

Arch. Biol. Med. Exp. 18: R359-R372 (1985)
Printed in Chile

**SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE
IX REUNION ANUAL**

LO BARNECHEA, CHILE

1º al 3 de agosto de 1985

PATROCINANTES

**UNIVERSIDAD DE CHILE
SOCIEDAD DE BIOLOGIA DE CHILE
DIRECCION DE INVESTIGACION, PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATOLICA DE CHILE
CONICYT – CHILE
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE**

**COOPERACIONES
BOEHRINGER MANNHEIM DE CHILE LTDA.
IVENS Y CIA. LTDA.**

SIMPOSIO TOPICOS EN METABOLISMO DE LIPIDOS

FLUJOS METABOLICOS DE ACIDOS GRASOS EN HEPATOCITOS. ROL DE PEPOXISOMAS. (Metabolic fluxes of fatty acids in hepatocytes. The role of peroxisomes). Bronfman, M., Orellana A., y Morales, M.N. Depto Biología Celular, Fac. Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile.

La contribución del sistema peroxisomal de B-oxidación de ácidos grasos por la célula hepática *in vivo*, así como el destino metabólico de sus productos no se conocen. Con el objeto de evaluar esta contribución, hepatocitos aislados de ratas controles y tratadas con Ciprofibrato (para aumentar la actividad del sistema peroxisomal) se incubaron con mezclas de ácidos grasos (acético, butírico, laurico y palmítico) con uno solo de ellos marcado con ^{14}C en el carbono 1 por vez. Bajo estas condiciones, la marca incorporada en productos de oxidación (CO_2 y cuerpos cetónicos) desde ácido láurico $1-^{14}C$ aumentó en hepatocitos de ratas tratadas, mientras que disminuyó la desde ácido butírico $1-^{14}C$. Incorporaciones intermedias se observaron con ácidos acético y palmítico. Estos resultados sugieren que, *in vivo*, los peroxisomas oxidan activamente ácidos grasos de cadena media (laurico) y concuerdan con resultados previos *in vitro*.

El contenido enzimático de los peroxisomas sugiere que los productos de la B-oxidación peroxisomal son acil-carnitina y acil-carnitinas de cadena corta y media. Para tratar de verificar esta proposición, se investigó el comportamiento de los compartimentos de carnitina y acil-carnitina, en hepatocitos oxidando ácido láurico. La adición de este sustrato resulta en un aumento del compartimento de acil-carnitina y en una disminución del compartimento de carnitina (2-3 veces). La llegada a estado estacionario aparente, luego de la adición de ácido láurico, es casi 10 veces más rápida en hepatocitos de ratas tratadas que en el caso de controles. Estos datos se discuten en términos de un modelo de flujos de acil-carnitinas en células hepáticas.

(Financiado por proyectos DIUC 76/82 y Fondo Nacional de Ciencias 1198/83)

TRANSPORTE VESICULAR DE COLESTEROL (C) BILIAR. Nervi, F., Ulloa, N. y Garrido, J. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina y Departamento de Biología Celular, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El (C) es solubilizado en micelas mixtas u otros complejos polimoleculares de sales biliares (SB) y fosfolípidos (FL) según sea el grado de saturación de C y la concentración total de lípidos. Es de conocimiento aceptado que el C biliar se encuentra especialmente en solución micelar. Usando ultracentrifugación y microscopía electrónica (ME) estudiamos la contribución del transporte de C no micelar en bilis hepática humana (sobresaturada) y de rata (no saturada). Se disolvió Metrizamida (33%) en bilis preparándose gradientes continuos con bilis no diluidas (límites de 1.020-1.030 g/ml). Después de centrifugar a 50.000 rpm x 19 h se obtuvieron 6-7 fracciones estudiándose la frecuencia de distribución de SB, FL y C biliares en función de las densidades de las fracciones. El C se concentró en fracciones livianas con $d < 1.060$ en bilis humana y de rata. El % molar de C en estas fracciones aumentó de 2-7% a 15-30%. Mientras el 55-75% de C se concentró en $d < 1.060$, < 20% de SB y < 30% de FL se encontraban en estas fracciones que a ME mostraron vesículas de 40-70 nm. Al aumentar la conc. de SB en la bilis de 37 a 90 mM el C de la fracción $d < 1.060$ contribuyó a < 5% del total presente en bilis. Se encontraron vesículas similares en bilis fresca de ratas sometidas a depleción aguda del pool de SB y en los canales de ellas, vesículas con diámetros de ± 54 nm: una cavidad rodeada de una bicapa de 6 nm. Estos estudios sugieren que el C de la bilis es transportado principalmente en vesículas, independientemente del grado de saturación de la bilis y apoyan la hipótesis de que los lípidos biliares pueden secretarse como vesículas desde los hepatocitos.

EFEECTO DE LA COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA SOBRE LAS PROPIEDADES DE SUS ENZIMAS. R.R. Brenner. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBI-OLP), CONICET-UNLP, 60 y 120, (1900) La Plata, Argentina.

La proporción de colesterol y la composición fosfolipídica de las membranas lipídicas son factores fundamentales que modifican su estructura y estado físico. Usando al retículo endoplásmico hepático como modelo hemos modificado su estructura y fluidez alterando el contenido de colesterol *in vitro* e *in vivo*. A continuación estudiamos los efectos producidos sobre las características cinéticas de varias enzimas de membrana. Las modificaciones físicas fueron monitoreadas por fluorescencia polarizada previa marcación con difenil hexatrieno, pireno. Las enzimas estudiadas fueron la glucosa 6-fosfatasa y UDP-glucuronil transferasa. Los diversos K_m , $1/V_m$ y la constante de Hill de la UDP-glucuronil transferasa de cobaya fueron medidas cuidadosamente. Los resultados obtenidos y especialmente los cambios de la constante de Hill indican que la incorporación de colesterol provoca una modificación pasando de una cinética no Micaeliana a Micaeliana. En base a esos resultados proponemos un modelo de actuación del colesterol. Según este modelo, el colesterol produciría efectos "condensantes" a temperaturas mayores de la transición de fase de los lípidos de la membrana, pero provocando la segregación de zonas más fluidas que interactuarían con la UDP-glucuronil transferasa modificando sus propiedades cinéticas en la forma antes mencionada.

SIMPOSIO PERSPECTIVAS BIOTECNOLOGICAS EN CHILE I

PROBLEMAS BIOQUIMICOS EN EL ESTUDIO DE LA LIXIVIACION BACTERIANA DE MINERALES DE COBRE. (Biochemical problems in the study of bacterial leaching of copper-bearing minerals.) Jorge E. Allende, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La lixiviación bacteriana del cobre es un proceso de gran importancia económica para Chile ya que permite extraer cobre de minerales de baja ley a un reducido costo. Entre las bacterias que realizan la lixiviación, la que se encuentra con mayor frecuencia es el *Thiobacillus ferrooxidans*, un organismo quimiolitotrófico. Esta bacteria gram-negativa usa como fuente de energía la oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} o de S^{-2} a SO_4^{-2} empleando O_2 atmosférico como oxidante, y es capaz de fijar CO_2 y N_2 como fuente de nutrientes. Se conoce muy poco de su bioquímica y prácticamente nada de su genética. Consideramos, por lo tanto, que este microorganismo representa una oportunidad para desarrollar estudios básicos sobre mecanismos bioquímicos y genéticos con una aplicación de notoria importancia nacional. Un consorcio de laboratorios de las Universidades de Chile y Católica estamos iniciando un ambicioso proyecto que contempla:

- Estudios sobre las proteínas y los genes que intervienen en la oxidación del hierro incluyendo la rusticianina y los citocromos presentes en la membrana celular;
- La quimiotaxis que podría atraer a la bacteria hacia los minerales que son lixiviados;
- Los lipopolisacáridos y proteínas de membrana que intervienen en la adherencia de la bacteria al mineral;
- Los plásmidos que podrían codificar genes de resistencia a metales tóxicos como mercurio, plata y sales de arsenatos;
- Las enzimas como la ribulosa bifsosfato carboxilasa y la nitrogenasa que intervienen en la captación de los nutrientes esenciales de estas bacterias.

