

VII REUNION ANUAL
SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE

Cartagena

11 – 13 de agosto de 1983

Resúmenes de las
Conferencias, Simposios y Comunicaciones

VII ANNUAL MEETING
SOCIETY OF BIOCHEMISTRY OF CHILE

Cartagena

August 11 – 13, 1983

Abstracts of
Lectures, Symposia and Communications

Conferencias

STRUCTURE AND EXPRESSION OF HUMAN MAJOR HISTOCOMPATIBILITY GENES.

(Estructura y expresion de los genes mayores de histocompatibilidad humanos).
Weissman, Sherman, M. Yale University, U.S.A.

We have used primer extension, together with synthetic oligonucleotide probes to obtain initial cDNA or genomic clones from human Class I, Class II antigens. These have then been used to isolate approximately forty Class I related genes or pseudo genes from homozygous cell line, and a number of heavy and light chain Class II genes. The organization of several of these genes has been established at the DNA sequence level. Expression of the Class I genes has been studied following transfection of intact and fragmented mouse cells. HLA B7 Class genes missing the normal promoter region gives rise to transcripts that initiate internally within the gene, as well as to what appears to be full length transcript, the structure of these transcripts is currently under investigation.

CIBERNETICA EVOLUTIVA.

(Evolutionary cybernetics).
Varela, Francisco J. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

La primera parte de esta charla consistirá en una *revisión* del pensamiento contemporáneo sobre evolución y su actual debate, concluyendo que *no* existe un consenso claro sobre los mecanismos de la evolución. Pondré especial atención a la crítica de la selección natural como solución fundamental de las preguntas sobre evolución. Esta revisión esbozará los resultados de algunas escuelas, en especial de aquellas que trabajan a nivel molecular y celular.

En la segunda parte de la charla presentaré mis propias contribuciones al debate, a través de una perspectiva cibernética, es decir, a través de identificar las bases del proceso evolutivo como independientes de la materialidad de sus componentes, y como requisito dinámico de cierta clase de sistemas. De esta perspectiva se deducen dos teoremas básicos: 1) de la conservación de la adaptación; 2) de la multiplicidad del acoplamiento estructural. La aplicación de estas ideas será ilustrada a través de dos situaciones: *i.* la evolución temprana de macromoléculas, y *ii.* la deriva molecular de proteínas.

Concluiré mostrando algunas consecuencias que resultan de este enfoque, y la necesidad de repensar el fenómeno evolutivo en toda su riqueza, en todos los niveles en que opera.

Simposio Internacional

THE SPATIAL FACTOR IN CELL DIFFERENTIATION.

(El factor espacial en la diferenciación celular).
Izquierdo, Luis. Departamento de Biología, Universidad de Chile.

It is assumed here that the process of cell differentiation can be largely reduced to the control of gene transcription by repressors and derepressors in the nuclear compartment whose operation ultimately de-

pends on signals from the cytoplasm. The case of early mammalian development will be discussed in order to show: first, that the cytoplasm compartment is or becomes spatially heterogeneous eventhough localized morphogenetic factors are still undefined; second, that the precise positioning of gene products within the cell probably requires a preexisting spatial structure; third, that positioning of cell membrane components may contribute to multicellular morphogenesis.

PHOSPHOLIPID SYNTHESIS AS A DIFFERENTIATED FUNCTION OF LUNG EPITHELIAL CELLS.

(Síntesis de fosfolípidos como función diferenciada de células epiteliales de pulmón).

Pochron, S. Cell Genetics Laboratory, Catholic Medical Center, New York, U.S.A.

The alveolar type II cell is a differentiated epithelial cell whose functions include the synthesis, packaging and secretion of specific phospholipids important to normal respiratory function. However, little is known about the regulation of these processes due to the cellular heterogeneity of the lung and to difficulties encountered in purifying and culturing normal type II cells.

Our laboratory has demonstrated that growth and lipid synthesis in both primary type II cell isolates as well as in lung tumor-derived cell line can be modulated through manipulation of cell culture medium and maintenance of cells on extracellular support growth and differentiation (i.e., characteristic morphology and lipid synthesis) for up to three months in culture. In contrast, cells cultured in serum-containing medium grow poorly and, after 3-5 days in culture, lose their ability to synthesize disaturated phosphatidylcholine, the primary lipid product of type II cells. In addition to use of defined medium for type II cell culture, we have utilized lung-derived connective tissue matrices for cell attachment in vitro. These matrices retain the in vivo composition of collagens, elastin and other specific matrix protein components. As opposed to cells cultured on plastic dishes, normal type II cells isolated from adult animals maintain their differentiated phenotype for longer periods of time when they interact with an extracellular matrix. Also, extracellular matrix stimulates disaturated phosphatidylcholine synthesis in partially differentiated lung tumor cells. These results demonstrate that we now have available appropriate in vitro model systems in which to study the effects of physiological modulators of lung-specific phospholipid synthesis and secretion. This knowledge will contribute to

our goal of understanding how the expression of the type II cell's specific genetic program is regulated both during development and in the adult organism.

ASSOCIATION BETWEEN LARGE TUMOR ANTIGEN AND CELLULAR PROTEINS ON THE SURFACE OF SV40-TRANSFORMED CELLS.

(Asociación entre antígeno T y proteínas celulares en la superficie de células transformadas por SV40).

Santos, Myriam, and Butel, J.S. Departamento of Virology and Epidemiology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, U.S.A.

Simian Virus 40 (SV40)-transformed cells synthesize large tumor antigen (T-ag), which is known to be the transforming protein although its mechanism of action has not been elucidated. T-ag is concentrated in the nucleus, but it is also present on the cell surface where it might have a role in maintaining the transformed phenotype. Such a role might be mediated by an interaction with cellular proteins.

The presence of a molecular complex between T-ag and p53, a cellular protein apparently involved in cell proliferation control, or histocompatibility antigens (mouse H-2 complex) on the surface of SV40-transformed mouse cells was investigated. To selectively detect surface T-ag, mKSA-A5c cells (SV40-transformed BALB/c kidney cells) were surface-iodinated by the lactoperoxidase technique or metabolically labeled with (³⁵S) methionine or ³²Pi, and subjected to differential immunoprecipitation. Labeled cells were incubated with specific antibodies, disrupted with NP40 solution, and the immune complexes adsorbed with formalin-fixed *Staphylococcus aureus* Cowan I. Eluted antigens were analyzed by SDS-PAGE, and autoradiography.

The results showed that p53 is detectable on the surface of SV40-transformed mouse cells, but not in their normal equivalents. A complex between large T-ag and p53, but not with H-2 antigens, was also detected on the surface of those cells.

The presence of p53 at the surface of SV40-transformed cells may be dependent

on T-ag expression. The T-ag/p53 complex might be related with the alterations of cell surface which are characteristics of the transformed state.

ORGANIZATION AND REGULATION OF HUMAN HISTONE GENES.

(Organización y regulación de genes histona humanos).

Stein, Gary S. University of Florida, U.S.A.

To study the regulation of human histone gene expression and the structural properties of human histone genes, our laboratory has isolated and characterized a series of cloned genomic human histone sequences. We have used these clones as probes to show that: A) Human histone genes are a family of moderately reiterated sequences with variations in the structure, organization and possibly in the regulation of the various copies; B) At least 15, though not necessarily all, human histone genes are coordinately expressed during the S phase of the cell cycle and appear to be temporally and functionally coupled with DNA replication; C) There are both transcriptional and post-transcriptional components to the regulation of those histone genes expressed in conjunction with DNA replication.

COUPLING OF HUMAN HISTONE GENE EXPRESSION AND DNA REPLICATION.

(Acoplamiento de la expresión de genes histona humanos y replicación de DNA).

Stein, Janet L. University of Florida, U.S.A.

Core histone mRNA metabolism has been examined in S phase HeLa cells recovering from DNA synthesis inhibition by 1 mM hydroxyurea. Using cloned human histone genes as probes for histone mRNA quantitation, the response to and recovery from DNA synthesis inhibition is shown to depend on the position of the cell with respect to the initiation of DNA replication. The incorporation of ³H-uridine into multiple histone mRNA in recovering

cells does not exceed preinhibition levels, and as this incorporation is maximal in early S phase, the synthesis of core histone mRNA is apparently present in control and interrupted S phase cells after recovery is not significantly different from that present in control cells and a temporal and functional coupling between histone mRNA levels and the relative rate of DNA synthesis is maintained in perturbed cells. The post-transcriptional modulation of cellular histone mRNA is therefore related to both the apparent rates histone mRNA and DNA synthesis, and changes thereof. Changes in these regulatory mechanisms during the cell cycle explain, in part, cell-cycle specific levels of hydroxyurea-resistant core histone mRNA.

SEPARATION BETWEEN CELLULAR DNA REPLICATION AND THE SYNTHESIS OR ACCUMULATION OF rRNA (Separación entre replicación de DNA y la síntesis o acumulación de rRNA).

Galanti, N., Mercer, E., Avignolo, C. and Baserga, R. Department of Pathology, Temple University, Philadelphia, USA.

To investigate the role of rRNA synthesis and/or accumulation in the control of cell proliferation an antibody against RNA polymerase I (aRNA pol I) was microinjected directly into the nuclei of quiescent Swiss 3T3 cells that were subsequently stimulated with serum.

Microinjection of aRNA pol I caused a 50-70% decrease in nucleolar RNA synthesis that lasted at least 17 hr, a 90% inhibition in the accumulation of nucleolar RNA, and a 70% inhibition in the accumulation of total cellular RNA. A control IgG, similarly microinjected into Swiss 3T3 cells had no inhibitory effect on either synthesis or accumulation of nucleolar and cellular RNA. Anti RNA pol I was totally ineffective in inhibiting nuclear DNA replication of serum stimulated Swiss 3T3 cells.

These results indicate that a normal rate of nucleolar RNA synthesis and a normal rate of accumulation of total cellular RNA are not a prerequisite for the entry of cells into S phase.

REGULATION OF CARDIAC MUSCLE GENE TRANSCRIPTION IN EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT (Regulación de la transcripción génica de músculo cardíaco en el desarrollo embrionario temprano).

Krauskopf, M.; Zárraga, A.M.; Mendola, C.; Saidapet, C.; Khandekar, P. y Siddiqui, M.A.Q. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile y Departamento de Bioquímica, Roche Institute of Molecular Biology, Nutley, N.J., U.S.A.

Heart muscle differentiation, which is an early event in chick embryonic development, provides a model system to investigate the mechanism(s) underlying the induction of embryonic gene functions. In order to correlate the process of muscle cell differentiation to changes in embryonic gene activity, we have cloned mRNAs sequences specific for myosin light (MLC) and heavy chain (MHC) polypeptides, the major constituents of muscle proteins, into *Escherichia coli* using plasmid pBR322. In addition, several genomic clones for myosin polypeptides were isolated by screening λ charon 4A based chick DNA library. We have previously reported isolation of a low molecular weight RNA, 7S RNA, that appears to play a role in myogenic differentiation in early embryonic cells *in vitro*. In order to understand its functional involvement in transcription of muscle specific genes, a recombinant plasmid, pSS48, containing the sequence for 7S RNA was constructed, characterized and sequenced. We found that 7S RNA, which is the product of repetitive chick DNA shares specific sequences common to MLC and MHC mRNAs, the single copy gene products. The common sequences reside in the 3'-untranslated regions of pML10 and pMHC8. Furthermore, 7S RNA appears in dividing myoblast significantly earlier than the onset of myosin gene transcription. These results suggests an important regulatory role for 7S RNA in heart muscle differentiation.

