

RESUMENES DE LAS COMUNICACIONES Y SIMPOSIOS DE LA
IV REUNION ANUAL DE LA
SOCIEDAD DE BIOQUIMICA
DE CHILE

realizada en conjunto con la

XVI REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD
ARGENTINA DE INVESTIGACION BIOQUIMICA

IX REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD
ARGENTINA DE BIOFISICA

17 al 20 de octubre de 1980
Mendoza, Argentina

Abstracts of Communications and Symposia of the

IV ANNUAL MEETING
SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE

held in a joint meeting with

XVI Annual Meeting of the Sociedad Argentina
de Investigación Bioquímica

IX Annual Meeting of the Sociedad Argentina
de Biofísica

October 17-20, 1980
Mendoza, Argentina

SIMPOSIO: *Mucopolisacáridos y Glicoproteínas*

CHANGES OF ACIDIC MUCOPOLYSACCHARIDES AND MUCOPOLYSACCHARIDES DURING HISTOGENESIS AND FETAL DEVELOPMENT: POSSIBLE INVOLVEMENT OF CHONDROITIN SULFATE C AND HYALURONIDASE WITH THE PROCESSES OF DIFFERENTIATION AND CELL DIVISION.

Dietrich, .CP. and Sampaio, L.O.

Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, Sao Paulo, Brasil.

We have shown previously that the sulfated mucopolysaccharides (SMPS) in tissue-organized animal life forms and in several mammalian cultures have a characteristic composition differing from each other in regard to the relative and absolute amounts, type, and molecular size of chondroitin sulfate B (CHS B), chondroitin sulfate A (CHS A) and heparitin sulfate (HTS). It was also shown that a significant increase of CHS A/C was observed in mammalian tissues during growth, in tumors and in transformed cells in culture when compared with several adult tissues and non-transformed cells respectively. These combined results led to the suggestion that HTS and CHS B might be involved in the process of cell recognition and CHS AC may have a role in the stimulation of cell division.

During histogenesis, hyaluronic acid is the main MPS present. Its concentration falls progressively during cell differentiation which in turns is accompanied by an increase of CHS C. This compound then falls slowly during fetal development until its complete disappearance in newborn animals. Hyaluronidase activity exhibit the same variation observed for CHS C whereas β -glucuronidase and N-acetylglucosaminidase activities remain constant during all fetal development. The other SMPS, namely CHS B and HTS also remain constant during the whole period. The embryonic CHS C is tissue specific, varying in molecular weight according to the tissue of origin. These and other are compatible with the suggestion that this compound has a role in the stimulation of cell division functioning as an anti-recognition molecule.

STUDIES OF PHOSPHORYLATED OLIGOSACCHARIDES - RECOGNITION MARKERS FOR THE TARGETING OF LYSOSOMAL ENZYMES.

Stuart Kornfeld, Ira Tabas, and Ajit Varki.

Washington University School of Medicine, St. Louis, MO.

It has been demonstrated that the recognition marker for the endocytotic uptake and intracellular targeting of acid hydrolases to lysosomes resides in phosphomannosyl moieties on these glycoproteins. To investigate the mechanism of this phosphorylation, we labeled mouse lymphoma cells for 3 hours with [2-³H] mannose and then purified the lysosomal enzyme β -glucuronidase by immunoprecipitation. The oligosaccharide units of newly synthesized β -glucuronidase contained phosphate residues in diester linkage between mannose and α -linked N-acetylglucosamine. Structural studies revealed that the phosphorylated oligosaccharides consisted of a family of related molecules, all of which contained a high mannose-type oligosaccharide core. The major class consisted of isomers containing a single phosphate in diester linkage to one of three mannose residues of the underlying oligosaccharide. Oligosaccharides with two and even three phosphates were also present. In addition there were small amounts of molecules with one or two phosphomonoester groups. The underlying high mannose oligosaccharides of the molecules with phosphomonoester moieties contained fewer mannose residues consistent with their being the "oldest" molecules which had undergone oligosaccharide processing. We have also identified an α -N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase from rat liver that is capable of removing the covering N-acetylglucosamine residues. This activity is greatly enriched in smooth membrane preparations and can be distinguished from a lysosomal α -N-acetylglucosaminidase by several criteria, including subcellular localization and differential inhibition by amino sugars.

Based on these data we propose that phosphorylation of the oligosaccharide units of acid hydrolases occurs by the transfer of α -N-acetylglucosamine 1-phosphate residues to mannose residues and that subsequently the N-acetylglucosamine is removed to unmask the targeting function of the phosphate residue.

LECTINS AS TOOLS FOR THE STUDY OF GLYCOPROTEIN OLIGOSACCHARIDES

Rosalind Kornfeld, Kerry Kornfeld, and Marc Reitman.

University School of Medicine, St. Louis, MO.

Previous work has established that plant lectins bind to specific oligosaccharide sequences present on cell surface and soluble glycoproteins. This property can be exploited to fractionate glycopeptides and to select tissue culture cell lines with specific blocks in oligosaccharide biosynthesis. We have examined several mouse lymphoma cell lines which were selected for resistance to toxic levels of pea lectin and which contained decreased numbers of pea lectin binding sites [Trowbridge, *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 8, 716-723 (1978)]. One of the mutant cell lines was unable to convert GDP-mannose to GDP-fucose. Another line could not transfer fucose from HDP-fucose to oligosaccharide acceptors. In both instances the cellular glycopeptides were markedly deficient in fucose. Since the involvement of fucose in specific pea lectin binding was quite unexpected, the binding specificity of this lectin was further explored by testing a number of glycopeptides of varying oligosaccharide structure for their ability to bind to pea lectin-Sepharose. Similar studies were done with lentil lectin-Sepharose since this lectin has a structure that is very similar to that of pea lectin. Our experiments showed that in both cases high affinity binding occurred only with complex-type oligosaccharides that contained a fucose residue linked α to the core N-acetylglucosamine residue and two α linked mannose residues in the outer branches. The outer α -linked mannose residues could be substituted at C-2. In fact, binding to pea lectin-Sepharose was slightly inhibited by the presence of these outer N-acetylglucosamine residues. High affinity binding to both lectins was abolished when one of the α -mannose residues was substituted at C-2 and C-4 but retained when the α -mannose residue was substituted at C-2 and C-6. In contrast, high affinity binding of glycopeptides to Con-A was independent of fucose content and did not occur when the outer α -linked mannose residues were substituted at any position other than C-2. These findings explain the basis for the resistance of the lymphoma cell lines to pea lectin. In addition this information, along with our previous knowledge of lectin binding specificities, has allowed us to design an effective procedure for fractionating cell surface glycopeptides using a series of lectin-Sepharose columns.

BIOSINTESIS Y FUNCION DEL DOLICOL DIFOSFATO G-OLIGOSACARIDO

Roberto J. Staneloni.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas - "Fundación Campomar" y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Vuelta de Obligado 2490, 1428 Buenos Aires.

Durante bastante tiempo se ha considerado que los oligosacáridos de las glicoproteínas son formados por la adición secuencial de cada uno de los azúcares a partir de los nucleótidos derivados. Este mecanismo parece ser el correcto para los oligosacáridos unidos O-glicosídicamente a las proteínas.

En estos últimos años se ha podido establecer que los mono y oligosacáridos unidos a poliprenil fosfatos funcionan como transportadores de glicosilos activados en la biosíntesis de oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a las proteínas. En este proceso biosintético los azúcares son transferidos a los dolicol derivados a partir de los nucleótidos azúcares por glicosil transferasas asociadas a membranas. Los azúcares unidos a nucleótidos o dolicol fosfato actúan como dadores de monosacáridos para dar lugar a la formación de oligosacáridos unidos al dolicol difosfato. La N-glicosilación de las proteínas ocurre por la transferencia "en block" a partir del dolicol derivado de un G-oligosacárido a un polipéptido naciente. El G-oligosacárido contiene: 3 glucosas, 9 manosas y 2 N-acetilglucosaminas. La presencia de glucosas es necesaria en el G-oligosacárido para su transferencia a la proteína. Luego de transferido el G-oligosacárido pierde sus glucosas, parte de sus manosas e incorpora N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico para dar lugar a la formación de los oligosacáridos complejos unidos al aminoácido asparagina de la cadena peptídica.

Mediante solubilización diferencial con detergentes y sales se han separado dos actividades glucosídicas a partir de microsomas de hígado. Una de ellas actúa sobre el G-oligosacárido que contiene 3 glucosas, y la otra sobre el de 2 y 1 glucosas. Las actividades de estas enzimas se inhiben específicamente por el agregado de diferentes disacáridos. Aunque la mayoría de los estudios han sido realizados sobre el G-oligosacárido unido a la cadena polipeptídica. Esto último indicaría que estas enzimas serían las encargadas del procesamiento de los oligosacáridos una vez transferidos a las proteínas.

SIMPOSIO: *Membrane Regulation of Cell Function (IUB Symposium 101)*
Parte I. *Transport Systems*

MEMBRANE TRANSPORT IN THE REGULATION OF THE Ca^{2+} LEVELS IN THE CYTOSOL

Carafoli, E.

Laboratory of Biochemistry, Swiss Federal Institute of Technology (ETH),
8092 Zurich, Switzerland.

The levels of Ca^{2+} in the cytosol are regulated by reversible transport across plasma and intracellular membranes, and by reversible complexation by soluble cytosolic ligands. The plasma membrane permits the influx of Ca^{2+} through specific channels, which are gated by potentials in excitable cells. It ejects Ca^{2+} from the cell by way of a specific Ca^{2+} -ATPase, and also (but probably not in all tissues) by an electrogenic $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ exchange. The Ca^{2+} -ATPase has high affinity for Ca^{2+} (K_m , $< 1 \mu\text{M}$) and a relatively low V_{max} of transport, the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange has opposite kinetic properties. The former system is inhibited by vanadate, the latter is not. The Ca^{2+} ATPase is activated by calmodulin, the specific transmitter of the Ca^{2+} message. Using a calmodulin affinity chromatography column, the Ca^{2+} ATPase has been isolated and purified from red cell membranes. It is a glycoprotein of MW about 140.000, which has now been reconstituted into artificial phospholipid bilayers.

Inside the cell, both mitochondria, and sarcoplasmic and endoplasmic reticulum, transport Ca^{2+} . Mitochondria possess independent pathways for Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} release. The uptake pathway is driven by the transmembrane electrical potential (about 200 mv), operates with a K_m of about $10 \mu\text{M}$ and is specifically inhibited by the polycation ruthenium red. The release pathway in the majority of mitochondria consists of an electroneutral $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange (K_m (Na^{+}), 6 mM, K_m (Ca^{2+}), $13 \mu\text{M}$) which is insensitive to ruthenium red. In some mitochondrial types, other Na^{+} independent pathways of Ca^{2+} release may be prevailing. They may be activated by polyunsaturated fatty acids, by phosphate, or by the transition of the redox state of pyridine nucleotides towards oxidation.

Sarcoplasmic reticulum accumulates Ca^{2+} via a specific ATPase (K_m , $< 1 \mu\text{M}$), which is apparently present also in endoplasmic reticulum. The pathway of Ca^{2+} release from sarcoplasmic (and endoplasmic) reticulum is unknown, but it is supposed that membrane depolarization plays a role in it. The Ca^{2+} -ATPase can be reversed, and lead to the release of Ca^{2+} , but the process is relatively slow.

The cytosol contains various low and high molecular weight Ca^{2+} ligands. Among them, the most interesting is calmodulin, an acidic protein of molecular weight 17.000, which mediates the transmission of the Ca^{2+} message to a variety of cell functions.

The Anion Exchange System of the Red Blood Cell

Aser Rothstein

Research Institute, The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada

Anion transport in red blood cells is mediated by band 3, an abundant transmembrane protein of 95,000 daltons molecular weight. The transport behaves kinetically as a one for one anion exchange system in which a carrier (or transport site) is alternately exposed at the inside and outside face of the membrane but in which only the anion-loaded carrier can cross the membrane. A second anion-binding site, the modifier influences the rate of translocation. The transport protein and the transport and modifier sites have been identified by use of bimodal chemical probes. These are inhibitors that can bind reversibly under some circumstances allowing kinetic analysis of the nature of the inhibition, or irreversibly under other circumstances allowing localization of sites. The disulfonic stilbene, DIDS, interacts with the transport site but only from the outside. The photoaffinity probe, NAP-aurine, interacts with the transport site from the inside but with the modifier site from the outside. Both probes bind to one site in each band 3 monomer. The transport site behaves as though it can be exposed to either side of the membrane. Thus when it is interacted with DIDS from the outside it is no longer available for reaction with NAP-aurine at the inside. The modifier site, on the other hand, is only accessible from the outside. The functional arrangement of band 3 in the bilayer has been determined not only by the use of probes, but also by application of proteolytic enzymes to the two sides of the membrane. In the intact cell an outside and inside cleavage with chymotrypsin results in splitting of band 3 into three segments two of which (17,000 and 35,000 daltons) remain in the membrane, with retention of transport function. The DIDS and NAP-aurine are found in the 17,000 dalton segment. Proteolysis of leaky ghosts results in cleavage of the 17,000 dalton segment to 15,000 daltons of the 35,000 dalton segment to 9,000 daltons (plus an undefined glycopeptide), with loss of transport activity. Dissection of the 15,000 and 9,000 dalton segments by chemical agents suggests that the former crosses the membrane three times and the latter twice. The crossing peptide strands probably form an assembly of alpha helices which provides the transport pathway. Within the pathway an anion-dependent spontaneous location conformational change allows the transport site to alternate between two positions, one topologically-in and the other topologically-out, accounted for the anion exchange. (This study was supported by a Medical Research Council (Canada) Grant #MT4665)

MECHANISM OF BIOLOGICAL AMINES UPTAKE IN STORAGE VESICLES

Scarpa, A. and Johnson, R.G.

