

SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE

XII Reunión Anual
11 al 13 de agosto de 1988

Cartagena, Chile

**Resúmenes de
SIMPOSIOS Y COMUNICACIONES**

CONFERENCIA PROFESOR OSVALDO CORI

BIOSINTESIS Y EXPRESION DE GANGLIOSIDOS DURANTE LA DIFERENCIACION DE CELULAS NEURALES. (Biosynthesis and expression of ganglyosides during differentiation of neural cells). Maccioni, H.J.F. CIQUIBIC (UNC-CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Biológica, CC61, 5016 Córdoba, Argentina.

Los gangliósidos son glicolípidos complejos caracterizados por poseer ácido siálico. Forman parte de la hemicapa externa de las membranas plasmáticas de células superiores, en las que se insertan por la región hidrofóbica exponiendo el oligosacárido al espacio extracelular. Están particularmente concentrados en las membranas del sistema nervioso (SN). Se los considera involucrados en el control de la proliferación celular, adhesión intercelular, eventos sinápticos, neuritogénesis y plasticidad neuronal. La biosíntesis del oligosacárido se realiza en el complejo de Golgi del soma neuronal, por la adición de monosacáridos a partir de nucleótido azúcares. Desde allí son transportados a la superficie neuronal, llegando a los terminales sinápticos en la onda rápida del transporte axonal.

La composición del oligosacárido de los gangliósidos cambia durante la ontogénesis del SN. En estadios proliferativos e indiferenciados abundan los gangliósidos carentes del disacárido terminal galactosil-N-acetilgalactosamina (GD3), mientras que en estadios diferenciados abundan los que contienen dicho terminal (GD1a). Estos cambios parecen ser consecuencia de la modulación por desarrollo de glicosiltransferasas claves de la biosíntesis, en forma específica para cada tipo celular, y que caracterizan al menos tres estadios celulares: neuro-glioblástico, diferenciado terminal (neuronas) y diferenciado no-terminal (algunos tipos gliales).

SIMPOSIO PROTEINAS: ESTRUCTURA Y FUNCION I

Coordinador: J. Eyzaguirre

ESTRUCTURA Y FUNCION DE FOSFOFRUCTOQUINASA. ESTRATEGIAS GENETICAS. (Structure and function of phosphofructokinase. Genetic strategies.) Babul, J. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Una de las herramientas genéticas más utilizadas para determinar el rol estructural o funcional de determinados aminoácidos en una proteína es cambiarlos por otros y examinar las propiedades de la proteína alterada. De especial interés son aquellos casos en que se someten a prueba las hipótesis sobre la importancia de algunos residuos de aminoácidos de proteínas cuya estructura se conoce a nivel atómico. Antes del desarrollo de la tecnología del DNA recombinante estos cambios se efectuaban por medio de mutaciones fenotípicas y, posteriormente, se ha hecho frecuente el uso de la mutagénesis dirigida del DNA que codifica a la proteína.

Estas estrategias han sido útiles para separar las características estructurales y funcionales, especialmente en el caso de enzimas reguladoras que, como la fosfofructoquinasa (Pfk), son estructuralmente complejas. Con *E. coli*, se ha conseguido obtener por mutación fenotípica cepas que presentan defectos de crecimiento cuyas Pfk son insensibles a la inhibición por ATP. Además la enzima mutada difiere de la normal en su estabilidad, mecanismo cinético y en el efecto de los sustratos sobre el estado de agregación. Por otra parte, cepas en las que una Pfk que presenta cinética hiperbólica (Pfk-2) reemplaza a otra que posee cinética sigmoidea con respecto a uno de los sustratos (Pfk-1), no son afectadas en su crecimiento. Al reemplazar por mutagénesis dirigida un residuo del sitio para el inhibidor P-enolpiruvato en Pfk-1, este compuesto se convierte en activador. Otros reemplazos han permitido conocer el rol de algunos residuos en el proceso catalítico.

Financiado por DTI (U. de Chile), Fondecyt y OEA.

MODIFICACION QUIMICA DEL SITIO ACTIVO DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE LEVADURAS. (Chemical modification of yeast phosphoenolpyruvate carboxykinase active site). E. Cardemil, S. Aráneda, M.V. Encinas, A.M. Jabalquinto, V. Quiñones, C. Saavedra. Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile.

La descarboxilación enzimática del oxaloacetato es una de las primeras etapas de la gluconeogénesis a partir de compuestos de 3 y 4 átomos de carbono. Este paso es catalizado por la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (PEPCK) en una reacción que requiere un nucleósido trifosforilado que, dependiendo de la especie, puede ser ATP, GTP o ITP.

La PEPCK es un monómero en la mayoría de las especies, un dímero de *T. cruzi*, un tetramero en levaduras, y un hexámero en plantas. En la mayoría de los casos, la masa molecular del monómero fluctúa entre 64 y 70 kDa, presentando alrededor de un 60% de homología en las secuencias primarias descritas para las enzimas de hígado de rata, de hígado de pollo y de *D. melanogaster*. En relación a las enzimas poliméricas, se tiene un conocimiento menor en cuanto a su estructura. Por ello, con el objeto de obtener información directa acerca de la estructura del sitio activo en estas enzimas que, junto con permitir un mejor entendimiento del proceso catalítico, pueda ser empleada para establecer relaciones estructurales entre carboxiquinasas de diferente estructura cuaternaria, hemos comenzado a estudiar la enzima de levaduras. Se discute la incorporación de sondas fluorescentes y radiactivas a la enzima de *S. cerevisiae*.

Financiado por DICYT-USACH y FONDECYT-CHILE.

PIRUVATO QUINASA: ESTRUCTURA Y FUNCION. (Pyruvate kinase: structure and function). Eyzaguirre, J. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

La piruvato quinasa (PK) es una enzima que participa en la regulación de la vía glicolítica, y que cataliza la transferencia de fosfato del fosfoenolpiruvato al ADP con formación de ATP y piruvato.

Importantes avances se han hecho recientemente en nuestros conocimientos sobre estructura y función de esta enzima. Actualmente se conoce la secuencia aminoacídica de las PK de hígado humano y de rata, de músculo de gato y de pollo y de levadura, las que muestran una homología significativa. La estructura tridimensional de la enzima de músculo de gato ha sido establecida por difracción de rayos X con una resolución de 2.6 Å.

Experimentos de modificación química han permitido determinar la participación de lisinas, cisteínas, argininas e histidinas como residuos esenciales para la función catalítica, si bien sólo se ha localizado en la estructura la participación de lisinas. Nuestro laboratorio, utilizando marcación por afinidad con ADP-dialdehído, seguida de ruptura triptica y purificación y secuenciación del péptido marcado, han establecido la participación de esta lisina esencial en la enzima de músculo de conejo, que estaría situada en el sitio de unión del nucleótido. También se ha localizado una lisina igualmente reactiva en una ubicación equivalente de la enzima de levadura, y por otros autores en la de músculo de gato.

Utilizando la estructura de la enzima de gato como punto de referencia, se ha ubicado esta lisina en uno de los alfa hélices del dominio A de la enzima, que está situado a la entrada del sitio activo.

Financiado en parte por DIUC.

REGULACION Y AGREGACION DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA (Regulation and aggregation of fructose 1,6-bisphosphatase). Slebe, J.C., Reyes, A., Rodríguez, P., Ludwig, H. y Hubert, E. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile

La multiplicidad de mecanismos de control que afectan la actividad de fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) indica que su modulación es compleja, razón que ha dificultado el conocimiento del mecanismo de la interacción de la enzima con sus ligandos. El dilucidar varios aspectos de la relación entre la estructura de la FBPasa y su función *in vivo*, constituye el objeto de interés de nuestras investigaciones.

Para comprender la regulación de esta enzima, hemos utilizado técnicas de modificación química, de análisis de estructura primaria y estudios espectroscópicos, empleando espectroscopía diferencial ultravioleta, fluorescencia y resonancia magnética nuclear. Hemos logrado caracterizar algunos residuos de aminoácidos implicados en la regulación de la actividad, obtener información acerca del microambiente de sitios de unión de ligandos y localizar algunos de estos sitios en la estructura de la proteína. Discutiremos como la combinación de estas técnicas ha proporcionado información acerca de las propiedades de los dominios y aun de aminoácidos individuales en la enzima, así como de la existencia de cambios conformacionales vinculados a su función catalítica.

Finalmente, se relacionará un cambio conformacional, inducido por cationes monovalentes, con una autoagregación de tipo filamentosa de la proteína. Esta asociación podría estar relacionada con una posible interacción *in vivo* de la FBPasa con otras proteínas citosólicas, situación que se está analizando por microscopía electrónica y otras técnicas adecuadas para detectar asociaciones débiles entre proteínas.

(Financiado por: DIC-UACH, RS-85-26; FONDECYT, 179/87)

SIMPOSIO PROTEINAS: ESTRUCTURA Y FUNCION II

Coordinador: J. Eyzaguirre

ESTRUCTURA, CATALISIS Y REGULACION DE APIRASAS VEGETALES Y ANIMALES. (Structural, catalytic and regulatory characteristic of plant and animal apyrases). Aida Traverso-Cori. Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

An ubiquitous diphosphohydrolase (EC. 3.6.1.5.) commonly called apyrase has been described in plant and animal tissues. This enzyme hydrolyses only pyrophosphate bonds from di and triphosphate of organic and inorganic substrates in the presence of bivalent metals. Homogeneous isoapyrase from some varieties of *Solanum tuberosum* tubers were obtained in order to perform studies on structural, kinetics and physicochemical properties as well as amino acid residues involved in the catalytic site of the isoenzymes.

Mammalian apyrase has been described in microsomal membrane of porcine pancreas, mammary and salivary glands, and bovine aorta. This ADP-hydrolysing enzyme has also been found and studied in blood-feeding arthropods salivary glands because of its inhibition of platelet aggregation which is due to the apyrase hydrolysis of ADP.

Activating and inhibitory proteins that modulate ATPase and ADPase activities of apyrase have been found in plant tissue. Although the apyrase activating protein is not a pure fraction it is different from calmodulin.

Cross reaction immunity exists between plant and animal apyrases.

FINANCED BY THE UNIVERSITY OF CHILE AND FONDECYT.

ESTRUCTURA, LOCALIZACION SUBCELULAR Y FUNCIONES BIOLOGICAS DE LA ARGINASA. (Structure, subcellular localization and biological functions of arginase). Nelson Carvajal. Depto. Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

La arginasa es la enzima terminal del ciclo de la urea aunque se la encuentra también en especies y tejidos no ureotéticos, en los que participaría en la síntesis de prolina y el catabolismo de la arginina. Numerosos estudios han intentado correlacionar las funciones biológicas de la arginasa con algunas propiedades particulares de la enzima. Los resultados obtenidos indican que:

A) los monómeros son activos y, en algunos tejidos se asocian para generar especies moleculares con propiedades regulatorias; B) las arginasas de tejidos ureotéticos y no ureotéticos se diferencian en algunas propiedades cinéticas, y C) la función biológica de la arginasa está determinada por su localización subcelular.

Una propiedad general de las arginasas es su total dependencia de un metal activador (Mn^{2+}), el que les confiere una gran estabilidad térmica, demostrada por mediciones cinéticas, de difracción circular y emisión de fluorescencia. En su ausencia, las arginasas oligoméricas se disocian en subunidades inactivas que se desnaturan rápidamente a temperaturas superiores a $37^{\circ}C$. Estas son estabilizadas también por la unión de sustratos e inhibidores competitivos, lo que sugiere que el metal no es esencial para la unión del sustrato y desempeña una función especialmente catalítica. Mediante estudios de protección a la inactivación térmica y modificación química de las subunidades, se han determinado las constantes de disociación para sustratos e inhibidores competitivos. Los valores obtenidos concuerdan con los determinados cinéticamente.

MARCAJE POR AFINIDAD DE METIONIL-tRNA SINTETASA DE *E. COLI*. (Affinity labeling of *E. Coli* methionil tRNA Synthetase.)

Oscar León¹ y Ladonne Schuiman². ¹Depto. Biología Molecular, Universidad de Concepción. ²DBC Albert Einstein College of Medicine, Bronx, N. Y. 10461. U.S.A.

La interacción específica del RNA de transferencia con su respectiva aminoacil-tRNA sintetasa es un modelo atractivo para el estudio del reconocimiento RNA-proteína. Sin embargo, estos estudios se han visto dificultados ya que no ha sido posible obtener co-cristales adecuados para el análisis por difracción de rayos X.