Patrocinado por el proyecto PNUD/ONU DI CHI/85/002.

ANALISIS DE CEPAS DE *Thiobacillus ferrooxidans* POR METODOS ELECTROFORETICOS E INMUNOLOGICOS. (Analysis of *Thiobacillus ferrooxidans* strains by electrophoretic and immunological methods). Carlos A. Jerez, Gabriel Campos, Doris Chamorro e Iris Peirano. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La biolixiviación de minerales es un proceso biotecnológico de gran importancia. Aunque este fenómeno se conoce desde hace muchos años, la información a nivel molecular de las bacterias implicadas es escasa. Nuestro grupo se ha interesado en estudiar algunos componentes de la membrana de las bacterias acidófilas que podrían estar implicados en la quimiotaxis microbiana frente a diversos metales. Como primera etapa hemos aislado, purificado y caracterizado cepas conocidas y autóctonas de minerales chilenos.

Las cepas individuales de *T. ferrooxidans* se crecieron en presencia de $^{14}CO_2$. Los componentes celulares así marcados fueron inmunoprecipitados mediante antiseros preparados contra bacterias intactas. Estos inmunoprecipitados se analizaron por electroforesis en placas de poliacrilamida en presencia de SDS seguida de autoradiografía. Los perfiles electroforéticos de los componentes inmunoprecipitados fueron diferentes de una cepa a otra. Por lo tanto, mediante estos antiseros no sólo es posible detectar la presencia de estos microorganismos quimiolitotróficos sino que también identificar el tipo de *T. ferrooxidans* presente en determinados minerales.

El análisis con proteinasa K de los componentes inmunoprecipitados indicó que la mayor parte de ellos son proteínas, las que probablemente se encuentran en la superficie celular.

Finalmente, experimentos de quimiotaxis demostraron la presencia de proteínas metilables de membrana cuyo grado de modificación varía en presencia de diferentes iones metálicos.

Financiado por Universidad de Chile y Proyecto PNUD/ONU DI CHI/85/002.-

ULTRAESTRUCTURA DEL *THIOBACILLUS FERROOXIDANS*. RELACION ENTRE ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA MEMBRANA EXTERNA. (Ultrastructure of *Thiobacillus ferrooxidans*. Relation between the structure and function of the outer membrane). Rodríguez, M. y Campos, S. Depto. de Biología Celular, Microbiología, Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El *Thiobacillus ferrooxidans*, bacteria Gram negativa se tiñe mal con este procedimiento. Hemos desarrollado una tinción con Fuccina ácida que lo visualiza claramente al microscopio de luz.

Con microscopía electrónica de transmisión las cepas R2., A3. y A6., presentan superficie ondulada. En ella destacan cuerpos densos, de 60-130 nm correspondientes a Poli-beta-hidroxi-butirato.

En la membrana externa se distingue una banda exterior de 50-60 A, una intermedia transparente de 10-50 A, y otra densa de 23-50 A.

El citoplasma presenta cuerpos polihédricos de Ribulosa di-fosfato carboxilasa (Carboxisomas) y una red fibrilar citoplásmica además de mesosomas. Un estudio del Lipopolisacárido, reveló un contenido en lípidos con 15.5% de K.D.O. y 25% de polisacáridos de 50%. Hemos podido establecer que hay un 1.01% de Glucosamina, 8.57% de Dideoxi azúcares y 2.9% de Heptosas.

En experimentos preliminares hemos podido observar que el poner en contacto LPS con concentraciones diferentes de calcopirita y luego incubadas con agitación por 20 minutos, al microscopio electrónico de transmisión es posible observar la calcopirita adherida al LPS, lo cual no ocurre con igual mezcla de LPS de *Salmonella typhi* y calcopirita.

Un estudio más en profundidad del LPS permitirá conocer mejor su función especialmente su participación o no en el fenómeno de adherencia al mineral.

Biodegradación de lignina: su estudio y posible utilización biotecnológica. (Lignin biodegradation and possible biotechnologic applications). Vicuña, R. Laboratorio de Bioquímica. Departamento Biología Celular. Pontificia Universidad Católica de Chile.

La lignina, luego de la celulosa, es el segundo polímero más abundante en la naturaleza y constituye, por lo tanto, una importante fuente de carbono. Su aprovechamiento como recurso es limitado, en parte por la complejidad estructural y por el desconocimiento que se tiene sobre su degradación. Sin embargo, en los últimos años, se ha comenzado a estudiar la degradación de lignina por microorganismos. En especial, se ha identificado el papel de los hongos de pudrición y, últimamente, el de bacterias del suelo en el proceso degradativo.

En esta exposición, se describirán los principales hallazgos en el estudio de la biodegradación de lignina, con especial énfasis en la participación de bacterias en el proceso y su posible utilización biotecnológica.

SIMPOSIO PERSPECTIVAS BIOTECNOLÓGICAS EN CHILE II

PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *S. typhi*: USO POTENCIAL DE LAS PORINAS EN DIAGNÓSTICO Y COMO VACUNA CONTRA FIEBRE TIFOIDEA. (Outer membrane proteins from *S. typhi*: potential use of porins for diagnostic and as typhoid vaccine) Venegas, A. Depto. de Biología Celular, Universidad Católica de Chile.

Se ha propuesto que los componentes de la membrana externa de las bacterias gram (-) están involucradas en la interacción de agente infeccioso y células del mesonero. Entre éstos, el LPS y la flagelina han sido usados en diagnóstico con resultados poco satisfactorios. Entre otros componentes destacan las porinas, proteínas que permiten el flujo de solutos hidrofílicos de PM inferior a 600 D. Estudios estructurales de las porinas y sus genes en *E. coli* han establecido la existencia de dos porinas típicas (OmpC y OmpF) y una especializada en transporte de fosfato (PhoE).

La detección de altos niveles de anticuerpos anti-porinas en sueros de pacientes de fiebre tifoidea ha sugerido la utilización de las porinas de *S. typhi* como método diagnóstico alternativo. La caracterización y purificación de porinas de *S. typhi*, ha permitido detectar dos componentes de PM 35 y 36 KD.

Debido a la incidencia de fiebre tifoidea en Chile, hemos iniciado un proyecto multidisciplinario que involucra varios laboratorios el que incluye:

- Evaluación del potencial inmunogénico de *S. typhi* como posible vacuna.
- Clonamiento y expresión de genes de porinas de *S. typhi* en *E. coli*.
- Estudios *in vivo* e *in vitro* de adherencia de la bacteria mediada a través de porinas.

Se presentará en detalle estrategias para clonamiento y expresión de estos genes, incluyendo algunos resultados preliminares.

Financiado por FONDECYT, PNUD-UNESCO y DIUC (Universidad Católica)

EL IMPACTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES EN MEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA. (The impact of monoclonal antibodies in medicine and biotechnology). De *Ioannes, A.* Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

A parte de la función natural de los anticuerpos en la respuesta inmune de los vertebrados, debido a su alta especificidad, estos han sido una herramienta importante en la cuantificación e identificación de moléculas de interés en investigación y medicina. Sin embargo, la respuesta inmune frente a un antígeno es heterogénea, es decir, diferentes linfocitos sintetizan diferentes anticuerpos que se mezclan en el suero, reconociendo cada uno de ellos un determinante antigénico distinto. Esto hace que los antisueros convencionales sean una mezcla de especificidades difíciles de aislar.