EXTRACELLULAR DIFFERENTIATION SIGNALS – MEMBRANE TRANSDUCTION THROUGH ADENYLATE CYCLASE (Señales extracelulares de diferenciación – transducción de membrana a través de adenilato-ciclase).

Olate, Juan; Jordana, Xavier; Connelly, Catherine and Allende, Jorge E. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, and Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Casilla 6671, Santiago, 7, Chile.

In general, cellular differentiation occurs in response to extracellular stimuli. The question then arises as to how extracellular signals can be transduced into intracellular responses that result in the differential metabolic or genetic activities of the target cells.

Adenylate cyclase present in the membrane of most eukaryotic cells serves as the transducing system for a large number of extracellular stimuli. Recent advances have made clear the versatility of this multi-component enzyme system and the mechanistic basis of its capacity to respond to positive and negative controls.

The amphibian oocyte differentiates into an egg cell through the process of meiotic maturation triggered by progesterone. Work in our laboratory has shown that progesterone inhibits oocyte adenylate cyclase. The inhibition of adenylate cyclase causes a drop in the intracellular cAMP concentration resulting in a cascade of events that leads to the synthesis of specific proteins that are responsible for the subsequent events of maturation.

Studies on the oocyte adenylate cyclase using different concentrations of guanine nucleotide analogs and forskolin indicate that the mechanism of progesterone inhibition is probably not mediated by the subunit Ni which is involved in the mechanism of other known inhibitors of this enzyme.

MECHANISM OF ACTIVATION OF eIF-2 α KINASE IN RABBIT RETICULOCYTE LY-SATES BY OXIDIZED GLUTATHIONE (Mecanismo de activación de eIF-2 α -quinasa por glutatión oxidado en lisados de reticulocitos de conejo).

Sierra, José M.; Palomo, C.; Vicente, O. and Ochoa, S. Centro de Biología Molecular, CSIC and Universidad Autónoma de Madrid, Spain.

GSSG activates an inhibitor of protein synthesis in rabbit reticulocyte lysates which corresponds to the same protein induced in heme-deprived lysates (HCI). This inhibitor phosphorylates the α -subunit of eIF-2 interfering with the recycling of the initiation factor. Whereas GSSG activated the HCI precursor (pro-HCI) in lysates and postribosomal supernatants, it was inactive with partially purified pro-HCI. Inhibition of lysate protein synthesis by GSSG was prevented or reversed by sugar phosphates capable of generating NADPH (G6P, F6P, dG6P) and by NADPH but not by NADH or FDP at the same concentrations. Dithiols but not monothiols acted like NADPH. None of these compounds was able to prevent the inhibition of translation caused by the absence of hemin or the presence of dsRNA. Further data suggest that NADPH interferes with HCI formation by GSSG. Inactive lysates in protein synthesis in the presence of hemin can be reactivated by DTT or compounds generating NADPH. This reactivation is accompanied by the disappearance of the eIF-2 kinase present in these lysates. Our results suggest that activation of HCI may occur as a consequence of hemin deprivation or NADPH depletion. NADPH may be required to keep the thioredoxin/thioredoxin reductase system active.

FACTORS REGULATING TRANSCRIPTION OF SV40 GENES (Factores que regulan la transcripción de genes SV40).

Weissman, Sherman. Department of Human Genetics, Yale University School of Medicine, 33 Cedar St., New Haven, CT 06510, U.S.A.

The transcription of SV40 early and late mRNA are initiated at two groups of start sites; one used early in the lytic cycle, the other after the onset of DNA replication. *In vitro* both sets of start sites are utilized with enzyme preparations from uninfected cells. We have prepared partially purified transcription systems, which utilize only the late-early starts, suggesting that an additional factor is specifically required to initiate early-early SV40 mRNA. Sequences necessary for transcription initiation, both

in vivo and *in vitro* lie within 100 bases upstream from the initiation site.

Late transcription initiation sites are strongly influenced by sequences downstream as well as upstream sequences. Sequences within 19 nucleotides upstream of the initiation site are sufficient to specify the major late initiation site. These results will be interpreted in terms of current understanding of eukaryotic RNA polymerase II promoters.

ADENOVIRUS EARLY GENE REGULATION AND THE AAV HELPER EFFECT (Regulación génica temprana de adenovirus y el efecto cooperador AAV).

Westphal, Heiner. Laboratory of Molecular Genetics, National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, Md 20205, USA.

The early adenovirus genes are arranged in clusters at several separate locations on both strands of the viral DNA. A complex regulatory scheme governs the expression of these genes. In an attempt to gain insight into this scheme, we have begun to microinject subsets of adenovirus early genes and gene products into cells permissive for adenovirus growth, and to measure their biological activities in a simplified system. The effect we chose to analyze is the ability of adenovirus to promote the growth of the defective adeno-associated virus, AAV. We have identified ordered sequences of communications among the early genes of adenovirus type 2 (Ad2) that result in expression of helper activity. We purified DNA fragments and mRNAs corresponding to early Ad2 regions E1A, E1B, E2A, E3 and E4 and injected them via glass capillaries into AAV-infected cells. DNA was placed in the nucleus, RNA in the cytoplasm. AAV DNA and proteins synthesized in response to the injected nucleic acids were extracted from as few as 50 cells and identified by gel electrophoresis. E4 was identified as the region necessary and sufficient to provide the AAV helper effect. However, expression of this helper effect is a complex process dependent on the synergistic interaction of several functions encoded in different early gene clusters of the adenovirus genome.

DNA SYNTHESIS, DNA POLYMERASES AND THE EFFECT OF DIADENOSINE TETRA-PHOSPHATE (Ap₄A) IN *Xenopus laevis* OOCYTES (Síntesis de DNA, DNA-polimerasas y el efecto de diadenosina tetrafosfato (Ap₄A) en oocitos de *Xenopus laevis*).

Zourgui, L.; Solari, A.; Tarragó-Litvak, L. and Litvak, S. Institut de Biochimie Cellulaire et Neurochimie du CNRS. 1 rue Camille Saint Saens. 33077 Bordeaux cedex. France.

* Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Casilla 6671. Santiago 7. Chile.

Large oocytes (stage VI) from *Xenopus laevis* ovaries are unable to replicate DNA, while unfertilized eggs matured in the presence of human gonadotrophic hormone are able to duplicate endogeneous DNA. We have found that stage VI oocytes have only DNA polymerases α and γ . The first one is confined in the nucleus and the second in the mitochondrial fraction. We have inferred from several experiments that the previously described DNA polymerase β activity is most probably localized in the follicular cells surrounding the oocytes. We will present evidences on the subcellular localization of DNA polymerases in oocytes from different stages of development as well as from unfertilized eggs.

The second part of our talk will be devoted to the study we have performed on the effect of Ap₄A on DNA synthesis in amphibians oocytes. This dinucleotide is dramatically increased in rapidly growing animal cells and binds specifically to the DNA polymerase α holoenzyme complex. Ap₄A stimulates DNA synthesis in *Xenopus laevis* oocyte extracts, as well as

microinjected in the nuclear compartment of stage VI oocytes.

In vitro effect: DNA polymerase activity in oocyte extracts was highly stimulated by Ap₄A, Ap₃A, ATP and other derivatives. No stimulation was observed using the same compounds on eggs ovulated after injection of chorionic gonadotrophic hormone. The stimulation involved DNA polymerase α as shown by the effect of inhibitors of DNA synthesis. The effect of Ap₄A on DNA synthesis was observed with activated DNA, poly dT, and poly dT-oligo dA as templates while no effect was found with poly dA-oligo dT and poly dC-oligo dG. These results support a role of Ap₄A in the initiation of DNA synthesis. Evidences will be presented that oocyte extracts are able to transform very efficiently ATP in a compound having many properties of Ap₃A.

In vivo effect: Ap₄A stimulated DNA synthesis when injected into oocytes. The stimulation was dramatically increased with an exogeneous DNA microinjected. Aphidicolin inhibited the effect of the dinucleotide supporting a role of DNA polymerase α in this process. No stimulation by Ap₄A was observed in microinjected eggs, nor ATP was able to mimic the *in vivo* effect of Ap₄A both in oocytes or eggs. The behaviour of microinjected synthetic polynucleotides was identical to those found *in vitro*.

We will discuss the possibility that Ap₄A stimulates DNA synthesis by creating new origins of replication, used as primers for DNA synthesis by DNA polymerase α . Supported by CNRS and INSERM (France) and the University of Chile.

EFFECTO DE LA PROGESTERONA EN LA INCORPORACION DE ACETATO 2-14C A COLESTEROL, COLESTEROL ESTER, FOSFOLIPIDOS Y SALES BILIARES EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA. (Progesterone effect on the incorporation of 2-14C-acetate into cholesterol, cholesterol ester, phospholipids and bile salts in rat isolated hepatocytes). Aiallón, J., Morales, M.N., Hervi, F.O. y Bronfman, M. Laboratorio de Citología Bioquímica, Departamento de Biología Celular, P. Universidad Católica de Chile.

Estudios "in vivo" en hígado de rata han demostrado un aumento en la secreción biliar de fosfolípidos y colesterol por acción de la progesterona. La disminución de la actividad hepática de la Acil-CoA colesterol aciltransferasa (ACAT) que se observa en ratas tratadas con progesterona, además de la inhibición "in vitro" de la enzima por la hormona, han llevado a proponer una menor esterificación de colesterol como uno de los mecanismos de acción de la progesterona.

En el presente trabajo se estudió la posibilidad de que la mayor secreción biliar de colesterol y fosfolípidos inducido por la progesterona se deba, en parte, a un aumento de la biosíntesis de estas sustancias. Con este objetivo se determinó la incorporación de acetato 2-14C a colesterol, colesterol ester, fosfolípidos y sales biliares en hepatocitos aislados de ratas controles y tratadas con progesterona. La incorporación de marca desde acetato a colesterol, fosfolípidos y sales biliares en hepatocitos de ratas tratadas con progesterona muestra una tendencia a aumento, no significativa, con respecto a los controles, sin modificación de la incorporación a colesterol ester. Estos resultados permiten postular que la mayor secreción biliar de colesterol y fosfolípidos inducida por la progesterona no se lleva a efecto por una mayor síntesis "de novo" de estos productos y reflejan, posiblemente, una redistribución de los compartimentos de colesterol libre y esterificado existentes en la célula, apoyando un rol regulador de la ACAT en el proceso.

(Financiado por proyecto DIUC 76/82)

8-AZIDO ADP COMO MARCADOR DE FOTOAFINIDAD DE LA QUINASA PIRUVICA DE MUSCULO DE CONEJO. (8-Azido ADP as photo affinity label for rabbit muscle pyruvate kinase). Bosch, M., Eyzaguirre, J., Schäfer, H.-J. y Bazaes, S. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile e Instituto de Bioquímica, Universidad de Mainz, Alemania.

Los reactivos de fotoafinidad han encontrado aplicaciones crecientes en la marcación de sitios de unión de sustratos o efectores en numerosas enzimas. Con el objeto de marcar el sitio activo de la quinasa pirúvica de músculo de conejo (PK) se empleó el 8-azido ADP (N_3 ADP).