Department of Biochemistry and Biophysics, School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pa. 19104, U.S.A.

The energy requirement and the molecular mechanism of accumulation of biological amines has been studied in chromaffin vesicles isolated intact from bovine adrenal medulla under isotonic Percoll gradients. Previous studies carried out in this and other laboratories have conclusively demonstrated that a) the granules contain high concentrations (several hundred mM) of epinephrine, norepinephrine and ATP; b) that the membrane of the granules maintain a much lower endogenous permeability than that of other subcellular organelles to H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} ; c) that the intragranular pH is 5.5 both in vivo and after isolation; d) that this intravesicular acidity is independent of the pH and composition of the suspending medium, suggesting that the H^+ conductance of the membrane is low, and that the intragranular buffering capacity is high; e) that an inwardly directed H^+ -translocating ATPase exists in the granular membrane which maintains an acidic inside; f) that the transmembrane H^+ concentration gradient (which can be enhanced or collapsed with ATP or ATPase inhibitors or alternatively with suitable ionophores) is the driving force for catecholamine accumulation.

Quantitative measurements of the effect of H^+ gradients and the operation of the ATPase on the accumulation of catecholamines has been studied in chromaffin ghosts, formed by hypoosmotic lysis of isolated granules and extensive dialysis, because of the lack of intragranular binding component and endogenous electrochemical gradients.

Upon ATP addition to suspensions or chromaffin ghosts, a transmembrane proton gradient alone, a transmembrane potential alone, or both, could be established, depending upon the compositions of the media in which the ghosts were formed and resuspended. When chloride which is permeable across the membrane was present in the medium, addition of ATP resulted in the generation of a transmembrane proton gradient, acidic inside, of 1 pH unit (and no transmembrane potential). When ATP was added to chromaffin ghosts suspended in a medium in which chloride was substituted by isethionate, a transmembrane potential inside positive of 45 mV and no transmembrane proton gradient, was measured. In each medium, the addition of agents known to affect proton or potential gradients, respectively, exerted a predictable mechanism of action. Accumulation of epinephrine or 5-hydroxytryptamine was over 1 order of magnitude greater in the presence of the transmembrane proton gradient or the transmembrane potential than in the absence of any gradient in a dose-dependent manner. When ghosts were added to a medium containing chloride or isethionate, both a ΔpH and $\Delta \Psi$ could be generated upon addition of ATP. In this preparation, the maximal rate of amine accumulation was observed. The results indicate that amine accumulation into chromaffin ghosts can occur in the presence of either a transmembrane proton gradient or a transmembrane potential gradient, and the maximal rate of accumulation may exist when both components of the protonmotive force are present.

A model which takes into account these findings is discussed. This basic mechanism and energy requirement of this transport is not confined to the uptake of catecholamine in chromaffin granules, but results are presented both in vivo and in vitro, indicating that it is universally applicable to the uptake of serotonin in platelet-dense granules and to that of histamine in mast cell granules.

THE Na, K-ATPase, A REGULATOR OF THE INTRACELLULAR Na^+ AND K^+ CONCENTRATIONS.

Skou, J.C.

Institute of Biophysics, Aarhus University, 8000 Arhus C. Denmark.

The active, energy requiring, transport of Na^+ out of and K^+ into the cell by the Na, K-ATPase maintains a steady state electrochemical gradient for Na^+ into and for K^+ out of the cell. With the higher membrane permeability for K^+ than for Na^+ , the passive flux which follows from the gradients leads to formation of a membrane potential with inside negative and from this follows a distribution of permeant anions with a concentration lower intra- than extracellular; this compensates for the osmotic effect of the intracellular impermeant anions. The Na, K-ATPase is thus responsible indirectly for formation of the membrane potential and for regulation of the cell volume. The passive flux is coupled to the active via an activating effect of internal Na^+ and of external K^+ on the coupling system, the Na, K-ATPase. It is a flexible system which besides the Na:K exchange and the reversible reaction can accomplish a Na:Na exchange (req. ATP and ADP) and a K:K exchange (ATP and Pi). There is apparently no ion flux through the system without a reaction with substrate (ATP, ADP, Pi).

The Na, K-ATPase is embedded in and spans the cell membrane. It can be extracted and dissolved as single units by a non ionic detergent Octaethyleneglycoldodecylmonoether (C_{12}E_8) and with full activity. Ultracentrifugation studies give a protein MW of 265.000; it consists of 4 polypeptide chains, two α of about 100.000 and two β of about 40.000 Dalton and has 27.000 g of carbohydrate (the β chains) as hexose, hexosamin and sialic acid, 50 molecule phospholipid (one acidic) and 40 molecules cholesterol per 265.000 g protein. When incorporated into lipid vesicles it has transport activity. It is dissociated into $\alpha\beta$ by higher detergent concentrations and with no activity.

Mg^{2+} and Na^+ internal and K^+ external is required for hydrolysis of ATP and with a Na-K-competition internal as well as external. Ouabain and Vanadate inhibits in μM concentrations.

With Na^+ bound to the internal site the conformation (Na-form) is different from that with internal K^+ bound (K-form). Binding of K^+ to the internal site is accompanied by a binding of H^+ , an increase in pK, while binding of Na^+ is accompanied by a release of H^+ , a decrease in pK, i.e. a protonation decreases while a deprotonation increases the apparent affinity for Na^+ relative to K^+ on the internal site. ATP has a higher affinity for the Na-form than for the K-form and shift the equilibrium towards the Na-form, and it increases the rate of release of K^+ from the K-form. The Na-form with Na on has catalytic activity and the hydrolysis of ATP probably leads to the out translocation of Na^+ while the translocation of K^+ into the cell in some way is connected to the ATP induced shift in conformation from the K-form to the Na-form.

SIMPOSIO: *Mecanismos Regulatorios en la Biosíntesis de Proteínas*

REGULACION DE LA SINTESIS PROTEICA EN DISTINTAS FASES DEL CRECIMIENTO CELULAR: ESTUDIOS CON PROCARIOTES Y EUCARIOTES.

Algranati, I.D., González, N.S., García-Patrone, M., Goldemberg, S.H. Burrone, O.R. y Ferrer, M

Instituto de Investigaciones Bioquímicas. "Fundación Campomar", Buenos Aires.

Durante los distintos estados fisiológicos que una célula alcanza en las diferentes fases de su crecimiento existe un control de la expresión genética que se ejerce tanto a nivel transcripcional como en la síntesis proteica.

La regulación de la traducción en bacterias depende principalmente de la síntesis y estabilidad de las moléculas de RNA mensajero. Sin embargo, también se ha demostrado que las partículas ribosomales y los factores de iniciación de cadenas polipeptídicas sufren importantes cambios a lo largo del ciclo de crecimiento celular, y que dichas alteraciones pueden controlar la eficiencia de la maquinaria de síntesis proteica.

Los ribosomas de *Bacillus stearotherophilus* en fase estacionaria de crecimiento tienen una capacidad de síntesis muy disminuída en comparación a aquéllos provenientes de células en crecimiento logarítmico. Esta menor actividad parece deberse tanto a una deficiencia del factor IF₃ como a la aparición de otro factor proteico (AF₁) que es capaz de estabilizar los pares de subunidades ribosomales 30S - 50S y de inhibir "in vitro" la síntesis de polipéptidos dirigida por poliU o mensajeros naturales.

Las células animales poseen variados mecanismos para regular la velocidad de síntesis proteica en distintas fases del ciclo de crecimiento. Los linfocitos normales pueden pasar de un estado de reposo metabólico a otro de crecimiento y proliferación activos. Dicha transformación, inducida por diversos agentes mitogénicos, va acompañada de profundos cambios bioquímicos que incluyen un gran aumento de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. La estimulación de la traducción en linfocitos activados es parcialmente independiente del proceso de transcripción y posiblemente se debe a cambios en los niveles de factores de iniciación y de un inhibidor unido a partículas ribosomales que desaparece durante la transformación celular. Dicho inhibidor ejerce su efecto a nivel de la elongación de cadenas peptídicas.

GENE EXPRESSION IN NORMAL AND TRANSFORMED CELLS.

Bravo, R. and Celis, J.E.

Division of Biostructural Chemistry, Department of Chemistry, Aarhus University, Aarhus, Denmark.

We have searched for differences between normal and tumorigenic cells that could be used as assays of transformation in cultured cells (1,2). Recently, thanks to the development of the high resolution two dimensional gel electrophoresis (3, 4) and to the improvement of (³⁵S)-methionine labelling techniques (5), it has been possible to search for changes in gene expression that could eventually be correlated with growth rate and/or transformation (6).

Analysis of the acidic and basic polypeptides synthesized by mouse 3/3B cells and hamster BHK21 cells and of their respectively SV40 and Polyoma transformed counter parts revealed significant changes in the relative proportion of some of the major (³⁵S)-methionine labelled polypeptides synthesized by the cells (6). Most of these changes corresponded to variations in the relative proportion of polypeptides that were synthesized both in normal and transformed cells rather than to the appearance of new polypeptides in transformed cells.

During the analysis of the polypeptides whose relative proportion increased in transformed cells we concentrated our attention on an acidic polypeptide of MW36.000 whose relative proportion has been found to increase also in many spontaneously transformed mouse and human cells of mesodermal origin.

The relative proportion of this protein is high in primary cultures of some normal cells at early passages but it appears to decline when cell division ceases. To clarify this general observations we have carried out a detailed study of the polypeptides synthesized throughout the life span of human skin fibroblasts showing that the relative proportion of this polypeptide decreases as the cell ages and DNA synthesis declines. However the polypeptide's relative amount increases again at least during the first stages of spontaneous transformation of these fibroblasts.

In addition we have found that irradiation of HeLa cells with lethal dosis of X-rays results in the formation of giant cells which are not able to divide and that show very small amounts of this protein (J. Bellatin et al, in preparation).

In conclusion our experiments suggest a possible correlation between the presence of this acidic protein and the growth rate of the cells under investigation. The possibility of using microinjection techniques to asses the function(s) of this protein will be discussed.

References:

- 1) Celis, J.E., Small, J.V., Andersen, P. & Celis, A., Exp.Cell Res. 114, 335 (1978)

- 2) Celis, J.E., Small, J.V., Kaltoft, K. & Celis, A., *Exp. Cell Res.* 120, 79 (1979)
- 3) O'Farrell, P.H., *J. Biol. Chem.* 250, 4007 (1975)
- 4) O'Farrell, P.H., Goodman, H.M. & O'Farrell, P.H. *Cell* 12, 1133 (1977)
- 5) Celis, J.E., Kaltoft, K. & Bravo, R., in *Transfer of cell constituents into eukaryotic cells* (ed. J.E. Celis, A. Graessman & A. Loyter) Plenum 1980
- 6) Bravo, R. & Celis, J.E., *Exp. Cell Res.* (in press)
- 7) Bravo, R. and Celis, J.E., *J. Cell Biol.* 84, 795 (1980)

EXPRESION IN VITRO DE ALGUNOS GENES DE PROTEINAS INVOLUCRADAS EN LA TRASCRIPCION Y TRADUCCION BACTERIANAS. (IN VITRO-EXPRESSION OF THE GENES FOR SOME PROTEINS INVOLVED IN BACTERIAL TRANSCRIPTION AND TRANSLATION).

Jerez, C.A. y Weissbach, H.

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina (Norte), Universidad de Chile y Roche Institute of Molecular Biology, N.J., USA.

Los sistemas para la síntesis in vivo de proteínas a partir del DNA que las codifica, constituyen una valiosa herramienta para estudiar la regulación de la expresión genética. Debido a la complejidad del sistema, en la mayor parte de los estudios in vitro para obtener la síntesis de proteínas se han utilizado extractos relativamente crudos. Sin embargo, una gran cantidad de nueva información podría obtenerse si la expresión genética se lograra en un sistema más definido.