Con el objeto de obtener información acerca de la orientación de ambas macromoléculas en el complejo enzima-tRNA se desarrollaron nuevos métodos de entrecruzamiento utilizando derivados de tRNA portando grupos reactivos dirigidos a Lisina en diferentes sitios de la molécula. Así, el reactivo bifuncional Ditiobis-(succinimidil)-propionato se unió al extremo 5'p, D-loop, anticodon y extremo CCA. Estudios previos, utilizando este derivado, establecieron que cuatro lisinas (Lis 402, 439, 465 y 640) fueron modificadas. En este trabajo se presenta la determinación de los sitios en el tRNA a los cuales cada una de las lisinas estaba unida. Los resultados indican que los peptidos conteniendo Lis 402, 439 estaban unidos al D-loop Lis 465 al anticodon y Lis 640 al extremo 5' del tRNA.

DTSP también se unió a la base rara X en tRNA^{met}. La reacción de entrecruzamiento es específica y un solo péptido fue aislado y secuenciado (Lis 596).

Finalmente se diseñó un nuevo reactivo bifuncional de entrecruzamiento (Succinimidil-Bromoacetil-Aminobenzoato). Este reacciona específicamente con $s^{34}U$ en tRNA^{met}. Estudios de marcaje por afinidad con el derivado obtenido indican una reacción específica, estequiométrica y dos péptidos han sido aislados (Lis 402 y 439).

Los datos así obtenidos junto con datos estructurales de la enzima a $1.8^{\text{Å}}$ (en progreso) serán utilizados en la construcción de un modelo del complejo tRNA-sintetasa.

USO DE METODOS DE PREDICCION DE ESTRUCTURA SECUNDARIA EN ESTUDIOS DE ESTRUCTURA Y FUNCION DE β -LACTAMASAS.

(Use of secondary structure prediction methods in the study of the structure and function of β -lactamases) H. Cid, M. Bunster, J. Martínez, L. Barros, V. Vargas y O. Carrillo. Lab. de Biofísica Molecular, Depto. de Biología Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Universidad de Concepción.

Nuestro objetivo fue desarrollar una metodología que permitiera obtener información estructural preliminar, antes o paralelamente con el proceso de cristalización de una proteína, uno de los principales escollos para la determinación de su estructura terciaria.

Nuestra metodología incluye predicción de estructura secundaria a partir de secuencia utilizando los métodos de Chou y Fasman y de Cid y col. La predicción así obtenida se transforma en un modelo a escala, utilizando las dimensiones del enlace peptídico y de los elementos de estructura secundaria. Las reglas de estabilización para las estructuras secundarias superiores, así como toda la información química y bioquímica de que se dispone, son cuidadosamente consideradas en la construcción del modelo.

Este método fue aplicado a 6 β -lactamasas clase A y a una β -lactamasa clase B. Todas las β -lactamasas clase A pueden ser descritas por un modelo común que consta de 2 dominios y muestran una alta conservación de la estructura secundaria. Este modelo permitió diseñar diversos experimentos para comprobar su validez, que han sido realizados en la β -lactamasa I de *B. cereus*. Test de proteólisis química y bioquímica, estudios cinéticos, y estudios de cambios conformacionales inducidos, son, hasta el momento, consistentes con el modelo.

Proyecto 89/87 de FONDECYT y 20.31.12 DIC Universidad de Concepción.

REGULACION DE LA POLIMERIZACION DE TUBULINA POR METALES DIVALENTES. (Regulation of tubulin polymerization by divalent metals). Monasterio, Q. y Acoria, M. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La tubulina, un heterodímero compuesto por dos subunidades de peso molecular 55.000, autoensambla en presencia de magnesio formando microtúbulos. La estructura del polímero depende de la naturaleza del metal divalente presente. Mn(II) induce microtúbulos similares a los formados con magnesio. Cinc y altas concentraciones de cobalto inducen estructuras laminares. Calcio desensambla estos polímeros.

Hemos determinado por medio de la función termodinámica de unión de Wyman que la elongación del microtúbulo es acompañada por la unión de un mol de magnesio por mol de dímero de tubulina agregado. El ión terbio, análogo fluorescente de calcio y de magnesio, se une a la tubulina produciendo polímeros lineales con ciertas ramificaciones. La curva de unión del ión a la tubulina se superpone con la curva de turbidez producida por la polimerización de la tubulina. Una vez que el terbio se une a la tubulina no es posible desplazarlo con magnesio o calcio. Esto sugiere que la región de unión del metal queda inaccesible en el polímero. Esta región se encontraría expuesta en el dímero de tubulina, pues magnesio y calcio impiden la unión del ión terbio. La unión de magnesio y calcio al complejo tubulina-DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) disminuye la fluorescencia de la sonda. El apagamiento podría explicarse como una competencia entre los metales y el DAPI por un sitio de unión con cargas negativas, pues la sonda se encuentra cargada positivamente bajo las condiciones de ensayo. Estos resultados sugieren que los sitios de unión para los metales divalentes se encontrarían en la región carboxilo terminal de la tubulina que posee una alta densidad de cargas negativas.

Financiado por FONDECYT, DTI (U. de Chile) y DEA.

SIMPOSIO AVANCES RECIENTES EN BIOMEDICINA EN RELACION A DIAGNOSTICOS Y VACUNAS

Coordinador: A. Venegas

PORINAS EN LA PATOGENICIDAD DE *Salmonella typhi*. (Porins in the pathogenicity of *S. typhi*). Mora, G.C. y Calderón, I. Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

La tifoidea es una enfermedad febril aguda causada por bacterias de la especie *S. typhi*, las cuales inician el proceso infeccioso mediante la adherencia al epitelio intestinal y la colonización de éste. Ambas etapas se establecen en el ambiente anaeróbico que caracterizan al intestino, y es a esta condición a la cual deben adaptarse las bacterias para vivir y proliferar en él.

En *E. coli* y *S. typhimurium* se han descubierto numerosos genes regulados anaeróbicamente, muchos de los cuales no han sido mapeados o caracterizados bioquímicamente.

Los componentes estructurales superficiales de las bacterias son muy importantes en la adherencia a los epitelios, sin embargo, no han sido considerados como elementos cuya regulación esté mediada por la disponibilidad de oxígeno en el medio ambiente.

Las porinas, proteínas de la membrana externa de enterobacterias, están expuestas al medio ambiente y la expresión de ellas es regulada por estímulos ambientales como la osmolaridad y la temperatura. Esto es una ventaja evolutiva que permite a estos microorganismos sobrevivir en distintos ambientes. Hemos determinado *in vitro*, la influencia que un ambiente anaeróbico tiene en la expresión de las porinas de *S. typhi*. Así, imitando una condición del intestino, nos aproximamos al fenotipo que *S. typhi* poseería durante el inicio de la infección. *S. typhi* en ambiente anaeróbico presenta una represión de la expresión de OmpF y OmpA.

Financiado por Proyecto FONDECYT N° 0264/88.

GENES Y PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE ENTEROBACTERIAS Y SU APLICACION EN DIAGNOSTICO: EL GEN OMPC DE *S. typhi*. (Genes and proteins of outer membrane from enterobacteria and their use in diagnostic: the ompC gene from *S. typhi*). Venegas, A., Zaror, I., Gómez, I., Castillo, G., Lira, P. y Sánchez, J.P. Unidad de Microbiología y Genética Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago.

La relación directa de las bacterias con su entorno está mediada físicamente a través de la membrana externa. En la respuesta inmune frente a infecciones bacterianas algunos de estos componentes funcionan como antígenos. Entre éstos, las porinas, que son proteínas capaces de formar poros para el paso de solutos pequeños, han resultado muy atractivas. Estudios previos han permitido establecer que pacientes con fiebre tifoidea presentan un alto título de anticuerpos anti-porinas. Se propone desarrollar nuevos métodos de diagnóstico de tifoidea en base a aglutinación de látex con porinas inmovilizadas o mediante hibridación molecular de segmentos de genes específicos.

Para este objeto se ha aislado y caracterizado el gen de la porina OmpC de *S. typhi* y se ha producido esta proteína en *E. coli*, lo que permite manejar y disponer de material suficiente sin riesgos de infección. El gen ha sido secuenciado y mostró un 74% homología con *E. coli*. Tres regiones de éste no tienen equivalente en *E. coli* y, junto a otros segmentos de DNA típicos de *S. typhi*, están siendo evaluados como sondas específicas en ensayos de "dot blot". Estudios preliminares para el uso de porina recombinante adsorbida en látex para detección de anticuerpos anti-porina son muy alentadores.

Estos avances recientes permitirán optimizar los métodos actuales y su principio podrá ser aplicado para diagnóstico de otras infecciones bacterianas.

Financiado por FONDECYT 2026/87 y DIUC 81/86.

USO DE SONDAS MOLECULARES EN LA DETECCIÓN ESPECIFICA DE AGENTES PATOGENICOS (Use of probes in the detection of pathogenic agents). Arturo Yudelevich. Unidad de Microbiología y Genética Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D Santiago.

En el desarrollo de sondas moleculares para la detección específica de agentes patógenos se han desarrollado varios enfoques. Se ha recurrido al clonamiento de genes de virulencia presentes en el agente patógeno que se quiere identificar. Otros métodos se han basado en el uso de secuencias específicas de una especie determinada aunque no estén relacionadas con genes de virulencia. Es así como se han desarrollado sondas consistentes en secuencias de genes de RNA ribosomal de alta variabilidad, o en secuencias provenientes de plásmidos cripticos. Estamos desarrollando una metodología para aislar, secuencias únicas presentes en el agente patógeno. Esta consiste en hibridar DNA de la especie en estudio con un gran exceso de una mezcla de DNAs de otras especies relacionadas y no relacionadas y luego rescatar de la mezcla de reacción solo secuencias hibridadas consigo mismas. Esto se logra un sistema de hibridación competitiva acelerada por fenol, seguida de clonamiento preferencial de moléculas hibridadas consigo mismas. Inicialmente hemos empleado este sistema para detectar secuencias únicas de *Shigella* y *Salmonella*. Otro aspecto de gran importancia en el desarrollo de una sonda es el método de detección del híbrido formado. Actualmente los sistemas basados en marcación radiactiva siguen siendo los de mayor sensibilidad; otros métodos, como el de la biotina son aun menos sensibles. Sin embargo, se están desarrollando algunos sistemas de amplificación, que acoplados a métodos de detección no radiactivos prometen al menos igualar la sensibilidad de los métodos radiactivos. Financiado por proyecto FONDECYT 0398/88

DETECCION Y CUANTIFICACION DE VIRUS Y ANTICUERPOS EN INDIVIDUOS INFECTADOS CON VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA. Espejo, Romilio. Centro de Estudios Científicos de Santiago y Unidad de Virología, Fac. Medicina, U. de Chile

La detección y cuantificación de los virus y de sus anticuerpos en los individuos infectados con los virus causantes de SIDA requiere de una alta sensibilidad y especificidad ya que su resultado es crucial para el paciente. La tecnología moderna ha permitido el desarrollo de técnicas que permiten una sensibilidad nunca antes lograda pero todavía la especificidad no alcanza 100%. En base a la experiencia en la implementación de algunas de estas técnicas en nuestro laboratorio se discutirá la sensibilidad y especificidad de distintos ensayos que incluyen aislamiento de los virus, ensayo de transcriptasa reversa, diversos ELISAS, inmunoblots (western blots), radioinmunoprecipitación (RIPA), hibridación e hibridación con amplificación. La alta sensibilidad lograda con algunas de estas pruebas requiere un análisis sobre el significado de un resultado positivo. Otra variable que se discutirá consiste en la especificidad de estas técnicas con respecto al tipo en cuestión (VIH-1 o VIH-2) y a la variación intratipos observada en los virus de la inmunodeficiencia humana.

DESARROLLO DE VACUNAS VIRALES. (Development of viral vaccines). Eugenio Spencer. Unidad de Virología, INTA. Universidad de Chile.