El N_3 ADP en presencia de Mg^{+2} resultó ser sustrato de la enzima con un Km de 2,4 mM comparado con 0,28 mM para el ADP; la $V_{máx}$ con el análogo fue el 30% de la obtenida con ADP. Al irradiar la enzima en presencia de N_3 ADP y Mg^{+2} se produce la inactivación de ella con cinética de pseudo primer orden alcanzándose un "plateau" el cual es dependiente de la concentración de N_3 ADP. A concentración infinita del reactivo de fotoafinidad se obtiene la inactivación total de la enzima. La PK parcialmente inactivada presenta la misma Km que la enzima nativa. El azido-ATP + Mg^{+2} es aún mejor inactivador que el N_3 ADP, este compuesto es inhibidor competitivo de la PK con respecto al ADP con una K_i de 1,3 mM. Los sustratos PEP, ADP y ATP protegen a la PK de la inactivación producida por N_3 ADP. El azido AMP + Mg^{+2} también produce la inactivación de la PK aunque a velocidad mucho menor.

Se concluye que el N_3 ADP así como el N_3 ATP se comportan como marcadores de fotoafinidad del sitio de unión de sustratos de la PK de músculo de conejo.

Proyecto DIUC 215/82, Universidad Católica de Chile.

MgATP NO ES INHIBIDOR DE UNA FOSFOFRUCTOQUINASA-2 MUTADA DE *E. coli*. (MgATP is not an inhibitor of a mutant phosphofructokinase-2 from *E. coli*).

*Aldunate, J., Guixé, V. y Babul, J. *Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, †Departamento de Biología y ‡Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Cepas con la mutación *pfkB1* poseen niveles aumentados de Pfk-2, mientras que cepas con las mutaciones *pfkB1 pfkB10* poseen altos niveles de una Pfk tipo 2 alterada estructuralmente, denominada Pfk-2*. Ambas cepas crecen bien en azúcares, pero cepas con la doble mutación crecen lentamente en sustratos gluconeogénicos. Para conocer el efecto de la mutación *pfkB10* en Pfk-2, se procedió a estudiar la inhibición por ATP, fenómeno común a la mayoría de las Pfk y de gran importancia en su regulación.

La actividad enzimática se midió en ensayos acoplados a la formación de fructosa-1,6-bisP. Se varió la concentración de Mg^{2+} , F-6-P y ATP y se calculó la concentración de Mg libre, MgATP y ATP^{4-} en cada caso.

A concentraciones subsaturantes de F-6-P, MgATP inhibió solo a Pfk-2 ($K_i \sim 4,3$ mM). Este efecto disminuyó al aumentar la concentración de F-6-P, al disminuir el pH del medio de reacción y al usar UTP, ITP, GTP o CTP en vez de ATP. ATP^{4-} inhibió tanto a Pfk-2 ($K_i \sim 0,28$ mM) como a Pfk-2* ($K_i \sim 0,17$ mM); en ambos casos la inhibición no se alteró al variar la concentración de F-6-P.

Estos resultados sugieren la existencia de un sitio regulatorio para MgATP en Pfk-2, el cual se encontraría alterado en Pfk-2* como consecuencia de la mutación *pfkB10*.

Financiado por Universidad de Chile (Proyecto B 1368), Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Proyecto 0255), PNUD-UNESCO CHI 81/001 y OEA.

MECANISMO CINÉTICO DE LA KINASA FOSFOMEVALONICA (Kinetic mechanism of phosphomevalonate kinase). D.J. Valdebenito, E. Cardemil, A.M. Javalquinto y J. Eyzaguirre. Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica de Chile y Departamento de Química, Universidad de Santiago.

La quinasa fosfomevalónica cataliza la reacción: fosfomevalonato (MVAP) + ATP \rightleftharpoons pirofosfomevalonato (MVAPP) + ADP. La enzima de hígado de cerdo es un monómero de PM 22.000 y presenta cinética hiperbólica. En este trabajo se estudia su mecanismo cinético por métodos de velocidad inicial e intercambio isotópico al equilibrio.

La enzima se purificó a homogeneidad. La velocidad inicial se determinó por 2 métodos: a) Espectrofotométrico, usando un ensayo acoplado para medir la formación de ADP. b) Radioquímico, empleando ^{14}C -MVAP el cual es separado del ^{14}C -MVAPP por cromatografía en papel DEAE. La velocidad de intercambio isotópico al equilibrio se midió usando ^{14}C -ADP y ^{14}C -MVAP, separándose sustratos y productos por el mismo método cromatográfico.

Las constantes cinéticas obtenidas en estudios de velocidad inicial son: Km MVAP=22 μ M, Km ATP=57 μ M, en tampón Tris-HCl pH 7,5 y 30°C. La inhibición por producto dio como resultado inhibición mixta tanto con ADP como con MVAPP al variar ATP y mantener constante MVAP. Al inhibir con ADP y variar MVAP con ATP constante, la inhibición resultó acompetitiva. La velocidad de intercambio isotópico al equilibrio entre MVAP \rightleftharpoons MVAPP, al variar [ATP]/[ADP] siguió una curva hiperbólica con decaimiento a altas concentraciones, y la velocidad de intercambio entre ATP \rightleftharpoons ADP, al variar [ATP]/[MVAPP] obedeció una curva similar.

Los estudios de velocidad inicial sugieren un mecanismo cinético secuencial. Los resultados de inhibición por productos permiten postular que el mecanismo es ordenado según el esquema:

MVAP + ATP \rightleftharpoons MVAPP + ADP lo cual es confirmado con los resultados de velocidad de intercambio isotópico al equilibrio.

ATP- γ -S : SUSTRATO E INHIBIDOR DE LA DESCARBOXILASA PIROFOSFOMEVALONICA, (ATP- γ -S : substrate and inhibitor of pyrophosphomevalonic decarboxylase), Cardemil, E., Solís de Ovando, F. y Jabalquinto, A.M. Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile.

La descarboxilasa pirofosfomevalónica cataliza la descarboxilación de pirofosfomevalonato en presencia de ATP y un metal bivalente para dar isopentenilpirofosfato, ADP, P_i y CO_2 . Nuestro grupo se encuentra trabajando en el mecanismo de acción de la enzima de hígado de pollo, y nos interesa determinar la estereoquímica de eliminación de P_i y el orden en que los sustratos se adicionan a la enzima. Estudios anteriores indican que esta adición es secuencial, pero aún no establecemos si es ordenada o al azar.

Se utilizó ATP- γ -S obtenido de Boehringer, Alemania, y repurificado en nuestro laboratorio. La descarboxilasa pirofosfomevalónica se obtuvo de hígado de pollo, y tenía una a.e. de 6,7 U/mg.

Se estableció que ATP- γ -S se comporta como sustrato de la enzima, aunque su velocidad de utilización es 1,3% de la del ATP. Se encontró que ATP- γ -S es un inhibidor competitivo con respecto al ATP ($K_i = 0,13$ mM) y competitivo con respecto al pirofosfomevalonato ($K_i = 0,48$ mM).

Se concluye que a) ATP- γ -S es sustrato de la enzima, lo que permitirá determinar la estereoquímica de la reacción utilizando $[\gamma-^{17}O, \gamma-^{18}O]$ ATP- γ -S quiral y determinando la quiralidad del $[^{16}O, ^{17}O, ^{18}O]$ tfofosfato liberado al medio y, b) el ATP- γ -S es un inhibidor de la descarboxilasa; el estudio de su inhibición con respecto a los sustratos sugiere un mecanismo ordenado para la adición de éstos a la enzima.

Financiado por proyectos 514/82 (FNC) y 08-10-82-40 (USACH).

ESTUDIOS SOBRE EL FACTOR DE INICIACION eIF_2 DE OOCITOS Y SU FOSFORILACION. (Studies on the eIF_2 initiation factor of oocytes and its fosforilation.) Carvallo, P., Sierra, J.M. y Allende, J.E. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y Departamento de Virología y Genética Molecular, Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid.

Durante las primeras horas de la maduración meiótica de los oocitos de *Xenopus laevis* gatillada por hormonas, ocurre un notable aumento en la síntesis de proteínas. Este fenómeno es regulado a nivel post transcripcional y se ha demostrado ser necesario para que ocurra la maduración del oocito. Por otra parte, en lisados de reticulocitos se ha descrito un sistema de regulación de la traducción, a través de la fosforilación de la subunidad α (PM 38.000) del factor de iniciación (eIF_2) de la síntesis de proteínas por una proteína quinasa independiente de cAMP (HCI). En reticulocitos la fosforilación eIF_2 , producida en ausencia de hemina, inhibe la síntesis de proteínas.

Planteando una analogía con este sistema regulatorio hemos purificado parcialmente el eIF_2 de oocitos. En las fracciones que tienen actividad de eIF_2 , se ha observado fosforilación de una proteína de 38.000 daltons catalizada por HCI. Además, en estas fracciones se ha detectado una actividad de proteína quinasa independiente de cAMP que fosforila la subunidad α de eIF_2 de *Artemia salina*, purificado, el cual también es fosforilado por HCI de reticulocitos. La microinyección en los oocitos de un factor termoestable (HS) purificado de reticulocitos, que es un activador de HCI produce una inhibición de un 80% de la síntesis proteica de los oocitos.

Estos resultados son compatibles con una posible regulación de la síntesis de proteínas de oocitos a través de la fosforilación del eIF_2 .

Financiado por Proyecto PNUD/Unesco CHI/81/001, OEA, Fondo Nacional de Ciencias y Universidad de Chile.

DISTINTAS FORMAS DE DNA POLIMERASAS AISLADAS DE *THERMUS THERMOPHILUS* HB-8. (DNA polymerase species isolated from *Thermus thermophilus* HB-8).- Cotorás, M., Rüttiman, C., Zaldívar, J. y Vicuña, R.- Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Se detectaron tres actividades DNA polimerásicas en la bacteria *Thermus thermophilus* HB-8. Estas especies se separaron en una cromatografía en fosfoocelulosa a pH 7,5 y se denominaron L, A y B, de acuerdo al orden de elución de esta columna.

Con el fin de conocer las relaciones que existen entre estas formas parcialmente purificadas, se estudiaron algunas de sus propiedades. Las tres formas se diferencian en la utilización de distintos templados, en su sensibilidad a N-etilmaleimida, estabilidad a 90°C y en el requerimiento de cationes divalentes: mientras que la forma L es veinte veces más activa con $MnCl_2$ que con $MgCl_2$, A y B muestran un 50% de actividad cuando el Mg es reemplazado por el Mn. Por otra parte, las tres formas exhiben un efecto inhibitorio semejante en presencia de concentraciones crecientes de NaCl.

El peso molecular de la forma L es de 82.000 y el de las especies A y B es de 98.000.

Las temperaturas a las cuales estas enzimas alcanzan su máxima actividad son de 55°C y 63°C para la forma L, y las especies A y B respectivamente.

Con los datos obtenidos en este trabajo, no es posible determinar si las actividades A, B y L corresponden a formas diferentes de una misma enzima, o bien si se trata de tres enzimas codificadas por genes distintos.

Financiado por DIUC.

"REGULACION DEL CICLO DEL γ -GLUTAMILO EN GLANDULA MAMARIA DE RATA". (Regulation of γ -glutamyl cycle in rat mammary gland).

Devoto, A., Puente, J. y Sapag-Hagar, M. Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

En nuestro laboratorio se ha descrito la existencia del ciclo del γ -glutamilo en la glándula mamaria de rata, el que presenta un significativo aumento de actividad en la lactancia.

En el presente trabajo se ha estudiado *in vitro*, en cultivo de explantes de glándula mamaria, la acción de los dos principales inhibidores fisiológicos de la lactancia, progesterona y AMP cíclico sobre dicho ciclo. Las enzimas estudiadas fueron γ -glutamilttransferasa (γ GT), 5-oxoprolinasa y γ -glutamiltcisteínasintetasa. El medio de cultivo fue MEMD con un 10% de suero fetal.