Así, hemos estudiado la expresión genética en un sistema crudo y en otro parcialmente definido que utiliza aproximadamente 30 factores purificados. Para estos estudios se expresaron in vitro los DNA de fagos transductores que contienen varias regiones genéticas del cromosoma de *Escherichia coli*. Estos son el fago transductor λ rif^{d18}, a partir de cuyo DNA se sintetizaron in vitro el factor de elongación (EF)-Tu (tuf B), las subunidades $\beta\beta'$ de la RNA polimerasa y las proteínas ribosomales L₁₀ y L₁₂. También se empleó el DNA del fago λ fus3 para estudiar la síntesis de (EF)-Tu (tuf A), EF-G y la subunidad α de la RNA polimerasa.

Las proteínas ribosomales L₁₀ y L₁₂ se sintetizan en el sistema parcialmente definido casi tan bien como en el sistema crudo. Sin embargo, EF-Tu, EF-G y las subunidades $\beta\beta'$ y α de la RNA polimerasa se sintetizan con menor eficiencia en el mismo sistema. Una fracción activa que estimula la síntesis de estas últimas proteínas se obtuvo por fraccionamiento de un sobrenadante de alta velocidad en DEAE-celulosa. Esta fracción contiene una proteína o factor L que estimula la síntesis de las subunidades $\beta\beta'$ pero no tiene efecto sobre la síntesis de los otros productos. Por otro lado, la síntesis de las subunidades $\beta\beta'$ de la RNA polimerasa es inhibida específicamente por un exceso de RNA polimerasa en el sistema.

En los actuales experimentos el sistema parcialmente definido mantiene las razones entre los productos formados de L₁₂/L₁₀=4 y de EF-Tu (tuf A)/EF-G=6. Estos valores concuerdan con los resultados de expresión genética de estos productos in vivo.

Varios de los productos codificados por los DNA de los fagos λ rifu¹⁸ y λ fus 3 son metilados in vivo. Así, las proteínas ribosomales L₁₁ y L₁₂, el factor de elongación Tu, RNA ribosomal y algunas especies de tRNA contienen todos grupos metilados.

Hemos utilizado el sistema in vivo para estudiar la síntesis de novo a partir de DNA, y la metilación de algunos de estos productos. Encontramos que la proteína ribosomal L₁₁, sintetizada a partir de DNA del fago λ rifu¹⁸ y en presencia de ³H-S-adenosilmetionina como dador de grupos metilo incorpora 4 a 5 grupos metilo por molécula sintetizada. La mayor parte de estos grupos se encuentran en la forma de N- ϵ -trimetil lisina. También detectamos la presencia de N-trimetilalanina, que se encuentra como grupo aminoterminal de L₁₁.

El presente sistema es útil por lo tanto para dilucidar nuevos factores que sean necesarios para la expresión genética como también para estudiar la regulación de la síntesis y modificación de varios productos genéticos in vitro

MODULACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS. (MODULATION OF PROTEIN SYNTHESIS).

Krauskopf, M

Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

El análisis de la distribución de tRNA isoaceptores en diversos organismos y tejidos, ha tocado interrogantes de gran importancia respecto a regulación y diferenciación. Sin embargo, pese a la cuantía de los estudios existentes, las respuestas a estas interrogantes son escasas. Existen algunos ejemplos que parecieran confirmar la existencia de una adaptación funcional de la población de tRNAs, a través de la cual la abundancia relativa de especies isoceptoras de tRNA, permite la traducción eficiente de un mRNA en un estado determinado de la actividad celular. En colaboración con otros laboratorios, hemos analizado el comportamiento de algunas isoespecies de tRNA durante el desarrollo larval del gusano de seda *Bombyx mori*. A través de fraccionamiento en columnas de BD-celulosa, RPC-5 y electroforesis en gel de poliacrilamida se identificaron 5 isoespecies de tRNA^{Ala}. En la glándula posterior (GP), donde se sintetiza la fibroína (ala compone el 30% de la molécula). tRNA₂^{Ala} constituye el 60% respecto al total de tRNA^{Ala}. Esta isoespecie está ausente en la glándula media y en la cubierta larval. La presencia exclusiva de altos niveles de este tRNA₂^{Ala} en la GP del gusano de seda, sería necesaria para asegurar la eficiencia de la traducción de la fibroína. De acuerdo a recientes trabajos el contexto de la lectura que se traduce, determina en parte la eficiencia de este proceso (Bossi y Roth, Nature, 286, 123, 1980).

Otro aspecto que influye sobre la eficiencia de la traducción se relaciona al microambiente celular. Hemos estudiado el efecto de Ca²⁺ en sistemas libres de células de miocardio de bovino, hígado y *E. coli* usando mensajeros sintéticos. En todos Ca²⁺ estimula la síntesis de poli (Phe) en presencia de concentraciones subóptimas de Mg²⁺. El efecto más notorio se obtuvo en miocardio de bovino con casi un 100% de estimulación. Estudiado el efecto de Ca²⁺ con mensajeros naturales se confir

nió la modulación ejercida por este catión. Al disminuir los niveles de Mg^{2+} endógeno en lisado de reticulocitos de conejos (con EDTA 2.5 mM) se incrementó la eficiencia del sistema en un 20% (Ca^{2+} 0.5 mM). EGTA anuló el efecto. En lisado de germen de trigo, la traducción de un RNA (Poli A) obtenido de corazón de embrión de pollo también fue estimulada por este catión.

No sólo el microambiente celular parece modular la eficiencia de la síntesis proteica. El efecto del medio ambiente (habitat), especialmente en ectotermos euritermales, afecta también esta etapa de la expresión génica. Ello ha sido investigado en nuestro laboratorio analizando este proceso y sus componentes durante adaptación a temperaturas propias de las variaciones estacionales.

Se discutirá la contribución funcional de los aspectos descritos a la modulación de la síntesis proteica en los diversos sistemas estudiados. (Financiado por DI-IACH. Grant S-80-17).

SIMPOSIO: *Contribuciones Latinoamericanas al Clonado Molecular*

THE ORGANIZATION OF THE RIBOSOMAL RNA GENES OF RHYNCHOSCIARA AMERICANA

Zaha, A.

Instituto de Química, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil.

The ribosomal RNA genes (rDNA) of *R. americana* were analysed using Southern transfers of DNA cleaved with E co RI, Hind III, Bam HI and Pst I. Following digestion with E co RI three bands of 9,5; 7,5 and 5,5 kb were detected, which hybridize with rRNA.

Recombinants containing E co RI/ fragments of *R. americana* DNA were prepared using the vector λ gt λ B. Three different recombinants (gt Ra1, gt Ra 23 and gt Ra5) were isolated containing rDNA fragments of 9,5; 7,5 and 5,5 kb respectively. These rDNA fragments were transferred to pBR325 and analysed with restriction/enzymes and Southern hybridization with 28 S rRNA and 18 S rRNA.

It was found that:

- 1) The DNA segment of 9,5 kb represents a complete rDNA repeat unit;
- 2) The DNA segments of 7,5 and 5,5 kb together represent a different repeat unit containing an insertion in the sequence coding for 28 S rRNA.

CONSTRUCTION OF BACTERIAL RECOMBINANTS CONTAINING HUMAN INSULIN cDNA

Villa, L.L. (1), Bolívar, F. (2) and Brentani, R.R. (1)

(1) Lab. Oncología Experimental, F. Medicina, Universidade Sao Paulo, CEP 01246. Sao Paulo, Brasil and (2) Depto. Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México 20, D.F.

Total poly A (+) mRNA was isolated by a guanidinium thiocyanate method from a human insulinoma and purified by two cycles of oligo (dT) column chromatography. cDNA and double stranded cDNA were synthesized, using this material as a template, with the aid of reverse transcriptase. After treatment with S₁ nuclease and DNA polymerase I the dsDNA was ligated to Hind III linkers in the presence of ATP and T4 DNA ligase. Sticky ends were generated by Hind III digestion and the material was annealed to pBR 322 linearized with the same endonuclease followed by treatment with bacterial alkaline phosphatase. The recombinant plasmid was used to transform *E. coli* HB 101. By Southern hybridization, employing a cloned DNA fragment corresponding to rat insulin, we have isolated one clone containing a 4000 bp insert. Restriction mapping and nucleotide sequencing of such insert are now under way.

REORDENAMIENTO DE LOS GENES PARA LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE DEL
TRIPANOSOMA BRUCEI

A.C.C. Frasch.

Jan Suammerdam Institute, University of Amsterdam.

Los tripanosomas africanos son capaces de evadir la respuesta inmunológica del huésped mediante el recambio periódico de sus antígenos de superficie. Cada parásito posee una única glicoproteína que cubre completamente su membrana plasmática, pero es capaz de expresar un número aún desconocido de antígenos que no presentan, "in vivo", reacción inmunológica cruzada.

Mediante hibridización diferencial con DNA complementario (cDNA) obtenido a partir de poli (A⁺)RNA de 4 diferentes clones de T. brucei, fue posible localizar los correspondientes a las 4 proteínas de superficie. Dichos clones fueron utilizados para estudiar la estructura y organización de los genes en DNA nuclear del parásito.

Los tripanosomas africanos pueden expresar un variado repertorio de antígenos debido a que poseen al menos un gen para cada proteína de superficie (basic-copy gene). El tripanosoma que expresa determinado antígeno, posee además, una nueva copia del gen correspondiente (expression-linked copy), por lo cual fue posible proponer un modelo que explique la expresión sucesiva, pero no simultánea, de cada uno de ellos.

Secuencias homólogas para cada cDNA fueron hallados en un número variable de fragmentos de DNA (familia de genes) que conservan la región 3' terminal. Resultados similares se obtuvieron cuando se compararon diferentes cepas de tripanosomas africanos, por lo cual es posible que los genes para las proteínas de superficie posean una región más altamente variable (5' terminal) debido a una mayor presión evolutiva.

Las duplicaciones en determinados genes para los antígenos de superficie, traerían como consecuencia deleciones, para conservar el genoma constante en cuanto a su tamaño, y ésto fue lo observado.

MOLECULAR CLONING OF KINETOPLAST DNA MINICIRCLE SEQUENCES FROM *TRYPANOSOMA CRUZI*

Galler, R.; Van Heuverswyn, H.; Muller, R.U.; Tedeschi, V.; Calcagnotto, A.M.; Cardoso, M.A.B.; Magalhaes, M.M.R. & Morel, C.

Departamento de Bioquímica e Biología Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365 Manguinhos -CEP 21040 Rio de Janeiro, R.J. - Brasil

Kinetoplast DNA (kDNA), the mitochondrial DNA of the organisms of the order Kinetoplastida, is formed by the catenation of thousands of DNA circles into a two-dimensional network localized in the kinetoplast region of the single mitochondrion of these organisms. In a given network, there are two types of such circles, maxi- and minicircles, with the following properties:

Component	Heterogeneity	n°/network	abundance	mol. weight	function
maxicircle	homogeneous	≈ 50	5-10%	13-26 x 10 ⁶	those of conventional mtDNA
minicircle	heterogeneous	3000-15000	90-95%	0.5-1.5x10 ⁶	unknown

In order to study more closely the minicircle component of *T. cruzi* kDNA, we have cloned *EcoRI*-linearized minicircles and minicircle fragments into the *EcoRI* site of the plasmid pBR325. Among the 331 bacterial clones that showed positive hybridization against nick-translated total kDNA, 110 have already been characterized by gel electrophoresis of the *EcoRI*-digested recombinant plasmids. Clones carrying full-length minicircles as well as some of those containing the most abundant *EcoRI* minicircle fragments have been selected for physical mapping and/or DNA sequence analysis. Preliminary results will be discussed.

We thanks Drs. Larry and Agda Simpson for helpful advice and discussions. This work was supported by grants from CNPq, Brasil.

SIMPOSIO: *Membrane Regulation of cell Function (IUB Symposium 101)*
Parte II. Membrane-Bound Oxidases and Related Systems

PRODUCCION MITOCONDRIAL DE RADICAL SUPEROXIDO Y DE PEROXIDO DE HIDROGENO.

Boveris, A.