Las vacunas han sido el factor de mayor importancia en el control y en algunos casos de la erradicación de enfermedades virales. La obtención de una vacuna se basa en la utilización de dos procedimientos: el uso de cepas virales atenuadas y la inactivación de virus por métodos químicos o físicos. Sin embargo, la obtención de vacunas por estos métodos para algunos virus no resulta eficiente ya sea por la inestabilidad de las mutaciones que producen la atenuación o porque la respuesta inmune que desarrollan no es capaz de neutralizar el virus infectante. Mediante la identificación de los antígenos de neutralización y el conocimiento de las secuencias de los genes virales se han podido desarrollar nuevas estrategias. Estos consideran principalmente la expresión de los antígenos de neutralización en diversos tipos de vectores tanto procariotes como eucariotes o virales. El uso de virus vacuna como vector ha demostrado ser una buena aproximación a este respecto. El virus posee zonas del DNA que pueden ser reemplazado por el gen de un antígeno de neutralización cuando esta inserción está bajo el control del promotor temprano de virus se produce expresión eficiente del polipéptido y genera una muy buena respuesta inmune en el huésped. Sin embargo, estas vacunas de subunidades virales no han sido eficaces en casos en que el antígeno de neutralización es variable o que esté compuesto por más de un polipéptido. En otros casos existen problemas adicionales como en HIV I debido a que en este caso no solo hay transmisión de la enfermedad por el virus sino que también por medio de células infectadas.

La preparación de vacunas por lo tanto parece ser un problema individual en el cual resulta difícil encontrar un método general.

SIMPOSIO ASPECTOS MOLECULARES DE LA BIOLOGIA
DEL *T. CRUZI*

Coordinador: A. Morello

LA CISTEIN PROTEINASA (TRYPANOPAINA) DE *TRYPANOSOMA CRUZI*. (The cysteine proteinase (Trypanopain) from *Trypanosoma cruzi*). Cazzulo, J.J. Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar. Antonio Machado 151, 1405 Buenos Aires, Argentina.

Los epimastigotes de *T. cruzi* contienen diversas actividades proteolíticas; experimentos de electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo fibrinógeno o hemoglobina, sugieren que la actividad cuantitativamente más importante es una cistein proteinasa, que hemos purificado hasta homogeneidad proteica. La enzima es una glicoproteína monomérica, de peso molecular aproximado a 60 kDa, capaz de hidrolizar caseína (pH 5 a 7.5), hemoglobina y seroalbúmina (pH 3 a 4). La enzima es fuertemente inhibida por leupeptina, quimostatina y antipaina (150 0.25, 0.75 y 1 μ M, respectivamente); organomercuriales; tosil lisil clorometilcetona (TLCK) y tosil fenilalanil clorometilcetona (TPCK). No es inhibida por fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), pepstatina ni o-fenantrolinea, y es activada por EDTA y beta mercaptoetanol. Experimentos de extracción de células enteras con digitonina, latencia en fracciones subcelulares y centrifugación en gra dientes isopícnicos de sacarosa indican que la proteinasa se comporta como la alfa-manosidasa, lo que sugiere que se encuentra en los lisosomas. La secuencia de 32 aminoácidos del extremo N-terminal y de 14 aminoácidos de un péptido triptico, presenta una identidad del 65 % con las papaina y la catepsina L de hígado de pollo. Estos datos indican que la enzima es una cistein proteinasa perteneciente a la superfamilia de la papaina, para la cual se propone el nombre de Trypanopaina.

CONSIDERACIONES INMUNOLÓGICAS MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO Y RESISTENCIA GENÉTICA A LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. (Immunological and molecular considerations in the diagnosis and genetic resistance to Chagas disease). A. Ferreira (1), R. Ramos, (2), M.A. Juri (1), A. Ramos (1), G. Hoecker (1) y S. Lavandero* (2). (1)Depto. Biol. Cel. y Genética, Fac. Med. U. de Chile, y (2) Depto. Bioquímica y Biol. Molec. Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile.

Cepas de ratones infectadas con *T. cruzi* difieren en la resistencia a Chagas. Por ej. ratones A.CA mueren 15 días después de recibir 10^4 tripomastigotes de la cepa Tulahuén. Su par congénico A.SW sobrevive. Por lo tanto, el complejo principal de histocompatibilidad participa en esta resistencia, presumiblemente a través de genes Ir. Recientemente hemos identificado un polipeptido de 45 Kd (T.c. 45) presente en epi y tripomastigotes, reconocido por la cepa A.SW. Extractos parasitarios fueron analizados por inmunowestern blotting, desarrollado con sueros de ratones inmunizados resistentes y sensibles, seguido por IgG de cabra, marcada con 125 I, anti IgG de ratón. T.c. 45 por ser inmunogenéticamente definida, merita el estudio de su valor inmunogénico protector y/o de diagnóstico. Paralelamente hemos estandarizado una fase sólida no convencional de alta superficie (sílica octadecil) para ensayos inmunoradiométricos que, contingente a la producción de anticuerpos monoclonales contra T.c. 45, permitiría pesquisar su presencia o de péptidos relacionados en especímenes como suero y orina.

* S.L. es becado por la Fundación Andes.
Financiado por Proyectos: FONDECYT 0463-1987 y 0191-1988.
y UNDP/World Bank/WHO/TDR. 820599

ANTICUERPOS NO LÍTICOS Y RESISTENCIA A LA INFECCIÓN AGUDA CON *T. CRUZI* LIGADA A H-2. (Non-lytic antibodies in H-2-controlled resistance to *Trypanosoma cruzi*). M.A. Juri, A. Ramos, A. Ferreira y G. Hoecker. Depto. Biol. Celular y Genética, Fac. Medicina, Universidad de Chile.

La resistencia (R) al *Trypanosoma cruzi* en el ratón es un carácter poligénico con un gen dominante de efecto mayor ligado a H-2 y varios genes menores complementarios que pueden conferir R al cruzar cepas susceptibles (S), vgr A.CA x B10.Br. Los ratones de cepas R, B10 y A.SW, sobreviven 60 o más días inoculados con 10^4 tripomastigotes sanguíneos; los ratones S, B10.Br y A.CA, mueren entre 15-30 días con esta dosis. La parasitemia en todas las cepas presenta un peak al día 8 post-inoculación (p.i.) que en los animales R disminuye paulatinamente. En los ratones S aparecen peaks menores hasta la muerte. En especial, la cepa A.CA (S) presenta un segundo y continuo aumento de la parasitemia.

La producción de IgM e IgG anti *T. cruzi* hasta el día 12 p.i. no es significativamente diferente entre las cepas R y S. En los animales R hay un aumento constante de las IgG hasta 100 días p.i. correlacionada positivamente con la protección a la muerte aguda, confirmada por experimentos de neutralización de los parásitos con suero inmune de 35 días p.i. o su fracción IgG. El efecto protector no depende de lisis mediada por la vía clásica del complemento.

Financiado por UNDP/Bank/WHO/TDR ID 820599, FONDECYT 0463 y DTI B.2688-8714.

ASPECTOS MOLECULARES DE LA PROLIFERACIÓN EN *Trypanosoma cruzi*. (Molecular aspects of cell proliferation in *Trypanosoma cruzi*). Toro, G.C.; Morales, M.G.; Rojas, M.V. y Galanti, N. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

T. cruzi es un protozoo hemoflagelado, agente causal de la enfermedad de Chagas, endémica en Chile. Presenta endomitosis, sin condensación de la cromatina en cromosomas. En este parásito se estudió la composición de histonas (organización y función de cromatina), la presencia de proteínas cromosomales de alta movilidad electroforética, HMG (regulación de transcripción) y la metilación del DNA (regulación de la expresión génica).

Las histonas y las proteínas cromosomales HMG se extrajeron en medio ácido y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida. La metilación del DNA se analizó por hidrólisis y cromatografía de las bases. Paralelamente, se estudió el efecto de 5-azacitidina (agente hipometilante) sobre la proliferación y diferenciación celular en el parásito.

Se encontró 6 histonas, al menos una de las cuales presenta características de H1. El patrón electroforético de estas proteínas básicas es diferente al de eucariontes superiores y al de otros géneros de la familia Trypanosomatidae. Por otra parte, 4 proteínas cromosomales presentan características de HMG. La composición cualitativa de estas proteínas varía en diferentes fases de proliferación del parásito. Finalmente, el DNA de *T. cruzi* está metilado en citosina y, aparentemente, esta modificación del material hereditario participa en la regulación de la proliferación del parásito en cultivo. (Financiado por WHO/PNUD/WB; O.E.A.; FONDECYT, 54-CHL TWAS y D.T.I., U. de Chile).

ASPECTOS BIOENERGETICOS DEL TRYPANOSOMA CRUZI (Bioenergetics of Trypanosoma cruzi), Aldunate, J., Letelier, M.E., Coloma, L. (*), Vásquez, X., Monteverde, P. y Morello, A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, (*) Departamento de Biología, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación.

En general, los procesos de obtención de energía en los parásitos presentan características diferentes respecto a los mamíferos. El Trypanosoma cruzi realiza una "fermentación aeróbica de la glucosa", ya que el azúcar es metabolizado a la misma velocidad tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, produciendo en ambas condiciones CO_2 y ácidos orgánicos. En la glicólisis, no existen enzimas regulatorias, lo cual en parte se explica al encontrarse la mayoría de las enzimas glicolíticas compartimentalizadas en un organelo subcelular, el glicosoma.

En nuestro laboratorio, nos hemos dedicado a estudiar la respiración mitocondrial en los T. cruzi intactas. Así hemos podido establecer que las formas epimastigotas y las formas tripomastigotas del parásito, consumen oxígeno independientemente de que existan o no precursores glicolíticos. La respiración del T. cruzi es insensible a la rotenona, que es un inhibidor del sitio I de acoplamiento energético en los mamíferos. En cambio, el consumo de oxígeno de los parásitos sí es inhibido por Antimicina A. Los compuestos antioxidantes BHA (2(3)-ter-butyl-p-hidroxi-anisol) y BHT (3,5-diter-butyl-p-hidroxitolueno) presentan efecto tripanosomicida cuya base bioquímica es una inhibición de la respiración celular del T. cruzi, a lo cual se asocia a un cambio del estado de óxido-reducción de los piridín nucleótidos y de los citocromos mitocondriales. Estos efectos sobre el T. cruzi sólo lo presentan aquellos compuestos que están estructuralmente relacionados con BHA y BHT.

UNDP/WB/WHO/TDR, OEA, FONDECYT-Chile, DIB B-1854.

EL GLUTATION COMO MECANISMO DE DEFENSA EN TRYPANOSOMA CRUZI. Repetto, Y., Moncada, C., Letelier, M.E., Kiwi, I., Lipchencu, I. y Morello, A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina y Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

El glutatión (GSH) representa para el Trypanosoma cruzi un mecanismo de defensa importante en relación a los radicales libres y a metabolitos reducidos del oxígeno como O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot que se generan en el metabolismo y por compuestos exógenos. El parásito es deficiente en las enzimas involucradas en la eliminación de estos compuestos. Las drogas de uso actual Nifurtimox (Nx) y Benznidazol (Bz) actúan sobre el T. cruzi vía radicales libres y/o generando productos de reducción parcial del O_2 . El T. cruzi tiene un contenido de GSH que fluctúa entre 0.5-1 mM. Al administrar a ratas infectadas con T. cruzi un inhibidor específico de la biosíntesis de GSH L-butionina sulfóximina (BS) se produce a las pocas horas una disminución de los niveles de GSH del parásito en un 50% y un bloqueo temporal de la parasitemia. Hemos estudiado el contenido de GSH en diversas cepas del T. cruzi y también la actividad de algunas enzimas relacionadas con su metabolismo. Se observó en la cepa LQ un contenido de GSH mayor que la cepa T. en un 60%. A su vez la actividad de glutamiltransferasa es 3.2 veces mayor en la cepa T. en relación a la LQ. Se estudió el efecto de Nx y Bz sobre el crecimiento de los parásitos en cultivo. Se observó que la cepa LQ es más resistente a estas drogas que la cepa T. Al adicionar a los cultivos Bs y después las drogas antichagásicas se produjo una potenciación en la inhibición del crecimiento. Estos experimentos demuestran que la concentración de GSH es un factor importantísimo en la resistencia del T. cruzi a estas drogas. Las diferencias descritas en la resistencia de diversas cepas del parásito podría explicarse en base a sus diferentes contenido de glutatión.

UNDP/WB/WHO/TDR, OEA, FONDECYT Chile, DIB. B-1854.

COMUNICACIONES LIBRES

REGULACION DE LA EXPRESION GENICA DE LAS ISOENZIMAS DE α -AMILASA DE SEMILLAS DE Araucaria araucana (Mol.) Koch, MEDIADA POR ACIDO GIBBERELICO. (Regulation of the genetic expression of the α -amylase isoenzymes of Araucaria araucana (Mol.) Koch, seeds by gibberellic acid) Acevedo, E y Cardemil, L. Dep. de Biología, Fac. de Ciencias, U. de Chile.