Tanto el dibutiril-AMP cíclico (1,0 mM) como la flufenazina, teofilina y adrenalina inhibieron significativamente solo a la 5-oxoprolinasa, enzima marcadora del ciclo. La progesterona (5-40 μ M) tuvo este mismo efecto, pero además aumentó marcadamente la actividad de la γ GT, efecto dependiente de la concentración de hormona. En base a las propiedades de estas enzimas se presenta un posible modelo de la función fisiológica del ciclo en la glándula.

Proyecto B 1138-8223 Universidad de Chile

EFFECTO FOTODINAMICO EN LISOZIMA Y α -LACTALBUMINA (Photo-dynamic effect in lysozyme and α -lactalbumin). Edwards, A.M. y Silva, E. Laboratorio de Química de Proteínas y Alimentos, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Introducción: El análisis cinético de la fotooxidación de aminoácidos en proteínas permite predecir el grado de exposición de dichos residuos en la conformación espacial. Es posible estimar el grado de exposición de los residuos de Trp en proteínas, estudiando su espectro de fluorescencia, ya que la λ de máxima emisión varía según cual sea el entorno de estos residuos.

Método: La composición aminoacídica se determinó en un analizador de aminoácidos Beckman 120-C. Se irradió con luz monocromática (452 nm) en presencia de riboflavina. La fluorescencia se estudió en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer 650-10S.

Resultados y Discusión: El análisis cinético de la destrucción de aminoácidos en lisozima nativa indica que de los seis residuos de Trp presentes en esta enzima dos se encuentran expuestos al solvente. Al modificar la estructura de lisozima se produce una mayor exposición de estos residuos al solvente. Al efectuar este análisis en α -lactalbúmina se obtiene un residuo de Trp expuesto. Esta diferencia con lisozima se podría explicar por el hecho de que uno de los residuos expuestos en lisozima, Trp-62, no corresponde a un residuo de Trp en α -lactalbúmina sino que al residuo Ile-59. Lisozima nativa presenta una λ de máxima emisión de 338 nm que da cuenta de dos residuos de Trp expuestos y cuatro apantallados. Al modificar la estructura, este máximo se corre a λ más largas, lo que está dando cuenta de que los residuos de Trp tienen en un entorno más polar. α -Lactalbúmina presenta una λ de máxima emisión mucho menor (325 nm), lo que estaría indicando que sus residuos de Trp se encuentran en la zona hidrofóbica de la molécula. Esto puede explicarse si la fluorescencia del único residuo expuesto se ve apagada por transferencia de energía. Al modificar la estructura de α -lactalbúmina también se observa un corrimiento de la λ de máxima emisión a λ más largas.

EFFECTO DE LA RADIACION GAMA (^{60}Co) CUERPO TOTAL SOBRE EL PATRON ELECTROFORÉTICO DE PROTEINAS DE CEREBRO. (Whole body gamma (^{60}Co) radiation effect on the brain's electrophoretic protein pattern). Egaña, E., Ramirez, M.T. y Acosta, M. Instituto de Medicina Experimental - Facultad de Medicina - Universidad de Chile.

En trabajos realizados en tres áreas del Sistema Nervioso Central (SNC) de ratas sometidas a ingestión permanente y filial de etanol, expuestas a radiación ionizante, se observaron algunas diferencias del contenido de proteínas, lo cual nos llevó a estudiar que significado tendrían estas alteraciones. Con este propósito se inició como etapa preliminar el estudio del perfil electroforético de cada una de las áreas del SNC de estas ratas.

Ratas adultas ♂ y ♀; grupo control (Normal) y tres grupos experimentales: "A.G./12", "A.G./25" y "A.G./H₂O"; las ratas fueron expuestas a 1,000 R gama (^{60}Co) cuerpo total y se sacrificaron 8-10 días post-irradiación. Se analizaron tres áreas del SNC: corteza cerebral, hipotálamo y cerebelo. Tres fracciones subcelulares: mitocondria, microsoma y citosol; el estudio electroforético se realizó en gel de poliacrilamida - SDS, al 14%, a 30 mA por aproximadamente cinco horas.

Los resultados obtenidos muestran una alteración en algunas bandas de proteínas en los animales irradiados, respecto a sus controles. Siendo más notoria esta alteración en las ♀ especialmente en la fracción microsomal y citosólica.

ESTIMULACION DE LA ACTIVIDAD F₁-ATPasa DE MITOCONDRIAS ACOPLADAS DE HIGADO DE RATA POR CATIONES MONOVALENTES. (Stimulation of F₁-ATPase activity by monovalent cations in rat liver coupled mitochondria). Ferreira, J. y Gil, L. Departamento de bioquímica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

El complejo F₁-ATPasa de mitocondria de hígado de ratas puede sufrir una transición reversible desde un estado inactivo a un estado activo. Esto ocurre mediante la asociación reversible de la proteína inhibidora de ATPasa con el componente F₁ del complejo.

Es posible determinar el estado de transición de la F₁-ATPasa midiendo su actividad en presencia de un desacoplante. Usando este método, hemos observado que los cationes monovalentes: Li⁺, Na⁺ y K⁺, aumentan la actividad de hidrólisis de ATP alrededor de 10 veces y paralelamente se observó un gran hinchamiento de las mitocondrias.

Este aumento de la actividad de hidrólisis de ATP se debería, presumiblemente, a que los cationes monovalentes inducirían la disociación entre la proteína inhibidora y la F₁-ATPasa; este efecto sería contrario al del Ca²⁺ que inhibe la actividad de hidrólisis de ATP, porque induce la asociación de la proteína inhibidora con F₁-ATPasa. (M. Tuena de Gómez-Puyou y col. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 592, 396-405)

Financiado por Proyecto de SDCACI N° B-535-835-5. Universidad de Chile.

ESTUDIO DE UNA UNION FOTOINDUCIDA LISOZIMA-RIBOFLAVINA II (Study of photobinding lysozyme-riboflavin II). Ferrer, I. y Silva, E. Laboratorio de Química de Proteínas y Alimentos, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Se ha demostrado en estudios anteriores que al irradiar lisozima en presencia de riboflavina, se produce una unión fotoinducida lisozima-riboflavina. En las flavoproteínas naturales la unión de la flavina a la proteína se realiza a través de un residuo de Cys, His ó Tyr. Considerando esta información, nos interesó estudiar la posible participación de estos residuos en la unión fotoinducida lisozima-riboflavina. Al modificar químicamente los residuos de Tyr con tetranitrometano y los puentes disulfuros mediante reducción, carboximetilación y posteriormente al irradiar estas dos formas de lisozima modificada en presencia de riboflavina ¹⁴C, se detectó la unión de la riboflavina a la proteína en ambos casos, lo que indicaba que probablemente la unión fotoinducida no se producía a nivel de los residuos de Tyr o Cys. Por otra parte, al modificar fotoquímicamente el único residuo de His de la lisozima y parcialmente los residuos de Trp de ella, se observaba incorporación de riboflavina ¹⁴C después de una irradiación en presencia de este sensibilizador pero la magnitud de la marca era un tercio del observado anteriormente. Esto era una indicación de que la His no participaría tampoco en la unión fotoinducida y que probablemente algún residuo de Trp estaría participando en la unión. La fotooxidación sensibilizada con riboflavina de los péptidos L-II (aa 13-105), L-III (aa 106-129) y L-II-III (aa 13-129) presentaron la unión al sensibilizador. Este hecho corroboró la no participación de los residuos de His y Tyr en esta unión ya que L-III carece de estos aminoácidos. Por otra parte el único aminoácido fotooxidable que está presente en estos segmentos es el Trp, el cual se fotooxida con rendimientos cuánticos enormemente altos. Se postula una posible unión entre Trp y riboflavina.

ANALISIS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE SITIOS DE UNION DE RNA POLIMERASA DE E. COLI A DNA DE PLASMIDIOS AISLADOS DE BACTERIAS TERMOFILICAS. (Electron microscopy studies of the binding sites of *E. coli* RNA polymerase to DNA from plasmids isolated from thermophilic bacteria). González, B., Vasquez, C. y Vicuña, R.- Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Celular, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Para estudiar la estructura y organización génica de bacterias termofílicas se han aislado y caracterizado los plasmidios pTT8 y pTF62 presentes en *Thermus thermophilus* HB8 y *Thermus flavus* AT62, respectivamente. En este contexto se ha emprendido el estudio comparativo de la unión de RNA polimerasa de *Escherichia coli* a los plasmidios nativos y a los híbridos construidos con pBR322. Este análisis se realizó utilizando una técnica de visualización de ácidos nucleicos por microscopía electrónica (Koller, T. y cols., *Biopolymers*, 13, 995, 1974), que permite identificar la posición de la enzima unida a la doble hebra.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten afirmar que la RNA polimerasa posee una afinidad tres veces superior por el DNA mesófilo que por el termófilo. Sin embargo, fue posible identificar sitios de unión de la enzima tanto a los plasmidios nativos como a las porciones termofílicas de los híbridos pBR322-pTF62 y pBR322-pTT8. Así, en cada híbrido se identificaron dos fuertes sitios de unión en pBR322 y 6 a 7 sitios menores en pTF62 y pTT8. Los primeros resultaron ser coincidentes con los sitios de inicio de transcripción en pBR322 previamente descritos (Stuber, D. y Bujard, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 167, 1981).

La afinidad de la enzima baja drásticamente si se utilizan plasmidios previamente linealizados o si se aumenta la fuerza iónica del medio de incubación.

Financiado por DIUC.

CARACTERIZACION DE UNA CISTEINA ALTAMENTE REACTIVA EN FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA. (Characterization of a highly reactive cysteine residue in Fructose 1,6-bisphosphatase). Hubert, E. y Slebe, J.C.- Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

En un intento por estudiar el mecanismo de activación de Fructosa 1,6-bisfosfatasa por cationes monovalentes, hemos demostrado que el tratamiento de la proteína con NaNCO 25 mM, pH 7,5 y 37° conduce a una pérdida de la activación de la enzima por K⁺ (medida como actividad relativa en presencia y ausencia de K⁺) sin alterar significativamente otros parámetros cinéticos, ej.: actividad catalítica, inhibición alostérica por AMP. La cinética de pérdida de activación mostró ser de primer orden y reversible, sugiriendo la posible participación de 2 grupos SH en la activación por el catión monovalente.

Se han usado estas condiciones para marcar la proteína con ¹⁴C-cianato y el análisis de la estequiometría de la reacción indicó que existen dos residuos esenciales para la activación por K⁺ por mol de enzima. Tratamiento del derivado (¹⁴C)cianato-enzima con Pronasa, produjo una mezcla de péptidos y aminoácidos libres, los cuales fueron cromatografiados en una columna de Bio Gel P-2. Las fracciones radioactivas fueron analizadas mediante cromatografía en papel y por composición de aminoácidos.

Los resultados obtenidos muestran la presencia de S-(¹⁴C)carbamilcisteína, indicando que los residuos esenciales para la activación por K⁺ son residuos cisteína.

Financiado por Proyecto S-82-36. Dirección de Investigación, UACH.