Instituto de Química Biológica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155, Buenos Aires. Argentina

La existencia de niveles significativos de radicales libres oxidantes en células y tejidos aeróbicos como la base molecular continua de la toxicidad del oxígeno y de las radiaciones ionizantes fue propuesta por Gerschman y col. en 1954 (*Science* 119, 623). El descubrimiento de la superóxido dismutasa, que cataliza la dismutación del radical anión superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2), por McCord y Fridovich (*J. Biol. Chem.* 244, 6049, 1969) implicó el concepto de que el radical superóxido cumpliría un papel biológico importante. Posteriores investigaciones permitieron establecer que la superóxido dismutasa cumple un papel esencial en la defensa antioxidante, juntamente con la catalasa y la glutatión peroxidasa. Las membranas mitocondriales parecen constituir el sitio intracelular más importante de generación de O_2^- ; en los hepatocitos, el retículo endoplásmico contribuye similarmente a la producción total celular de O_2^- (Chance, Sies y Boveris, *Physiol. Rev.* 59, 527, 1979). El estado estacionario de O_2^- es mantenido en 10^{-12} M en la matriz mitocondrial por la Mn-superóxido dismutasa intramitocondrial y en 10^{-11} M en el citosol por la Cu-Zn-superóxido dismutasa citosólica. Estas dos enzimas son las rápidas (2×10^9 $M^{-1} \text{seg}^{-1}$) conocidas. La generación de H_2O_2 por las mitocondrias constituye un evento fisiológico en condiciones aeróbicas; tanto los sustratos NAD-dependientes como el succinato son capaces de sustentarla (Boveris y Chance, *Biochem. J.* 134, 707, 1973). La generación mitocondrial de H_2O_2 da cuenta de aproximadamente el 2% del consumo total de oxígeno. El O_2^- es el precursor estequiométrico del H_2O_2 mitocondrial (Boveris y Cadenas, *FEBS Lett.* 54, 311, 1975). Aparentemente, hay dos sitios principales de generación de O_2^- en la cadena respiratoria: en la interacción entre la ubiquinona y los citocromos b y c_1 y en la NADH-deshidrogenasa. En el área ubiquinona-citocromo b la generación de O_2^- es de 1,9 nmol/min/mg proteína a pH 7.4. Estudios de extracción y reconstitución de la ubiquinina mostraron que la generación de O_2^- y de H_2O_2 depende linealmente de la ubiquinona reducible (Boveris y col., *Biochem. J.* 156, 435, 1976). Los Complejos I (NADH-ubiquinona reductasa) y III (ubiquinol-citocromo c reductasa), que tienen ubiquinona como componente común, son activos generadores de O_2^- y de H_2O_2 (Cadenas y col., *Arch. Biochem. Biophys.* 180, 248, 1977). En el Complejo I la generación de H_2O_2 fue inhibida por rotenona. El Complejo II (succinato deshidrogenasa) resultó muy ineficiente como generador de O_2^- y de H_2O_2 . Reacciones modelo de autooxidación de quinoles, extendidas al ubiquinol mitocondrial, y el efecto del cianuro y de la tenoiltrifluoroacetona sobre la producción de O_2^- y H_2O_2 , llevaron

a postular que la ubisemiquinona sería la reductora del oxígeno molecular. El efecto de protóforos (PCP, FCCP y CCCP), ionóforos y Ca^{2+} sobre la producción de H_2O_2 por mitocondrias inhibidas con antimicina llevó a postular que el potencial de membrana, componente de la fuerza protomotriz de Mitchell, controla la velocidad de formación de ubisemiquinona (Cadenas y Boveris, *Biochem. J.* **188**, 31, 1980). La NADH-deshidrogenasa de membranas mitocondriales reducida por NADH en presencia de rotenona o por flujo de electrones invertido genera $0.9 \text{ nmol } \text{O}_2^-/\text{min}/\text{mg}$ proteína a pH 7.4. La generación de O_2^- a nivel de la ubisemiquinona y de la NADH-deshidrogenasa son aditivas en el rango de pH 7.0 a 8.8. El cianuro inhibe la producción de O_2^- por la ubisemiquinona pero no afecta la generación de O_2^- por la NADH-deshidrogenasa (Turrens y Boveris, *Biochem. J.* en prensa, 1980). La producción continúa de radicales libres oxidativos, que aparentemente es confirmada por la observación reciente de la quimioluminiscencia espontánea de órganos *in situ* (Boveris y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 347, 1980) es considerada como un factor contribuyente al envejecimiento natural y a la mutagénesis espontánea.

ALTERACIONES EN EL METABOLISMO DE DROGAS POR EFECTOS NUTRICIONALES.

Gil, L. y Pedemonte, J.

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

El sistema de oxidasas de función mixta (s.o.f.m.) es responsable de las transformaciones metabólicas de moléculas de naturaleza lipofílica extrañas al organismo (drogas, contaminantes ambientales, etc.) y de algunos sustratos endógenos tales como hormonas esteroidales y ácidos grasos. Los componentes de este sistema son: dos flavoproteínas (NADH b₅ reductasa y NADPH citocromo P-450 reductasa), dos flavoproteínas (citocromo b₅ y citocromo P-450) y fosfolípidos. Citocromo P-450 es la oxidasa terminal, el sitio de unión del sustrato de activación del oxígeno y de la oxidación del sustrato. Sólo en los últimos años se ha aceptado la presencia de múltiples formas de citocromo P-450 pero su número total es aún materia de controversia. Los trabajos publicados en la literatura sobre efectos nutricionales en el metabolismo de drogas no han reportado alteraciones en la composición de las múltiples formas de citocromo P-450. En nuestros estudios hemos utilizado ratas con desnutrición calórica proteica (desnutridas) ratas desnutridas realimentadas con una dieta rica en caseína (realimentadas) y ratas alimentadas con dieta normal (normales). La desnutrición provocó alteraciones en la composición de las especies de citocromo P-450 que se manifiestan por: 1) cambio en el espectro diferencial con CO de 450 nm a 452 nm; 2) variaciones en la K_m aparente para metabolizar diferentes sustratos *in vitro*; 3) Variaciones en la actividad oxidativa para oxidar diferentes sustratos *in vivo* e *in vitro*; 4) Variaciones en los espectros diferenciales con diferentes ligandos; 5) Variaciones en las bandas de PM 46.000-60.000 en geles de poliacrilamida con SDS. La realimentación de ratas desnutridas con una dieta rica en proteínas produjo aumentos superiores al 400% en la actividad para oxidar diferentes drogas y aumentos similares en el contenido de los componentes del sistema, superando los valores obtenidos para ratas normales. Estos aumentos fueron bloqueados por administración de actinomicina D. El espec-

tro diferencial con CO fue desplazado de 452 nm a 450 nm después de 6 días de realimentación, observándose además importantes alteraciones en algunas bandas electroforéticas. Estas y otras evidencias que se presentarán demuestran que el estado nutricional puede provocar cambios drásticos en el s.o.f.m. Alteraciones en las especies de citocromo P-450 por efectos nutricionales podrían tener importantes implicaciones farmacológicas y toxicológicas en el metabolismo de drogas que deberían ser considerados en tratamientos terapéuticos de individuos con algún tipo de desnutrición.

Financiado por Proyecto N°B 535-802 del Servicio de Desarrollo Científico, Artístico y de Cooperación Internacional de la Universidad de Chile.

CARACTERIZACION DE LA OXIDASA PEROXISOMAL DE ACIDOS GRASOS

Leighton, F., Inestroza, N., Soto, U. y Bronfman, M.

Departamento de Biología Celular, Universidad Católica de Chile

En el estudio del sistema peroxisomal de B-oxidación de ácidos grasos hemos utilizado hígado de rata e hígado humano y centrado nuestra atención en la oxidasa peroxisomal de ácidos grasos (OAG) por tratarse de una enzima característica del sistema inducible por dietas grasas y drogas hipolipemiantes y la responsable aparente de su especificidad.

La caracterización de la enzima, que hemos purificado casi a homogeneidad, obteniendo una actividad específica de 27 U/mg proteína con palmitoil-CoA como sustrato, muestra que se trata de una flavoproteína, de p.m. 136.000 constituida probablemente por 2 subunidades de 22,000 y de 2 de 45.000. Posee especificidad para sustratos de cadena media y larga (K_m 6.0 μ M para palmitoil-CoA) y una gran afinidad con O_2 con K_m aparente de 5-10 μ M. La OAG une FAD débilmente con K_D aparente de 0.6 μ M. Se presentarán y discutirán otras propiedades físicas y bioquímicas de la enzima. La OAG purificada parcialmente oxida palmitoil-CoA más rápidamente en presencia de NAD^+ . Este y otros argumentos derivados del análisis en geles de poliacrilamida-SDS e inhibidores de proteasas, hacen plantear la posibilidad de que la OAG forme parte de un péptido o un complejo multienzimático con otras enzimas de la B-oxidación.

La OAG genera H_2O_2 , sin desprender O_2 , el que podría participar en un ciclo de la reoxidación del NADH producido por la B-OH acil CoA deshidrogenasa. La información disponible señala que esta oxidasa plantea desde un punto de vista filogenético, interesantes interrogantes, tanto sobre la adquisición de organelos redox por la célula como en el establecimiento de secuencias metabólicas.

Inestroza, Bronfman y Leighton. *Biochem. J.* 182: 779-788 (1979)
Bronfman, Inestroza y Leighton, *B.B.R.C.* 88: 1030-1036 (1979)
Inestroza, Bronfman y Leighton, *Life Sciences* 25: 1127-1136 (1979)
Inestroza, Bronfman y Leighton, *B.B.R.C.* 95: 7-12 (1980)

Financiado por Proyecto DIUC 50/79

HEMO OXIGENASA: UN ANALISIS DE SU ESPECIFICIDAD

Frydman, de R., Tomaro, M.L., Buldain, G., Awruch, J., Díaz, J. y Frydman, B.

Cátedra de Fitoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A.

La hemo oxigenasa es una enzima microsomal que degrada el hemo IX a biliverdina IX-X. Su especificidad fue estudiada usando como sustrato heminas y hierro-porfirinas sintéticas. Se encontró que 24 hierro-porfirinas sintéticas fueron sustratos de la hemo oxigenasa. Todos ellos tenían en común dos restos de ácidos propiónicos vecinos en C₆ y C₇, lo que sería por tanto, el requerimiento estructural esencial de un sustrato de la hemo oxigenasa. Las hierro-porfirinas que llevaban ácidos propiónicos en otras posiciones del anillo del hemo no eran sustratos.

Las hierro-porfirinas que llevaban sustituyentes con características deactivantes del α -metino (restos acilos) en C₂ y C₄ seguían funcionando como sustratos de la hemo oxigenasa, aunque los rendimientos de biliverdina eran menores. Algunas hierro-porfirinas tales como la hemina XIII y la hemina III, eran mejores sustratos de la hemo oxigenasa que la hemina IX.

La oxidación enzimática fue siempre selectiva para el puente de α -metino y en presencia de biliverdin-reductasa se obtuvieron siempre las α -bilirubinas. El sistema enzimático empleado fue la hemo-oxigenasa microsomal unida a membranas y un sistema de biliverdin-reductasa de hígado de rata. Este última enzima reducía a todas las α -biliverdinas formadas en la oxidación enzimática de las hierro-porfirinas sintéticas.

La preincubación del sistema enzimático con las heminas que eran sustratos de la hemo-oxigenasa, en ausencia de NADPH, daba como resultado la inhibición de la oxidación enzimática de las heminas. Las porfirinas libres de hierro correspondientes a las heminas anteriores, eran también inhibidores del sistema enzimático. Este efecto inhibitorio estaba ausente cuando se ensayaron las hierro-porfirinas y sus correspondientes porfirinas que no llevaban en su estructura los dos restos de ácidos propiónicos vecinos en C₆ y C₇. En presencia de hemo-hemina IX la oxidación de la hemina IX estaba totalmente inhibida. Estos resultados permiten delinear un esquema del mecanismo de la hemo oxigenasa. Pusieron en evidencia que la hemina debe unirse a la hemo oxigenasa en su forma reducida de Fe²⁺ (forma de bajo spin). Si se une a la enzima la forma de alto spin (Fe³⁺) su reducción por NADPH a Fe²⁺ ya no tiene lugar. Otra alternativa podría ser que la unión de la forma hemínica y del NADPH deban ser simultáneas para permitir la formación del hemo.

DESCARBOXILASA PIRÓFOSFOMEVALÓNICA DE HIGADO DE POLLO: CONDICIONES PARA EL ENLAYO Y PURIFICACIÓN PARCIAL.

(Chicken liver pyrophosphomevalonate decarboxylase: assay conditions and partial purification). Alvear, M., Jabalquinto, A.M. y Cardemil, E. - Unidad de Bioquímica, Fac. Med. Occidente, y Departamento de Medicina Experimental, Fac. Med. Oriente, Universidad de Chile.

La descarboxilasa pirofosfomevalónica es una de las primeras enzimas de la síntesis de colesterol a partir de mevalonato. Ha sido detectada en hígado de rata, levaduras y vegetales, pero no ha sido caracterizada en ningún sistema, en parte por su inestabilidad.

Se preparó un extracto acelular de hígado de pollo, en que se midió la enzima a 37°C en amortiguador acetato pH 4,9. El ensayo consistió en incubar la enzima con [2-¹⁴C]-MEVPP, detener la reacción con un exceso de fosfatasa alcalina, extraer los alcoholes liberados con hexano y determinar la radiactividad de éste en un contador de centelleo.