La enzima α -amilasa obtenida de semillas de Araucaria araucana presenta 6 isoformas. Las isoenzimas han sido purificadas. Los pasos de purificación incluye tratamiento a 70°C, precipitación con glicógeno y cromatografía de afinidad Sefarosa-CHA. Los pesos moleculares de las 6 isoenzimas fueron determinados por electroforesis de poliacrilamida en SDS. Fraccionamiento a través de una columna DEAE-celulosa usando un gradiente de 0-0.6 M de NaCl ha permitido separar las dos isoformas mayores del resto de las isoenzimas.

Inhibidores de la síntesis de giberelinas AMO 1618 y CCC en concentraciones de 10^{-4} M para AMO 1618 y 20 mM para CCC, afecta la expresión de tres de las 4 isoenzimas presentes en el embrión a las 90 hrs. de imbibición. Estas 3 isoenzimas están disminuidas cuando el inhibidor es AMO 1618 y desaparecen completamente cuando el inhibidor es CCC. La actividad total de α -amilasa se reduce a 37% del control en presencia de CCC. Acido giberélico agregado al medio de incubación en semillas tratadas con CCC, permite la recuperación de la actividad amilásica y la expresión de todas las formas de la enzima presente a esa edad de la plántula.

(Proyecto DIB B 1580-8755, U. de Chile)

PROTEINAS TRANSDUCTORAS QUE MEDIAN LA RESPUESTA QUIMIOATRACTICA EN Leptospirillum ferrooxidans. (Transducing proteins mediating the chemotactic response in L. ferrooxidans). Acuña, J., Aquilón, J.C., Peirano, I. y Jerez, C.A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Hemos descrito en L. ferrooxidans la presencia de proteínas similares a las MCPs de E. coli, las que se metilan en presencia de Ni^{+2} y Fe^{+2} (atrayentes) y se desmetilan en presencia de aspartato (repelente), de acuerdo con el comportamiento quimiotáctico de las bacterias frente a estos efectores.

En la presente comunicación estudiamos la posible homología estructural entre los receptores de L. ferrooxidans y los de E. coli. Para ello empleamos sistemas in vitro de metilación de membranas y la técnica de dot y Southern blot. Como sonda se utilizó el plasmidio pAK 106 que contiene el gen tar (receptor de aspartato y Ni) de E. coli. Determinamos que las proteínas tipo MCPs de L. ferrooxidans se modificaron post-traduccionalmente en presencia de las enzimas metiltransferasas de E. coli. Mediante dot blot encontramos que el DNA cromosomal de L. ferrooxidans y T. ferrooxidans (fragmentos Eco RI de 6,0 Kb) hibridan con la sonda utilizada. Nuestros resultados indican la presencia de alguna secuencia complementaria conservada entre el gen tar y el gen que codifica a los receptores tipo MCPs tanto en L. ferrooxidans como en T. ferrooxidans y sugieren además la existencia de un dominio común entre los receptores de ambos tipos de microorganismos.

Financiado por PNUD/UNESCO (CHI 85/002), FONDECYT (723/87 y 88-0074) y Universidad de Chile (B.1972-87 y 82889-8814).

CARACTERIZACION CINETICA DE LA β -GALACTOSIDASA DE ASPERGILLUS ORYZAE INMOVILIZADA EN QUITINA. (Chitin-Immobilized β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* Kinetic characterization). Aguirre C., Curotto E., O'Reilly S., Illanes A., Ruiz A., Zúñiga M.E. Instituto de Química y Escuela de Ingeniería Bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso.

Sueros y permeados, subproductos de la elaboración de quesos son eliminados frecuentemente a pesar de su valor nutritivo y de su alta carga contaminante. Estos a través de un proceso de hidrólisis pueden ser utilizados en la formulación de alimentos, de dietéticos lácteos y como medio de fermentación en la producción de alcohol.

El objetivo de este trabajo es la caracterización cinética de la β -galactosidasa (E.C.3.2.1.23) inmovilizada en quitina-glutaraldehído (EIQ) para obtener posteriormente un diseño teórico de un reactor enzimático, que pueda ser utilizado en un proceso de hidrólisis continua de sueros lácteos. Se realiza además un estudio con la enzima soluble (E-sol) con fines comparativos.

La actividad enzimática se determina usando lactosa y ONPG como sustratos. La enzima inmovilizada se trabaja en un sistema batch.

Las mejores condiciones de trabajo encontradas para EIQ son pH 4.0 y 55°C; para E-sol, pH 4,5 y 50°C.

De acuerdo a los resultados la inmovilización de esta enzima en quitina-glutaraldehído no afecta mayormente la K_m (lactosa). La galactosa producto de la hidrólisis inhibe la reacción en forma competitiva en ambos sistemas, sin embargo el efecto es menor para la enzima inmovilizada, lo que constituye una ventaja frente a la enzima soluble. La glucosa presenta un efecto activador en la enzima soluble.

Fondecyt 390/87

LOCALIZACION Y PROPIEDADES DE UNA ACTIVIDAD PROTEOLITICA NEUTRA EN HIGADO DE GENYPTERUS MACULATUS "CONGRIO NEGRO". (Localization and properties of a neutral proteolytic activity from *Genypterus maculatus*). Aíno L., y Sánchez L. Depto. Biología Molecular. Fac. Cs. Biológicas y Recursos Naturales. Universidad de Concepción.

Se ha descrito en células de mamíferos que la proteólisis intracelular ocurre a través de vías lisosomales y no lisosomales. La primera se ha considerado que participa en la degradación de proteínas de vida media larga, en cambio, la no lisosomal en la degradación de proteínas de vida media corta, entre ellas enzimas reguladoras. En el presente trabajo se informa de la localización intracelular y caracterización parcial de una actividad proteolítica no lisosomal en peces a fin de investigar su participación en la degradación específica de enzimas.

Su localización se investigó por centrifugación diferencial de un homogeneizado, siguiendo la metodología de Casey y Anderson modificada. La actividad fue medida mediante la hidrólisis de caseína en presencia de Ditioneitol 4.8 mM. En la fracción microsomal se encontró una actividad con un pH óptimo de 7.2 y con una purificación de 12 veces con respecto al homogeneizado. Es soluble por desoxicolato al 0.5%, no es afectada por Ca^{+2} (0.2 mM) ni por Zn^{+2} (1mM), es inhibida parcialmente por EDTA (2 mM) y Mg^{+2} (0.2 mM) y totalmente por urea 3M. Mn^{+2} (0.5 mM) y Co^{+2} (1.6 mM) la activan siendo el último el mejor activador (3 veces) y revierte la acción inhibitoria parcial del EDTA.

Estos resultados permiten concluir que la fracción microsomal de hígado de congrio contiene sistemas proteolíticos que podrían estar participando en procesamiento de proteínas o en regulación de actividades enzimáticas.

Financiado por Proyecto DIC 20.31.20 y FONDECYT.

MARCACION QUIMICA DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE LEVADURAS CON $[8-^{14}C]_0ATP$ Y AISLACION DE PEPTIDOS RADIATIVOS. (Chemical modification of yeast phosphoenolpyruvate carboxylase with $[8-^{14}C]_0ATP$ and isolation of radioactive peptides). Aráneda, S., Saavedra, C., Jabalquinto, A.M., y Cardemil, E. Departamento de Química, Universidad de Santiago de Chile.

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (PEPCK) de levaduras cataliza la reacción de descarboxilación de oxaloacetato en presencia de ATP y Mn^{2+} para generar PEP, ADP y CO_2 . Esta es una importante reacción de la gluconeogénesis y la enzima ha sido descrita en diversas especies. La enzima de *S. cerevisiae* es un tetrámero, en tanto que la de mamíferos y aves es un monómero, la de plantas un hexámero y la de *T. cruzi* un dímero. En este estudio se quiere obtener péptidos del sitio activo de la enzima de levaduras, para efectuar comparaciones estructurales entre ellas.

La PEPCK se marcó con el reactivo de afinidad $[8-^{14}C]_0ATP$ (Arch. Biol. Med. Exp. (1987) 20 (2) R-245). Se encontró una estequiometría de marcación de 1 mol $[8-^{14}C]_0ATP$ /mol subunidad, con protección casi total de la marcación por ADP + PEP. La enzima marcada y carboximetilada fue digerida con tripsina y los péptidos se resolvieron por HPLC con columna RPC-18 en gradiente de acetónitrilo, determinándose su radiactividad. La radiactividad se encontró asociada principalmente a un péptido corto que eluye al comienzo del gradiente. Este péptido no se encontró radiactivo en la enzima marcada en presencia de los sustratos.

Ha sido posible marcar por afinidad la PEPCK de *S. cerevisiae* con $[8-^{14}C]_0ATP$, y se ha encontrado que la marca está asociada casi exclusivamente a un sólo péptido trípico corto, lo que podría dificultar su secuenciación. Se trabaja en la obtención de péptidos obtenidos por digestión con otras proteasas.

Financiado por DICYT-USACH y FONDECYT.

ENZIMAS DE HONGOS QUE HIDROLIZAN LA PARED CELULAR VEGETAL: EXCRECION Y PROPIEDADES. (Enzymes from fungi that hydrolyze plant cell wall: Excretion and properties). Aubá, M., Mettifoço, S., Pérez, L.M. Depto. de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. Cs. Qcas. y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Pectinasas y celulasas participan en la degradación de los componentes de la pared celular vegetal. Las pectinasas son enzimas indispensables para que hongos patógenos produzcan la infección de plantas superiores. Se estudió la cinética de excreción de pectinasa y celulasa por *Alternaria chlamydospora* y *Trichoderma aureoviride*, aisladas de cítricos. Ambas especies de hongos secretaron pectinasa a tiempos menores en relación a la excreción de celulasa y las enzimas mencionadas se indujeron sólo en presencia del sustrato correspondiente. La cinética de excreción coincide con la hidrólisis secuencial de los componentes de la pared celular.

Tanto pectinasa como celulasas presentaron un pH óptimo en el rango ácido, cercano al pH superficial del tejido vegetal. Sus actividades no se modificaron frente a cambios bruscos de temperatura, presencia de tioles, etc.

Los resultados indican que pectinasa y celulasas son enzimas de baja masa molecular, con una gran estabilidad frente a diferentes factores ambientales, lo que explica la dificultad para controlar el efecto de fitopatógenos que las excretan, a nivel de campo.

FINANCIADO POR PROYECTO FONDECYT 9/87 Y C 1139-1 INTERNATIONAL FOUNDATION FOR SCIENCE.

INMUNOGLOBULINA G FOSFORILADA Y ACTIVIDAD SERICA DE PROTEIN TIROSIN QUINASA EN ENFERMOS CON NEOPLASIA EN TRATAMIENTO (Phosphorylated IgG and serum protein tyrosine Kinase activity in patients with neoplasia under treatment). Campos, E., González, U., Neno, H., Smith, C. T., Bustamante, M., Vila, A., Klempau, A. E. Departamentos de Biología Molecular y de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

La enzima protein tirosin quinasa (TPK) ha sido asociada con la proliferación celular. Oncogenes que codifican esta enzima elevan su actividad durante el proceso neoplásico. Algunos receptores para factores de crecimiento y hormonas fosforilan tirosina. En conejos portadores de neoplasia se ha detectado inmunoglobulina G fosforilada (IgG-P) en tirosina, demostrándose actividad de TPK circulante. Esto podría también ocurrir en humanos. Con el objeto de profundizar el conocimiento de la actividad de TPK y establecer un posible método de diagnóstico de neoplasias basado en la detección de IgG-P y de la actividad sérica de TPK, realizamos un muestreo en el Servicio de Oncología del Hospital Guillermo Grant de Concepción. Observamos que individuos normales no presentaban IgG-P ni actividad sérica de TPK. De los individuos con CA mamario en tratamiento, el 85% presentaba actividad de TPK. De estos pacientes, los tratados con radioterapia (72%) presentaban además IgG-P en un 30.8% de los casos. Los tratados con quimioterapia o cirugía (28%) no presentaban IgG-P. De los pacientes con CA uterino en tratamiento, el 87.5% presentaba actividad de TPK. De los pacientes tratados con radioterapia (88%), un 12.5% presentaba además IgG-P. El 12% restante, tratado con quimioterapia, no presentaba IgG-P. Por lo tanto, al menos el 85% de los pacientes con estas 2 neoplasias presentaban actividad de TPK sérica, ausente en los controles. Financiado por Proyecto FONDECYT 86/87, Deptos. de Biología Molecular y Microbiología, U. de Concepción

PURIFICACION DE LA β -LACTAMASA DE *Shigella flexneri* UCSF-129 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD, EFECTO DE INDUCTORES Y CATIONES DIVALENTES EN SU ACTIVIDAD (Purification of β -lactamase from *Shigella flexneri* UCSF-129 by affinity chromatography, induction an divalent cations (II) effect on enzymic activity). Campos, M., González, H., Alarcón, M. y González I. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Concepción, Casilla 3-C. Concepción.

