal effect and inhibition of ribonucleic acid nucleotidyl-transferase by rifampicin in E. coli K12. J. Bacteriol., 97: 761-768.
- Lavallé, R. & Haver, G., 1968 - Messenger RNA synthesis during amino-acid starvation in E. coli. J. Mol. Biol., 37: 269-288.
- Lazzarini, R.A. & Winslow, R.M., 1970 - The regulation of RNA synthesis during growth rate transitions and amino-acid deprivation in E. coli. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 35: 383-390.
- Leighton, T.J. & Doi, R.H., 1971 - The stability of messenger RNA during sporulation in B. subtilis. J. Biol. Chem., 246: 3189-3195.
- Leive, L., 1965 - RNA degradation and the assembly of ribosomes in AMD-treated E. coli. J. Mol. Biol., 13: 862-875.
- Levinthal, C., Keynan, A. & Higa, A., 1962 - Messenger ribonucleic acid turnover and protein synthesis in B. subtilis inhibited by actinomycin D. Proc. Nat. Acad. Sci. US., 48: 1631-1638.
- Lewis, J.B. & Doty, P., 1970 - Derivation of the secondary structure of 5S RNA from its binding of complementary oligonucleotides. Nature, 225: 510-512.
- Littlefield, J.W., Keller, E.B., Gross, J. & Zamecnik, P.C., 1955 - Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. J. Biol. Chem., 217: 111-124.
- Littlefield, J.W. & Keller, E.B., 1957 - Incorporation of C^{14} -amino-acids into ribonucleoprotein particles from the Ehrlich mouse ascites tumor. J. Biol. Chem., 224: 13-30.
- Loening, U., 1967 - The fractionation of high molecular weight ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. Biochem. J., 102: 251-257.
- Loening, U.E., 1968 - Molecular weights of ribosomal RNA in relation to evolution. J. Mol. Biol., 38: 355-365.

- Luria, S.E., Delbrück, M. & Anderson, T.F., 1943 - Electron microscope studies of bacterial viruses. J. Bacteriol., 46: 57-78.
- Maggi, N., Pasqualucci, C.R., Ballota, R. & Sensi, P., 1966 - Rifampicin, a new orally active rifamycin. Chemotherapy, 11: 285-292.
- Mandell, J.D. & Hershey, A.D., 1960 - A fractionating column for analysis of nucleic acids. Analyt. Biochem., 1: 66-77.
- Mangiarotti, G. & Schlessinger, D., 1967 - Polyribosome metabolism in E. coli. II. Formation and lifetime of mRNA molecules, ribosomal subunits couples and polyribosomes. J. Mol. Biol., 29: 395-418.
- Mangiarotti, G., Apirion, D., Schlessinger, D. & Silengo, L., 1968 - Biosynthetic precursors of 30S and 50S ribosomal particles in E. coli. Biochem., 7: 456-472.
- Manor, H., Goodman, D. & Stent, G., 1969 - RNA chain growth rates in E. coli. J. Mol. Biol., 39: 1-29.
- Marmur, J., 1961 - A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol., 3: 208-218.
- Maruta, H., Tsuchiya, T. & Mizuno, D., 1971 - In vitro re-assembly of functionally active 50S ribosomal particles from ribosomal proteins and RNA of E. coli. J. Mol. Biol., 61: 123-134.
- Midgley, J.E.M. & McCarthy, B.J., 1962 - The synthesis and kinetic behavior of deoxyribonucleic acid-like ribonucleic acid in bacteria. Biochim. Biophys. Acta, 61: 697-717.
- Midgley, J.E.M., 1962 - The nucleotide base composition of ribonucleic acid from several microbial species. Biochim. Biophys. Acta, 61: 513-525.
- Miller, O.L., Beatty, B.R. Jr., Hamkalo, B.A. & Thomas, C.A., 1970 - Electron microscope visualization of transcription. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 35: 505-512.