Hace diez años Milstein y Köhler concibieron la idea que era posible producir anticuerpos monoclonales *in vitro*, mediante híbridos formados por la fusión entre células tumorales y linfocitos esplénicos provenientes de un animal inmunizado. Una vez establecido un clon de un híbrido, las células pueden ser mantenidas en cultivo por largo tiempo, secretando cantidades ilimitadas de anticuerpos homogéneos al medio de cultivo.

Los anticuerpos monoclonales obtenidos de esta manera han demostrado tener una especificidad exquisita por el determinante antigénico que reconocen, haciéndolos una herramienta imprescindible para la investigación biomédica y para el diagnóstico y terapia de enfermedades humanas.

Además debido a su alta afinidad por el ligando pueden ser usados para el fraccionamiento industrial de moléculas cuando las técnicas convencionales presentan limitaciones como son bajo rendimiento y alto costo.

DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO MEDIANTE DETECCIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO VIRAL. Viral Diagnosis by Nucleic Acid Detection.

José Manuel Ojeda F., Sección Virología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina D.C.M.N., Universidad de Chile.

Existen diversos métodos de aislamiento e identificación de entidades virales a partir de muestras clínicas. La mayoría de éstos se basan en la capacidad que tienen ciertos virus de producir efecto citopático en cultivos celulares "in-vitro", que son fácilmente identificables y característicos del virus infectante. Como complemento a estos métodos y facilitando su especificidad se han utilizado métodos inmunológicos que permiten identificar grupos de virus.

Recientemente se ha comenzado a utilizar métodos diagnósticos basados en la detección e identificación de ácido nucleico viral. Estos métodos tienen la ventaja de permitir el reconocimiento de entidades virales en forma directa y rápida, como es el caso de los Rotavirus.

Los virus Herpes simplex también han podido detectarse por identificación de su DNA mediante hibridación de ácidos nucleicos, y con técnicas citoquímicas específicas para DNA.

Se discute la aplicabilidad de estas técnicas en base a su utilidad y ventaja en el diagnóstico de ciertas infecciones virales.

INHIBICIÓN DE *Pseudomonas solanacearum* MEDIANTE CEPAS ANTAGONISTAS. (Antagonistic strains with inhibitory action to *Pseudomonas solanacearum*). Ciampi, L., Bustamante, P. y Poñette, M.

Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias e Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Informes recientes señalan el uso de procariontes para controlar bacterias fitopatógenas. Entregamos antecedentes sobre un método para el aislamiento y evaluación de bacterias del suelo para controlar biológicamente a *P. solanacearum* agente causal de la marchitez bacteriana. Esta enfermedad se detectó en Chile durante 1983, y es una amenaza para la producción de papas.

Plántulas de papas desarrolladas de semilla botánica se sembraron en bandejas con un suelo orgánico no estéril. Al tener 8 cm. de altura fueron inoculadas con tres suspensiones de *P. solanacearum* de 1×10^8 (D.O. 600nm=0.1) y diluyendo a 1×10^6 y 1×10^3 UFC/ml. Las bandejas fueron incubadas a 28°C en una cámara ambiental durante 21 días. Posteriormente las plantas sobrevivientes se utilizaron para aislar bacterias de tejidos interiores. Las plantas fueron esterilizadas con NaClO, lavadas y trozos de tallos suspendidos en solución estéril. De cada tubo se realizaron aislamientos sobre la cas de agar-cloruro de trifenil tetrazolio, de las cuales se confeccionó una colección de cepas; luego cada placa se expuso por 30 minutos a vapores de cloroformo (2ml). Una segunda capa de agar blando conteniendo 1.5×10^8 UFC/ml de *P. solanacearum* fue depositada sobre estas placas. Este método permitió detectar cepas inhibidoras donde se seleccionaron aquellas que no causaban daño a tubérculos de papas. Finalmente se seleccionaron 4 cepas inhibidoras de las cuales se obtuvieron extractos crudos semipurificados, los que fueron teñidos con una solución al 1% de acetato de uranilo, observándose partículas tipo picocinas al microscopio electrónico.

Financiado por Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (Chile), Proyecto 170/84.

SIMPOSIO EXPRESION GENICA

CLONAMIENTO DEL GEN DE LA VALIL-tRNA SINTETASA DE LEVADURA. (Cloning of the yeast Valyl tRNA synthetase gene). Jordana, X., Chatton, B. y Fasiolo, F. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile e Institut de Biologie Moleculaire et Cellulaire, C.N.R.S., Estrasburgo, Francia.

Las aminoacil-tRNA sintetetas (ARS) desempeñan un papel crucial en la síntesis de proteínas al catalizar la unión de los aminoácidos a sus respectivos tRNAs. Los genes de varias ARS de *E. coli* y de *Saccharomyces cerevisiae* han sido clonados, y algunos secuenciados, con el fin de determinar la estructura primaria de las enzimas, las relaciones estructura-función y los mecanismos de regulación de su expresión génica.

En el caso de la Valil-tRNA sintetasa de *S. cerevisiae*, el gen fue clonado con la ayuda de un procedimiento inmunológico. Una genoteca de DNA de levadura en un vector de expresión (λ gt11) fue ensayada con anticuerpos anti ValRS purificados por cromatografía de afinidad. Se aisló un clon positivo que contenía un fragmento del gen de la ValRS. Este fragmento fue utilizado para detectar por hibridización clones de *E. coli* que poseían el gen de la ValRS en un plásmido capaz de replicar en *E. coli* y en levadura. Al transformar células de levadura con plásmido extraído de estos clones, se obtuvo una sobreproducción de ValRS de aproximadamente 10 veces (determinada por medición de actividad y por electroforesis en geles de polianilamida y análisis de tipo "Western").

CLONAMIENTO Y EXPRESION DE UN GEN DE tRNA^{Val} DE *Thermus thermophilus*. (Cloning and expression of a tRNA^{Val} gene isolated from *Thermus thermophilus*). González, E., Davagnino, J., Yáñez, L., Lira, P., Leighton, V., Cross, D. y Venegas, A. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

Pocos estudios se han realizado acerca de las características estructurales de los ácidos nucleicos de organismos termofílicos y aún menos sobre procesos vitales, especialmente en lo que se refiere a expresión de genes. A fin de iniciar un análisis sobre expresión génica a altas temperaturas hemos decidido aislar y caracterizar algunos componentes de tal proceso como son: un gen de origen termofílico y la RNA polimerasa del mismo organismo.

Hemos escogido como modelo a *Thermus thermophilus* HB8, bacteria termofílica estricta. Se construyó una genoteca de DNA genómico en el vector pBR322. Mediante hibridización con ³²P-tRNA total de *T. thermophilus*, se aislaron 4 clones que codifican para genes de tRNA. Uno de ellos fue caracterizado en mayor detalle, determinándose su secuencia nucleotídica. Un análisis mediante un programa de computación y experimentos de hibridización indican que el DNA clonado codifica para un tRNA^{Val}.

Paralelamente, se purificó la RNA polimerasa de esta bacteria, se determinó su composición de subunidades y se ensayó su capacidad para transcribir el gen antes descrito. Los resultados obtenidos indican que existe una eficiente expresión del gen de tRNA^{Val} por la polimerasa termofílica, con una T_o óptima para el proceso de 60°C. La RNA polimerasa de *E. coli* transcribió eficientemente este gen, indicando que sus señales de control de expresión poseen una homología funcional con promotores mesofílicos.