Las β -lactamasas constituyen el mecanismo de resistencia más relevante para los antibióticos β -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas). Es vital el estudio de su centro activo que permitirá diseñar inhibidores altamente específicos, lográndose su recuperación. Estos estudios requieren de cantidades apreciables de enzima pura, proveniente de *Shigella flexneri* UCSF-129 (productora de graves cuadros diarreicos). Se ensayaron diferentes antibióticos como inductores, siendo exitoso la lincomicina que aumentó la producción y la actividad específica en 2,5 y 3,6 veces, respectivamente. Esta enzima periplásmica y plasmidial se purificó a través de cromatografía de afinidad en geles de agarosa ácida fenilborónica (inhibidor reversible), la actividad específica y el rendimiento fueron 3,8 y 1,7 veces mayor, con respecto a los métodos tradicionales. La preparación era homogénea de acuerdo a los criterios de electroforesis en geles de poliacrilamida e inmunodifusión. Se estudió el efecto de los siguientes cationes divalentes (1mM), en la enzima pura: Zn, Ca, Cd, Mn, Co, Cu, Sn, Mg, Hg. Destacó sólo la inhibición de un 74% por Sn (II). Base para futuros estudios cristalográficos y ratifica su exclusión de la clase B.

Financiado por Proyecto N°20.13.54 de D.I. de la Universidad de Concepción.

STATUS OXIDATIVO EN LA REPERFUSION DE UN TEJIDO DESPUES DE UNA ISQUEMIA TEMPORAL. (Oxidative status of a reperfused tissue after a temporal ischemia). Campos, R., Garrido, A., Guerra, R., Valenzuela, A. Unidad de Bioquímica Farmacológica, INTA. U. de Chile. Casilla 15138, Santiago 11, CHILE.

El daño producido por la reperfusión de un órgano sometido a una isquemia temporal, ha sido asociado con la iniciación de estres oxidativo. Enzimas como la xantina deshidrogenasa, al ser transformada en una oxidasa, formaría radicales libres del oxígeno que serían causantes de este estres oxidativo. Si bien las evidencias morfológicas del daño que se produce en un tejido isquémico reperfundido son abundantes, la evaluación de parámetros bioquímicos es escasa y contradictoria. No existen evidencias directas de lipoperoxidación celular como consecuencia del daño oxidativo, por lo cual nos propusimos montar un modelo de isquemia renal en ratas mediante la oclusión durante 60 minutos de la arteria renal izquierda y nefrectomizando el riñón derecho al momento de reperfundir por 1 ó 2 horas. Se evaluaron niveles de glutatión de los homogenizados, lipoperoxidación, generación de radicales libres y consumo de oxígeno del homogenizado y microsomas. Los resultados obtenidos son paradójicos y contrarios a lo planteado en la literatura. Los niveles de lipoperoxidación, generación de radicales libres y consumo de oxígeno, tanto espontáneo como inducidos por prooxidantes como Fe-Ascórbico o NADPH, son mas bajos en los riñones sometidos a isquemia a pesar de la depresión del glutatión que se produce en estos. Esta observación se contrapone a las hipótesis planteadas para explicar el daño isquémico. Si bien falta por investigar, nuestros resultados podrían cambiar el concepto actual sobre el uso de drogas antioxidantes en el tratamiento de los accidentes isquémicos. Financiado por FONDECYT proyecto 174/87.

RESPUESTA FISIOLÓGICA AL ESTRES DE HERIDAS EN SEMILLAS DE *ARAUCARIA ARAUCANA*. (Response to Wounding in *Araucaria araucana* Seeds). Cardemil, L y Riquelme, A. Dep.de Biol., Fac. de Ciencias, U. de Chile.

Semillas de *Araucaria araucana* responden fisiológicamente a heridas provocadas por cortes en los tejidos de la semilla y plántula, con un aumento de hasta 10 veces el nivel basal de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRPG) presentes en la pared celular. El tejido megagametofítico acumula 6 veces mas hidroxiprolina por ug. de proteína que el embrión en esta respuesta al estrés.

Inmunoimpresión de diferentes tejidos presentes en semillas y plántulas de *A. araucana*, realizados con anticuerpos policlonales obtenidos contra HRPGs de pared celular de raíces de zanahoria o cubiertas de semillas de soja, sugiere que la respuesta se debe a un aumento de proteínas similares presentes en paredes celulares de zanahoria y de soja.

Western análisis de proteínas extraídas de las paredes celulares de embrión y megagametofito, después de sometidas a electroforesis en geles SDS de poliacrilamida, muestran tres bandas de proteínas que dan inmunoreacción cruzada con los anticuerpos de soja y de zanahoria. Las tres bandas son positivas al reactivo PAS. Electroforesis de las proteínas nativas en geles catiónicos, muestran que solo dos de las proteínas pueden transferirse a membranas de nitrocelulosa.

Las proteínas de paredes celulares de semillas y plántulas de *A. araucana* se expresan diferencialmente durante el desarrollo y su grado de expresión es específica respecto al tejido involucrado en el estrés. (Proyecto FONDECYT 0160).

EFFECTO DEL SHOCK TERMICO Y DE PH SOBRE LA EXPRESION GENICA DE *THIOBACILLUS FERROOXIDANS*. (Effect of heat and pH shock upon genetic expression of *T. ferrooxidans*). Chamorro, D., Feirano, I., Arredondo, R., y Jerez, C.A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Las bacterias regulan rápidamente su expresión génica en respuesta a cambios externos mediante redes regulatorias, las que frente a un stress ambiental reducen la síntesis normal de las proteínas celulares y provocan la sobreproducción de un grupo de proteínas conocidas como proteínas del stress. Hemos estudiado la respuesta al shock térmico y de pH en el *Thiobacillus ferrooxidans*. Las bacterias se crecieron en presencia de $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ y los productos radiactivos sintetizados en respuesta a los diferentes stress se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y fluorografía.

Al transferir las bacterias de 30° a 41°, éstas disminuyeron la síntesis de proteínas, y aumentaron la de un grupo de proteínas del shock térmico. Frente a un cambio de pH (1,5 a 3,5) se observó la síntesis de una gran cantidad de una proteína de 35 KDa. En cambio, al disminuir el pH de 3,5 a 1,5, no sólo se eliminó la inducción de la proteína de 35 KDa, sino que se provocó además una respuesta similar a la del shock térmico.

Nuestros resultados sugieren que algunos de estos componentes de la respuesta al stress estudiado son parte de la membrana externa y que los cambios en su expresión pueden constituir, como en otros organismos, parte de la barrera defensiva contra variaciones en el medio ambiente local.

Financiado por PNUD/UNESCO (CHI 85/002), FONDECYT (723/87 y 88-0074) y Universidad de Chile (B.1972-87 y B2889-8814).

DETERMINACION DEL P.M. DE LA ALDEHIDO-NAD-OXIDOREDUCTASA (E.C. 1.2.1.3) DE SNC DE "A.G. RATS" EN GELES NATIVOS DE POLIACRILAMIDA. (Molecular Weight determination of aldehyde-NAD-oxidoreductase in "A.G. rats" SNC by Polyacrylamide Gels Electrophoresis). Egüña, E., Grez, P. & Ramirez, M.T. Universidad de Chile-Facultad de Medicina; Instituto de Medicina Experimental - Laboratorio de Neuroquímica - Santiago 7 - Chile.

Los estudios realizados en hígado de rata y humano revelan la presencia de a lo menos cuatro isoenzimas de la ALDH, las cuales difieren en su origen, K_m y movilidad electroforética entre otros parámetros. Las más importantes de estas isoenzimas, E2 y E1 también han sido detectadas en SNC de rata en áreas tales como corteza, centros subcorticales y cerebelo. Cada una de ellas, presentan subunidades con un P.M. aprox. de 54,000 daltons. Sin embargo estas subunidades difieren en su estructura primaria, lo que determina una alteración en el patrón hidrofóbico, explicando así el porqué las subunidades de las diferentes isoenzimas no forman estructuras tetraméricas. Nos interesa conocer la distribución de esta enzima e isoenzimas en las diferentes áreas del SNC Normal y de cepas "A.G. rats" (alcoholismo permanente y generacional) y posteriormente determinar mediante la electroforesis el P.M. de las formas moleculares que se encontraron. Ratas adultas albino Mistar ♂ y ♀ de los grupos Normal (Control), "A.G./25" y "A.G./H₂O". Se estudió en SNC, 4 áreas: corteza cerebral, hipotálamo, cerebelo y menencéfalo. Electroforesis del sobrenadante de 20,000 x g de cada una de las 4 áreas mencionadas. Se encontró que existían 3 estructuras moleculares en los grupos experimentales estudiados. Dos de estas se hallan distribuidas en forma irregular entre los grupos. La 3ª estructura (P.M. 52,000) estuvo presente en todos los grupos y en ambos sexos, lo que nos hace presumir que esta última constituye la mínima subunidad catalíticamente activa de la ALDH.

SESQUITERPENO CICLASA DE FLAVEDO DE LIMON. (Sesquiterpene cyclase from lemon rind). Chayet, L. y Brown, G. Depto. de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Cs. Ocas. y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Hay unos 200 sesquiterpenos, se piensa se forman por ciclación de farnesilpírofosfato (FPP), pero muy pocos sistemas libres de células han sido descritos que lo hagan, y no hay información sobre las ciclasas mismas.

En un extracto de flavedo de limón se ensaya sesquiterpene ciclase con FPP tritiado como sustrato. Los hidrocarburos sesquiterpénicos son constituyentes menores de aceites esenciales. Los productos generados, alcoholes provenientes de la acción de fosfatasa e hidrocarburos de interés, se extraen del medio de reacción por partición en hexano y luego se separan por absorción en ácido silícico.

La partición en hexano resulta ineficiente por lo que se ensaya el efecto de denaturantes y solventes, resultando mejor urea 4M.

La enzima es dependiente de metal divalente siendo mejor Mn^{+2} que Mg^{+2} , pues mejora la relación fosfatasa-ciclase. La K_m aparente para farnesilpírofosfato es 0,9 μM .

Se intenta purificar la enzima por precipitación con PEG, con resultados de rendimiento y purificación variable. La metódica permite liofilizar y estabilizar así la materia prima.

La C₁₅ ciclase forma a partir de trans-farnesilpírofosfato, 54% de hidrocarburo que co-cromatografía con valenceno y 21% con cariofileno. El resto no ha sido identificado.

Se requiere purificar la enzima para resolver problemas de ensayo y continuar los estudios. FINANCIADA D.T.I. PROYECTO B-2078-872F. Y FONDECYT 0988.

SECUENCIACION PARCIAL DE UN OPERON RIBOSOMAL DE *Thiobacillus ferrooxidans*. IDENTIFICACION DEL GEN 5S. (Partial sequencing of a *Thiobacillus ferrooxidans* ribosomal operon. Identification of the 5S gene.) Flores, H., Sánchez, H., Hevia, E. y Venegas, A. Unidad de Microbiología y Genética Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica Casilla 114-D, Santiago.

El operón ribosomal bacteriano es una unidad transcripcional compleja que contiene los genes de los RNA ribosomales dispuestos colinealmente en el orden 16S, 23S y 5S. Los RNAs ribosomales se obtienen a partir de un precursor único que es sometido a un procesamiento secuencial específico que renueva las secuencias espaciadoras. Algunos operones ribosomales, típicamente los de *E. coli*, contienen 2 genes de tRNAs en la región espaciadora de los genes de 16S y 23S, y 1 a 2 genes de tRNAs en el extremo 3' final del operón. En otras bacterias la distribución de los genes de tRNA en los espaciadores es variable y pueden estar ausentes. Esta característica de variabilidad puede utilizarse para la identificación de un determinado microorganismo mediante uso de sondas específicas.