- Miura, K., 1962 - The nucleotide composition of ribonucleic acids of soluble and particle fractions in several species of bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 55: 62-70.
- Möller, W., Amons, R., Groene, J.C.L., Garrett, R.A. & Terhorst, C.P., 1969 - Protein-ribonucleic acid interactions in ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 190: 381-390.
- Moss, B., Rosenblum, E.N., Katz, E. & Grimley, P.M., 1969 - Rifampicin: a specific inhibitor of vaccinia virus assembly. *Nature*, 224: 1280-1284.
- Moss, B. & Rosenblum, E.N., 1973 - Protein cleavage and Pox virus morphogenesis: tryptic peptide analysis of core precursors accumulated by blocking assembly by rifampicin. *J. Mol. Biol.*, 81: 267-269.
- Mosteller, R.D. & Yanofsky, C., 1970 - Transcription of the tryptophan operon in *E. coli*: rifampicin as an inhibitor of initiation. *J. Mol. Biol.*, 48: 525-531.
- Nandi, U.S., Wang, J.C. & Davidson, N., 1965 - Separation of deoxyribonucleic acids by Hg(II) binding and Cs_2SO_4 density gradient centrifugation. *Biochem.*, 4: 1687-1689.
- Nierlich, D.P. & Vielmetter, W., 1968 - Kinetic studies on the relationship of ribonucleotide precursor pools and ribonucleic acid synthesis. *J. Mol. Biol.*, 32: 135-147.
- Nikolaev, N., Silengo, S. & Schlessinger, D., 1973 - Synthesis of a large precursor to ribosomal RNA in a mutant of *E. coli*. *J. Mol. Biol.*, 70: 3361-3365.
- Nikolaev, N., Schlessinger, D. & Wellauer, P.K., 1974 - 30S-pre-ribosomal RNA of *E. coli* and products of cleavage by ribonuclease III: Length and molecular weight. *J. Mol. Biol.*, 86: 741-747.
- Nomura, M., Traub, P. & Bechmann, H., 1968 - Hybrid 30S ribosomal particles reconstituted from components of different bacterial origins. *Nature*, 219: 793-799.
- Nomura, M., 1970 - Bacterial ribosome. *Bacteriol. Rev.*, 34: 228-277.

- Nomura, M. & Erdmann, V.A., 1970 - Reconstitution of 50S ribosomal subunits from dissociated molecular components. *Nature*, 228: 744-748.
- Nygaard, A.P. & Hall, B.D., 1963 - A method for the detection of RNA-DNA complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 12: 98-104.
- Oishi, M. & Sueoka, N., 1965 - Location of genetic loci of ribosomal RNA on *B. subtilis* chromosome. *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*, 54: 483-491.
- Osawa, S., 1960 - 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.
- Osawa, S., 1968 - Ribosome formation and structure. *Annu. Rev. Biochem.*, 37: 109-130.
- Otaka, E., Osawa, S. & Sibatani, A., 1964 - Stimulation of C^{14} -leucin incorporation into protein *in vitro* by ribosomal RNA of *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15: 586-574.
- Pace, B. & Pace, N.R., 1971 - Gene dosage for 5S ribosomal ribonucleic acid in *E. coli* and *B. megaterium*. *J. Bacteriol.*, 105: 142-149.
- Pace, N.R., 1973 - Structure and synthesis of the ribosomal ribonucleic acid of prokaryotes. *Bacteriol. Rev.*, 37: 562-603.
- Palade, G.E. & Siekevitz, P., 1956 - Liver microsomes - an integrated morphological and biological study. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2: 171-200.
- Pardee, A.B. & Prestidge, L.S., 1961 - The initial kinetic of enzyme induction. *Biochim. Biophys. Acta*, 49: 77-88.
- Pato, M.L. & von Meyenburg, K., 1970 - Residual RNA synthesis in *E. coli* after inhibition of initiation of transcription by rifampicin. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 35: 497-504.

- Perry, R.P. & Kelley, D.E., 1968 -Resistent synthesis of 5S RNA when production of 28S and 18S ribosomal RNA is inhibited by low dosis of actinomycin D. J. Cell. Physiol., 72: 235-246.
- Pettijohn, D.E., 1969 - Transcription of an RNA polymerase-DNA complex from E. coli. Evidence for in vitro synthesis of rRNA. Biochem. Biophys. Res. Commun., 34: 541-547.
- Pettijohn, D.E., Stonington, O.G. & Kossman, C.R., 1970 - Chain termination of ribosomal RNA synthesis in vitro. Nature, 228: 235-239.
- Ramareddy, G. & Reiter, H., 1969 - Specific loss of newly replicated deoxyribonucleic acid in nalidixic acid-treated B. subtilis 168W. J. Bacteriol., 100: 724-729.
- Reich, E., Goldberg, I.H. & Rabinowitz, M., 1962 - Structure-activity correlations of actinomycins and their derivatives. Nature, 196: 743-748.
- Reid, P. & Speyer, J., 1970 - Rifampicin inhibition of ribonucleic acid and protein synthesis in normal and EDTA-treated E. coli. J. Bacteriol., 104: 376-389.
- Renold-O'Donnel, E. & Zillig, W., 1969 - Purification and properties of DNA-dependent RNA polymerase of B. stearothermophilus. Eur. J. Biochem., 7: 318-323.
- Roberts, R.B., 1958 - Microsomal particles and protein synthesis. Pergamon Press, N. York.
- Roberts, J.W., 1969 - Termination factor for RNA synthesis. Nature, 224: 1168-1174.
- Robertson, H.D., Webster, R.D. & Zinder, N.D., 1968 - Purification and properties of ribonuclease III from E. coli. J. Biol. Chem., 243: 82-91.
- Rogerson, A.C. & Ezekiel, D.H., 1974 - Decay of RNA synthesis in amino-acid-starved E. coli after rifampicin treatment. J. Bacteriol., 117: 987-993.