Financiado por DIUC (Universidad Católica) y PNUD-UNESCO.

EXPRESION GENICA COMPROMETIDA EN LA ADAPTACION ESTACIONAL EN PECES (Gene expression committed in fish seasonal adaptation). Manuel Krauskopf, Rodolfo Amthauer, Sergio Oñate y Julieta Villanueva. Instituto de Bioquímica, U.Austral de Chile, Valdivia, Chile.

La aclimatación estacional de ectotermos euritermales implica respuestas compensatorias a las variaciones de temperatura del medio. Hemos postulado que la expresión génica diferencial constituiría una de las estrategias adaptativas que configuran la respuesta compensatoria a nivel molecular.

Al investigar aspectos celulares y moleculares asociados a expresión génica en hígado de carpa (*Cyprinus carpio*), observamos que la aclimatación genera profundas diferencias. El nucléolo del hepatocito de invierno se presenta notoriamente segregado y los niveles de RNA están claramente disminuidos. El citoplasma está ocupado principalmente por gránulos de glicógeno y el RER replegado casi exclusivamente alrededor del núcleo. Durante el verano, la ultraestructura del hepatocito varía reflejando una franca actividad transcripcional y de síntesis proteica.

Experimentos con suspensiones de hepatocitos aislados confirman que en invierno la transcripción está reprimida más que lo esperado por el solo efecto de Q₁₀ y que síntesis de proteínas también decrece. Fraccionamiento de la población de tRNA mediante electroforesis 2-D, demuestra que ésta varía entre verano e invierno.

Para estudiar expresión génica diferencial analizamos la actividad nuclear y mitocondrial. Se ha clonado el mtDNA de carpa y determinado su organización genómica. Por otra parte, para examinar la actividad nuclear y aislar clones de genes que codifican albúmina y rRNA hemos procedido a aislar y caracterizar estos productos. Al mismo tiempo, se está construyendo una genoteca de *C. carpio*. Los clones se utilizarán como sondas para determinar los niveles de expresión, siguiendo la técnica de hibridación *in situ*. (Proyecto RS-83-52, DID-UACH).

COMUNICACIONES

UNA MUTANTE DE FRUCTOSA BISFOSFATASA INSENSIBLE A LA INHIBICION POR AMP. (A fructose bisphosphatase mutant insensitive to AMP inhibition). Babul, J. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Harvard Medical School, EE. UU.

El control de la actividad catalítica de las enzimas es uno de los mecanismos responsables de la regulación del flujo metabólico. Sin embargo, son escasas las pruebas que demuestran que los efectos observados *in vitro* son los responsables de la regulación fisiológica *in vivo*. Una estrategia que podría ser de utilidad al respecto, es el uso de mutantes que posean enzimas alteradas en sus propiedades alostéricas. En este trabajo se presenta la caracterización preliminar de la fructosa bisfosfatasa de una mutante de *E. coli* insensible a la acción de AMP. En la mayoría de las fructosa bisfosfatasas AMP actúa como un inhibidor no competitivo por unión a un sitio alostérico.

Las enzimas mutada y normal, presentes en cepas clonadas, se purificaron por cromatografía en fosfoce-lulosa. Por filtración en Sephacryl S-300 se encontró un perfil heterogéneo para ambas enzimas, el que se desplazó hacia la región de agregados mayores en presencia de AMP. Las enzimas presentaron igual peso molecular de subunidades, la misma K_m para fructosa-1,6-P₂ y fueron inhibidas por exceso de sustrato y por altas concentraciones de fosfoenolpiruvato. AMP se comportó como un inhibidor no competitivo con valores de K_i de 0,016 y 1,3 mM para la enzima normal y la mutada, respectivamente.

Estos experimentos indican que la insensibilidad relativa de la enzima mutada a la inhibición por AMP es una propiedad intrínseca de ella y que sus demás propiedades son similares a las de la enzima normal. Esto, junto con el crecimiento normal en distintas fuentes de carbono de la cepa que contiene a la enzima mutada, muestra que la pérdida de la sensibilidad a la inhibición por AMP no causa necesariamente una gran perturbación metabólica. Financiado por NIH.

ESTRUCTURA DE UN PEPTIDO DEL SITIO ACTIVO DE LA PIRUVATO QUINASA DE MUSCULO DE CONEJO. (Structure of an active site-peptide of rabbit muscle pyruvate kinase). Bazaes, S., Bezares, G., Hinrichs, M.V., Kemp, R. y Eyzaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile y Department of Biological Chemistry and Structure, Chicago Medical School, USA.

Se ha demostrado previamente que el ADP oxidado con peroxodato (oADP) se comporta como marcador de afinidad de la piruvato quinasa (PK), ocupando el sitio de unión del nucleótido. Esto ha permitido aislar y secuenciar un péptido perteneciente al sitio activo de la enzima.

La enzima pre-incubada con oADP en presencia de ATP-Mg (lo que modifica sitios inespecíficos) y dializada, dio la misma cinética de inactivación que la enzima nativa. La estequiometría de incorporación de ¹⁴C-oADP a la enzima así tratada fue 1,2 moles por subunidad. El digerido triptico de la enzima marcada fue fraccionado por cromatografía en Sephadex G-25 y Sephadex G50, seguido de HPLC. El péptido purificado se sometió a secuenciación por el método de Edman automático de fase gaseosa. Se obtuvo la secuencia completa de un péptido de 34 aminoácidos, correspondiendo la lys 25 al residuo modificado.

La estructura del péptido aislado es homóloga a la descrita entre los residuos 341 y 374 de la PK de músculo de pollo y los residuos 342 y 375 de la enzima de músculo de gato, como a la secuencia de un péptido obtenido por digestión triptica de la piruvato quinasa de músculo de bovino marcada con trinitrobenzenosulfonato en un residuo de lisina que participa en el sitio de unión de nucleótidos. Dada la homología encontrada se concluye que el péptido secuenciado participa en el sitio de unión de nucleótidos del sitio activo de la enzima.

Financiado en parte por proyecto DIUC 215/82.

INHIBICION REVERSIBLE DE LA PROLIFERACION DE CELULAS TRANSFORMADAS POR SV40. (Reversible inhibition of SV40-transformed cells growth). Beck, I.; Carmona, M.T. y Santos, M. Depto. Biol. Cel. y Gen., Fac. Med., Univ. de Chile.

Las células transformadas por SV40 expresan antígeno tumoral (Ag-T), proteína viral transformante. Un análisis del rol del Ag-T en la regulación de la proliferación de dichas células requiere que éstas estén sincronizadas. Previamente, hemos establecido que Hidroxiurea (HU) 1 mM detiene las células en S temprano, mientras Azida de sodio (Az) 0.4 mM lo hace en G₁. Con el objeto de entender el mecanismo de bloqueo de la proliferación celular y evaluar el uso potencial de estas drogas como agentes sincronizadores se determinó el efecto de HU y Az en la incorporación de ³H-timidina y ³H-leucina, en el contenido de proteínas y ATP, y en el consumo de O₂ en células transformadas por SV40. Los resultados muestran que HU inhibe fundamentalmente la síntesis de DNA, mientras que Az modifica diversos parámetros. Estos datos sugieren que el bloqueo por HU en S sería más bien específico, mientras el bloqueo por Az en G₁ sería consecuencia de una alteración metabólica general. El efecto de ambos tratamientos es reversible. Por lo tanto, HU y Az podrían ser utilizados como sincronizadores de la proliferación de células transformadas por SV40.