Se encontró pH óptimo entre 4,5 y 5,5, Km ap. MEVPP = 46 µM. La enzima ha sido purificada 330 veces (19% rendimiento) usando corte a pH 5,3, fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografías en DEAE celulosa, Sephadex G-200 e hidroxilapatita. La enzima purificada puede guardarse en 50% glicerol a -5°C.

Se concluye que debería ser posible obtener enzima homogénea en el futuro próximo para estudiar su estructura y el mecanismo de la reacción que cataliza.

Financiado por U. de Chile proyecto B 402-802.

METILACION DE LA PROTEINA RIBOSOMAL L11 DE BACILLUS SUBTILIS (Methylation of ribosomal protein L11 from *Bacillus subtilis*). Amaro, A.M., Mardones, E., Toledo, H. y Jerez, C.A., Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina (Norte), Universidad de Chile.

La proteína ribosomal L11 es indispensable para la síntesis de ppGpp en bacterias. Esta proteína es la más metilada del ribosoma en *B. subtilis* (Mardones, E., Amaro, A.M. and Jerez, C.A. 1980, *J. Bacteriol.* 142, 355-358). Hemos analizado los aminoácidos metilados que contiene L11 de *B. subtilis* y su grado de metilación durante la esporulación, ya que mutantes de *B. megaterium* resistente a tiostrepton son incapaces de esporular y muestran ausencia de L11 metilada.

Se creció *B. subtilis* 168M en presencia de metil-³H-metionina y/o 1-¹⁴C-metionina. Las proteínas ribosomales fueron obtenidas a distintos tiempos por métodos convencionales. La separación de las proteínas se hizo mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. El grado de metilación se determinó por la razón ³H/¹⁴C de cada proteína. Los aminoácidos metilados se determinaron por cromatografía después de hidrólisis ácida de las proteínas.

Encontramos que la proteína L11 contiene casi exclusivamente N-E-trimetilisina en su estructura, como en el caso de *E. coli*. Estos resultados sugieren que la metilación de L11 y probablemente otras proteínas ribosomales se conserva en los procariontes. Durante todo el proceso de esporulación L11 se encuentra altamente metilada. Esta modificación puede ser necesaria en la esporulación, lo cual se comprobará mediante mutantes bloqueados en distintas etapas del proceso.

Financiado por Universidad de Chile, proyecto B-1065 801.

ALTERACION DEL CRECIMIENTO DE *E. coli* EN MUTANTES DE FOSFOFRUCTOQUINASA. (Altered growth of *E. coli* in phosphofructokinase mutants)

Babul, J., Guixé, V. y Dalal, F. Departamento de Química y Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Harvard Medical School, EE. UU.

E. coli posee una fosfofructoquinasa alostérica (PFK I), actividad principal de la cepa silvestre y una isoenzima no alostérica (PFK II) cuyos niveles alcanzan el 10% de la actividad total. En cepas con una mutación (*pfkBI*) en el gen que especifica a PFK II los niveles aumentan cerca de 30 veces y una mutación cercana (*pfkB10*) modifica aparentemente su estructura. Así, la mutante doble *pfkBI pfkB10* (llamada *pfkB1**) tiene niveles altos de una variante, PFK II*, de mayor labilidad.

Una cepa *pfkBI*, sin PFK I, crece en glicerol de una manera similar a la cepa silvestre. En cambio la cepa isogénica *pfkB1** crece lentamente y en esta situación presenta niveles muy bajos de fructosa-6-P y altos de fructosa-1,6-P₂ comparados con los de la cepa silvestre. PFK II presentó inhibición competitiva por fructosa-1,6-P₂ al variar la concentración de fructosa-6-P, en cambio PFK II* presentó inhibición de tipo mixto. En el caso de PFK II* la inhibición fue menor, lo que sugiere la presencia de un ciclo fútil entre fructosa-6-P y fructosa-1,6-P₂ en *pfkB1**. Al crecer esta cepa en glicerol-3-P y ³²PO₄ este ciclo no se detectó. La correlación entre las características de crecimiento de ambas cepas, las propiedades de sus enzimas y la concentración de metabolitos claves no da cuenta del lento crecimiento de *pfkB1** en glicerol.

Financiado por S.D.D.C.C.A.C.I., Universidad de Chile, OEA y NIH.

DETERMINACION DE ACIDO SIALICO EN HORMONA UTEROTROFICA PLACENTARIA (UTPH). (Sialic acid determination in uterotropic placental hormone - UTPH). Boric, M.A., y Beas, F. Departamento Materno Infantil, Facultad de Medicina Sur, Universidad de Chile, Hospital Paula Jaraquemada.

La UTPH es una hormona proteica placentaria con acción uterotrófica. Otras hormonas proteicas contienen ácido siálico en su estructura, lo que les da carácter de glicoproteínas, condicionando sus propiedades biológicas. Por ello se estudió la presencia de ácido siálico en soluciones de UTPH "nativa" extraída de placentas humanas de término, con y sin hidrólisis ácida previa. Se empleó la técnica del ácido tiobarbitúrico descrita por Warren. Los resultados indicaron que la UTPH contiene ácido siálico unido en una proporción de 1,5-2,0%.

Como otros estudios indicaron que la UTPH estaba unida o contaminada con inmunoglobulinas se determinó ácido siálico en preparaciones de UTPH libre de inmunoglobulinas, y los resultados también fueron positivos. Se concluye que la UTPH obtenida de placentas de término, con actividad biológica e inmunológica, es una glicoproteína.

Se discute la relación de esta proteína con otras proteínas asociadas al embarazo.

POLI (ADENOSINA DIFOSFATO RIBOSA) SINTETASA EN MITOCONDRIAS DE TESTICULO DE TORO. (Poly (adenosine diphosphate ribose) synthetase in bull testis mitochondria). Burzio, L.O., Cornejo, R. y Zuvić, T. - Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Poli(ADP-Rib) sintetasa es una enzima nuclear que transfiere el residuo ADP-Ribosa del NAD^+ a proteínas cromosomales. Esta actividad se encontró en mitocondrias de testículo de toro purificadas por sedimentación en un gradiente lineal de sacarosa (0.9 M a 2.1 M). La actividad de esta enzima coincide exactamente en la gradiente con la distribución de proteínas y con la actividad de la succínico-citocromo c reductasa. La actividad es considerablemente alta en testículo de toro (100-150 pmoles de ADP-Rib/mg proteína). Mitocondrias de testículo de rata también contienen una alta actividad. Sin embargo, la actividad fue muy baja en mitocondrias de hígado y de espermios.

La enzima es inhibida por nicotinamida, timidina y teofilina, y su actividad es dependiente de DNA. El producto sintetizado son oligómeros de ADP-Rib unidos a proteínas.

Los resultados demuestran la presencia de una poli(ADP-Rib) sintetasa en mitocondrias de testículo, cuya alta actividad contrasta con la encontrada en otros tejidos. (Proyecto DI UACH, S-79-20).

PROPIEDADES CINÉTICAS Y DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA COLESTEROL ESTER HIDROLASA EN HIGADO HUMANO. (Kinetic properties and subcellular distribution of cholesteryl ester hidrolase in human liver).

Del Pozo, R; Nervi F; Leighton F; Bronfman M. Laboratorios de Gastroenterología y Citología -Bioquímica. Universidad Católica de Chile.

Los ésteres de colesterol, removidos de las lipoproteínas plasmáticas, son hidrolizados en el hígado por una colesterol ester hidrolasa (CEH). La CEH ha sido escasamente estudiada en hígado humano. Por ello, se determinaron algunas características cinéticas y ubicación subcelular de ella.

Las determinaciones se realizaron en homogeneizados y fracciones celulares de biopsias quirúrgicas. Como sustrato se utilizaron liposomas de lecitina conteniendo colesterol oleato- ^{14}C .

La CEH es estable, e inhibida con pCMB; presenta una cinética tipo Michaelis-Menten, y muestra actividad máxima a pH 4.5. La distribución subcelular de la CEH es preferentemente lisosomal.

Estos estudios permiten precisar las condiciones mínimas necesarias para conocer eventuales diferencias en el sistema CEH lisosomal de diferentes condiciones metabólicas o patológicas en hígado humano.

Financia proyecto DIUC 10/80 .

REGULACION DE FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS POR CALMODULINA EN OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS (Regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase by calmodulin in *X.laevis* oocytes) Echeverría, M., Orellana, O., Jedlicki, E., Plaza, M. y Connelly, C., Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina (Norte) y Depto. Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La maduración meiótica de oocitos de anfibio involucra una caída transiente en los niveles de cAMP. Este hallazgo nos ha llevado a estudiar *in vivo* e *in vitro* la regulación de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE) usando (^3H)cAMP y (^3H)cGMP y el ensayo de Thompson et al (Meth. in Enz. Vol. 38).

Se han destacado 3 PDE que hidrolizan cAMP y por lo menos dos que actúan sobre cGMP. PDE I y II para cAMP están en el citoplasma y difieren en elución cromatográfica en DEAE-celulosa y en su K_m para cAMP. PDE I hidroliza cAMP y cGMP y PDE II es específica para cAMP. PDE I es activada de 8 a 10 veces por calmodulina de cerebro de bovino o de oocitos de *X.laevis*. PDE III está unida a membrana y se caracteriza por tener el K_m para cAMP más bajo ($\sim 0.1 \mu\text{M}$) y por requerir pH sobre 7.3 para su actividad. La actividad de PDE medida *in vivo* por microinyección de (^3H)cAMP y (^3H)cGMP no es activable por CDR ni es inhibible por 2-cloro-10(3 aminopropil)fenotiazina que inhibe todas las reacciones que requieren CDR. La actividad de PDE para cGMP *in vivo* es menor que la actividad detectable *in vitro* y co-inyección de cGMP no inhibe la hidrólisis de (^3H)cAMP. Los resultados obtenidos *in vivo* difieren considerablemente de los obtenidos *in vitro* sugiriendo que la actividad de PDE medible en la célula no estaría bajo control de CDR.

Ayudado por: Fundación Ford, O.E.A., PNUD/Unesco Proyecto RLA 78/024 y U. de Chile.

EXTRUSION DE H^+ DE MITOCONDRIA DE SNC DE RATAS QUE BEBEN ETANOL EN FORMA PERMANENTE Y FILIAL; EFECTO AcCHO. (H^+ extrusion in CNS mitochondria of rats drinking ethanol in a permanent and filial way; effect of AcCHO). Egaña, E., Ramirez M.T. y Schoellermann, S. Laboratorio de Neurobioquímica - Instituto de Medicina Experimental - Facultad de Medicina Sur Universidad de Chile - Santiago 7 - Chile.

La acción del EtOH sobre membranas ha motivado este estudio sobre efecto de la ingestión filial y permanente de EtOH (12% v/v como única fuente de bebida "A.G. rats" 68 generaciones) y de la supresión de EtOH ("A.G. rats" que después de la 48ª toman sólo agua "A.G./ H_2O " 23 generaciones), sobre funciones de membrana de mitocondria de SNC. Anteriormente comunicamos resultados sobre actividad ATPasa (Na^+ - K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} estimulada). En este trabajo se analizó la extrusión de H^+ ligada a la acumulación de Ca^{2+} -energía dependiente y la acción del AcCHO "in vitro" sobre este proceso. Se estudió también el efecto AcCHO, en iguales condiciones, sobre cada na respiratoria y se relacionó ambos procesos. Se usó mitocondria de tres áreas de SNC: corteza cerebral, hipotálamo y cerebelo. El movimiento de H^+ y el consumo de O_2 se midió simultáneamente en polarógrafo de Gilson con electrodo combinado Sensorox y electrodo Clark.

La extrusión de H^+ , que se expresa como la relación $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, descendió en SNC de rata "A.G." y "A.G./ H_2O " comparada con normal. AcCHO "in vitro" produjo inhibición de la eyección de H^+ en relación directa a su concentración, la que fue menor en los "A.G." y "A.G./ H_2O ". El efecto AcCHO se observó también sobre el estado 3 de cadena respiratoria, disminuyendo el R.C.R. al aumentar su concentración.

EFFECTO DE LA INGESTION AGUDA DE ETANOL EN LOS NIVELES DE GLUTATION HEPATICO, BILIAR Y SANGUINEO. (Effect of acute ethanol ingestion on the levels of hepatic, biliary and blood glutathione concentrations). Fernández N.¹, Valenzuela A., Fernández V.², Videla L.². 1. Unidad de Bioquímica. INTA. 2. Unidad de Bioquímica, Facultad de Medicina Occidente. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

El Glutati6n (GSH) es considerado el mas abundante componente sulfidrilo intracelular. El GSH y GSSG (oxidado) est1n involucrados en la actividad de mecanismos protectores de la c6lula contra el efecto deteriorativo de muchos agentes y/o sus metabolitos.