- Roodyn, D.B. & Mandel, H.G., 1960 - A simple membrane fractionation method for determining the distribution of radioactivity in chemical fractions of B. cereus. Biochim. Biophys. Acta, 41: 80-88.
- Rose, J.K., Mosteller, R.D. & Yanofsky, C., 1970 - Tryptophan mRNA elongation rates and steady-state levels of tryptophan operon enzymes under various growth conditions. J. Mol. Biol., 51: 541-550.
- Rosenthal, D. & Reid, P., 1973 - Rifampicin resistant DNA synthesis in phage T₄ infected E. coli. Biochem. Biophys. Res. Commun., 55: 993-1000.
- Rosset, R. & Monier, R., 1963 - A propos de la présence d'acide ribonucléique de faible poids moléculaire dans les ribosomes d'E. coli. Biochim. Biophys. Acta, 68: 653-656.
- Rudner, R., Karkas, J. & Chargaff, E., 1968 - Separation of B. subtilis DNA into complementary strands. I. Biological properties. Proc. Nat. Acad. Sci. US., 60: 630-635.
- Saito, H. & Miura, K., 1963 - Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. Biochim. Biophys. Acta, 72: 619-629.
- Salser, W., Tanin, J. & Levinthal, C., 1968 - Measurements of the unstable RNA in exponentially growing cultures of B. subtilis and E. coli. J. Mol. Biol., 31: 237-266.
- Sanger, F. & Brownlee, G.G., 1967 - Two-dimensional fractionation method for radioactive nucleotides, p. 361-381, in Methods in Enzymology vol. 12 (A) Acad. Press Inc. N.York.
- Sarkar, N. & Comb, D.G., 1969 - A study on the attachment and release of 5S ribosomal RNA from the large ribosomal subunit. J. Mol. Biol., 39: 31-44.
- Schachman, H.K., Pardee, A.B. & Stanier, R.Y., 1946 - Studies on the macromolecular organization of microbial cells. Arch. Biochem. Biophys., 38: 245-260.
- Schleif, R., 1969 - Isolation and characterization of a streptolydigin resistant RNA polymerase. Nature, 223: 1068-1069.

- Schlessinger, D. & Apirion, D., 1969 - E. coli ribosomes: recent developments. Annu. Rev. Microbiol., 23: 387-426.
- Schwartz, T., Craig, E. & Kennell, D., 1970 - Inactivation and degradation of mRNA from lactose operon of E. coli. J. Mol. Biol., 54: 299-311.
- Sederoff, R., Bolle, A. & Epstein, R.H., 1971 - A method for the detection of specific T₄ mRNA by hybridization competition. Virology, 45: 440-455.
- Shine, J. & Dalgarno, L., 1974 - The 3'-terminal sequence of E. coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc. Nat. Acad. Sci. US., 71: 1342-1346.
- Sibatani, A. & Mizuno, N., 1963 - Synthesis of RNAs in E. coli irradiated with ultraviolet light. Biochim. Biophys. Acta, 76: 188-200.
- Sippel, A. & Hartmann, G., 1968 - Mode of action of rifamycin on the RNA polymerase reaction. Biochim. Biophys. Acta, 157: 218-219.
- Smith, I., Dubnau, D., Morell, P. & Marmur, J., 1968 - 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.
- Smith, I., Goldthwaite, C. & Dubnau, D., 1969 - The genetic of ribosomes in B. subtilis. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 34: 85-89.
- Smith, I., Colli, W. & Oishi, M., 1971 - Studies on physical linkage of antibiotic resistance markers to ribosomal RNA genes. J. Mol. Biol., 62: 111-119.
- Snyder, A.L., Kann, H.E. & Kohn, K.W., 1971 - Inhibition of the processing of ribosomal precursor RNA by intercalating agent. J. Mol. Biol., 58: 555-565.
- Sogin, M.L., Pechman, K.J., Zablen, L., Lewis, B.J. & Woese, C.R., 1972 - Observation on the post-transcriptionally modified nucleotides in the 16S ribosomal ribonucleic acid. J. Bacteriol., 112: 13-16.