Proyecto B1651-8533, D.I.B., Universidad de Chile.

NUEVAS REGIONES DEL DNA MITOCONDRIAL DE LA LEVADURA CON CAPACIDAD TIPO ars. (New yeast mitochondrial DNA regions with ars-like activity) Bonjardim, C.A. y Nóbrega, F.G. - Bioquímica, Instituto de Química - Universidade de São Paulo - 05508 São Paulo-SP - Brasil.

Cytoplasmic "petite" mutants can be obtained from most regions of yeast mitochondrial DNA (mtDNA) although these deletion mutants often do not contain the regular or surrogate origins of replication (ori) described by Bernardi and col. We have been looking for regions with ars like ability obtained from the COB region, a well known section of mtDNA from which many ethidium bromide induced "petite" mutants were obtained and precisely mapped. To that effect Sau 3AI restriction enzyme fragments of mtDNA spanning the region were cloned into YIp5, a vector that contain the ura yeast gene and the bacterial β -lactamase gene but does not contain a yeast chromosomal origin of replication (ars). The characterized recombinants are tested in a yeast transformation assay using *S. cerevisiae* YMN 21 (ura⁻, trp⁻) as recipient and scoring the transformation frequencies. The mitotic stability, generation time and the physical presence of the plasmid are also investigated.

Eight recombinant plasmids were characterized and their transformation frequencies compared with the autoreplicative (ars 1) control plasmid YRp17. Seven recombinants transform yeast with efficiency that is similar or superior to the control plasmid. One of the clones (pBC 676) is incapable to transform and is derived from a mtDNA region that yielded no discrete "petite" genomes while the transforming clones were derived from regions contained in the unit length of one or more "petites".

Supported by FAPESP, CNPq-PIG and FINEP.

ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN FRACCIONES NUCLEAR Y SOLUBLE DE CROMATINA DE HUEVO FECUNDADO DE ERIZO DE MAR *T. niger*. (Proteolytic activity in nuclear and soluble chromatin fractions from fertilized sea urchin egg *T. niger*). Contreras, M., Ainol, L. y Sánchez, L. Depto. Biología Molecular, Fac. Cs. Biol. y de Rec. Naturales. Universidad de Concepción, Chile.

Entre las proteínas cromatínicas no histónicas se han descrito algunas con actividad proteolítica que podrían considerarse como participantes en procesos de regulación de la expresión génica.

En este estudio se informa de la presencia de actividad proteolítica en fracción nuclear y cromatina de huevo fecundado y su acción sobre histonas de espermatozoides de la misma especie.

La fracción nuclear 70 min post fecundación tiene una relación proteína/DNA de 2.3. Presenta actividad proteolítica sobre caseína urea con pH óptimo de 7, es activada levemente por Mg^{++} e inhibida por NaCl sobre 50 mM. Degrada parcialmente las histonas de espermatozoides. Al aumentar su concentración se degrada preferentemente H_1 , H_2 y H_4 . NaCl hasta 4 mM aumenta la degradación de todas, sin embargo a 6 mM se observa una protección parcial. ATP ejerce un efecto protector que se mantiene cuando se agrega Mg^{++} en relación 5:1. Si se aumenta la relación se disminuye la protección. EDTA y ditiotreitól protegen parcialmente la degradación.

La fracción soluble de cromatina obtenida con ClNa 0,7 M degrada histonas de espermatozoides siendo más sensible H_1 a 0°C y H_4 a 37°C

De estos resultados se concluye que ambas fracciones degradan histonas de espermatozoides de la misma especie en forma diferencial.

Proyecto 20.31.08. Universidad de Concepción.

ALTERACIONES EN LAS FUNCIONES BIOENERGETICAS MITOCONDRIALES PRODUCIDAS POR TRATAMIENTO IN VIVO CON BENZO(a)PIRENO. (ALTERATIONS ON MITOCHONDRIAL BIOENERGETIC FUNCTIONS BY IN VIVO BENZO(a)PYRENE TREATMENT.) Ferreira J. y Salazar I. Departamento Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

Se estudió las funciones bioenergéticas en mitocondrias de hígado de ratas tratadas con una dosis i.p. de Benzo(a)pireno (40mg/kg peso corporal).

Los procesos de fosforilación oxidativa y acumulación de Ca^{+2} fueron aumentados en mitocondrias de hígado de ratas tratadas. Los índices de Control Respiratorio y Control de Ca^{+2} no fueron afectados por el cancerígeno.

En organelos tratados la velocidad de oxidación de sustratos comunes en los tres sitios de acoplamiento fue mayor, tanto en Estado 3 como en Estado 4, sin embargo no hubo pérdida en la eficiencia del acoplamiento de energía puesto que las relaciones ADP/O y Ca^{+2} / sitio permanecieron inalteradas.

Las actividades NADH-oxidasa, NADH-juglona reductasa, NADH-citocromo c reductasa, succinato-citocromo c reductasa y citocromo oxidasa aumentaron significativamente en mitocondrias tratadas.

Estos efectos son dependientes del tiempo post-tratamiento, observándose el mayor aumento 48 horas después de la inyección.

El contenido de los citocromos b, c_1 y $a + a_3$ de mitocondrias aisladas 24, 48 y 72 horas post-tratamiento fue significativamente mayor que el de organelos control.

Los resultados sugieren que el tratamiento con Benzo(a)pireno estimula la respiración mitocondrial, afectando diferentes niveles de la cadena respiratoria.

Proyecto B-1407-8433-DIB. U. de Chile.

ANALISIS PRELIMINAR DE EXPRESION DE GENES DE PORINAS DE *E. coli*. (Preliminary analysis of expression of *E. coli* porin genes). Cotorás, M., Zaror, I., Claude, A., Yudelevich, A. y Venegas, A. Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica de Chile.

La membrana externa de bacterias Gram negativas consta de fosfolípidos, LPS y proteínas. Entre estas últimas las porinas forman en la membrana poros hidrofílicos que permiten el paso de nutrientes y compuestos de bajo peso molecular por libre difusión. En *E. coli* se han descrito las porinas OmpC, OmpF, OmpD y PhoE entre otras. La cantidad y tipo de porinas está bajo compleja regulación por cambios de osmolaridad y nutrientes. Los genes de algunas de ellas se han caracterizado en detalle.

Nuestro interés es clonar genes de porinas de *S. typhi* por su posible relevancia en fiebre tifoidea. Para ello se debe disponer de mutantes porina⁻ o alterar el medio para expresar sólo una de ellas.

Hemos analizado por PAGE-SDS las porinas de las cepas JM101, HB101, RR1am15, DP50supF y los mutantes W7NR y P530. HB101 expresa preferentemente OmpC y bajo nivel de OmpF; P530 sólo OmpF y W7NR sólo OmpC. Datos indirectos sugieren que carbenicilina sería transportada selectivamente por OmpF lo que sería útil para detección de genes de *S. typhi*. Por esto hemos estudiado la sensibilidad a carbenicilina de P530, W7NR y HB101. Se observó que HB101 y W7NR fueron resistentes hasta 80 y 125 ug/ml respectivamente, en cambio P530 sólo hasta 10 ug/ml. Se concluye que W7NR es la más apropiada para la detección del gen ompF. W7NR se transformó con el gen ompF de *E. coli*. Los experimentos para detectar la proteína OmpF están en curso.

Financiado por FONDECYT (proyecto 1205/84), PNUD-UNESCO y DIUC (U. Católica).

BIOSINTESIS DE PROTEINAS EN CLOROPLASTOS AISLADOS DE *Euglena gracilis* var *bacillaris*. (Protein biosynthesis by isolated *Euglena* chloroplasts). Gómez Silva, B. Photobiology Inst., Brandeis Univ. Waltham, MA. y Lab. Microbiología, P. Univ. Católica de Chile.