MODULACION DE LA VIA LIPOXIGENASA DEL METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO POR LAS HORMONAS SEXUALES. (Modulation of the lipoxigenase pathway of arachidonic acid metabolism by sex hormones). Guivernau, M. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Los estrógenos y progestágenos modifican la producción de prostaglandinas (PG) en diversos tejidos. Con el fin de evaluar el efecto de estas hormonas sexuales en la biosíntesis de leucotrienos (LT) y otros derivados de lipoxigenasa (HETE), se estudió el metabolismo del ácido araquidónico (AA) en dos órganos target para estrógenos, el útero y la encía obtenidos de ratas Sprague Dawley en diferentes estadios del ciclo sexual y de conejos hembras New Zealand tratadas durante 14 días con etinilestradiol (E) 140 µg/semana o E más un progestágeno, noretindrona 3 mg/semana. Estos tejidos fueron incubados en Krebs con (1-¹⁴C) AA durante 2 hrs a 37°C. Los productos radioactivos fueron extraídos con solventes orgánicos y las PG, LT, HETE y AA separados por cromatografía de capa fina utilizando diversos sistemas de solventes. Los metabolitos radioactivos del AA se determinaron de acuerdo a la migración de los standards mediante autoradiografía y radiocromatografía scanner y se cuantificaron en un contador de centelleo líquido. Estrógeno estimuló e indujo la síntesis de LTB₄, 5-HETE y 12-HETE en el tejido uterino y gingival de animales tratados con E y en úteros obtenidos de ratas en proestro tardío o estro. La adición del progestágeno al tratamiento estrógeno antagonizó este efecto. Estrógeno estimuló la producción de prostaciclina, pero no modificó la síntesis de PGF_{2α} y PGE₂. Indometacina inhibió la formación de PG, pero no bloqueó la producción de los derivados de lipoxigenasa. Estos resultados evidencian que las hormonas sexuales modulan la vía lipoxigenasa del metabolismo del AA en condiciones fisiológicas y farmacológicas. Además, LTB₄ y HETE son quimiotácticos para los neutrófilos y eosinófilos lo cual sugiere la participación de estos metabolitos del AA en ciertos mecanismos fisiológicos y patológicos mediados por las hormonas sexuales.-

ESTUDIOS DE pH DE LA DESCARBOXILASA PIROFOSFOMEVALONICA (pH studies of pyrophosphomevalonate decarboxylase). Jabalquinto, A.M., Lira, P. y Cardemil, E. Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile.

La descarboxilasa pirofosfomevalónica cataliza la reacción bimolecular entre ATP y mevalonato-5-pirofosfato (MVAPP) para formar isopentenilpirofosfato, ADP, Pi y CO₂ en presencia de un metal divalente.

Se estudió la variación de los parámetros cinéticos para la enzima de hígado de pollo en el rango de pH de 5,0 a 8,1, usando un tampón que era 35 mM en ácido fórmico, Mes, Bistrispropano y 100 mM en KCl. La actividad enzimática se determinó mediante un ensayo espectrofotométrico o por determinación de P_i.

El parámetro V/K para ambos sustratos disminuyó bajo pH 5,75, y sobre 6,6 para ATP y 6,8 para MVAPP. En cambio, V para ambos sustratos no varió entre pH 5,05 a 7,5, observándose una pequeña disminución a pH 8,05. Como el pK de 5,75 es diferente del pK del MgATP⁻² (5,3), se concluye que refleja un grupo en la enzima importante para la unión del sustrato pero no para la catálisis ya que este pK no se ve en el gráfico de V en función del pH. Los resultados sugieren que tanto MnHATP⁺ como MgATP⁻² son sustratos de la enzima. Este punto fue confirmado mediante la comparación de curvas experimentales de velocidad en función de la concentración de ATP a pH 8,05 y 4,5, con curvas teóricas obtenidas mediante un programa de computación suponiendo MnATP⁺ o MnHATP⁺ como sustratos.

Financiado por proyectos 514/82 (FNC) y 08-10-82-40 (USACH).

PROTEOLISIS EN MITOCONDRIA DE LEVADURA. EFECTO DE ATP E INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO. (Proteolysis in yeast mitochondria. Effect of ATP and influence of growth medium). Jacob, G.; Tellez, R. y George-Nascimento, C. Dpto. Ramos Básicos, División Cristero, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y Dpto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Puerto Rico.

La proteólisis estimulada por ATP ha sido descrita en una serie de sistemas. En este trabajo se estudió el efecto de ATP sobre la degradación de proteínas mitocondriales sintetizadas *in vivo* (totales) e *in vitro* (origen mitocondrial). Estas últimas se obtienen marcadas incubando mitocondrias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio con ^{35}S -metionina. Estas proteínas son rápidamente degradadas en el organelo y el proceso es estimulado por ATP. La degradación de proteínas sintetizadas *in vivo* se estudia en mitocondrias aisladas de células crecidas en un medio con ^{35}S . En este caso, la proteólisis es lenta y no es estimulada por ATP. Estos resultados se confirman en experimentos de doble marca, con mitocondrias aisladas de células crecidas en ^{35}S y se sintetizaron proteínas usando ^3H -leucina. Se propone que la proteólisis estimulada por ATP ocurre sólo cuando los productos de la traducción mitocondrial, en su mayoría subunidades de complejos respiratorios, no se integran con las subunidades citoplasmáticas respectivas para formar dichos complejos.

La actividad estimulada por ATP se ve muy disminuida si las células crecen en un medio en que se ha disminuido el extracto de levadura (3 a 1%) y el SO_4^{2-} ($1,1 \pm 0,007 \text{ M}$). Dicha actividad aumenta o disminuye, según el caso, al traspasar las células de un medio a otro.

FUNCION DE LA MEMBRANA PEROXISOMAL EN LA REGULACION DE LA OXIDACION DE ACIDOS GRASOS. (Function of the Peroxisomal Membrane in the Regulation of Fatty Acid Oxidation). Kriz, A., Leighton, F. Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

En organelos delimitados por una ó más membranas cabe esperar que ésta desempeñe un papel regulador. En los peroxisomas de células animales no se ha demostrado que su membrana regule su función.

Con el objeto de evaluar al posible rol regulatorio de la membrana en peroxisomas, se realizaron estudios en fracciones L provenientes de hígado de ratas tratadas con inductores de proliferación peroxisomal, enriquecidas en peroxisomas. Se establecieron las condiciones de aislamiento para lograr la mejor preservación posible de los organelos, analizando numerosas alternativas. Mediante mediciones de consumo de O_2 insensible a cianuro, se evaluó la actividad de B-oxidación sobre ácidos grasos libres y sus derivados acil-CoA y acil-carnitina en condiciones de preservación estructural y líticas, con y sin suplementación de cofactores. Pudo establecerse que los acil-CoA no acceden libremente al interior de peroxisomas y no se logró demostrar el mecanismo de transporte activo postulado por otros autores. Estos hallazgos aportan evidencia en favor de la hipótesis de que CoA y sus acil derivados no pasan a través de la membrana peroxisomal y que la translocación de grupos acil hacia y desde la matriz del organelo se realiza vía acil-carnitina derivados.

Se concluye que la permeabilidad selectiva de la membrana, el pool intraperoxisomal de CoA+Ac-CoA y la actividad de las Carnitina Acil Transferasas presentes en la matriz peroxisomal son factores preponderantes en la regulación de la oxidación de ácidos grasos.

Financiado por Proyecto DIUC 58/82.

ACTIVACION POR FOSFOLIPIDOS, TRIPSINA Y CALMODULINA DE UNA FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS DE OVARIO DE *Xenopus laevis*. (Activation by phospholipids, trypsin and calmodulin of a cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Xenopus laevis*.) Jedlicki, E., Orellana, O., Connelly, C. y Allende, J. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina y Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

En el sistema de oocito de *Xenopus laevis* existe una actividad fosfodiesterásica de nucleótidos cíclicos (FDE I), que hidroliza tanto cAMP como cGMP, y que es estimulada por calmodulina y calcio. Esta enzima puede separarse por DEAE celulosa de otra forma enzimática que no es estimable por estos efectores. FDE I ha sido purificada, hasta aparente homogeneidad. Datos previos demuestran que FDE I es estimulable por un tratamiento controlado con tripsina, lo que causa una pérdida de sensibilidad a calmodulina y calcio y además, a una disminución de peso molecular de 140.000 a 90.000. Dicho tratamiento probablemente alteraría el sitio de unión de la enzima a la calmodulina. FDE I también puede ser estimulada por algunos fosfolípidos tales como lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina. Esta estimulación es inhibida por flufenazina, compuesto que también inhibe la estimulación por calmodulina y calcio. La enzima tratada con tripsina no es estimulada por fosfolípidos. La estimulación por fosfolípidos, tripsina o calmodulina y calcio se debe a un aumento en la V_{max} , no habiendo variación significativa en la K_m aparente. Nuestros experimentos sugieren que la FDE I posee una región regulatoria en la estructura de la enzima cuya modificación por calmodulina, tripsina o fosfolípidos provocaría una estimulación de la actividad enzimática.

(Financiado por OEA, Fondo Nacional de Ciencias, proyecto PNUD/Unesco CHI/81/001 y Universidad de Chile.)

ALTERACIONES MOLECULARES ESPECIFICAS EN CELULAS DE GLANDULAS PAROTIDAS HIPERTROFIADAS (Specific molecular modifications within cells of hypertrophic parotid glands). López Solís, R.O., Miranda, D., González, M.J. y Allende, C. Dpto. Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, División de Ciencias Médicas Norte, Universidad de Chile.

La hipertrofia se define como el aumento en la masa seca de un órgano, tejido o célula. En glándula parótida, entre muchas otras, esta respuesta no ha sido evaluada en términos moleculares.

El isoproterenol, catecolamina B adrenérgica, induce en forma relativamente específica el crecimiento de las glándulas parótidas de ratón cuando se administra diariamente por vía i.p. a razón de 1 mg por animal.

La evolución de la hipertrofia alcanza un plateau y se caracteriza por un aumento en las razones proteína/DNA y RNA/DNA, disminución de las razones alfa amilasa/proteína y alfa amilasa/DNA, mantención de la sensibilidad al isoproterenol y de su carácter de tejido secretor, y por la aparición y desaparición de polipéptidos específicos en las células. Secretagogos colinérgicos, como Pilocarpina, no inducen ninguna de estas modificaciones al ser administrados crónicamente. La hipertrofia inducida por isoproterenol desaparece paulatinamente con la suspensión de la estimulación crónica, fenómeno que se corresponde con una recuperación cuantitativa y cualitativa de componentes moleculares particulares de las células normales.

Estos resultados indican que la hipertrofia glandular en parótidas de ratón no se debe a un stress secretorio crónico sino que a una acción propia del isoproterenol relacionada a la modificación de componentes moleculares específicos de localización intracelular.

Proyectos 31651-8313, DDI, U. de Chile y 1/82 PNUD-UNESCO

UN METODO ISOCRATICO, SIMPLE, REPRODUCIBLE Y RAPIDO PARA ESTUDIAR METABOLISMO DE TESTOSTERONA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESTION. (A simple, reliable and rapid isocratic method to study testosterone metabolism by HPLC). Mancilla, J. y Gil, L. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La oxidación de testosterona en diferentes posiciones aparentemente es mediada por diferentes especies de citocromo P-450, proporcionando su estudio una buena metodología para distinguir entre isoenzimas de citocromo P-450. Los ensayos normalmente se efectúan usando sustrato radioactivo y determinando los metabolitos por cromatografía en papel o en placa fina. Estas técnicas son engorrosas y proporcionan una muy baja resolución en la separación de los diferentes metabolitos.