Se ha propuesto que el GSH participa en el metabolismo de per6xidos y que su descenso provocaría un desacoplamiento de los sistemas celulares que descomponen hidrop6xidos y H₂O₂ a metabolitos inactivos (sistemas GSH-Peroxidasa y GSSG-Reductasa).

La intoxicaci6n aguda con etanol (5g/kg peso) en ratas ayunadas provoca una disminuci6n del GSH intrahep1tico y un aumento de GSSG a las seis horas, aunque este 6ltimo no da cuenta de la reducci6n de GSH. Se produce, adem1s una disminuci6n del GSH y GSSG biliar y un aumento de la concentraci6n plasm1tica de ambos. En el gl6bulo rojo no hay cambios en el contenido total de glutati6n pero s1 un cambio en el estado de oxidaci6n. Se discute la relaci6n entre estos cambios metab6licos del GSH y el da1o hep1tico inducido por etanol. (Financiado por el Serv. Des. Cient. Art. Coop. Int. U. de Chile. Proj. B-691-802 y M-308-792).

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION DE METIONINA EN LA ACTIVIDAD DE RNA POLIMERASAS DE HIGADO DE RATA. (Effect of supplementation of methionine on the rat hepatic RNA polymerase activity). F. Garrido, E. Y1ñez y M. Perretta. INTA. Universidad de Chile.

La adaptaci6n de un organismo a las fluctuaciones dietarias, est1 dada por cambios bioqu1micos, consistentes esencialmente en variaciones de la s1ntesis proteica, la que repercute en el crecimiento celular.

En este trabajo se muestran los efectos nutricionales a diferentes niveles, por la ingesta de diferentes dietas elaboradas a partir de Lupino amargo suplementadas con 0.1, 0.2 y 0.3 % de DL-metionina.

La capacidad funcional midi6, determinando la actividad RNA polimer1sica en n6cleos aislados de h1gado, por la incorporaci6n de UMP-H³ de RNA, a alta y baja fuerza i6nica (FIA y FIB) con o sin α -amanitina.

Los resultados obtenidos demuestran que las ratas pierden peso con las dietas de lupino sin suplementar, y aquellas alimentadas con dietas suplementadas con metionina crecieron normalmente.

La actividad RNA polimer1sica (I, II) disminuye con las dietas de lupino solo y aumenta hasta valores sobre la normal en las suplementadas con metionina.

Los resultados obtenidos permiten deducir que la s1ntesis de RNA y prote1nas est1 condicionada a las ofertas dietarias de amino1cido esenciales y que uno de los niveles de regulaci6n es el de transcripci6n en el h1gado.

(Financiado en parte por los proyectos B 311-803 y A 307-781 del Servicio Desarrollo Científico, Artístico y Cooperaci6n Internacional. Universidad de Chile).

INHIBICION DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES MITOCONDRIAL POR GUANETIDINA. (Inhibition of mitochondrial electron transport by guanethidine) Ferreira, J., Gil, L., y Orrego, E. Deptos. de Bioquímica y Fisiología, Fac. de Medicina Norte, Universidad de Chile.

La guanetidina es un agente antihipertensivo que actúa bloqueando selectivamente las terminaciones nerviosas adrenérgicas. Esta droga, en un rango de concentraciones de 10 a 50 mM inhibi6 el consumo de O₂, la incorporaci6n de H⁺, el control respiratorio y el consumo de O₂ estimulado por DNF en mitocondrias de coraz6n, h1gado y cerebro de ratas.

La inhibici6n de estos procesos dependi6 de la concentraci6n de la droga y del tipo de sustrato oxidado, siendo mayor el efecto para los sustratos glutamato y succinato y menor para ascorbato + TMPD. Los resultados que se presentan sugieren que la guanetidina actuaría inhibiendo el transporte de electrones mitocondrial a nivel del sitio II de fosforilaci6n, en alguna regi6n del complejo III.

Este efecto podr1a ser importante para explicar el mecanismo de acci6n de esta droga.

Financiado por los Proyectos N° B 535-802 y B 396-803 de SDCA y CI U. de Chile.

PROTEINA QUINASAS DE OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS (Protein kinases from *Xenopus laevis* oocytes). Gonz1lez, C. y Véliz, M.; Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

Se han separado diversas formas de prote1na quinasa de oocitos y ovario de *X. laevis*, mediante cromatografía en columnas de DEAE-celulosa. Estas formas pueden distinguirse por su dependencia de cAMP y pueden ser comparadas con las prote1na quinasa de m6sculo esquelético de conejo y de coraz6n de bovino.

Estas formas han sido parcialmente purificadas, demostrándose en un l1quido sobrenadante de oocitos, la existencia de por lo menos tres especies. Estas mismas formas se encuentran en la fracci6n soluble de oocitos anucleados; en cambio en n6cleos aislados se observa s6lo una de ellas. La capacidad de uni6n de cAMP se encuentra asociada fundamentalmente a dos de las especies separadas. En el perfil de eluci6n de la cromatografía en DEAE-celulosa, se ha determinado tambi6n que una prote1na se autofosforila.

Se ha estudiado el efecto de las hormonas gonadotropina cori6nica (hCG) y progesterona en la maduraci6n de oocitos y su efecto sobre la actividad de las prote1na quinasa. La actividad total aumenta al incubar oocitos u ovario con progesterona. Este efecto desaparece al agregar, junto con progesterona, inhibidores de fosfodiesterasa.

Al medir la actividad total de prote1na quinasa despu6s de un per6odo de inyecci6n de las ranas con hCG, se observa que ésta aumenta; al incubar en presencia de progesterona, el efecto de hCG sobre la actividad de prote1na quinasa se potencia.

Ayudado por Fundaci6n Ford, O.E.A., PNUD/Unesco y Universidad de Chile.

MARCACION POR AFINIDAD DE LA QUINASA PIRUVICA MEDIANTE ADP-DIALDEHIDO. (Affinity labelling of Pyruvate kinase by ADP-dialdehyde). Hinrichs, M.V. y Eyzaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica de Chile.

Los derivados 2',3'-dialdehídos de nucleótidos han sido usados para marcar el sitio activo de varias enzimas. Hemos utilizado el derivado del ADP (oADP) con la quinasa pirúvica de músculo de conejo.

Se preparó oADP oxidando ADP con IO_4^- , y se purificó en Sephadex G-10. La enzima (homogénea) y el modificador se incubaron en tampón cacodilato 50 mM pH 7,8, midiéndose espectrofotométricamente la actividad residual.

La inactivación sigue cinética de pseudo primer orden. La velocidad de inactivación aumenta al subir el pH. No es posible revertir la inactivación por diálisis, adición de sustratos, Tris o lisina. No se requiere NaBH_4 para estabilizar el complejo inactivo. La unión entre oADP y enzima es saturable, estimándose cinéticamente 0,78 moles de oADP unidos por sitio activo. ADP y ATP (en especial en presencia de Mg^{+2}) protegen de la inactivación. El Mg^{+2} estimula la inactivación a bajas concentraciones, pero a altas protege parcialmente. El pK del grupo modificado se estimó en 8,77.

Se concluye que el oADP se une por afinidad al centro activo en el sitio de unión del ADP, combinándose posiblemente a la enzima mediante un enlace morfolino con un residuo de lisina.

ENZIMAS QUE METILAN HISTONAS EN OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS (Enzymes that methylate histones in *X.laevis* oocytes) Hinrichsen, V., Aranda, E., Seelenfreund, D. y Allende, J.E.; Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina (Norte) Universidad de Chile.

La modificación enzimática de las histonas altera las propiedades de la cromatina y podría jugar un papel en la regulación de la expresión genética. Se han estudiado en oocitos de *X.laevis* las enzimas capaces de metilar la histona H2B de timo de ternera, usando (^3H) (metil)S-adenosil metionina (SAM) como dador de metilos. En los ensayos, se incubaba en 140 μl de volumen 50 mM Tris-HCl pH 8., 4mM ditionitrotol, 80 μg de histona H2B, 10 mM (^3H)metil SAM (act. esp. 50 $\mu\text{c}/\mu\text{mol}$) y S-adenosil metil transferasa, durante 15 min. a 37°. La reacción se detiene con ácido tricloroacético al 10% y la radioactividad precipitable se cuantifica. El sobrenadante de un homogenizado de oocitos de *X.laevis* se somete a cromatografía en DEAE-celulosa, eluyéndose con un gradiente de 0 a 0.45 M KCl dos picos de actividad metilante (A y B). La fracción B requiere la presencia de Mg^{2+} y es totalmente inhibida por 10 mM EDTA mientras que la A no requiere metales. Las dos S-adenosil metil transferasas difieren además en su Km para SAM y en su sensibilidad a la inhibición por Cu^{2+} , pero se asemejan en su especificidad hacia los diferentes tipos de histonas. Análisis de los aminoácidos metilados por ambas enzimas demuestran que la enzima A metila preferentemente las lisinas mientras que la enzima B metila principalmente las argininas. Inyección en oocitos de histona H2B metilada *in vitro* permite establecer que los grupos metilos son estables dentro de la célula.

Ayudado por Fundación Ford, O.E.A., PNUD/Unesco RLA/78/024 y Universidad de Chile.

EFFECTO DE LA INHIBICION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS SOBRE LA REPLICACION DE EMBRIONES DE ERIZO DE MAR. (Effect of protein synthesis inhibition on replication of the sea urchin embryos) M. Imschenetzky; M. Puchi; P. Massone; S. Gamboa. Dento. Bioquímica U. de Concepción.

La expresión de los genes de histonas es coincidente y está ligada a la replicación del genoma en la mayoría de las células eucarióticas. Sin embargo, en etapas precoces del desarrollo embrionario estos dos eventos son no coincidentes: mPNA para histonas se encuentran preformados en oocitos y su traducción no ocurre exclusivamente durante la fase S del ciclo celular de cigotos.

La relación entre síntesis de proteínas y replicación del genoma fue investigada en *Tetrapygus niger*. Cultivos sincronizados y libres de contaminación bacteriana fueron bloqueados con cycloheximida: al fecundar el oocito; en etapa prerreplicativa y al comienzo de la primera fase S. Para cada experimento se analizó la incorporación de ^3H -dTTP en fracción nuclear TCA insoluble.

Los resultados obtenidos indican que se produce una inhibición de la síntesis de DNA si se bloquea la síntesis de proteínas a comienzos de la primera fase S. El bloqueo en G1 no afecta la primera onda replicativa. Sin embargo, si la síntesis de proteínas es inhibida al fecundar el oocito, se produce un aumento en la incorporación de ^3H -dTTP en el núcleo. Se discuten estos resultados en función de las proteínas sintetizadas de novo en las diferentes fases del primer ciclo de segmentación de los oocitos. Trabajo financiado por OEA y por VPI, Universidad de Concepción.

ACTIVIDAD DE RNA POLIMERASAS EN RATAS CASTRADAS-POLICITEMICAS. EFECTO DE ERITROPOYETINA Y TESTOSTERONA (RNA Polymerases activity in castrated-polycythemic rats. Effect of erythropoietin and testosterone) Johnson, M.C., Garrido, F., Carrido, A., Ronco, A.M. y Perretta, M.

INTA. Universidad de Chile.

La eritropoyesis está controlada por las hormonas eritropoyetina (EPO) y Testosterona (T) al regular la actividad de RNA polimerasas. Se ha demostrado que EPO induce la síntesis de pre-RNA_m y T activa la producción de pre-RNA_r.

Sirve de parámetro bioquímico para estimar la acción hormonal la incorporación de UMP- ^3H al RNA en núcleos aislados de médula ósea de rata, bajo condiciones de alta y baja fuerza iónica (FIA y FIB) y con o sin α -amanitina.

En este trabajo se presentan resultados obtenidos en ratas castradas-policitémicas que tienen niveles muy bajos de EPO y T circulantes.

La actividad RNA pol II no se altera en el animal castrado, mientras que la RNA pol I disminuye. En ratas castradas-policitémicas, la EPO aumenta la actividad a FIA y FIB, mientras que la T lo hace a FIA y muy poco a FIB.

Se concluye que en estos animales se mantiene un nivel mínimo apropiado de EPO y T endógenas para realizar la eritropoyesis. Frente a la acción de EPO y T exógenas, el sistema parece responder en forma diferente al del animal normal, estimulándose las RNA pol en forma inespecífica (Financia el Serv. Des. Cient., Art. y Coop. Int. U. de Chile. Proy. N° B 311-803).

RNAs SINTETIZADOS *IN VITRO* POR EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA PURIFICADO. (RNAs synthesized *in vitro* by purified african swine fever virus). Kuznar*, J., Salas, M.L. y Viñuela, E. Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid. *Depto. de Química, Facultad de Mat. y CC. Naturales, Universidad de Chile, Valparaíso.