La purificación de cloroplastos (Clp) de *Euglena*, estructural y fisiológicamente íntacto, ha permitido estudiar sus capacidades biosintéticas in organello, entre ellas, la biosíntesis de proteínas (BP), con el fin de definir su grado de autonomía metabólica.

Clp, purificados en gradientes de Percoll, se obtuvieron de células crecidas fotoorganotroficamente. BP (incorporación de L-[³⁵S] metionina en material insoluble en TCA caliente) se estudió en Clp suspendidos en sorbitol/tricina (pH 7.8), bajo varios regímenes de iluminación o en la oscuridad (con/sin ATP y/o Mg^{++}).

BP en Clp de *Euglena* fue lineal por 30 min y estrictamente dependiente de la energía radiante. En la oscuridad, éstos organelos no sintetizaron proteínas, excepto si ATP (5-10 mM) y Mg^{++} (15 mM) eran incluidos en el ensayo. Ambas actividades fueron indistinguibles con respecto a niveles de síntesis, productos, cinética y efecto de inhibidores de la traducción. Inhibidores de la actividad fotosintética del Clp afectaron únicamente la BP dependiente de energía radiante.

La BP en cloroplastos aislados de *Euglena* fue dependiente del transporte fotosintético no-cíclico de electrones y de la fotofosforilación. ATP exógeno reemplazó eficientemente la energía radiante, si Mg estaba presente. Probablemente, la transcripción de mRNAs lineales BP in organello.

BIOSINTESIS Y PROCESAMIENTO DE LOS PRECURSORES PARA OXITOCINA Y VASOPRESINA. (Biosynthesis and processing of the precursors for oxytocin and vasopressin). González, C.B. y North, W.G. Instituto de Histología y Patología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile y Department of Physiology, Dartmouth Medical School, Hanover, USA

Las neuronas de los núcleos supraópticos (SON) y paraventriculares del hipotálamo sintetizan oxitocina y vasopresina como precursores de mayor peso molecular, junto a sus respectivas neurofisininas. Los precursores son empaquetados en gránulos secretorios y éstos transportados al lóbulo neural. Durante el trayecto, los precursores son enzimáticamente convertidos a los productos finales. Ratas fueron inyectadas con 20 μ Ci de [35 S]cisteína en los SON y sacrificadas a diferentes tiempos después de la inyección. Se hicieron extractos de SON y lóbulo neural y las proteínas fueron separadas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La radioactividad fue determinada por centelleo líquido en alíquotas de las fracciones. Los precursores fueron identificados por inmunoprecipitación y sometidos a microsecuenciación.

Un precursor para oxitocina de peso mol. 15 000 y dos para vasopresina con pesos de 19 000 y 21 000 en geles de SDS, fueron separados por HPLC de extractos de SON. Ambos precursores de vasopresina fueron precipitados por anti-vasopresina y antineurofisinina y se unieron a Con A. El precursor de oxitocina fue precipitado por antioxitocina y antineurofisinina y no se unió a Con A. La microsecuenciación mostró en estos tres precursores residuos de cisteína en las posiciones 1, 6, 22 y 25. Esto indica que se trata de los precursores sin la secuencia de señal. La cinética de aparición de los productos marcados en el lóbulo neural sugiere que el primer evento en la conversión del precursor a los productos es la liberación de la hormona de su precursor.

Financiado en parte por subsidios CA 19613 de USPHS y S-83-44 de la Dirección de Investigaciones, UACH.

PIRUVATO QUINASA DE LEVADURA: ESTRUCTURA DEL SITIO ACTIVO ANALIZADA MEDIANTE MUTAGENESIS SITIO-ESPECÍFICA. (Yeast pyruvate kinase: structural analysis of active site by site-specific mutagenesis). González, E.; Gómez, I.; Imarai, M. y Venegas, A. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

La enzima piruvato quinasa participa en una de las etapas claves de la vía glicolítica: la conversión de PEP en piruvato, reacción en la que se genera además, una molécula de ATP. La comparación de la secuencia aminoácida deducida para la piruvato quinasa de levadura (PYK) con aquellas descritas para las enzimas de músculo tanto de pollo como bovino ha sugerido un posible rol en la actividad catalítica para los residuos Asp²⁴, Cys²² y Lys³³⁷ de PYK.

Hemos analizado tal posibilidad, empleando para ello la técnica de mutagenesis sitio específica mediante oligonucleótidos sintéticos. Dicha metodología nos ha permitido alterar en forma altamente selectiva la región codificadora del gen de PYK, a modo de generar las siguientes modificaciones en la estructura primaria de la proteína: Asp²⁴ por Lys, Cys²² por Ser y Lys³³⁷ por Glu o Leu.

En sucesivas etapas de manipulación genética hemos construido nuevos genes (mutados) para PYK los que se insertaron en un vector de expresión en levaduras. Tales construcciones han sido introducidas por transformación en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* deficiente en PYK. Los genes mutados se han expresado en esta cepa y estamos evaluando el efecto de cada una de las modificaciones mencionadas sobre la función de PYK.

Financiado por DIUC (Universidad Católica) y PNUD-UNESCO.

CRECIMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE LA NATURALEZA EN COMPUESTOS MODELO DE LIGNINA. (Degradation of lignin model compounds by some natural bacterial strains). Goycoolea, M., Seelenfreund, D., Ruttimann, C., González, B. y Vicuña, R. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El conocimiento sobre la biodegradación y el aprovechamiento potencial de la lignina son muy limitados debido a la complejidad e irregularidad de su estructura. En la naturaleza la degradación de la lignina se lleva a cabo muy lentamente, siendo principalmente hongos los organismos encargados de catabolizar el polímero. Sin embargo, informaciones recientes apuntan hacia la participación activa de bacterias en este proceso.

En este trabajo se estudió la capacidad lignolítica de algunas cepas bacterianas naturales. Se aislaron a partir de madera en descomposición en un medio sintético conteniendo como única fuente de carbono monómeros de lignina o fracciones obtenidas de un hidrolizado de lignina Kraft. La capacidad de las diferentes bacterias de metabolizar las fuentes de carbono utilizadas fue registrada por el aumento de la densidad óptica de los cultivos y la modificación de los perfiles de elución de fracciones de lignina Kraft obtenidos mediante HPLC.

Los resultados indican que las bacterias aisladas son capaces de proliferar en los monómeros con una efectividad comparable a su crecimiento en glucosa o alanina. Con respecto a su crecimiento en lignina Kraft, si bien éste es menor que en los sustratos anteriores, se observa una metabolización selectiva de sus componentes de acuerdo a la cepa analizada.

Financiado por Celulosa Arauco y Constitución y DIUC.

FOSFORILACION DE PROTEINAS EN LA BACTERIA FOTOSINTETICA *Rhodospirillum rubrum*. (Protein phosphorylation in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*). Holuique, L., Torruella, M., Lucero, H.A. y Vallejos, R.H. Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos, CONICET, Rosario, Argentina.

Se estudió la presencia de sistemas de fosforilación y defosforilación, catalizadas por protein-quinasas y fosfatasa respectivamente en la bacteria *R. rubrum*.