Hemos desarrollado una técnica por fase-reversa que permite separar en forma isocrática testosterona y sus metabolitos principales. El solvente usado fue una mezcla de n-hexano e isopropanol. La testosterona y sus metabolitos eluyen con los siguientes tiempos de retención; Androstanediona 5.30 min, Testosterona 7.45 min, 2- β -hidroxitestosterona 13.45 min, 6- β -hidroxitestosterona 15.15 min, 16- α -hidroxitestosterona 23.30 y 7- α -hidroxitestosterona 24.45 min. La resolución entre los diferentes metabolitos fue muy buena y varió entre 0.963 y 7.625. La sensibilidad del método varió entre 3.8 y 14 ng para testosterona y sus productos de oxidación.

Esta técnica simple, rápida y precisa no requiere de sustrato radioactivo y proporciona una alta sensibilidad para estudios metabólicos en preparaciones de diversos tejidos y componentes celulares. En nuestro laboratorio ha sido aplicada con buen éxito para estudiar las alteraciones en las especies de citocromo P-450 en hígado de ratas en diferente estado nutricional.

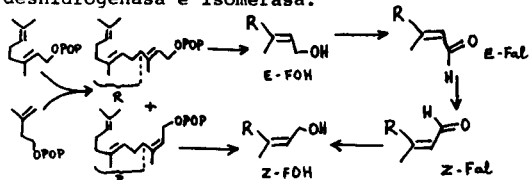
Financiado por Proyecto de SDCACI N° B-535-835-5. Universidad de Chile.

BIOSINTESIS DE Z-FARNESOL EN FLAVEDO DE *Citrus sinensis*. (Biosynthesis of Z-Farnesol in *Citrus sinensis* flavedo). Pérez, L.M. (Depto. Bioquímica, Fac. Cs. Bías. y Farm. Univ. de Chile).

La biosíntesis de Z-farnesol (Z-FOH) puede realizarse a partir de Z-farnesilpirofosfato (Z-FPP) sintetizado por la preniltransferasa, o bien a través de un mecanismo de isomerización redox a partir del correspondiente E-sesquiterpenoide sintetizado por el sistema enzimático. (Esquema)

Un extracto libre de células de flavedo fresco de *C. sinensis* biosintetiza Z-FOH, en ausencia de síntesis del correspondiente pirofosfato, el Z-FPP. El sistema enzimático forma una mayor proporción de Z-FOH si el sustrato inicial es el IPP. La 6 las enzimas necesarias para la biosíntesis del Z-FOH se encuentran asociadas a una fracción soluble, obtenida por fraccionamiento subcelular mediante centrifugación diferencial del extracto fresco.

No ha sido posible detectar una actividad de deshidrogenasa en las condiciones en que se obtiene el Z-FOH, y la actividad de fosfatasa presente en el extracto es inespecífica. Los resultados sugieren la participación de un probable complejo polienzimático, que se encontraría en una fracción soluble y que incluiría al menos las actividades de preniltransferasa, fosfatasa, deshidrogenasa e isomerasa.



UN SISTEMA ACOPLADO PARA EL ESTUDIO DE LA EXPRESION GENETICA BASADO EN LA FORMACION DEL PRIMER DI- O TRIPEPTIDO (A coupled system to study gene expression based on di- and tripeptide formation). Meza-Basso, L., Robakis, N., Cenatiempo, Y., Brot, N., Weissbach, H. - Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Roche Institute of Molecular Biology, Nutley, N.J., U.S.A.

Con el propósito de estudiar la regulación de la expresión genética, se han desarrollado diversos sistemas *in vitro* DNA dependientes que son capaces de sintetizar proteínas.

En el presente trabajo se describe un sistema simplificado que mide la formación del primer di- o tripeptido característico del producto génico. El sistema está diseñado utilizando factores de iniciación y elongación, RNA polimerasa, ribonucleósidos trifosfato, ribosomas, fMet-tRNA y DNA o mRNA como templado. La síntesis del dipéptido o del tripeptido se logra por la adición de las especies aminoacil-tRNA apropiadas.

El sistema es más aplicable utilizando templados con un número limitado de genes, e.g. plasmidios, fragmentos de restricción en donde se conozca la secuencia amino terminal. Un aspecto importante de este sistema es que puede ser utilizado como un ensayo cuantitativo, rápido y específico de la cantidad de un mRNA templado particular presente en una mezcla de especies de mRNAs.

La formación del primer di- o tripeptido del producto genético involucra una transcripción exacta y una adecuada iniciación de la traducción, haciéndolo particularmente apropiado para estudiar regulación de la expresión genética.

ANILLO DE SIMILITUD QUIMICA DE SUSTITUCION AMINOACIDICA CODIGO DEPENDIENTE. (Aminoacid chemical similarity ring code dependent). Pieber M. y Tohá J. Departamento de Física, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.

Se describe, deduce y evalúa un anillo de similitud química de aminoácidos a partir de las frecuencias de sustitución de aminoácidos en proteínas homólogas. La similitud encontrada se certifica en términos de similitud en parámetros físico-químicos.

Se concluye que las sustituciones de aminoácidos más frecuentes en proteínas corresponden a aminoácidos más similares químicamente.

Basándose en estimaciones teóricas sobre equilibrio cetona-enólica de nucleótidos y evidencias experimentales de la literatura, es posible inferir un correspondiente anillo de similitud para la sustitución más probable de codones.

El valor de la desviación estándar de las matrices que describe el anillo de similitud de aminoácidos y de codones resulta prácticamente igual. La correlación encontrada para las sustituciones más frecuentes de aminoácidos y más probable de codones es analizada y discutida en términos de restricciones impuestas por la estructura del código y de la mayor discrepancia estructural existente a nivel de algunos codones que sin embargo codifican aminoácidos más similares.

Basado en estos resultados se intenta finalmente una explicación evolutiva para las sustituciones aminoácidas (y codones) del citocromo en diferentes especies.

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-HEXOQUINASA B DE RANA. (Preparation and characterization of monoclonal antibodies to frog hexokinase B). *Preller, A., †DeIoannes, A. y *Ureta, T. *Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, †Departamento de Biología Celular, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.

Para estudiar algunos problemas relacionados con la función *in vivo* de hexoquinasa en oocitos de *Calyptcephalella caudiverbera*, se hizo necesaria la preparación de anticuerpos monoespecíficos.

Se purificó hexoquinasa B de músculo por cromatografía en DEAE-celulosa, hidroxapatita y Cibacrom F3GA-Sepharose. La purificación fue ~2000 veces y la actividad específica de ~7 unidades/mg de proteína; la preparación presentaba una banda por electroforesis en poli-acrilamida. Se inyectó hexoquinasa B purificada a ratones BALB/c según un protocolo estándar de inmunización. Las células del bazo se fusionaron con células de mieloma NS1-Ag4/1 y los hibridomas resultantes se clonaron y cultivaron en medio HAT completo. De 186 clones se seleccionaron 6 líneas celulares que secretaban inmunoglobulinas con reacción anti-hexoquinasa B, medida por ELISA. Una de las líneas (1-A6) produce IgM. Las cinco restantes (1-C5, 1-D5, 2-B1, 2-A2, 2-C5) producen IgG de las subclases 1 y 3. Las IgG se purificaron por cromatografía de afinidad en proteína A-Sepharose y la IgM se purificó parcialmente por precipitación con sulfato de amonio.

Ninguna de las inmunoglobulinas inhibió la actividad enzimática del antígeno, lo que sugiere que los anticuerpos monoclonales obtenidos no están dirigidos al sitio activo. (Financiado por proyecto B-705-8355 del Departamento de Desarrollo de la Investigación, Universidad de Chile, por el Programa PNUD-UNESCO CHI-81/001 y por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Proyecto 0255)).

COMPARACION ENTRE HISTONAS DE ESTADOS PRECOCES Y TARDIOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DE TETRAPYGUS NIGER. (Comparison between the histones from early and late developmental stages of *Tetrapygus niger*). Puchi, M., Massone, R., Inostroza D., Gamboa, S. e Imschenetzky, N. Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción.

Durante la embriogénesis de erizos de mar se producen cambios en la expresión de genes para histonas: variantes de histonas precoces (tipos CS y tipos α) son transcritos previo a la eclosión de los embriones, predominando posteriormente las variantes de histonas tardías (tipos β , δ y ϵ). Con el objeto de comparar las variantes de histonas presentes en cromatina de embriones en estados de segmentación y de larvas obtenidas post-eclosión se aislaron y caracterizaron las histonas correspondientes a ambos estados.

Se seleccionaron embriones al estado de dos blastómeros y larvas al estado de pluteus, se purificó la cromatina de ambos estados, obteniéndose las histonas correspondientes por extracción con H_2SO_4 0.4 N. Estas proteínas, fueron purificadas por electroelución desde geles preparativos de poli-acrilamida conteniendo ácido acético/urea/Tritón DF-16, hidrolizadas en HCl 6 N y analizadas en cuanto a su composición en amino ácidos.

Los resultados obtenidos indican que las variantes de histonas de larvas de *Tetrapygus niger* difieren notablemente de histonas homólogas presentes en los estados de segmentación. Estas diferencias se manifiestan tanto en sus movilidades electroforéticas en geles uni y bidimensionales como en su tamaño molecular y su composición en amino ácidos.

Financiado por: Proyectos 203102-203106 Universidad de Concepción y 8/82 PNUD/UNESCO RLA 78/024

VARIACION ISOENZIMATICA DE α -AMILASA DURANTE LA GERMINACION DE SEMILLAS DE *Araucaria araucana* Y *Araucaria angustifolia* (Variation of α -amylase isoenzymes during seed germination of *A. araucana* and *A. angustifolia*) Salas, E. y Cardemil, L. Departamento de Biología, Fac. de Cs. Bás. y Farma., Universidad de Chile.

En semillas de estas especies de Araucarias, la principal reserva es el almidón y su degradación durante las primeras 90 horas de imbibición de la semilla está iniciada por α -amilasa. Ambas Araucarias tienen un origen común en el Jurásico y se establecieron como bosques relictuales durante el Terciario.

Las isoenzimas de α -amilasa en semillas de ambas especies se estudiaron por electroforesis e isoelectroenfoque. Antes de la imbibición, las isoenzimas son cinco, idénticas para ambos tejidos pero distintas en ambas especies. A las 18 horas de imbibición, cuando la actividad de la enzima presenta un máximo las formas isoenzimáticas son dos para *A. araucana* iguales en ambos tejidos y dos para el gametofito de *A. angustifolia* y con una forma en el embrión. A las 48 horas reaparece para ambas especies y ambos tejidos el patrón de 0 tiempo de imbibición. Después de 90 horas de imbibición formas enzimáticas diferentes son detectadas en embrión respecto al gametofito.

Los cambios encontrados se discuten de acuerdo a las fluctuaciones de actividad enzimática de proteínas totales y a cambios de giberelinas.

DINAMICA DEL ANTIGENO T EN LA SUPERFICIE DE CELULAS TRANSFORMADAS POR SV40. (Dynamics of large tumor antigen on the surface of SV40-transformed cells). Santos, M. y Butel, J.S. Department of Virology and Epidemiology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, U.S.A.

Células transformadas por SV40 expresan un antígeno tumoral (ag-T). Este se concentra en el núcleo, pero también se expresa en la superficie, donde podría tener un rol en la mantención del estado transformado. Este rol podría estar influenciado por el grado de estabilidad del ag-T en la superficie celular. En este trabajo se estudió el recambio del ag-T en la superficie de células de ratón transformadas por SV40. Las células fueron marcadas con ^{125}I mediante la reacción catalizada por lactoperoxidasa, o metabólicamente con (^{35}S) metionina. El ag-T de superficie fue detectado inmediatamente o a distintos intervalos después de la marcación. Las células marcadas fueron incubadas con anticuerpos específicos, los complejos antígeno-anticuerpo fueron solubilizados con NP40 y precipitados con *Staphylococcus aureus*. Los antígenos fueron eluidos y analizados por electroforesis y autorradiografía. Los resultados obtenidos sugieren que el ag-T es inestable en la superficie celular. Eliminación y reposición de moléculas de ag-T parecen ser procesos constantes e independientes de energía, aunque probablemente controlados por el grado de fluidez de la membrana plasmática.