El virus de la peste porcina africana (VPPA) contiene una actividad RNA polimerasa que sintetiza *in vitro* RNA complementario al DNA viral. Para determinar si el producto de la reacción contiene secuencias de poli A se estudió la sensibilidad a RNAsas del RNA marcado con ^3H -ATP *in vitro* y se efectuó el análisis del vecino más próximo del material marcado con ATP- ^{32}P .

Por sedimentación en gradientes de sacarosa del RNA sintetizado *in vitro* en presencia de ^3H -ATP y ^{14}C -UTP y posterior selección de las RNAs poliadeniladas se identifican 4 picos marcados con ambos isótopos y uno adicional marcado exclusivamente con ^3H -ATP. Este último (4S) presumiblemente corresponde a poli A libre. Si el experimento se efectúa marcando *in vitro* con S-adenosil (metil- ^3H) metionina y ^{14}C -UTP se obtienen esencialmente los mismos picos, coincidiendo la incorporación de grupos metilos tritiados con la de ^{14}C -UTP. El análisis del RNA marcado con ^3H -SAM reveló que la radiactividad se incorporó en un alto porcentaje a $7\text{mGpppA}^{\text{m}}$. Estos resultados indican que el VPPA sintetiza *in vitro* RNAs con las características estructurales de los mRNAs eucarióticos.

DETECCION DE UN POOL INTRAPEROXISOMAL DE FAD EN HIGADO DE RATA (Detection of an intraperoxisomal pool of FAD in rat liver). Lazo, O., González, O., Bronfman, M., y Leighton, F. Laboratorio de Citología Bioquímica, Departamento de Biología Celular Universidad Católica de Chile.

La oxidasa peroxisomal de ácidos grasos (OAG) es una flavoproteína con FAD como grupo prostético unido débilmente. Controla la actividad y especificidad del sistema de B-oxidación peroxisomal y su actividad es incrementada por drogas hipolipémicas como Clofibrato y Nafenopin. Clofibrato aumenta un 40% el contenido hepático de FAD. Estos antecedentes sugieren que el FAD podría ejercer un rol regulador sobre el sistema a través de la OAG.

Hemos estudiado el contenido y la distribución subcelular de FAD en ratas normales y tratadas con Nafenopin mediante el procedimiento de reactivación de apo-D-aminoácido oxidasa y fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial y gradientes continuos de densidad en Metrizamida.

Nafenopin no incrementa el contenido total de FAD hepático ($57\mu\text{g/g}$ hígado), pero induce una redistribución subcelular que produce un aumento de más de 3 veces del contenido peroxisomal.

Se detecta así, por primera vez, un pool peroxisomal de FAD en que es incrementado por Nafenopin de 6,8 a 22,5% del contenido hepático, lo que apoya nuestra hipótesis inicial de que el FAD podría ejercer un rol regulador sobre la OAG y por su intermedio del sistema peroxisomal de B-oxidación de ácidos grasos.

Financiado por Proyecto DIUC 50/79

MODIFICACION QUIMICA DE GRUPOS SULFIDRILOS EN PIRUVATO QUINASA DE CONCHOLEPAS-CONCHOLEPAS. (Chemical modification of sulphhydryl groups of Concholepas-concholepas muscle pyruvate kinase) León, O.; Morán, A.; González, R. y Muñoz, S. Depto. Bioquímica, ICMB. Universidad de Concepción. Chile.

La piruvato quinasa de músculo de *Concholepas-concholepas*, es una enzima tetramérica de peso molecular 230.000 daltons que requiere para su estabilización de agentes reductores como 2-mercaptoetanol. La enzima es inactivada por modificadores de grupos SH, por lo que se investigó la participación de tales grupos en la actividad catalítica con 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB).

Se encontró una cinética de inactivación bifásica en que la segunda fase conduce a una rápida inactivación de la enzima. También existe un efecto saturante en la inactivación a altas concentraciones de DTNB. Se obtuvo un valor para la constante de disociación Enzima-DTNB de $8.3 \times 10^{-4} \text{ M}$ y una constante máxima de inactivación de 0.62 min $^{-1}$.

El pKa de los grupos SH necesarios para la actividad fue de 8.2 y se encontraron 36 residuos de cisteína por mol de enzima, cuando ésta se tituló con DTNB en presencia de clorhidrato de guanidina 5M.

Sustratos y metales como Mg^{2+} protegen de la inactivación siendo el mejor protector la mezcla piruvato-magnesio.

Es interesante destacar finalmente, que la enzima modificada con un 20 a 40% de actividad residual no fue reactivada por 2-Mercaptoetanol ni Ditiotreitól.

ESTUDIOS CINETICOS DE E-PRENILSINTETASA DE FLAVEDO DE CITRUS SINENSIS. (Kinetic studies of E-Prenylsynthetase from Citrus sinensis). Loyola, G., Pérez, L.M., Cori, O. Lab. Bioquímica General. Fac. Ciencias Químicas y Farmacológicas. Universidad de Chile.

La E-C $_1$ Prenilsintetasa, purificada de polvo catiónico de flavedo de *C. sinensis* (naranja) cataliza la transformación de isopentenilpirofosfato + geranilpirofosfato en farnesilpirofosfato y PPI.

Las gráficas de dobles recíprocas con IPP constante, muestran una doble concavidad tanto a concentraciones por sobre 5 μM como por debajo de 2.5 μM de GPP. En cambio, cuando IPP es el sustrato variable, se observa solamente una concavidad por sobre 20 μM IPP. El efecto inhibitorio de GPP es parcialmente contrarrestado por concentraciones de IPP por sobre 50 μM . El patrón de las curvas obtenidas con IPP variable y a distintas concentraciones de GPP constante pasan por una pendiente mínima que luego aumenta al aumentar la concentración de GPP. Este efecto se observa también en la prenilsintetasa de pollo (Poulter et al. J.B.C. 254 9458 (1979)), si bien los autores no lo comentan.

La interpretación más plausible de estos resultados sería la de un mecanismo secuencial al azar, pero complicado probablemente por la existencia de una ruta preferencial y complejos de fondo de saco.

BIOSINTESIS DE ISOPRENOIDES. INCORPORACION DE ^{14}C -MVA POR UN SISTEMA ENZIMATICO DE FLAVEDO DE CITRUS PARADISI. (Terpene biosynthesis. Incorporation of ^{14}C -MVA by an enzyme system from Citrus paradisi flavedo). Lozada, R*, Pérez, L.M., Cori, O. Lab. Bioquímica. Fac. Ciencias Quím. y Farmacol., Univ. de Chile y *Dpto. Química, Univ. de Antioquia (Medellín), Colombia.

Un extracto libre de células obtenido de flavedo de *C. paradisi* (pomelo o toronja), transforma $2\text{-}^{14}\text{C}$ -MVA en presencia de ATP y metales bivalentes en prenoles y prenifosfatos de 5 a 15 átomos de carbono.

El Mn es el ión más efectivo. En su presencia se forman isoprenoides de conformación Z y E identificados por TLC, en tanto que con Mg se forman solamente compuestos E.

El KF disminuye la formación de prenoles por inhibición de fosfatasa. Como además disminuyen los prenifosfatos, se puede concluir que esta inhibición afecta también a otras enzimas de esta ruta biosintética.

El DTNB $4\ \mu\text{M}$ o p-Cl mercuribenzoato $20\ \mu\text{M}$ inhiben la formación de todos los intermediarios identificados. Esto indica que no sólo la IPP isomerasa y las prenifosfatasas, sino que también las quinasa del sistema requieren la presencia de grupos -SH intactos.

Este sistema se asemeja al obtenido de *Pinus radiata*, en todos los aspectos hasta ahora estudiados, lo que recalca la unidad de sistemas biosintéticos en taxa bastante alejados.

CARBAMILACION DE TUBULINA Y SU EFECTO EN LA FORMACION DE MICROTUBULOS (Carbamylation of tubulin and microtubule assembly). Maccioni, R., Mellado, W. y Slebe, J.- Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

El ensamblaje de los microtúbulos desde tubulina cerebral purificada por ciclos de polimerización y despolimerización y liberada del nucleótido intercambiable, requiere GTP. Estudios preliminares (J. Cell. Biol. 75, 285a, 1977) han sugerido que residuos lisina de la tubulina estarían involucrados en la unión de GTP necesaria para el ensamblaje.

Se han realizado estudios de modificación química de la tubulina para investigar el mecanismo de formación de microtúbulos. La carbamilación de tubulina con KNCO a 25° , pH 6,4, produjo una disminución en su capacidad para formar microtúbulos siguiendo una cinética de primer orden aparente ($k_{\text{obs}} = 0.115\ \text{min}^{-1}$). Esta modificación mostró como características más relevantes: alteración de la velocidad y nivel de polimerización de tubulina, función de saturación de la inactivación respecto a la concentración de KNCO dependencia del pH y una protección por GTP.

Experimentos cinéticos de incorporación con KNC^{14}O indican que la pérdida de actividad polimerizante está relacionada con la modificación irreversible de un residuo de lisina de la tubulina. (Proyecto RS-79-9 DIUACH).

CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS DE DOS ISOPIRASAS DE S. TUBEROSUM (Quantification of amino acids of two isopyrases from S. tuberosum) Mancilla, M., Kettlun, A.M., Valenzuela, M.A., Traverso-Cori, A. Laboratorio de Bioquímica, Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas. Universidad de Chile. (Santiago)

La apirasa es una pirofosfodrolasa de tejidos vegetales que cataliza la hidrólisis de enlaces pirofosfóricos, en presencia de un metal bivalente, siendo la cadena pirofosfórica el único requerimiento estructural del sustrato.

Se han purificado a homogeneidad dos isoenzimas provenientes de variedades de S. tuberosum: Pimpernel y Desirée. Estas isoenzimas tienen igual P.M., pero difieren en su pI y comportamiento cinético, a pesar de que ambos sitios activos contienen los mismos residuos de aminoácidos.

En ambas isoenzimas se determinó: a) el pI por electroenfoque encontrándose dos unidades de pH de diferencia; b) el contenido de residuos de triptofano; c) SH libres y puentes disulfuro y d) la composición porcentual de aminoácidos.

Las diferencias en el contenido de aminoácidos entre ambas isoenzimas explicaría los pI encontrados y también la existencia de un microambiente distinto que envolvería los mismos residuos amiacídicos del sitio activo de estas apiraras.

MECANISMO DE LA INACTIVACION DE LA GLUCOQUINASA POR 5,5'-DITIOBIS(2-NITROBENZOATO). (Mechanism of glucokinase inactivation by 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate). Monasterio, O., Heberlein, U., Orellana, O. y Niemeyer, H. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La glucoquinasa de hígado de rata era inactivada a 30° y pH 8 por 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato) (DTNB). La cinética de inactivación era multifásica y DTT revertía totalmente la inactivación. La primera fase, caracterizada por una constante de pseudo-primer orden (k_1), era responsable de un 70 a 80% de pérdida de la actividad en 1 a 3 min. El efecto de la concentración de DTNB sobre k_1 sugiere la formación de un complejo enzima-DTNB. Mediante la protección de la inactivación se pudieron determinar las constantes de disociación aparentes para glucosa, 2-desoxiglucosa y ADP, que fueron 2,5, 28,9 y 3,1 mM, respectivamente, a DTNB $2\ \mu\text{M}$. Estos valores se mantenían a otras concentraciones de DTNB, sugiriendo cambios conformacionales responsables de interacciones no competitivas entre los ligandos y el DTNB. Glucosa-6-fosfato aumentaba ligeramente (20%) la inactivación. ATP y MgATP ejercían un pequeño, pero reproducible, efecto protector (10%) y no modificaban el efecto protector de ADP o AMP. En contraste, ATP y MgATP protegían a la glucoquinasa de la inactivación por fotooxidación catalizada por rosa de bengala. El conjunto de resultados es compatible con la operación de un mecanismo cinético con una ruta preferencial donde el azúcar sería el primer sustrato y ADP el último producto. (Financiado por U. de Chile, OEA y PNUD-UNESCO).

METOPRENO E HIDROPRENO SON METABOLIZADOS POR HIDROLISIS DEL ENLACE ESTER EN HEPATOCITOS AISLADOS (Methoprene and Hidroprene are metabolized by ester cleavage in isolated hepatocytes) Morello, A., Repetto, Y., Agosin, M. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Metopreno (isopropil-2E-4E-11-metoxi-3,7,11-trimetil dodeca-2,4-dienoato) e hidropreno (etil-2E,4E,3,7,11-trimetil dodeca-2,4-dienoato) son análogos de la Hormona Juvenil (JH) de insectos. Su metabolismo en hepatocitos aislados de rata y en fracciones subcelulares de hígado se estudió usando como técnica analítica la cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Ambos compuestos fueron rápidamente absorbidos por los hepatocitos y sus metabolitos excretados al medio de incubación. Metopreno e hidropreno fueron metabolizados principalmente a sus respectivos ácidos y en menor grado a glucuronidos. La actividad esterásica se encontró localizada en la fracción microsomal y fué completamente inhibida por tri-*o*-tolilfosfato en hepatocitos y en la fracción microsomal suplementada con NADPH. Las vías metabólicas de hidropreno y metopreno en hepatocitos pueden explicar la baja toxicidad aguda de estos compuestos.