Con el fin de caracterizar esto a nivel de secuencia nucleotídica del operón de *T. ferrooxidans*, se ha clonado parcialmente un operón y se lo ha analizado mediante enzimas de restricción, hibridación Southern y secuenciación parcial mediante el método de Sanger.

Se ha identificado el gen de RNA 5S y una señal de terminación de la transcripción que excluyen la presencia de genes de tRNA en el extremo 3'. No obstante, existen dos genes de tRNA entre los genes de RNA de 16S y 23S. Se discute la posibilidad de usar estas características para la identificación de cepas de *T. ferrooxidans*.

Financiado por proyecto PNUD/ONUDI CH185/002.

t-BUTIL-4-HIDROXIANSOL (BHA) INHIBE LA RESPIRACION DE CELULAS TUMORALES (t-Butyl-4-hydroxyanisole (BHA) inhibits the respiration of tumoral cells). Fones, E., Amigo, A., Gallegos, K., Guerrero, A., Gallardo, J. y Ferreira, J. Departamentos de Bioquímica y Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Casilla 70086 Santiago 7, Chile.

BHA se ha usado ampliamente como aditivo antioxidante en alimentos por más de 20 años, por su muy baja toxicidad. Por otro lado, se ha demostrado que BHA es un inhibidor muy versátil de neoplasias inducidas por una amplia variedad de agentes carcinogénicos, posiblemente porque aumenta las actividades de varias enzimas que metabolizan xenobióticos: glutatión S-transferasa, NAD(P)H quinona reductasa, NADPH oxidasa, epoxihidrolasa, UDPG-glucuroniltransferasa, entre otras. Recientemente, se ha demostrado que BHA reduce la incidencia de hiperplasias del estómago e inhibe el crecimiento de varias líneas de células tumorales de humanos en cultivo.

Debido a la complejidad de la respuesta a BHA, es difícil establecer cuál de las alteraciones bioquímicas (o qué combinaciones) están relacionadas con su acción tóxica aparente sobre células tumorales.

Los estudios se realizaron en dos líneas de células tumorales de ratón: 786 Ay TA3. BHA inhibió el crecimiento de cultivos en medio líquido de ambas líneas celulares y esta inhibición es dependiente de su concentración. La respiración celular también fue inhibida por BHA: 50% entre 0.45 y 0.58 mM y 90% alrededor de 0.8 mM, tanto en presencia como en ausencia de CCCP; sugiriendo que BHA inhibe el transporte de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial. De los estudios de los cambios de los estados redox en estado estacionario de los componentes de la cadena respiratoria NAD(P) y citocromos b, c y a₃, se observó que se reduce NAD(P) y todos los citocromos se oxidaron en presencia de BHA, indicando que su acción inhibitoria es en el segmento NAD-citocromo b. Este efecto es muy similar al previamente encontrado en algunos tripanosomatídeos.

Financiado por FONDECYT, Proyecto N° 47/87

EFFECTO PROTECTOR DEL FLAVONOIDE SILYBINA EN LA DEPLECIÓN DE GLUTATIÓN PRODUCIDA POR ACETAMINOFENO EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA: EVENTUAL COMPORTAMIENTO ANTIOXIDANTE DEL ACETAMINOFENO. (Protective effect of the flavonoid silybin on the glutathione depletion induced by acetaminophen on isolated rat hepatocytes). Garrido, A., Arancibia, C., Guerra, R., Valenzuela, A. Unidad de Bioquímica Farmacológica, INTA. Universidad de Chile. Casilla 15138, Santiago 11. CHILE.

La silybina (syl) es un flavonoide utilizado en diversas hepatopatías. Su mecanismo de acción no está claro aunque se postula un efecto estabilizante de membranas y una acción antioxidante. Nuestro grupo ha caracterizado algunas propiedades bioquímicas de syl, en especial aquellas que se refieren a su efecto protector en la depleción hepática de glutatión (GSH) producida por el etanol y la fenilhidrazina. El acetaminofeno (ACP) es un analgésico que en condiciones de sobre dosis es un hepatotóxico, produciendo una depleción de GSH hepático y una necrosis irreversible. Los hepatocitos aislados constituyen un modelo para el estudio del efecto de xenobióticos y de hepatoprotectores. La syl protege a los hepatocitos de la depleción de GSH producida por el ACP, y también protege a estas células de la lipoperoxidación (LP) espontánea. El ACP, en nuestras condiciones experimentales no induce LP, sino presenta un carácter antioxidante que potencia el de syl. Esta observación difiere de aquellas de otros autores que postulan para ACP un carácter prooxidante. Experimentos in vivo muestran un efecto de syl similar al observado en hepatocitos pero con ACP la situación es diferente. El fármaco produce LP después de 24 horas de acción y que es inhibida por el flavonoide. No se descarta la posibilidad que ACP sea un antioxidante. La LP in vivo sería consecuencia del daño bioquímico y de la necrosis tisular ya que a las 24 hrs. de intoxicación no habría ACP libre ni tampoco biotransformado.

Financiado por DTI. U. de Chile, Dr. Madaus (Alemania) y FONDECYT 174/87.

RESPUESTA FISIOLÓGICA AL TRATAMIENTO TÉRMICO DE LOS TEJIDOS DE SEMILLAS Y PLÁNTULAS DE ARAUCARIA ARAUCANA (MOL.) KOCH. (Heat Shock Response of Seed and Seedling Tissues of Araucaria araucana (Mol.) Koch. Goycoolea, C. y Cardemil, L. Dep. de Biol., Fac. de Ciencias, U. de Chile.

Tejidos de semillas y plántulas de Araucaria araucana fueron sometidos por diferentes períodos de tiempo a temperaturas de 32°, 36°, 40°, 44° y 48° C. La viabilidad del tejido fue determinada por el test del cloruro de trifenil tetrazolio o por salida de electrolitos de los tejidos, en el caso de las semillas y por porcentaje de crecimiento después de 24 horas de tratamiento térmico, en el caso de las plántulas.

En semillas, el tejido más resistente a altas temperaturas es el tejido megagametofítico, seguido por el eje embrionario y por los cotiledones que son los más sensibles al estrés térmico. Las plántulas son mucho más sensibles que los tejidos de las semillas, ya que mueren después de 30 minutos de ser tratadas a 44° C. Las temperaturas de 40° y 36° C fueron definidas como subletales.

Análisis por fluorografía de las proteínas sometidas a electroforesis en geles de SDS poliacrilamida y que fueron sintetizadas durante dos horas de estrés térmico, en presencia de ³⁵S-metionina, muestra la presencia de 7 nuevas bandas de proteínas que no están presentes a 28° C, siendo la temperatura óptima de acumulación de ellas 36° C y el período de síntesis máxima de 2-3 horas después de iniciado el estrés a esta temperatura. A 36° C la plántula adquiere termotolerancia.

Hibridación Norte del RNA total extraído de los tejidos usando sondas ³²P marcadas, una para la proteína de estrés de 70 Kd y otra para ubiquitina, revelan dos mRNA para la proteína de 70 Kd y un mRNA para la ubiquitina con un óptimo de acumulación a 36° C. (Proyecto FONDECYT 0160).

SECRECIÓN DEL ÓRGANO SUBCOMISURAL: ANÁLISIS IN SITU E IN VITRO. (Secretion of the subcommissural organ: in situ and in vitro analysis). Hein, S. y Rodríguez, E.M. Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

La actividad secretoria del órgano subcomisural (OSC) está demostrada, desconociéndose, sin embargo, la composición de su secreción; al menos parte de ella es liberada al III ventrículo en donde se condensa formando la fibra de Reissner (FR).

El uso de lectinas (Con A, LFA, RCA, WGA), de glicosidasas específicas y de técnicas inmunoquímicas aplicadas a cortes histológicos y a extractos de OSC y FR (transferidos a nitrocelulosa después de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS), permitieron analizar la secreción del OSC de bovino, in situ e in vitro.

Las observaciones realizadas sugieren: 1) que la secreción liberada al ventrículo está constituida por varias glicoproteínas y por una proteína no glicosilada; 2) la presencia de formas precursoras, las cuales son sintetizadas y almacenadas en el RER y procesadas durante el transporte hacia el polo apical de la célula; 3) las glicoproteínas presentes en los gránulos secretorios y FR corresponderían a las formas procesadas cuyos oligosacáridos están unidos por unión tipo N y 4) algunas glicoproteínas serían liberadas al ventrículo desde cisternas del RER. Financiado por DID-UACH, proyecto S-85-39 y por Stiftung Volkswagenwerk, I/63 476.

EFFECTO DE PALMITOIL-CoA EN LA RESPUESTA DE PROTEINA KINASA C A FOSFOLIPIDOS Y DIGLICERIDOS. (Effect of Palmitoyl-CoA in the Protein Kinase C response to phospholipids and diacylglycerols). Hidalgo, P., Loyola, G., Morales, M.N., Orellana, A., y Bronfman, M. Dpto. Biología Celular, Fac. Cs. Biológicas P.U. Católica.

Proteína Kinasa C (PKC) es una enzima dependiente de fosfolípidos y calcio. La presencia de diacilglicerol aumenta su afinidad por calcio llevando la enzima a su actividad máxima. Recientemente hemos descrito que los acil-CoA de cadena larga potencian la actividad de PKC (1). Esta potenciación solo se observa en presencia de fosfolípidos, calcio y diacilglicerol (DAG), es decir cuando la enzima se encuentra en su máximo de actividad. Utilizando la enzima de cerebro de rata purificada a homogeneidad, hemos analizado el efecto de palmitoil-CoA (PCoA) en la respuesta de PKC a fosfatidilserina (PS) y DAG (Dioleilglicerol, dipalmitoilglicerol y dioctanoilglicerol). La actividad de PKC se determinó en dos tipos de ensayo: a) PS y DAG sonicados y b) misceladas mixtas de Tritón X-100, PS y DAG. La actividad de PKC, a concentraciones crecientes de DAG, da una curva hiperbólica. La adición de PCoA produce un aumento en los valores de Km app y Vmax app, en los dos tipos de ensayos. Por otro lado a concentraciones crecientes de PS la actividad de PKC resulta en una curva de tipo sigmoide. Al adicionar concentraciones crecientes de PCoA se produce una disminución en el valor de K_{0.5}, y además una disminución en el número de Hill. En cuanto al valor de Vmax, existe una tendencia a permanecer constante. Los resultados sugieren que el efecto potenciador de PCoA puede ser explicado, al menos en parte, por un aumento en la afinidad por fosfolípidos.

Financiado: DIUC 82/86 y Fondecyt 0390-88

(1) Biochem. Biophys. Res. Comm. 152 (3), 987-992, 1988

IDENTIFICACION Y LOCALIZACION DEL RECEPTOR DE EGF EN GLANDULAS GASTRICAS DE RATA. (Identification and localization of the EGF receptor in rat gastric glands) Houigue L., Juca F., López E., Orellana A., Bronfman M., Garrido J., y González A. Fac. Ciencias Biológicas y Fac. Medicina, P. Universidad Católica de Chile

El efecto más conocido del EGF, y menos explorado en su mecanismo, sobre células altamente diferenciadas que probablemente no se dividen, es una inhibición de la secreción gástrica de HCl y de pepsinógeno. Las acciones de esta hormona peptídica se han estudiado casi exclusivamente en relación a los mecanismos que controlan la proliferación y diferenciación celular, siendo en ellos importantes: a) la presencia en la superficie celular de un receptor específico, de membrana, que en su dominio citoplásmico posee una actividad tirosina kinasa estimulable por EGF desde el exterior, y b) la fosforilación de este receptor inducida por el propio EGF y por reguladores de la proteína kinasa C

En el sistema gástrico, no hay información sobre receptores de EGF y tampoco sobre los posibles eventos bioquímicos que éste gatilla, que podrían ser comunes con los involucrados en el efecto mitogénico de esta hormona. Como primera aproximación al problema, purificamos el receptor de EGF de hígado de rata y obtuvimos anticuerpos que nos han permitido identificarlo mediante técnicas de inmunoblot, inmunoprecipitación e inmunocitoquímica. Mostraremos aquí la presencia de estos receptores en fracciones de membrana de glándulas gástricas aisladas, el tipo de células que lo poseen, su fosforilación dependiente de su interacción con EGF y las posibles relaciones funcionales con la proteína kinasa C.