SINTESIS DE DNA Y ACTIVIDAD DNA POLIMERASA EN TRYPANOSOMA CRUZI. (DNA synthesis and DNA polymerase activity in *Trypanosoma cruzi*.) Solari, A., Tharaud, D., Repetto, Y., Aldunate, J., Morello, A., Litvak, S. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, IBCN, CNRS, Francia.

El parásito *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, la cual es transmitida en el hombre por vectores del género triatomino. En el ciclo de vida del parásito se distinguen tres formas características: epimastigotes (cultivo), amastigotes (intracelular) y tripomastigotes (torrente sanguíneo de animales infectados). Sólo la forma tripomastigote es infecciosa y a diferencia de las otras dos no es proliferativa.

El estudio del aparato enzimático implicado en la replicación del DNA en estos organismos puede constituir un eslabón crucial en la búsqueda de mecanismos que permitan controlar la proliferación de estos parásitos. Hemos logrado purificar parcialmente desde formas epimastigotes una actividad DNA polimerasa capaz de reconocer preferencialmente matrices como DNA activado, poli dA-dT₁₂ y poli dC-dG₁₂. Esta DNA polimerasa es completamente resistente a la afidicolina, un inhibidor específico de la DNA polimerasa α (implicada en la replicación del genoma nuclear). Sin embargo, al estudiar el efecto de inhibidores en la síntesis de DNA "in vivo" utilizando la forma epimastigote, observamos una fuerte inhibición en presencia de afidicolina, lo que sugiere la presencia de una DNA polimerasa en *T. cruzi* que por ahora no hemos podido aislar. En esta comunicación presentamos diversas propiedades de la DNA polimerasa parcialmente purificada así como del sistema de síntesis de DNA "in vivo" en *T. cruzi* intactos.

Proyecto financiado por CONICYT-CHILE y UNDP/WB/WHO/TDR.

ESTUDIOS DE UNION DE RNA POLIMERASA DE BAL 31 A DNA DE PM2. (Binding studies of RNA polymerase of BAL 31 to PM2 DNA). Susaeta, M., Bull, P. y Yudelevich, A. Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica de Chile.

El DNA del fago PM2 es circular, altamente sobreenrollado y de pequeño tamaño. Se estudiaron las características de interacción de la RNA polimerasa del huésped *Alteromonas BAL 31*, a este DNA.

Se incubó la enzima purificada con DNA de PM2 a distintas condiciones de fuerza iónica y luego se digirió con HincII o HindIII. Los fragmentos de DNA fueron analizados por electroforesis en geles. En algunos casos, los fragmentos unidos a la enzima se separaron por filtración en membrana de nitrocelulosa previo a la electroforesis.

Usando la enzima HincII, se encuentran sitios re-fractarios al corte a 0.69, 0.7 y 0.73 unidades de mapa (u.m.). Al aumentar la fuerza iónica, aparecen nuevas regiones protegidas hacia 0.64 u.m. y además se produce protección en la región de 0.2-0.3 u.m. Este mismo efecto se obtiene al aumentar la razón molar enzima/DNA, pero manteniendo la fuerza iónica original. Usando HindIII, se hace evidente un sitio de unión a 0.54 u.m. junto con otro menor a 0.73 u.m. Al aumentar la fuerza iónica, aparece un tercer sitio a 0.63 u.m. Estos tres sitios también son detectados por retención en filtros, sin embargo, sólo el primero resiste una incubación con heparina. La unión de la RNA polimerasa a todos estos sitios sólo se produce cuando se usa holoenzima y con DNA sobreenrollado.

Ya que algunos sitios de unión fueron detectados sólo a alta fuerza iónica, es probable que éste sea un efecto tanto sobre la enzima como sobre la estructura terciaria del DNA.

Experimentos de microscopía electrónica en curso permitirán confirmar la posición de estos sitios. Financiado por DIUC.

METILACION IN VITRO DEL FACTOR DE ELONGACION EF-Tu DE ESCHERICHIA COLI (In vitro methylation of the elongation factor EF-Tu from *Escherichia coli*).

Toledo, H. y Jerez, C.A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

El factor de elongación EF-Tu une el aminoacil-tRNA al ribosoma, por lo cual es considerado como esencial durante la síntesis proteica. EF-Tu posee su lisina 56 metilada, y como este aminoácido se ubica próximo al sitio de unión del aa-tRNA al factor, se piensa que esta modificación podría tener algún papel en esta interacción. El propósito inicial de este trabajo es estudiar por primera vez la enzima que efectúa este tipo de metilación, descrita no sólo en procariontes sino también en EF-1 α de eucariontes.

Para obtener sustratos metilables, se incubaron células de *E. coli* D-10 (met-) en presencia de etionina, análogo de metionina que se incorpora a las proteínas pero que no es capaz de metilar vía S-adenosilmetionina (SAM). Como otra forma de obtener EF-Tu no metilado, se sintetizó este in vitro a partir de DNA. La metilación de ambos EF-Tu sub-metilados se realizó en presencia de 3H-metil-SAM y un extracto crudo (S-100) como fuente de enzima. Los productos se caracterizaron mediante inmunoprecipitación con suero anti-EF-Tu y análisis de los aminoácidos metilados después de hidrolizar las proteínas.

Encontramos que EF-Tu es metilable in vitro específicamente en el aminoácido lisina en forma de dimetil-lisina. Resultados preliminares indican que es posible separar mediante isoelectroenfoque dos formas de EF-Tu, que podrían diferir en su grado de metilación. Esto permitirá medir sus funciones independientemente. Esperamos así poder determinar si existe un rol fisiológico para esta modificación química del aparato traduccional.

Financiado por Proyectos B-1065/8344 y PNUD/UNESCO/LRA 78/024 N° 15-82.

INHIBICION ALOSTERICA POR GLUCOSA-6-FOSFATO DE LA REACCION REVERSA DE HEXOQUINASA DE CEREBRO DE RATA. (Allosteric inhibition of brain hexokinase by glucose-6-phosphate in the reverse reaction). *Ureta, T. †Lazo, P. y †Sols, A. *Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile e †Instituto de Enzimología y Patología Molecular del C.S.I.C., Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, España.

Existe controversia acerca del mecanismo de la inhibición por Glc-6-P de la fosforilación de glucosa por algunas hexoquinasas. En vista que 2-desoxiglucosa-6-P (dGlc-6-P) o fructosa-6-P no son inhibidores, aunque las hexosas son buenos sustratos, se ha postulado la interacción de Glc-6-P con un sitio alostérico en la enzima. Por otra parte, el efecto de Glc-6-P es competitivo vs ATP, lo que podría indicar interacción del grupo fosfato del éster con el fosfato γ de ATP en el sitio activo.

Para dilucidar este problema se estudió la reacción reversa de hexoquinasa de cerebro mediante un ensayo acoplado a glucosa-oxidasa-peroxidasa-cromógeno para la medición continua de glucosa y glicerol-quinasa-glicerol para atrapar ATP.

La variación de Glc-6-P a diferentes concentraciones de ADP, resultó en curvas bifásicas, con marcada inhibición por "exceso de sustrato", con valores de Km y Ki \sim 0.2 mM. En cambio, la variación de dGlc-6-P produjo cinética hiperbólica (Km app \sim 2 mM). La Km app para MgADP fue \sim 16 mM cualesquiera fuera la naturaleza o concentración del sustrato hexosa-6-P.

Los resultados apoyan la postulación de un sitio alostérico para Glc-6-P. La inhibición competitiva por Glc-6-P vs ATP en la reacción directa podría deberse a la presencia de un sitio regulador para ATP. (Financiado por la Comisión Asesora para la Investigación Científica y por el Instituto de Cooperación Iberoamericana, España).

ACTIVIDAD CALMODULINICA EN TUBERCULO DE *S. tuberosum* Y SU INTERACCION CON APIRASA. (Calmodulinic activity in the *S. tuberosum* tuber and its interaction with apyrase). Valenzuela, M.A.; Anich M.; Mancilla, M.; y Traverso-Corí A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

La calmodulina unida a Ca^{2+} es una proteína activadora de diversas quinasas, fosfodiesterasas y ATPasas la cual ha sido también descrita en tejidos vegetales. En el presente trabajo se muestra el aislamiento y caracterización de una proteína tipo calmodulina del tubérculo *S. tuberosum* var. Desirée y su interacción con apirasa proveniente del mismo tejido.

La purificación de esta posible calmodulina se realizó por precipitación 0-50 con $(NH_4)_2SO_4$, a un extracto de papa seguido de calentamiento a 100°C por 5 min. Finalmente se concentró 50 veces por liofilización. En esta forma la preparación es estable mantenida a -18°C.

La caracterización de esta preparación con actividad calmodulínica se fundamentó en el ensayo de activación de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos. Este liofilizado de papa Desirée presentó una curva de saturación respecto a la activación de la fosfodiesterasa. También se encontró que la trifluoroperazina inhibía la activación de la fosfodiesterasa producida por esta proteína de acción semejante a la calmodulina. Se determinó su PM el cual es semejante al descrito para otras calmodulinas.

Las actividades ATPásicas y ADPásicas de la apirasa mostraron una estimulación al preincubar esta enzima con esta preparación tipo calmodulina, procedente del tubérculo de papa.

Proyecto financiado por Fondo Nacional N°089/82

ELIMINACION DE ELEMENTOS EXTRACROMOSOMALES DE TERMOFILOS EXTREMOS E IDENTIFICACION DE UNA NUEVA ESPECIE DE PLASMIDIO EN *T. THERMOPHILUS* HB8. (Plasmid curing in thermophilic bacteria and isolation of a new extrachromosomal element from *T. thermophilus* HB8) Vázquez, C. y Villanueva, J.- Laboratorio de Bioquímica, Universidad de Santiago y Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica de Chile.

Como un intento por encontrar un marcador genético codificado por pTT8 (6,0 Mdal) y/o pTF62 (6,8 Mdal) presentes en *T. thermophilus* HB8 y *T. flavus* AT-62 respectivamente, se probaron varios agentes que promueven la eliminación o curación de plasmidios en bacterias mesofílicas. De los agentes utilizados que incluyeron drogas in tercalantes como anaranjado de acridina y bromuro de etidio, y antibióticos como rifampicina y novobiocina, sólo la aplicación de este último resultó en la eliminación de pTT8 y pTF62 a una frecuencia aproximada de 0.5% en ambos casos. Estudios fenotípicos comparativos llevados a cabo entre las células silvestres y curadas frente a una gran variedad de condiciones experimentales, no arrojaron diferencias detectables.

En el transcurso de estos experimentos, un segundo plasmidio (pVW8) presente en *T. thermophilus* HB8 fue identificado. Mediante análisis por electroforesis en geles de agarosa y microscopía electrónica, se calculó un peso molecular de 47,0 Mdal para pVW8. La posibilidad que este último sea un múltiplo de pTT8, el otro plasmidio presente en la misma cepa, fue descartada mediante el análisis con endonucleasas de restricción.

En contraste, el análisis exhaustivo de lisados aclarados obtenidos de *T. flavus* AT-62, han confirmado la presencia de solamente pTF62.