- Spahr, P.E. & Tissières, A., 1959 - Nucleotide composition of ribonucleoprotein particles from E. coli. J. Mol. Biol., 1: 237-239.
- Spahr, P.E., 1962 - Amino acid composition of ribosomes from E. coli. J. Mol. Biol., 4: 395-406.
- Stamato, T.D. & Pettijohn, D.E., 1971 - Regulation of ribosomal RNA synthesis in stringent bacteria. Nature New Biol., 234: 99-102.
- Stanley, W.M. Jr. & Bock, R.M., 1965 - Isolation and physical properties of the ribosomal ribonucleic acid of E. coli. Biochem., 4: 1302-1311.
- Strand, B.C. & Sypherd, P.S., 1969 - Unique protein moieties for 30S and 50S ribosomes of E. coli. J. Bacteriol., 98: 1080-1086.
- Stubbs, J.D. & Hall, B.D., 1968 - Level of tryptophan messenger RNA in E. coli. J. Mol. Biol., 37: 289-302.
- Stuy, J.H., 1958 - The nucleic acids of B. cereus. J. Bacteriol., 76: 179-184.
- Subramanian, A.B., Ron, E.Z. & Davis, B.D., 1968 - A factor required for ribosome dissociation in E. coli. Proc. Nat. Acad. Sci. US., 61: 761-767.
- Sueoka, N., 1961 - Variation and heterogeneity of base composition of deoxyribonucleic acids: a compilation of old and new data. J. Mol. Biol., 3: 31-40.
- Takahashi, H., Saito, H. & Ikeda, Y., 1967 - Species specificity of the ribosomal RNA cistrons in bacteria. Biochim. Biophys. Acta, 134: 124-133.
- Timbal, M.T., 1960 - Rifomycin, II. Antibacterial activity of rifomycin B. Antib. Annu. 1959-1960: 271-276.
- Tissières, A. & Watson, J.D., 1958 - Ribonucleoprotein particles from E. coli. Nature, 182: 778-780.
- Tissières, A., Watson, J.D., Schlessinger, D. & Hollingworth, B.R., 1959 - Ribonucleoprotein particles from E. coli. J. Mol. Biol., 1: 221-233.

- Toivonen, J.E. & Niehrlich, D.P., 1974 - Biological decay of 5'-triphosphate termini of the RNA of E. coli. Nature, 252: 74-76.
- Traub, P. & Nomura, M., 1968 a - Structure and function of E. coli ribosomes. Partial fractionation of the functionally active proteins and reconstitution of artificial subribosomal particles. J. Mol. Biol., 34: 575-593.
- Traub, P. & Nomura, M., 1968 b - Structure and function of E. coli ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. US., 59: 777-784.
- Traut, R.R., Delmis, H., Ahmad-Zahed, C., Bickle, T.A., Pearson, P. & Tissières, A., 1969 - Ribosomal proteins of E. coli: stoichiometry and implications for ribosome structure. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 34: 25-38.
- Umezawa, H., Mizuno, S., Yamazaki, H. & Nitta, K., 1968 - Inhibition of DNA-dependent RNA synthesis by rifamycins. J. Antibiot., 21: 234-236.
- Van Dijk-Salkinoja, M.S. & Planta, R.J., 1970 - Formation and life cycle of ribosomal subunits, mono- and polyribosomes in B. licheniformis. Arch. Biochem. Biophys., 141: 477-488.
- Viñuela, E., Algranati, I.D. & Ochoa, S., 1967 - Synthesis of virus-specific proteins in E. coli infected with the RNA bacteriophage MS2. Eur. J. Biochem., 1: 3-11.
- Waller, J.P. & Harris, J.I., 1961 - Studies on the composition of the protein from the E. coli ribosomes. Proc. Nat. Acad. Sci. US., 47: 18-23.
- Weed, L.L. & Wilson, D.W., 1951 - The incorporation of C¹⁴-orotic acid into nucleic acid pyrimidines in vitro. J. Biol. Chem., 189: 435-442.
- Wehrly, W., Nuesch, J., Knusel, F. & Staehelin, M., 1968 a - Action of rifamycins on RNA polymerase. Biochim. Biophys. Acta, 157: 215-217.