PURIFICACION PARCIAL DE CITOCROMO P-450 DE HIGADO DE RATAS NO INDUCIDAS. (Partial purification of cytochrome P-450 of non induced rat liver). Pedemonte, J., Olate, J., Cervantes, P. y Gil, L. Fac. Medicina, U. de Chile.

Microsomas de ratas cepa Wistar se solubilizaron en colato de sodio 0.6%, el sobrenadante de 105.000 g x 1 hr, se llevó a una columna de octilamina sefarosa 4B. Después de lavar con diferentes buffers se eluyó el citocromo P-450 con TN-101 (0.16%), recuperándose el 50% de la cantidad inicial con una a.e. de 5. Esta fracción diluída 15 veces se volvió a pasar por octilamina sefarosa 4B; se obtuvo dos fracciones de citocromo P-450. La fracción A eluyó con buffer contenido TN-101 (0.05%) con una a.e. de 5. La fracción B eluyó con buffer conteniendo TN-01 (0.16%) a.e. de 8. La fracción B se ajustó a 40 mM fosfato y se pasó por hidroxilapatita: celulosa (1:1) equilibrada con 40 mM fosfato TN-101 (0.16%). El 50% del citocromo P-450 no fue retenido (BII) y el resto se eluyó con buffer 150 mM (BI) con una recuperación de 39%. Las fracciones BI y BII estaban libres de citocromo b₅ y ambas reductasas, las a.e. fueron 8 y 10 respectivamente. Electroforesis en PAGE-SDS mostró dos bandas BII y cuatro para BI. El método descrito proporciona una técnica simple, reproducible y con rendimientos superiores a los reportados en la literatura. Financiado por Proyecto N° B 535-802 del SDCACI de la Universidad de Chile.

ACTIVIDAD PROTEOLITICA, UNIDA A CROMATINA EN HUEVO DE ERIZO NEGRO ACTIVADO CON AMONIO. Chromatin Bound Proteolytic Activity from ammonia activated sea urchin egg. Ponce, O.; Sánchez, L.; Merino, V.; Silva, V.; Fernández, J.; Enríquez, S. Depto. Bioquímica, Instituto de Ciencias Médicas Biológicas, Universidad de Concepción.

Se ha aislado y caracterizado de cromatina de huevo no fecundado de erizo negro una actividad proteolítica que degrada selectivamente proteínas cromatínicas.

La cromatina fue obtenida desde huevos activados con ClNa₄ 10 mM pH 7.5. Desde ella se extrajeron con concentraciones de ClNa 0.7, 1, 2 y 3 M actividades proteolíticas endógenas detectadas por electroforesis en geles de poliacrilamida S.D.S.

La actividad de la fracción soluble en 0,7 M NaCl es selectiva para proteínas cromatínicas especialmente las de más alto peso molecular. Las otras actividades proteolíticas presentan diferentes especificidades de la que se extrae con ClNa 0,7 M, siendo la actividad presente de la fracción soluble 3 M la menos específica. En todos los casos PMSF 2 mM inhibe estas actividades en forma parcial y selectiva.

En conclusión en la cromatina del huevo activado existen actividades proteolíticas de acción selectiva sobre proteínas cromatínicas y se postula tendrían un posible rol en la regulación de la expresión génica.

DISTRIBUCION CELULAR DE LAS ISOENZIMAS FOSFORILANTES DE GLUCOSA EN HIGADO DE RATA. (CELLULAR DISTRIBUTION OF GLUCOSE PHOSPHORYLATING ISOENZYMES IN RAT LIVER). Reyes, A. y Cárdenas, M. L. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

En hígado de rata se han descrito cuatro isoenzimas capaces de fosforilar glucosa: tres de K_m baja (hexoquinasas A, B y C) y una de K_m alta (glucoquinasa o D). Existe además N-acetilglucosamina-quinasa que también puede fosforilar glucosa (alta K_m). La opinión predominante es que los hepatocitos sólo contendrían glucoquinasa y que la actividad hexoquinásica estaría confinada a las células sinusoidales. Sin embargo, algunos autores han presentado datos que sugieren la existencia de una o más hexoquinasas en los hepatocitos. La duda semantiza porque los métodos para aceptar o rechazar la presencia de hexoquinasas no han sido adecuados. No hay información sobre la N-acetilglucosamina-quinasa.

En este trabajo se aplica la cromatografía en DEAE-celulosa para estudiar la composición isoenzimática de hepatocitos y de células sinusoidales aisladas. La actividad fosforilante de glucosa se determinó espectrofotométricamente o midiendo en un contador de centelleo el [¹⁴C]-glucosa-6-P formado a partir de [¹⁴C]-glucosa.

Todos los perfiles obtenidos de hepatocitos indican la presencia constante de las isoenzimas A, C y D, identificadas por la posición de elución y por los cocientes de actividad a 0,2 y 2 mM glucosa. La isoenzima B, de estar presente, se encontraría en muy baja proporción. En las células sinusoidales se identificó la presencia de hexoquinasas A, B y C, estando ausente D. La N-acetilglucosamina-quinasa se detectó, espectrofotométricamente sólo en los hepatocitos, pero no en las células sinusoidales. (Financió: OEA, PNUD/UNESCO, U de CHILE).

PURIFICACION PARCIAL DE LA HORMONA UTEROTROFICA PLACENTARIA (UTPH). (Partial purification of uterotropic placental hormone) Rojas, I., y Beas, F. Depto. Materno Infantil, Facultad de Medicina Sur, Universidad de Chile, Hospital Paula Jaraquemada.

En diversas preparaciones de hormona uterotr6fica placentaria se ha demostrado la presencia de Inmunoglobulinas A, G y M. Con el fin de buscar una manera de purificar la hormona de estos contaminantes y conocer la influencia que su presencia puede tener sobre su actividad biol6gica se dise1on6 un m6todo basado en cromatograf1a de afinidad.

A Sepharosa activada se ligaron anticuerpos antiinmunoglobulina G con la cual se rellen6 una columna de 6,9 X 0,37 cm (3 ml). A esta columna se aplic6 una muestra de UTPH obteni6ndose al eluir con buffer fosfato 0,01 M pH 7,8 dos fracciones de prote1na, ambas con actividad inmunol6gica frente a anticuerpo anti UTPH y una de ellas con actividad biol6gica en la prueba de crecimiento de 6teros de ratones imp6beres los cuales mostraban a6n la presencia de inmunoglobulina M e inmunoglobulina A.

En otro grupo de experimentos se ligaron anticuerpos antiinmunoglobulinas totales a la Sepharosa activada obteni6ndose un eluido libre de inmunoglobulinas pero que conserva la actividad biol6gica e inmunol6gica frente a antisuero anti UTPH.

Se concluye que la purificaci6n de la UTPH de las inmunoglobulinas "contaminantes" por este m6todo preservaba la actividad biol6gica de las preparaciones de UTPH y 6sta mantiene tambi6n su capacidad inmunol6gica.

EFFECTOS DE UNA DIETA PROTEICA SOBRE EL SISTEMA OXIDATIVO MICROSOMAL DE RATAS CON DESNUTRICION CALORICO-PROTEICA (Effects of a protein diet on the mixed function oxidase system in rats with protein-calorie malnutrition) Salazar, I., Pedemonte, J. y Gil, L.; Depto. de Bioqu1mica, Facultad de Medicina (Norte) U. de Chile.

Ratas j6venes con desnutrici6n cal6rico proteica aguda fueron alimentadas con una dieta aptoteica por 14 d1as y separadas en dos grupos. El grupo A continu6 con la dieta aptoteica por 6 d1as y el grupo B fue realimentado por el mismo tiempo con una dieta de case1na 10% NDpcal. Los efectos de la realimentaci6n en los componentes y en la actividad oxidativa microsomal hep6tica fueron comparados con ratas normales de la misma edad y con ratas del grupo A. La realimentaci6n produjo con respecto a las ratas del grupo A un aumento m6ximo a los 4 d1as, de alrededor de 400% en el contenido de citocromo P-450, citocromo b5, y en la actividad NADH citocromo c reductasa, NADPH citocromo c reductasa, aminopirina y etil morfina N-desmetilasas. Estos valores fueron a6n superiores a los obtenidos en ratas normales. El espectro diferencial con CO present6 un m6ximo de absorci6n a 450 nm en ratas normales, 452 nm en ratas desnutridas, 451 nm en ratas desnutridas realimentadas por 4 d1as y 450 nm en ratas desnutridas realimentadas por 6 d1as. Electroforesis en slab geles de SDS-poliacrilamida sugieren que los cambios en el espectro diferencial con CO estar1an relacionados con cambios en la composici6n de las diferentes especies de citocromo P-450.

Financiado por Proyecto B-535-802 del SDCACI, U. de Chile.

REACCION DE CIANATO CON GRUPOS FUNCIONALES DE FRUCTOSA 1,6-BIFOSFATASA. (Reaction of cyanate with functional groups in Fructose 1,6-bisphosphatase). Siebe, J. C., Herrera, R., Ojeda, A., y Maccioni, R. - Instituto de Bioqu1mica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

La Fructosa 1,6-bifosfatasa (FDPasa) es inhibida alost6ricamente por AMP. Se ha demostrado que KNCO carbamila irreversiblemente grupos amino relacionados con esta inhibici6n

Se estudi6 la caracterizaci6n de lisinas reactivas, involucradas en la interacci6n FDPasa-AMP, siguiendo las velocidades de p6rdida de la cooperatividad y sensibilidad a AMP y tambi6n la velocidad de reacci6n con $KN^{14}CO$. La disminuci6n del coeficiente de Hill (n_H) por el tratamiento con NaNCO (50mM) pH 7.5 y 37° sigui6 una cin6tica de pseudo primer orden ($k_{obs}=0.017 \text{ min}^{-1}$). Este efecto fue protegido por la presencia de AMP (1mM) pero no por el sustrato FDP (25mM). La sensibilidad para AMP (medida por cambios en el K_i para AMP) disminuy6 con una cin6tica bif6sica con k_{obs} de 0.150 y 0.018 min^{-1} . La K_i no fue afectada cuando la modificaci6n se hizo en presencia de AMP y/o FDP. En condiciones de protecci6n con FDP se incorpor6 1 mol de $KN^{14}CO$ /mol de mon6mero. Hidr6lisis triptica de la FDPasa carbamilada, permiti6 aislar un p6ptido radioactivo que corresponder1a a la regi6n de la prote1na que contiene el residuo de lisina involucrado en la interacci6n entre las subunidades. (Proyecto RS-79-9.DI-UACH).

METODOS UTILIZADOS EN DETECCION Y MEDICION DE OXIDASA PEROXISOMAL DE ACIDOS GRASOS (Methods utilized for detecting and measuring peroxisomal fatty acid oxidase). Ulloa, N., Necochea, C., Bronfman, M., Leighton, F. - Departamento de Biologia Celular Universidad Cat6lica de Chile.

La medici6n de oxidasa peroxisomal de 6cidos grasos (OAG), por detecci6n de consumo de O_2 (Ines trasa, Bronfman y Leighton), permiti6 medir OAG en h1gado de rata y humanos, detectando hasta 10^{-9} moles de O_2 . Nuestro objetivo es aumentar la sensibilidad para evaluar OAG en otros tejidos. Desarrollamos 3 m6todos, que se basan en la medici6n de H_2O_2 producida por OAG cuando cataliza la oxidaci6n de un Acil-CoA a Enoil-CoA. Los m6todos son: 1) Acoplamiento peroxidativo con aminoantipirina y fenol como sustratos peroxidables; 2) Inactivaci6n irreversible de catalasa por 3-amino-1,2,4-triazol en presencia de H_2O_2 producida por OAG; 3) Acoplamiento peroxidativo con leuco-2',7'-diclorofluoresce1na como sustrato peroxidable.

Se concluye que el m6todo de detecci6n polar6grafica de O_2 y el peroxidativo con aminoantipirina y fenol tienen sensibilidades del mismo 6rden. El m6todo de inactivaci6n irreversible de catalasa es 10 veces m6s sensible. A6n mayor sensibilidad present6 el m6todo peroxidativo con leuco-diclorofluoresce1na que fue aproximadamente 100 veces m6s sensible que la detecci6n de consumo de O_2 . En consecuencia podemos detectar cantidades del orden de los 10^{-11} moles de H_2O_2 producida por OAG.

Financiado por Proyecto DIUC 44/80.