Financiado por DIUC y por el Programa CHI 81-001, PNUD, UNESCO.

TRANSCRIPCION IN VITRO DE GENES DE tRNA^{phe} DE LEVADURA EN UN SISTEMA HOMÓLOGO. (In vitro transcription of yeast tRNA^{phe} genes in an homologous system). Wilkens, M., Moenne, A., Valenzuela, P., Venegas, A. y Bull, P.- Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica de Chile.

La transcripción de genes de tRNA en eucariotes requiere la presencia de RNA polimerasa III y factores de transcripción. En un ensayo *in vitro*, éstos son aportados por un extracto celular. En una comunicación anterior presentamos resultados de transcripción *in vitro* de genes de tRNA^{phe} de levadura con un extracto de células HeLa. En la presente comunicación hemos complementado estos estudios usando un extracto de levaduras para definir un sistema homólogo.

Se incubó extracto con diversos genes de tRNA^{phe} en presencia de nucleótidos, NaCl, Mg^{2+} y GTP- α - $[^{32}P]$ por tiempos adecuados. El RNA sintetizado se extrajo y se separó en geles de acrilamida-urea, localizándose las bandas por autoradiografía. Estas se cuantificaron mediante su radiactividad.

Se demostró que la transcripción es específica usando como controles un gen cortado en un extremo de su región codogénica e incubando con α -amanitina. De los 9 genes analizados, tres son muy eficientes (clones 4, 6 y 13), dos transcriben pobremente (clones 9 y 10) y cuatro no transcriben (clones 5, 11, 14 y 16). Por estudios cinéticos se determinó que primero se sintetiza un precursor, el cual se procesa a un producto maduro sin intrón a través de intermediarios. Estudios de competencia usando como competidor fragmentos de DNA que contienen mitades de un gen que no se transcribe, sugieren que la mitad 3' secuestra factores de transcripción.

Estos resultados demuestran que para estudios de regulación de la transcripción es importante el uso de un sistema homólogo, ya que algunos resultados obtenidos en este estudio difieren notablemente de los obtenidos con el extracto HeLa. Financiado por DIUC.

TRANSCRIPCION HOMÓLOGA IN VITRO DE UN FRAGMENTO DE DNA DE *THERMUS THERMOPHILUS* CLONADO EN pBR322. (Homologous in vitro transcription of a DNA fragment from *Thermus thermophilus* cloned in pBR322).- Yañez, L., Davagnino, J., González, E., Sánchez, H., Cross, D., Lira, P. y Venegas, A.- Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Hemos clonado previamente un fragmento de DNA de *Thermus thermophilus*, analizado parcialmente su secuencia de bases y su funcionalidad por transcripción con la RNA polimerasa de *E. coli*.

En la presente comunicación se muestra la secuencia de la región transcrita por la enzima termofílica (~400 pares de bases) y además, parte de la región promotora. Se ha localizado por análisis de la secuencia y experimentos de transcripción con la enzima homóloga, un posible promotor termofílico. Esta zona comparte características típicas de los promotores de *E. coli* y de hecho es también utilizada por la enzima mesofílica.

La secuenciación del DNA se realizó por el método de Maxam y Gilbert. Los experimentos de transcripción específica *in vitro* se analizaron en un sistema en geles de poliacrilamida-urea 8M para separar los fragmentos de RNA marcados con $[^{32}P]$ - α -GTP y visualizarlos por autoradiografía. La purificación de la enzima se hizo por métodos clásicos, incluyendo un paso final muy eficiente en DNA celulosa. El análisis de la secuencia se abordó mediante programas de computación específicos.

Nuestro esfuerzo final se enfocó hacia la explicación de varias especies menores de la RNA polimerasa termofílica que varían en composición y estequiometría de subunidades y que se obtienen en cromatografía en DNA celulosa. Un análisis funcional de estas especies mediante transcripción específica podrá arrojar luz sobre el origen, funcionalidad de ellas, así como también del requerimiento de subunidades.

Financiado por DIUC, Proyecto 71/82 y Fondo Nacional de Ciencias, Proyecto 653/82.

ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA ADENILATO CICLASA, (Monoclonal antibodies to adenylate cyclase).

R. Attar, M. Torruella, C. Eisenchlos, M.M. Flawiá y H.N. Torres.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", INGEBI-CONICET y FCEN-UBA, Buenos Aires, Argentina.

Utilizando preparaciones purificadas de la adenilato ciclasa de *Neurospora crassa* se han preparado anticuerpos monoclonales contra la misma. El anticuerpo inhibe a la enzima sin necesidad de un segundo anticuerpo; tiene especificidad cruzada contra la enzima de *Mucor rouxii* y de *Trypanosoma cruzi* y no inhibe a la ciclasa soluble de testículo de rata o de membranas de eritrocitos de ave.

Con la obtención del clon productor del anticuerpo y la amplificación del mismo se logró purificar y caracterizar la inmunoglobulina secretada por ensayos inmunoenzimáticos (E.L.I.S.A.), observándose que se trata de IgG. Además, se prepararon columnas de afinidad agarosa-anticuerpo obteniéndose la retención específica de la adenilato ciclasa de *Neurospora crassa*.

Por procedimientos similares se prepararon anticuerpos monoclonales contra la adenilato ciclasa de *Trypanosoma cruzi*. La caracterización del mismo se efectuó en forma similar a la enzima de *Neurospora*. Por medio de una cromatografía de inmunofinidad se logró obtener una substancial purificación de esta enzima en una sola etapa.

RECONSTITUCION DEL SISTEMA "HOLOCICLASA" POR FUSION DE LA "PROTOMICLASA" DE EUKARIOTES INFERIORES CON LA SUBUNIDAD "R" Y "G" DE MAMIFEROS (Reconstitution of the "Holo-cyclase" system by fusion of a low eucariotic "protocyclase" with the R. and G subunits from liver and erythrocyte membranes).

M. Torruella, C. Eisenchlos, R. Attar, M.M. Flawiá y H.N. Torres. Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", INGEBI-CONICET Y FCEN - UBA, Buenos Aires, Argentina.

Las "Protomiclasa" de Eucariotes inferiores se caracterizan porque no responden a guanil-nucleótidos, toxina del cólera, fluoruro y hormonas, y son dependientes de Mn²⁺. Tal es el caso de las enzimas de *Neurospora crassa* y *Trypanosoma cruzi*. El componente catalítico (C) de la adenilato ciclasa de *Neurospora* puede interactuar con el componente regulatorio (G) de dicha actividad y con el receptor (R) existentes en extractos de detergentes de membrana de eritrocitos de ave. Como consecuencia de esta interacción se reconstituye un sistema R-G-C que responde a agonistas adrenérgicos, toxina del cólera, F⁻, Gpp(NH)p, utilizando como sustrato el ATP-Mg⁺⁺.

Mediante procedimientos de fusión, en presencia de polietilenglicol 6000 se reconstituyó además un sistema "holociclase" entre membranas plasmáticas de hígado de rata y membranas de *Trypanosoma cruzi* o de la cepa "slime" (sin pared celular) de *Neurospora*. En ambos casos se consiguió acoplar la subunidad G y el receptor R de mamíferos al componente C del eucariote inferior. El sistema responde entonces a ATP-Mg⁺⁺, toxina del cólera y forskolina (activadores de G y de C, respectivamente) y es sensible a guanil-nucleótidos y a distintas concentraciones de glucagón. La respuesta es dependiente de la cantidad de fosfolípidos agregados durante la fusión.

INCIDENCIA DEL METABOLISMO SOBRE ALGUNOS PROCESOS DE LA FECUNDACION EN OVOCITOS DE ANFIBIO (Incidence of metabolic behaviour upon some fecundation processes in amphibian oocytes). Bühler, M.I., Petrino, T. & Legname, A.

Instituto Superior de Investigaciones Biológicas, Departamento de Biología del Desarrollo (INSIBIO). CONICET. U.N.T. Tucumán, Argentina.

Los ovocitos celómicos de *Bufo arenarum* presentan dos tipos diferentes y alternativos de comportamiento metabólico estrechamente relacionados con las variaciones estacionales. En efecto, durante el período otoño-invierno, estos ovocitos presentan un comportamiento metabólico similar al de los tejidos diferenciados de la misma especie, mientras que durante el período primavera-verano o de reproducción, adquieren el comportamiento que caracteriza al huevo en segmentación.

Existe una estrecha relación entre el tipo de metabolismo presente en el ovocito y su capacidad para iniciar la segmentación. Es así, que solo aquellos ovocitos que han adquirido el metabolismo característico del período reproductor son capaces de segmentar.

El objetivo de este trabajo es estudiar comparativamente en ovocitos celómicos de invierno y verano algunos de los procesos involucrados en la fecundación, desde el punto de vista morfológico. Los resultados indican que los fenómenos de activación, formación del pronúcleo masculino y síntesis de DNA ocurren normalmente en ambos tipos de ovocitos. Por el contrario la capacidad del citoplasma para inducir la formación del áster a partir del centriolo espermático está limitada solo a aquellos ovocitos con un comportamiento metabólico propio del período reproductor.

FOSFORILACION DE LA PROTEINA RIBOSOMAL S₆ DURANTE LA GERMINACION DE ZOOSPOROS DE *Blastocladiella emersonii*

(Phosphorylation of ribosomal protein S₆ during *Blastocladiella emersonii* zoospores germination.) Bonato, M.C.M., Maia, J.C.C. y Juliani, M.H. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Univ. de São Paulo.

Ribosomes isolated from *B. emersonii* zoospores contain 30 different proteins in the 40S subunit and 38 proteins in the 60S subunit. Ribosomal proteins were identified according to the method of "four corners" of Madjar et al. (Molec. gen. Genet. 171: 121, 1979). Protein S₆ of the small ribosomal subunit was the major phosphoprotein of *B. emersonii* ribosomes. In zoospore most of the S₆ migrated in the unphosphorylated position, with a small amount in the first and second derivatives (S_{6a} and S_{6b}). If the ribosomes were isolated from zoospore in the absence of NaF and phosphate, S₆ was completely unphosphorylated. Accompanying the germination of zoospores in a growth medium we observed a continuous increase in S₆ phosphorylation with the appearance of maximally phosphorylated S₆ derivatives (S_{6d}, S_{6c}). However, phosphorylation did not occur when the germination was induced in inorganic salt solution. After completion of germination, the shift from this inorganic solution to a growth medium led to the appearance of the derivatives S_{6c} and S_{6d}. Conclusion: The phosphorylation of S₆ that occurs during the zoospore germination is not required for the resumption of protein synthesis occurring in the transition round cell → germling.

Los resúmenes de las páginas R-83 a R-92 fueron preparados por los autores y luego impresos por el sistema foto-offset, sin correcciones ni revisión editorial. La exactitud de lo allí expresado, así como la nomenclatura empleada, referencias bibliográficas, etc., son de exclusiva responsabilidad de los autores. Nótese que la aparición de un resumen en este fascículo de *Archivos* no necesariamente implica la futura publicación de un artículo científico formal. Tampoco debe considerarse que esos resúmenes reemplazan la publicación normal de los resultados. Por ello, si un resumen es citado en un artículo formal o en un *curriculum vitae* debiera explícitamente señalarse que se trata de un resumen.

Los siguientes trabajos no fueron presentados en la
VII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica de Chile:

EGAÑA E, RAMIREZ M.T. Y ACORIA M. Efecto de la radiación gama (γ) cuerpo total sobre el patrón electroforético de proteínas de cerebro. p. R-85.

GUIVERNAU M. Modulación de la vía lipoxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico por las hormonas sexuales. p. R-86.