- Wehrly, W., Knusel, F. & Staehelin, M., 1968 b - Action of rifamycin on RNA polymerase from sensitive and resistant bacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 32: 284-288.
- Wehrly, W., Knusel, F., Schmid, K. & Staehelin, M., 1968 c - Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. Proc. Nat. Acad. Sci. US., 61: 667-673.
- Wehrly, W. & Staehelin, M., 1971 - Action of rifamycins. Bacteriol. Rev., 35: 290-309.
- White, R.J., Lancini, G.C. & Silvestri, L.G., 1971 - Mechanism of action of rifampicin on Mycobacterium smegmatis. J. Bacteriol., 108: 737-741.
- Winslow, R.M. & Lazzarini, R.A., 1969 - Amino acid regulation of the rates of synthesis and chain elongation of ribonucleic acid in E. coli. J. Biol. Chem., 244: 3387-3392.
- Yankofsky, S.A. & Spiegelman, S., 1962 a - The identification of the ribosomal RNA cistron by sequence complementarity. I. Specificity of complex formation. Proc. Nat. Acad. Sci. US., 48: 1069-1072.
- Yankofsky, S.A. & Spiegelman, S., 1962 b - The identification of the ribosomal RNA cistron by sequence complementarity. II. Saturation of and competitive interaction at the RNA cistron. Proc. Nat. Acad. Sci. US., 48: 1466-1472.
- Yankofsky, S.A. & Spiegelman, S., 1963 - Distinct cistrons for the two ribosomal RNA components. Proc. Nat. Acad. Sci. US., 49: 538-544.
- Yu, M.T., Vermeulen, C.W. & Atwood, K.C., 1970 - Location of the genes for 16S and 23S ribosomal RNA in the genetic map of E. coli. Proc. Nat. Acad. Sci. US., 67: 26-31.
- Zehavi-Willner, T. & Comb, D.G., 1966 - Studies on the relationship between transfer RNA and transfer-like RNA. J. Mol. Biol., 16: 250-254.
- Zillig, W., Zechel, K., Rabussay, D., Schachner, M., Sethi, V.S., Palm, P., Heil, A. & Seifert, W., 1970 - 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.

Zimmermann, R.A. & Levinthal, C., 1967 - Messenger RNA and RNA transcription time. J. Mol. Biol., 30: 349-370.

6. APÊNDICE*

Na análise do mecanismo de transcrição dos genes para RNA ribossômico 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 (o mesmo acontecendo consequentemente, para seus produtos de transcrição).
- c) As RNA polimerases localizadas ao longo dos genes estão igualmente espaçadas (concluindo-se que sobre os genes para 23S existe o dobro das polimerases que existem sobre os genes para 16S).
- d) A velocidade de alongamento das cadeias de rRNA 16S e 23S é a mesma.

A partir dessas premissas pode-se considerar que a quantidade de produto formado é função do número de RNA polimerases que existem ao longo dos genes.

Dessa forma pode-se adotar um modelo de distribuição contínua e constante das enzimas ao longo de um segmento representativo do gene a fim de analisar os possíveis mecanismos de transcrição dos genes para rRNA. Esse estudo se baseará nos modelos de transcrição esquematizados no Quadro I (ver Introdução).

* Agradeço ao Dr. W. Rolim de Moraes Filho do Instituto de Matemática e Estatística da U.S.P. (Setor de Matemática Aplicada e Computação) bem como ao chefe desse setor, Dr. W. Setzer pela extrema atenção que dedicaram à análise matemática desse problema.

6.1. INCORPORAÇÃO DE UM PRECURSOR RADIATIVO DE RNA ADICIONADO NO TEMPO ZERO

5.1.1. Em Ausência de Rifampicina

Num processo contínuo de transcrição, sem adição do antibiótico, já que a velocidade de migração das enzimas sobre os genes é constante, e o tamanho da molécula de RNA produzida é igual ao comprimento do gene correspondente, a síntese por unidade de tempo u (u é definido como o tempo de transcrição do gene para 16S) é dada, tanto nos modelos de transcrição independente como nos de cotranscrição, pelas equações:

$$\text{Prod (16)} = k \int_0^u \text{adt} = \text{kau}, \text{ para o gene 16S}$$

$$\text{Prod (23)} = k \int_0^u 2 \text{adt} = 2 \text{kau}, \text{ para o gene 23S}$$

sendo: Prod = radiatividade incorporada; a = comprimento do gene 16S; 2a = comprimento do gene 23S; k = constante que depende da radiatividade específica dos precursores de RNA e da velocidade de utilização desses precursores.

Na figura 18 mostra-se a representação geométrica para cada mecanismo; tem-se, portanto, a relação

$$\frac{\text{Prod (23)}}{\text{Prod (16)}} = \frac{2}{1} = 2$$

COTRASCrito (B-1)

COTRASCrito (B-2)

FIGURA 18 - Representação gráfica da incorporação de radiatividade em rRNA 16S e 23S, em ausência de rifampicina, em diferentes modelos de transcrição para um tempo u de transcrição. u = tempo de transcrição do gene para rRNA 16S; $2u$ = tempo de transcrição do gene para rRNA 23S; a = comprimento do gene para 16S; $2a$ = comprimento do gene para 23S; área dos polígonos = radiatividade total incorporada.