EXISTENCIA DE APIRASA EN BACTERIAS. (Existence of apyrase in Bacteria). Kettlun, A.M.; Alegría, P.; Cotorás, D.; Rojas, J.; Valenzuela, M.A.; Mancilla, M. y Traverso-Cori, A. Depto. de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. de Cs. Ocas. y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

La apirasa (ATP:difosfohidrolasa) ha sido descrita tanto en tejidos vegetales y animales. En cambio, existe muy poca información al respecto en microorganismos, por lo cual se inició un estudio en bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Se estandarizó el medio de cultivo (sin fosfato) y las mejores condiciones de extracción de la apirasa respecto a pH, tratamiento con lisozima y tiempo de sonicación.

Las bacterias Gram positivas, sobre todo las del género *Bacillus*, tienen actividad apirásica tanto en la fracción particulada como en la soluble (en la que es más abundante).

La distribución de la apirasa en las bacterias Gram negativas varía según la especie. Entre ellas *E. coli* es la que presenta la mayor actividad apirásica. Cabe hacer notar que entre los microorganismos explorados *Pseudomonas aeruginosa* resultó ser el único que excreta cantidades detectables de apirasa al medio de cultivo.

Para suprimir la acción de otras enzimas interferentes se usó inhibidores como F⁻ (fosfomonoesterasa) y Ap5A (adenilatoquinasa). Se determinaron algunos parámetros bioquímicos de la apirasa obtenida en la fracción soluble de *Bacillus* s p. N° 10.

FINANCIADO POR PROYECTO FONDECYT N°49 (1987).

Acción de las encefalinas sobre la glándula mamaria en lactancia. (Enkephalin actions in lactating rat mammary gland)*.

Lavandero, S.,** Conde, E., Puente, J. y Sapag-Hagar, M. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

El AMP cíclico es un importante inhibidor de la lactogénesis, siendo sus niveles en la glándula mamaria elevados en la preñez y muy bajos en la lactancia, desconociéndose los mecanismos íntimos que producen estos cambios.

Algunas encefalinas hacen bajar los niveles intracelulares de AMP cíclico y varios de estos péptidos han sido detectados en la leche materna, por lo que podrían ejercer algún papel regulador en la lactogénesis.

En este trabajo se informa el resultado de los estudios *in vitro* del efecto de metionina y leucina encefalínicas sobre la secreción de leche en explantes de glándula mamaria en lactancia y la acción de estos péptidos sobre los niveles intracelulares de AMP cíclico, como también sus sitios de unión al tejido mamario.

Los resultados mostraron que no hay cambios significativos en dichos niveles ni en la secreción evaluada como lactosa y actividad μ -glutamiltranspeptidasa, así como tampoco ninguna respuesta funcional mamaria mediada por los receptores μ de las encefalinas.

La estimulación de los receptores opioides μ con morfina, no hizo variar tampoco los niveles basales de AMP cíclico o los estimulados por toxina del cólera. Al investigar directamente la presencia de receptores mamarios para encefalinas estos no se encontraron, todo lo cual sugiere que la glándula mamaria en lactancia no responde a la acción de estos péptidos.

* Proyectos Fondecyt 88-0872/0874 y INT B-2116-8844. Universidad de Chile.

** SLG es un becado de Fundación Andes.

BUSQUEDA Y CARACTERIZACION DE PROMOTORES DE TRANSCRIPCION EN *Thiobacillus* sp. (Isolation and characterization of transcription promoters from *Thiobacillus* sp.) Metz, C., Sánchez, H., Hevia, E. y Venegas, A. Unidad de Microbiología y Genética Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica Casilla 114-D, Santiago.

Los tiobacilos acidófilos representan una interesante alternativa en el proceso de lixiviación de minerales. Desarrollar un sistema de manipulación genética en estos microorganismos, es un paso importante para lograr un mejoramiento del proceso de biolixiviación. Para esto es necesario disponer de un vector apropiado, el cual deberá contener un origen de replicación, un marcador genético y un promotor de transcripción que sean funcionales en el microorganismo a manipular.

Para la búsqueda de promotores utilizamos el vector pKK232-8. Dicho vector posee el gen para la cloranfenicol acetil transferasa (CAT), el cual por construcción, carece de promotor propio. Hemos aislado promotores de transcripción de *Thiobacillus acidophilus* a partir de DNA cromosomal, y de un plásmido críptico de *T. ferrooxidans*. La secuencia de bases ha sido determinada de acuerdo a Sanger y se ha estudiado la expresión de dichos promotores *in vivo*, determinando la actividad CAT en *E. coli* HB101.

Con el fin de estudiar la capacidad funcional de estos promotores, en otros sistemas bacterianos, hemos subclonado algunos de ellos en pKT240, un vector de amplio rango de hospedero, para ensayarlos en otros sistemas.

Se discute la posibilidad de usar estos promotores en la construcción de vectores.

Financiado por proyecto PNUD/ONU DI CH185/002.

CARACTERIZACION CINETICA Y SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD γ -GLUTAMILTRANSPEPTIDASA EN *T. CRUZI*.

Moncada, C., Repetto, Y., González, J., Letelier, M.E., Aldunate, J. Morello, A. Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Bioquímica, y Departamento de Biología, Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

Nos ha parecido de gran interés la caracterización de γ -GTP en *T. cruzi*, ya que esta enzima comanda la degradación del GSH, el cual representaría uno de los mecanismos más importantes, para la detoxificación de radicales libres y metabolitos reducidos del oxígeno producidos por el metabolismo del huésped y por las drogas que se usan en la actualidad contra la enfermedad de Chagas. La actividad enzimática se encontró en la fracción citosólica determinándose su actividad de transpeptidación espectrofotométricamente, utilizando diversos aminoácidos y dipéptidos.

Los resultados evidencian una clara diferencia entre la enzima del parásito y la de mamíferos en su eficiencia como aceptores del grupo γ -glutamilo. Así por ejemplo L-glutamina un buen aceptor para la enzima de mamíferos, resultó ser inhibidor en la enzima de *T. cruzi*. Esto nos lleva a pensar que la función de esta enzima en el parásito sería eminentemente hidrolítica y su participación en fenómenos de transporte sería de menor importancia. Esto concuerda en parte con lo encontrado por microscopía electrónica de transmisión, realizada con el objeto de caracterizar subcelularmente esta actividad, ya que resultó estar tanto libre en el citoplasma como en unos organelos subcelulares, cuyas características están aún en estudio.

Creemos que la mejor comprensión de los eventos relacionados con la síntesis y degradación del GSH, podrán orientarnos hacia una terapia más racional de la enfermedad de Chagas.

Financiado por: UNDP/WB/WHO/TDR, OEA, FONDECYT Chile, DIB B-1854.-

DESCARBOXILASA DIFOSFOMEVALONICA DE HIGADO DE RATA: EVIDENCIA DE ACTIVIDAD CATALITICA DE LA ESPECIE MONOMERICA. (Rat liver mevalonate diphosphate decarboxylase: Evidence of catalytic activity of the monomeric species). Muñoz, Q., Cardemil, E. y Jabalquinto, A.M. Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile.

La descarboxilasa difosfomevalónica cataliza la reacción entre $MgATP^{2-}$ y mevalonato-5-difosfato para formar isopentenildifosfato, ADP, Pi y CO₂. Se ha informado que las enzimas obtenidas de hígado de pollo e hígado de cerdo son dímeros de PM. 85.400 y 88.000, respectivamente, mientras que la enzima de hígado de rata sería un tetrámero de PM 126.000.

Utilizando una preparación parcialmente purificada de hígado de rata hemos realizado un reestudio del PM de la descarboxilasa difosfomevalónica mediante filtración en gel e inactivación por radiación. Se irradió la enzima, previamente liofilizada, con rayos gamma, a temperatura ambiente y luego se determinó la actividad enzimática residual mediante un ensayo espectrofotométrico. La pérdida de la actividad enzimática siguió un decaimiento exponencial simple el cual correspondió a un PM de 47.300. Por otra parte, se obtuvo un PM de 89.100 al realizar filtraciones en Sephacryl S-200.

Estos resultados nos permiten concluir que la estructura cuaternaria de la descarboxilasa difosfomevalónica no varía entre las enzimas de hígado de pollo, cerdo y rata.

Financiado por DICYT-USACH y FONDECYT. Agradecemos la valiosa colaboración de la Comisión Chilena de Energía Nuclear donde se realizó la irradiación.

EFFECTO IN VIVO DE PALMITOIL-CoA Y PALMITOIL-CARNITINA EN LA ACTIVIDAD DE PROTEINA KINASA C. (Effect in vivo of Palmitoyl-CoA and Palmitoyl-Carnitine in the Protein Kinase C Activity). Orellana, A., Loyola, G., Kawada, M., Holuigue, L., González, A. y Bronfman, M. Dpto. Biología Celular, Fac. Cs. Biológicas, P.U. Católica.

El interés en el estudio del papel que cumple proteína kinasa C (PKC) en regulación celular se ha visto incrementado al conocerse que es el receptor de los ésteres de forból conocidos promotores de tumorigénesis. La activación de PKC esta asociada a la degradación de fosfatidilinositol, con producción de diacilglicerol, activador natural de la enzima en presencia de fosfolípidos y calcio. Se ha descrito que moléculas hidrofóbicas con carga positiva son inhibidores de la actividad de PKC, entre estos se cuenta palmitoil-carnitina y clorpromazina. Por otro lado, recientemente, utilizando PKC purificada a homogeneidad desde cerebro hemos demostrado que los acil-CoA de cadena larga modulan la activación de PKC por DAG (1), al parecer aumentando la afinidad de la enzima por fosfolípidos. En ensayos *in vitro* hemos visto que el efecto de palmitoil-carnitina en la afinidad por fosfolípidos (fosfatidilserina) es opuesto al efecto de palmitoil-CoA. Para analizar este fenómeno *in vivo* se utilizaron plaquetas humanas, en las que se ha caracterizado bastante bien la fosforilación de una proteína de 40 Kd, dependiente exclusivamente de PKC. Los resultados muestran que en presencia de ésteres de forból, se produce fosforilación de 40 Kd la que aumenta cuando las plaquetas se colocan en presencia de palmitoil-CoA y disminuye cuando las plaquetas se colocan en presencia de palmitoil-carnitina. Resultados preliminares, utilizando hepatocitos aislados y analizando la fosforilación de un sustrato específico de PKC como lo es el receptor de EGF, corroboran los experimentos obtenidos en plaquetas.

(1) Biochem. Biophys. Res. Comm. 152 (3):987-992 1988
Financiado: DIUC 82/86 y Fondecyt 0390-88

ORGANIZACION Y ESTRUCTURA DE GENES DE rRNA DE *Thiobacillus ferrooxidans*. (Organization and structure of rRNA genes from *T. ferrooxidans*). Orellana O., Salazar, O., Takamiya, M. y Gaete, L. Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Thiobacillus ferrooxidans es una bacteria autotrófica que participa en la biolixiviación de cobre. A pesar de la importancia en el proceso industrial señalado, se conoce poco sobre aspectos de genética molecular de este microorganismo. Con el objeto de estudiar en *T. ferrooxidans* la organización y la regulación de la expresión génica, estamos analizando la estructura y funcionalidad de los genes de rRNA de esta bacteria. Previamente informamos de la identificación y caracterización de cuatro plasmidios recombinantes (denominados pIR-1, 2, 3 y 4) que poseen secuencias de rDNA y de la presencia de dos operones de rRNA en el cromosoma de *T. ferrooxidans*.

En este trabajo, mediante estudios de hibridación a sondas de rDNA derivadas del plasmidio pIR-3, se construyó un mapa de restricción detallado de los dos operones identificados en el cromosoma bacteriano. Se observó similitud en las regiones codificantes de los genes y marcadas diferencias en las regiones adyacentes a los operones. Al comparar el mapa de restricción de un segmento del DNA clonado en el plasmidio pIR-1, que posee secuencias que hibridan con el rRNA 16S, se comprobó que era idéntico al extremo 5' terminal de uno de los operones identificados. Este hecho sugiere que el segmento clonado podría contener los promotores de dicho operon. Actualmente se encuentran en desarrollo estudios de la estructura y la funcionalidad de este segmento de DNA. Financ. por FONDECYT, PNUD/ONUDI y U. de Chile.