Se realizó fosforilación in vitro de fracciones subcelulares con ATP- γ -P³² y se analizaron las proteínas endógenas marcadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y autoradiografía. En membranas se obtiene una proteína mayoritaria de 75 kD y en la fracción soluble una de 64 kD. El análisis de fosfoaminoácidos por electroforesis de alto voltaje en papel mostró la presencia de fosfoserina, fosfotreonina y fosfotirosina. En estas preparaciones se encontraron actividades fosfatasa que defosforilan los sustratos endógenos. Tanto las protein-quinasas como las fosfatasa poseen características típicas de organismos procariontes. En experimentos de marcación in vivo con ortofosfato-P³² se obtiene fosfotirosina como el fosfoaminoácido más importante. Se corroboró la presencia de tirosin-quinasa en *R. rubrum* con el uso de péptidos y polímeros sintéticos como sustratos exógenos. Este es el primer informe de fosforilación de proteínas en una bacteria fotosintética.

ENSAMBLAJE Y LOCALIZACION DE LA ACETILCOLINESTERASA 16S EN CELULAS NEURONALES: PAPEL DE LOS PROTEOGLICANES DE HEPARAN SULFATO. (Assembly and localization of 16S Acetylcholinesterase in neuronal cells: rol of the heparan sulfate-proteoglycans). Inestrosa, N. and Matthew, W. Lab. Neurofisiología, Universidad Católica de Chile and Dept. Neurobiology, Harvard Medical School.

El estudio de proteínas asociadas a matrices extracelulares ha despertado gran interés en los últimos años. En este trabajo se ha estudiado la distribución de las formas moleculares de Acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7) en una variante de células neuronales PC12 de rata, que carecen de proteoglicanos de heparán sulfato en la superficie celular, utilizando sedimentación en gradientes de sacarosa.

Después de tratamiento con NGF, los mutantes sintetizan menos forma 4S y más 10S y 16S que las células normales. Esta distribución es similar a la observada cuando células normales se incuban con beta-D-xilósidos, moléculas que interfieren con el ensamblaje de proteoglicanos. La localización celular se estableció, utilizando colagenasa e inhibidores de la AChE que son permeables e impermeables a membranas biológicas. Se determinó que en células normales más del 95% de la AChE 16S se encuentra en la superficie celular, sin embargo, en la variante cerca del 70% se encuentra en un compartimento intracelular. Después de inhibir irreversiblemente toda la AChE celular, la forma 16S recién sintetizada aparece en el compartimento interno con un retardo de 1h, y no se le detecta en la superficie celular hasta 2h después.

Se concluye que la forma 16S se ensambla en el interior de las neuronas y que alteraciones en la síntesis y distribución de proteoglicanos de heparán sulfato afecta tanto la cantidad como la localización celular de la AChE 16S.

MEVALONATO-5-(2-TIODIFOSFATO): SUSTRATO DE LA DESCARBOXILASA DIFOSFOMEVALONICA. (Mevalonate-5-thiodiphosphate): Substrate of mevalonate diphosphate decarboxylase). Jabalquinto, A.M. y Cardemil E. Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile.

La descarboxilasa difosfomevalónica cataliza la descarboxilación de difosfomevalonato en presencia de ATP y un metal bivalente para dar isopentenildifosfato, ADP, Pi y CO₂. Nos encontramos trabajando en el mecanismo de acción de la enzima de hígado de pollo, y nos interesa determinar su mecanismo cinético. Estudios previos indican un mecanismo secuencial. Con el objeto de diferenciar si este mecanismo es ordenado o al azar puede emplearse el enfoque de Fromm, el cual requiere la disponibilidad de un inhibidor competitivo para cada sustrato. Se informa la síntesis enzimática de mevalonato-5-(2-tiodifosfato) (MVAPP8S) a partir de mevalonato-5-fosfato y ATPγS usando quinasa fosfomevalónica de hígado de cerdo como catalizador. El MVAPP8S se identificó y caracterizó por cromatografía en papel en dos sistemas y mediante análisis de fósforo y enzimáticos. El rendimiento final fue de 37%. Se encontró que MVAPP8S se comporta no como un inhibidor sino como un sustrato de la descarboxilasa difosfomevalónica, encontrándose las siguientes razones Vm/Km: 306,7 para MVAPP y 8,65 para MVAPP8S.

Financiado por USACH y Fondo Nacional de Ciencia.

ACCION DIFERENCIAL DEL RECEPTOR BETA ADRENERGICO EN LA REGULACION TRANSCRIPCIONAL Y POST-TRANSCRIPCIONAL EN GLANDULA PAROTIDA. (Differential action of the beta adrenergic receptor on the transcriptional and post-transcriptional regulation in parotid gland). López Solís, R.O. y Castillo, L. Depto. Biología Celular y Genética, Fac. Medicina, U. de Chile.

La administración intraperitoneal crónica de isoproterenol (agonista beta-adrenérgico) induce en las glándulas parótidas de ratón la síntesis de al menos 5 polipéptidos secretables y de fácil caracterización electroforética. Como el mecanismo de acción del isoproterenol en esta respuesta celular no es conocido, se estudió el efecto sobre ella de algunos inhibidores metabólicos específicos.

El bloqueo de los receptores beta-adrenérgicos por propranolol o la inhibición de la transcripción por actinomicina D antes de cada estimulación con isoproterenol suprimen completamente la inducción de los polipéptidos. Una vez inducidos los polipéptidos, actinomicina D no interfiere y propranolol interfiere sólo parcialmente con la secreción de éstos provocada por el mismo isoproterenol. Sin embargo, tanto actinomicina D como propranolol no interfieren con la resíntesis post-secreción de los polipéptidos. Estos resultados sugieren la mediación del receptor beta-adrenérgico y del proceso de transcripción en la inducción de los polipéptidos y de un control post-transcripcional independiente del receptor beta-adrenérgico en la resíntesis post-secreción de los polipéptidos.

Proyectos B1651-8533, Universidad de Chile y 1089/84 Fondo Nacional de Ciencias, CONICYT.

INACTIVACION DE LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIQUINASA DE LEVADURAS CON FENILGLIOXAL Y 2,3 BUTANODIONA. (Inactivation of yeast phosphoenolpyruvate carboxylase with phenylglyoxal and 2,3 butanedione). Malebrán, P. y Cardemil, E. Departamento de Química, Universidad de Santiago de Chile.

La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) cataliza la reacción
$$\text{PEP} + \text{ADP} + \text{HCO}_3^- \xrightarrow{\text{Mn}^{+2}} \text{Oxalacetato} + \text{ATP}$$
 siendo ésta una de las etapas claves de la gluconeogénesis. Todas las enzimas estudiadas requieren de reductores de grupos sulfidrilos para su actividad, habiéndose demostrado la presencia de residuos esenciales de cisteína en la enzima de hígado de rata. Dada la naturaleza de sustratos y productos, se justifica averiguar el posible papel de residuos de arginina en la catálisis, lo que hasta ahora no se ha informado. En esta comunicación se presentan resultados preliminares sobre la presencia de residuos de arginina en el sitio activo de la PEPCK de levaduras, mediante modificación química con 2,3 butanodiona y fenilglioal.

Ambos reactivos inactivan la enzima con cinéticas de pseudo primer orden, sugiriendo la presencia de uno o más residuos de arginina esenciales para la actividad. El tratamiento de los datos obtenidos indican mecanismos cinéticos de inactivación irreversible en ambos casos. Ambos sustratos, ADP y PEP en presencia de Mn⁺², protegen de la inactivación frente a los dos reactivos. La enzima parcialmente modificada con butanodiona recupera en parte su actividad por filtración en una columna de Sephadex G-25 con TRIS-HCl pH 8,2.

En conclusión, los datos permiten sugerir la presencia de residuos de arginina en el sitio activo de la PEPCK de levaduras. Los futuros experimentos se enfocarán a la cuantificación química de estos residuos.

Financiado por DICYT, USACH.