6.1.2. Em Presença de Rifampicina

Quando se adiciona concomitantemente ao precursor radiativo a rifampicina, antibiótico que inibe a reiniciação da transcrição, ocorrerá a terminação de todas as cadeias de rRNA que estavam sendo alongadas (supondo-se que o tempo de latência da ação do antibiótico é zero).

Analisando-se graficamente (figura 19) a distribuição das RNA polimerases ao longo de um gene (x) e das cadeias de RNA em alongamento no momento de adição da droga, verificar-se-á que, em média, as moléculas de RNA estão semicompletas.

A quantidade de RNA sintetizado após a adição de rifampicina corresponde à quantidade que seria sintetizada em ausência de rifampicina, durante um intervalo de tempo igual à metade do tempo de transcrição (t_x) do gene x.

Como pode ser verificado a partir da figura 19 as porções das cadeias de RNA, que incorporam radiatividade podem ser representadas graficamente como um triângulo. Não se deve esquecer, entretanto, que a representação gráfica é estática. Na verdade a distribuição real das polimerases obedece a um processo contínuo, de tal modo que a radiatividade total incorporada será dada pela área do triângulo.

Para cada espécie de rRNA (16S e 23S), dentro de cada modelo de transcrição, pode ser esquematizada a incorporação de radiatividade quando o precursor marcado e a rifampicina são adicionados ao mesmo tempo (figura 20).

FIGURA 19 - Incorporação de radiatividade em cadeias de RNA em presença de rifampicina. ■ = rifampicina; O = RNA polimerase; — = gene x; — = segmento de RNA não radiativo; — = segmento de RNA radiativo; t = tempo de marcação em presença de rifampicina; t_x = tempo de transcrição do gene x.

INDEPENDENTE (A)

COTRASCITO (B₁)

COTRASCITO (B₂)

FIGURA 20 - Incorporação de radiatividade em rRNA 23S e 16S, quando rifampicina e precursor radiativo são adicionados comitantemente. u = tempo de transcrição do gene para rRNA 16S; $2u$ = tempo de transcrição do gene para rRNA 23S; a = comprimento do gene para 16S; $2a$ = comprimento do gene para 23S; ■ = rifampicina. Áreas hachuradas representam a radiatividade total incorporada em cada espécie de rRNA.

A síntese de rRNA durante a terminação das cadeias (até o final da reação da transcrição) será dada pelas seguintes equações:

No modelo de transcrição independente (A) e de cotranscrição (B-1):

$$\text{Prod (16)} = k \int_0^u \frac{a}{u} t dt = k \frac{a}{u} \frac{u^2}{2} = \frac{kau}{2}$$

No modelo de transcrição independente (A) e de cotranscrição (B-2):

$$\text{Prod (23)} = k \int_0^{2u} \frac{a}{u} t dt = k \frac{a}{u} \frac{4u^2}{2} = 2 kau$$

Portanto, para o modelo independente (A) a relação

$$\frac{\text{Prod (23)}}{\text{Prod (16)}} = \frac{4}{1} = 4$$

No modelo de cotranscrição (B-1) (figura 20) tem-se que o gene para rRNA 23S é precedido pelo gene para rRNA 16S, dentro da mesma unidade transcripcional, portanto o gene para 23S será transcrito não apenas pelas RNA polimerases localizadas sobre ele no momento da adição da droga (área representada pelo triângulo) como ainda pelas enzimas que estavam sobre o gene 16S (área representada pelo retângulo).

A produção de rRNA 23S será, portanto, representada por:

$$\begin{aligned} \text{Prod (23)} &= k \int_0^u 2 \, adt + k \int_0^{2u} \frac{a}{u} \, tdt = \\ &= 2 \, kau + k \frac{a}{u} \frac{4u^2}{2} = 4 \, kau \end{aligned}$$

donde resulta para o modelo cotranscrito (B-1) a relação

$$\frac{\text{Prod (23)}}{\text{Prod (16)}} = \frac{8}{1} = 8$$

Por raciocínio análogo no modelo cotranscrito

(B-2) ter-se-á

$$\text{Prod (16)} = k \int_0^u \frac{a}{u} \, tdt + k \int_0^{2u} adt = \frac{kau}{2} + 2 \, kau = \frac{5 \, kau}{2}$$

e a relação $\frac{\text{Prod (23)}}{\text{Prod (16)}} = \frac{4}{5} = 0,8$

Na tabela XI mostram-se os valores das relações teóricas iniciais de radiatividade incorporada e de atividade específica dos rRNAs 23S e 16S, quando rifampicina e precursor radiativo são adicionados concomitantemente.