ACTIVIDAD PROTEOLITICA ACIDICA DE GLANDULA DE LEIBLEIN DE *Concholepas concholepas*. (Acid proteolytic activity from gland of *Leiblein of Concholepas concholepas*). O. Ponce., A. Magaña., L. Carrasco. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

Concholepas concholepas es un gastrópodo prosobranquio. Es un recurso natural exclusivo del océano Pacífico entre Perú y Chile y representa actualmente el único ejemplar vivo en su género. Se ha descrito la glándula de Leiblein asociada al esófago de función desconocida.

En el presente trabajo se describe el aislamiento, purificación parcial y caracterización de una actividad proteolítica ácida a partir de esta glándula.

La actividad se midió por el método de Anson utilizando hemoglobina como sustrato. Se investigó su ubicación por fraccionamiento subcelular y se purificó parcialmente por cromatografía en Sephadex G-200. Se estudió su estabilidad en función de la temperatura y la acción de efectores.

La actividad enzimática tiene un pH óptimo de 3,5; se ubica en la fracción citosólica; es estable a 0° C hasta 12 días; se pierde en un 50% a los 100 min a 37°C y en un 74% a los 100 min a 55°C. es activada por cisteína, glutatión y DTT. Es inhibida por pepstatín, un inhibidor específico de proteasas ácidas y por mercurio II. El contenido enzimático por gramo de tejido es de 10.000 unidades.

De estos resultados se concluye que una función de la Glándula de Leiblein es contribuir de manera importante en la digestión intracelular de las proteínas de la dieta.

Por la fácil extracción de esta glándula y su alto contenido enzimático proteolítico, es interesante la posibilidad de considerar su uso industrial.

Proyecto: 20.31.20 Dirección de Investigación y FONDECYT

MARCACION DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE LEVADURAS CON REACTIVOS FLUORESCENTES DIRIGIDOS A GRUPOS TIOLAS. (Chemical modification of yeast phosphoenolpyruvate carboxylase by fluorescent reagents directed to thiol groups). Quiñones, V., Encinas, M.V., Jabalquinto, A.M. y Cardemil, E. Departamento de Química, Universidad de Santiago de Chile.

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (PEPCK) de levaduras cataliza la reacción de descarboxilación del oxaloacetato en presencia de ATP y Mn^{2+} para generar PEP, ADP y CO_2 . Como parte de una investigación dirigida a obtener información estructural de la enzima de *S. cerevisiae*, se estudia la interacción de la enzima con sondas fluorescentes que puedan ser empleadas en el análisis de características fisicoquímicas del sitio de unión de los sustratos.

Se empleó la PEPCK obtenida de *S. cerevisiae* S288C, la que se hizo reaccionar con N-pirenomaleimida (PIM), N-etilmaleimida (NEM) y IAEDANS. En todos los casos se obtuvo inactivación de la enzima, con protección de la reacción de inactivación por los sustratos. Se determinó una estequiometría de unión de 1 mol de PIM/mol de subunidad de enzima. El tiempo de decaimiento de la fluorescencia del PIM ligado a la enzima es biexponencial con τ_1 de 59 nseg y 9 nseg, en tanto que el aducto sintético PIM-mercaptoetanol presenta un decaimiento monoexponencial con $\tau_1 = 10$ ns. La enzima tratada con DTNB no reacciona con PIM, apoyando la idea de que este reactivo reacciona con grupos -SH de la enzima. Se encontró que el número total de grupos -SH que se titulan con DTNB es de 12 en la enzima nativa y 42 en la enzima desnaturalada con SDS.

Los resultados obtenidos indican que PIM reacciona con grupos SH de la enzima (probablemente del sitio de unión de los sustratos), y que la sonda fluorescente unida a la proteína sensa distintos microalrededores.

Financiado por DICYT-USACH y FONDECYT.

EFFECTO DE GLICEROL SOBRE LA ACTIVACION DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA POR CATIONES MONOVALENTES (Glycerol effect on the activation of fructose 1,6-bisphosphatase by monovalent cations). Reyes, A., Bravo, N. y Slebe, J.C. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

La fructosa-1,6-bisfosfatasa es activada selectivamente por cationes monovalentes, tales como K^+ y NH_4^+ . Se ha postulado que este efecto se debería a la inducción de un conformero de la enzima que presenta menor inhibición por exceso de sustrato y mayor actividad específica (Hubert et al. (1986) Arch. Biochem Biophys. 250, 336-344). Buscando mejores pruebas para esta hipótesis, se planteó caracterizar el efecto de los cationes en presencia de glicerol, agente que por su acción sobre el potencial químico de la solución puede alterar la distribución de estados conformacionales de proteínas.

La activación de la enzima de riñón de cerdo por concentraciones variables de cationes monovalentes fue afectada por la presencia de glicerol. Para K^+ , por ejemplo, las constantes de semiactivación fueron de alrededor de 30 mM y 50 mM en ausencia y presencia de glicerol 20% (v/v). La $V_{máx}$ de la reacción y la K_m de la enzima fueron disminuidas en alrededor de 50-60% cuando glicerol se aumentó desde 0 a 20%. Asimismo, no se observó variación significativa de otros parámetros cinéticos. Análisis de espectroscopía diferencial ultravioleta y de exposición de un residuo cisteína reactivo, muestran que glicerol perturba residuos tirosina expuestos y apantalla al grupo tiol. Los efectos de glicerol fueron revertidos al disminuir la concentración del perturbante por glicerol.

Se concluye que glicerol estabiliza una conformación de la enzima que exhibe mayor afinidad por el sustrato. Se favorece entonces el modelo que la activación por cationes monovalentes está acoplada a la inducción de un cambio conformacional.

(Proyectos: DIC-UACH, RS-85-26; FONDECYT, 179-87)

DETERMINACION DEL pK DE UN RESIDUO LISINA INVOLUCRADO EN LA COOPERATIVIDAD HACIA AMP DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA (The pK value of the lysine residue involved in AMP cooperativity of fructose 1,6-bisphosphatase). Sáez, D., Hubert, E. y Siebe, J.C. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

La fructosa-1,6-bisfosfatasa es un tetrámero que posee dos residuos lisina por subunidad, los cuales están comprometidos en la interacción de la enzima con el inhibidor AMP. La modificación química con cianato, en presencia de sustrato, permite diferenciar uno de ellos, esencial para la cooperatividad de la enzima hacia el nucleótido (Siebe *et al.* (1983) J. Prot. Chem. 2, 437-443). En este trabajo caracterizamos termodinámicamente este residuo mediante su modificación con cianato.

Se estudió la cinética de pérdida de cooperatividad hacia AMP, tratando la enzima con NaNO₂ 100 mM en presencia de sustrato 25 mM, a pHs entre 6,0 y 9,0. Los valores de K_{obs} aumentaron entre pH 6,0 y 7,3 y se observó una leve disminución a pHs mayores de 7,5. Esta disminución se correlacionó con un cambio conformacional de la enzima, inducido por el pH, que elimina gradualmente la cooperatividad hacia el nucleótido. Las cinéticas de carbamilación entre pH 6,0 y 7,3, a 37°C, permitieron determinar la constante de velocidad de segundo orden independiente del pH (k) y el pK del grupo relacionado con la cooperatividad. Estos valores fueron $k = 46,5 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ y $pK = 6,58$.

El valor de pK, inusualmente bajo para un residuo lisina, nos llevó a analizar la dependencia de este parámetro con la temperatura, no observándose quiebres en el intervalo de 17 a 37°C. El calor de ionización obtenido fue de 11,23 Kcal/mol. Este valor de ΔH y la certeza que cianato forma unión covalente sólo con lisinas, confirman que el pK obtenido corresponde a un residuo lisina, ubicado probablemente en un ambiente hidrofóbico.

(Proyectos: DIC-UACH, RS-85-26; FONDECYT, 179-87)

PROTEOSINTESIS SELECTIVA EN EL GRUPO α -NH₂ DE LISINA (Selective proteosynthesis on the α -NH₂ group of lysine) Tello, M., Herrera, C. e Ibáñez, I. Lab. de Química de Proteínas y Alimentos, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Las proteinasas realizan tanto "in vivo" como a nivel de laboratorio la función de hidrolizar los enlaces peptídicos y en esta acción muestran una gran especificidad. Esta misma especificidad se manifiesta al realizar "in vitro" el proceso de proteosíntesis que es el inverso al de hidrólisis. Por tanto, es posible formar enlaces peptídicos en que se encuentre involucrado sólo el grupo α -NH₂ de lisina, dejando el ϵ -NH₂ libre y susceptible de reaccionar químicamente con otra molécula.

Se prepara t-Boc-tirosina por reacción del aminoácido con Boc ON en dioxano al 50% y luego la reacción de proteosíntesis se realiza disolviendo 0.02 moles de t-Boc-tirosina en 75 ml de 1.4 Butanodiol al que se agrega 0.7 g de α -Quimotripsina y 0.06 moles de lisina, disueltos en 25 ml de buffer acuoso Tris-HCl 0.05 M, llevándolo luego el pH a 6.5 y manteniendo la mezcla en constante agitación por una semana a 37°C. Los productos se separan por cromatografía en DEAE Sephadex.

Se obtiene el dipéptido t-Boc-tirosil-lisina con el grupo ϵ -NH₂ libre, dando reacción positiva frente a Ninhidrina, en un rendimiento de aproximadamente 60%. Este será utilizado para la síntesis química de ϵ -NH₂ derivados de lisina, con actividad biológica, tales como, Lisino-Alanina y Mollerossina, esta última causante del "vómito negro" en aves.

Nuestros resultados indican que la enzima α -Quimotripsina ha realizado la función de proteosíntesis dentro de la especificidad esperada frente a un residuo de tirosina y la formación de enlace peptídico con el α -NH₂ del aminoácido lisina, sin protección previa del grupo ϵ -amino.

Financiado por proyecto FONDECYT 2040/87.

METILACION DEL FACTOR DE ELONGACION EF-Tu DE CLOROPLASTOS DE *EUBLENA GRACILIS* (Methylation of the chloroplast elongation factor EF-Tu from *E. gracilis*). Toledo, M., Vargas, D. y Jerez, C.A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El aparato traduccional de los cloroplastos presenta muchas características de tipo bacteriano, lo que ha apoyado la hipótesis de un origen endosimbótico para este organelo. En estudios previos encontramos que el ribosoma eubacteriano presenta un patrón de metilación altamente conservado, y que éste se encontraría también en los cloroplastos. En esta comunicación ampliamos los estudios comparativos de las modificaciones del aparato traduccional al factor de elongación EF-Tu de cloroplastos de *E. gracilis*.

Los microorganismos se crecieron en presencia de metil(³H) metionina y el producto metilado se analizó mediante inmunoprecipitación con suero anti EF-Tu de *E. coli*, electroforesis en gels de poliacrilamida, autorradiografía y posterior hidrólisis del factor. Para la metilación in vitro se emplearon extractos crudos y metil(³H)-S-adenosilmetionina.

Estando presente la secuencia del sitio de metilación de EF-Tu de *E. coli* en el factor de cloroplastos de *E. gracilis*, se podría predecir la metilación de este último. Encontramos que EF-Tu de cloroplastos es metilado tanto in vivo como in vitro, conteniendo principalmente mono-metil-lisina, como en el caso de *E. coli*. Nuestros resultados sugieren la existencia de metiltransferasas en los cloroplastos y que la modificación del EF-Tu sería conservada, apoyando la idea de un posible origen bacteriano para el cloroplasto.

Financiado por Universidad de Chile, proyecto B.1972.87.

GENERACION ENZIMATICA DE ACIDO DICETOSUCCINICO EN ESTADO EXCITADO.

Villablanca, M. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca, Talca, Chile.

Una emisión débil observada durante la oxidación catalizada por peroxidasa (HRP) del ácido dihidroxifumarico a dihidroxitartrico es intensificada por la adición de detergente, CTAB. La emisión comienza alrededor de 500 nm siendo máxima cerca de 540 nm. El espectro de emisión y excitación de la mezcla de reacción presenta picos a 545 y 490 nm, respectivamente. La presencia o ausencia de oxígeno no altera el espectro. De estos resultados y de otros anteriores podemos deducir que (i) el ácido dihidroxifumarico es oxidado a ácido dicetosuccinico en un estado excitado singlete (ii) durante la catálisis emisión no hay moléculas de agua en el sitio activo de la enzima (iii) la clorofila es capaz de aceptar energía de especies excitadas al estado singlete.

Este trabajo fue financiado por "Financiadora de Estudios e Proyectos" (Finep, Brasil), el "Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico" (CNPq, Brasil) y una beca de postdoctorado de la Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo" (FAPESP, Brasil).