TABELA XI

Relações teóricas de incorporação e atividade específica^a dos rRNAs 23S e 16S

Relação	Modelo ^b		
	Independente	Cotranscrito	
23S/16S	A	B-1	B-2
Radiatividade	4	8	0,8
Atividade específica	2	4	0,4

a) Obtida dividindo-se a razão de radiatividade pela razão de $\frac{A_{260nm} \, 23S}{A_{260nm} \, 16S} = 2$

b) Segundo o Quadro I.

6.2. CINÉTICA DE INCORPORAÇÃO DE RADIATIVIDADE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO À RIFAMPICINA

Partindo da hipótese de uma ação instantânea da rifampicina inibindo a reciclagem das polimerases sobre todos os genes (tempo de latência = zero segundos), se o antibiótico for adicionado em tempos diferentes antes do precursor radiativo, este será incorporado apenas nas cadeias de rRNA que ainda estão sendo alongadas no momento da adição do precursor. A radiatividade incorporada em rRNA medirá a síntese que se processou entre o momento da adição do precursor e a interrupção total da reação de transcrição. Supõe-se o antibiótico sendo introduzido no

tempo t antes da uridina radiativa. A síntese residual pode ser calculada pelas equações abaixo.

Para o rRNA 16S no modelo independente (A) e cotranscrito (B-1) ter-se-á:

$$\text{Prod (16)} = k \int_0^{u-t} \frac{a}{u} v dv = k \frac{a}{u} \frac{(u-t)^2}{2}$$

Para o rRNA 23S no modelo independente (A)

$$\text{Prod (23)} = k \int_0^{2u-t} \frac{a}{u} v dv = k \frac{a}{u} \frac{(2u-t)^2}{2}$$

No modelo de cotranscrição (B-1), já que o gene para rRNA 23S é transcrito pelas RNA polimerases dispostas sobre ele e pelas enzimas que estão localizadas sobre o gene para rRNA 16S, duas situações devem ser analisadas: se $t < u$ o gene para rRNA 23S será transcrito também por algumas polimerases que estavam sobre o gene para 16S; se $t > u$ apenas pelas polimerases que ainda estão sobre o gene para 23S, no momento da adição do precursor radiativo.

$$\begin{aligned} \text{Se } t \leq u \quad \text{Prod (23)} &= k \int_0^{u-t} 2 \frac{a}{u} v dv + k \int_0^{2u} \frac{a}{u} v dv = \\ &= 2 k a (u-t) + k \frac{a}{u} \frac{4u^2}{2} = 2 k a (u-t) + 2 k a u \end{aligned}$$

$$\text{Se } t \geq u \quad \text{Prod (23)} = k \int_0^{3u-t} \frac{a}{u} v dv = k \frac{a}{u} \frac{(3u-t)^2}{2}$$

Na figura 21 mostra-se a representação geométrica para o modelo independente e para o cotranscrito B-1. Como é improvável que o modelo de cotranscrição B-2 ocorra, tendo em vista os resultados experimentais, não será analisado a partir deste ponto.

Essas expressões forneceram as curvas de cinética de decaimento de radiatividade incorporada em função do tempo de exposição prévia à rifampicina, apresentadas na figura 22 para o modelo de transcrição independente (A) e cotranscrição B-1 (para tempo de latência da ação do antibiótico = zero). Para ambos os modelos a curva de rRNA 16S é a mesma, representada por uma parábola. Para o rRNA 23S, no modelo independente, a representação também é uma parábola. Os pontos em que as parábolas tocam a abscissa correspondem ao tempo de terminação da transcrição dos genes para rRNA 16S ($t=u$) e 23S ($t=2u$). No modelo cotranscrito B-1 a curva para o rRNA 23S apresentará uma porção de reta que corresponde às cadeias alongadas pelas RNA polimerases que estão sobre o gene para rRNA 16S. A intersecção do prolongamento dessa reta com a abscissa (figura 22) define o ponto de terminação da transcrição do rRNA 23S ($t=2u$), o que pode ser previsto a partir da equação que determina a porção de reta da curva de cinética de decaimento da síntese de 23S. A curva passará a ser uma parábola no momento em que o gene para 16S

INDEPENDENTE (A)

COTRANSCRITO (B₁)

FIGURA 21 - Incorporação de radiatividade em rRNA 23S e 16S em função do tempo de exposição prévia à rifampicina (t). Os símbolos são os mesmos da figura 20.

terminar de ser transcrito. O ponto da abscissa atingido pela parábola corresponde a $t = 3u$, tempo de transcrição da unidade transcripcional.

6.3. EFEITO DO TEMPO DE LATÊNCIA DA RIFAMPICINA SOBRE AS RAZÕES INICIAIS E SOBRE A CINÉTICA DE INCORPORAÇÃO

Admitindo um tempo de latência r na ação do antibiótico, e supondo que esse tempo seja fixo e constante, ter-se-á, durante essa latência, uma síntese constante de moléculas de RNA como se o antibiótico estivesse ausente. A síntese durante a latência r , será, portanto:

$$\text{Prod (16)} = k \int_0^r \text{adv} = kar$$

$$\text{Prod (23)} = k \int_0^r 2 \text{adv} = 2 kar$$

Se o precursor radiativo for adicionado após um tempo t e: Se $t \geq r$: A síntese de rRNA que ocorre até a terminação da transcrição será igual à síntese que ocorreria com um tempo de latência igual a zero, após o instante $(t-r)$. Isto porque o antibiótico começa a agir no instante r , e a uridina é colocada no tempo t ; portanto o tempo de real exposição à rifampicina será dado por $t-r$.

FIGURA 22 - Curvas teóricas de cinética de decaimento de ra diatividade incorporada em rRNA 23S e 16S em função do tem po de exposição prévio à rifampicina (t), nos modelos de transcrição independente e cotranscrição (B-1). u = tempo de transcrição do gene para rRNA 16S; $2u$ = tempo de transcrição do gene para rRNA 23S; $3u$ = tempo de transcrição da unidade transcricional; a = comprimento do gene para 16S; $2a$ = comprimento do gene para 23S; r = tempo de latência de rifampicina. No gráfico inserido na figura mostra-se a variação da razão teórica de radiatividade incorporada 16S em função do tempo de latência de rifampicina r (em segundos). A família de curvas na porção superior do gráfico refere-se ao modelo cotranscrito B-1; a família de curvas na porção inferior do gráfico refere-se ao modelo de transcrição independente. Em cada família as curvas foram calculadas para tempos de transcrição (gene 16S) de 60; 50; 40; 30 e 20 segundos, de cima para baixo, respectivamente.

Se $t < r$: A síntese de rRNA será igual à soma total da síntese em presença do antibiótico (com um tempo de latência igual a zero) mais a síntese durante o tempo $(r-t)$, pois a transcrição durante a parcela t do tempo de latência não originará moléculas de rRNA radiativas.

Esse raciocínio pode ser formalizado pelas seguintes equações:

Modelo independente (A) e cotranscrito (B-1), para rRNA 16S

$$\text{Se } t \geq r: \text{Prod (16)} = k \frac{a}{u} \frac{(u-t+r)^2}{2}$$

$$\text{Se } t < r: \text{Prod (16)} = \frac{kau}{2} + ka(r-t)$$

Modelo independente A, para rRNA 23S:

$$\text{Se } t \geq r: \text{Prod (23)} = k \frac{a}{u} \frac{(2u-t+r)^2}{2}$$

$$\text{Se } t < r: \text{Prod (23)} = 2kau + 2ka(r-t)$$

No modelo cotranscrito B-1, para rRNA 23S:

$$\text{Se } t < r: \text{Prod (23)} = 4kau + 2ka(r-t)$$

$$\text{Se } r \leq t \leq u+r: \text{Prod (23)} = 2kau + 2ka(u-t+r) =$$

$$= 4kau + 2ka(r-t)$$

$$\text{Se } t > u+r: \text{Prod (23)} = k \frac{a}{u} \frac{(3u-t+r)^2}{2}$$

As relações iniciais quando rifampicina e precursor radiativo são adicionados coincidentemente decrescem

em função do tempo de latência do antibiótico.

Modelo independente:

$$\frac{\text{Prod (23)}}{\text{Prod (16)}} = \frac{2ka(u+r)}{ka(\frac{u}{2}+r)} = 4 \frac{(u+r)}{u+2r}$$

Modelo cotranscrito B-1

$$\frac{\text{Prod (23)}}{\text{Prod (16)}} = \frac{2ka(2u+r)}{ka(\frac{u}{2}+r)} = 4 \frac{(2u+r)}{u+2r}$$

A cinética de incorporação de radiatividade também é modificada em função da latência de rifampicina (figura 22). Nota-se que as curvas tocam a abscissa em tempos $u+r$; $2u+r$ ou $3u+r$.

No gráfico inserido na figura 22 foram calculadas as razões de radiatividade iniciais em função do tempo de latência de rifampicina (r), para diferentes tempos de transcrição de rRNA 16S (u).