EFFECTO DEL ATP EXTERNO EN LOS MOVIMIENTOS DE POTASIO Y CALCIO EN CELULAS DE GLOMERULOSA ADRENAL. (Effect of ATP on potassium and calcium movements in glomerulosa cells). Marusic, E.T. y Lobo, M.V. Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Es conocido el efecto indirecto del ATP intracelular en las concentraciones iónica de las células actuando como sustrato de ATPasas tales como la Na^+ , K^+ -ATPasa y Ca-ATPasa. Recientemente se ha sugerido la existencia de receptores purinérgicos sobre los cuales el ATP extracelular estaría alterando la permeabilidad celular y en hepatocitos se ha descrito hiperpolarización de las células. Con el objeto de estudiar la posible acción del ATP en células endocrinas se eligió las células de glomerulosa adrenal en la cual hemos descrito un canal de potasio calcio-dependiente. Las células de glomerulosa se obtuvieron por dispersión de tejido adrenal de bovino con colagenasa. La permeabilidad del K^+ (P_K) se estudió midiendo la salida de Rb^{86} en un sistema de perfusión continuo. En forma paralela se midió la producción de aldosterona.

La adición de 10^{-4} M ATP produjo un significativo aumento en la salida de Rb^{86} y en la esteroidogénesis ($p < 0.001$). Este efecto fue similar al obtenido con angiotensina II. Ambos efectos fueron inhibidos por quinina lo que lleva a postular que el ATP estaría produciendo un aumento del calcio citosólico.

EL EFECTO DEL FRIO SOBRE LA BIOSINTESIS PROTEICA EN PLANTULAS DE RAPS (The effect of cold on protein synthesis in rapeseed seedlings). Meza-Basso, L., Alberdi, M., Raynal, M. y Delseny, M. Instituto de Bioquímica e Instituto de Botánica, Fac. de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Laboratoire de Physiologie Végétale, Université de Perpignan, Francia.

Ciertos vegetales son resistentes al efecto del frío. Esta propiedad está asociada a ajustes metabólicos que incluyen entre otros, variaciones del contenido proteico y de algunas actividades enzimáticas. Sin embargo, el efecto de las bajas temperaturas sobre la síntesis proteica no ha sido analizado en detalle.

Para el análisis de biosíntesis proteica se germinaron semillas de raps provenientes de variedades de invierno y de primavera. Las plántulas fueron crecidas 48 h a 18° o a 0°C , incubándolas con ^{35}S metionina durante las últimas seis horas. Los cotiledones fueron procesados y las proteínas solubles totales extraídas. El análisis de síntesis proteica *in vitro* se realizó extrayendo poliA+ RNA a partir del RNA total. Los poliA+ RNA fueron traducidos en un sistema libre de células. Los productos sintetizados *in vivo* e *in vitro* fueron analizados por electroforesis bidimensional.

La síntesis *in vivo* de varios polipéptidos es aparentemente inducida o estimulada por el tratamiento a bajas temperaturas, en tanto que en otros su síntesis no cambia o es reprimida. Cambios similares se detectan en la síntesis proteica *in vitro*. Diversos mRNAs son más abundantes a 0° que a 18°C mientras que otros se encuentran en baja proporción o no existen luego de la exposición a 0°C . Se detectaron además, diferencias importantes al comparar la respuesta a las bajas temperaturas en las variedades de invierno y de primavera.

Los resultados indicarían cambios importantes en la expresión genética sugiriendo la existencia de un proceso adaptativo mediado por las bajas temperaturas. Financiado por DID-UACH (S-84-29, RS-83-19), FNC 1212-84, CNRS (UA 565, AIP 95 31 67).

MUERTE CELULAR Y LESION DEL DNA PRODUZIDO POR LA REACCION DE HABER-WEISS. (Cell killing and DNA damage mediated by a Haber-Weiss reaction). Alberto C. Mello Filho and Rogério Meneghini. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, CP. 20780 - São Paulo, Brasil.

Active oxygen species, produced by phagocytic cells at the site of inflammation, have been implicated with cellular injury at these sites. DNA damage, lipid peroxidation, transformation and cell death are effects that have been described as consequences of exposure of mammalian cells to active oxygen species. We are particularly interested in the mechanism of cellular death and DNA damage production when mammalian fibroblasts are exposed to xanthine oxidase plus acetaldehyde, a system that mimics the production of oxygen species by the phagocytic cells. The target for the lethal injury as well as the molecular species involved in these effects are controversial. The *in vivo* iron catalyzed Haber-Weiss reaction ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^- \rightarrow \text{OH}^- + \text{O}_2 + \text{OH}^\cdot$) is also a disputed matter. We have obtained evidence for its occurrence inside the cells and for its role in the DNA damage and cell killing processes. Studies involving metal ion chelators both in whole cells and purified nuclei have shown the participation of iron cations. The use of enzymes which scavenge oxygen species and its inhibitors demonstrated the participation of both O_2^- and H_2O_2 in the processes of cell death and DNA strand break production.

Supported by FAPESP, FINEP, CNPq.

INHIBICION DE HEXOQUINASAS POR FRUCTOSA-2,6-BISFOSFATO EN PRESENCIA DE EXTRACTOS DE HIGADO RATA. (Inhibition of hexokinases by fructose 2,6-bisphosphate in the presence of rat liver extracts). Niemeyer, H., Rabajillo, E., Cerpa, C. y Acoria, M. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El fructosa-2,6-bisfosfato (F-2,6- P_2) es un metabolito que modula la actividad de un gran número de enzimas en diversas clases de células. No modifica directamente la actividad de hexoquinasas purificadas. Se exploró la posibilidad de que actuara sobre estas enzimas en extractos crudos.

Se encontró que la glucoquinasa (hexoquinasa D) es inhibida por el F-2,6- P_2 cuando se hace el ensayo en el líquido sobrenadante de un homogeneizado de hígado de rata al 50% (p/v), centrifugado a 90.000 g, después de filtrarlo en Sephadex G-25. La inhibición depende de la concentración del extracto y de F-2,6- P_2 , pero no de la concentración de glucosa y de MgATP. También se produce inhibición de otras hexoquinasas animales y de hexoquinasa de levadura, añadidas al medio de ensayo que contiene el extracto de hígado. La acción del F-2,6- P_2 es reversible y la K_i es 3 a 4 μM . El metabolito parece muy específico porque otros hexosofosfatos (mono y bis) no tienen efecto a concentración 100 μM , ni como inhibidores ni como competidores del F-2,6- P_2 .

Se postula que en el extracto existe un factor coinhibidor, que pudiera ser una proteína reguladora: no es retenido en G-25, es inestable aún a temperatura de 0° y es protegido muy efectivamente por F-2,6- P_2 100 μM ; es retenido por DEAE-celulosa a muy baja fuerza iónica y no por CM-celulosa; sedimenta en sulfato de amonio al 40% de saturación y requiere F-2,6- P_2 para mantener su actividad como coinhibidor.

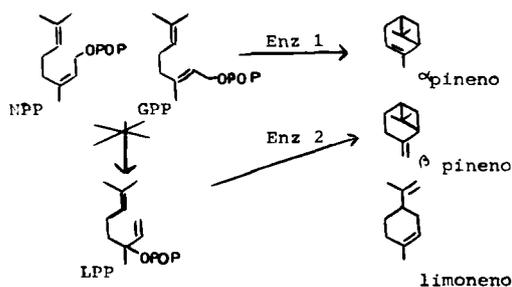
Financiado por el Proyecto B-266-8523, Departamento de Investigación y Bibliotecas, Universidad de Chile, y por la Organización de los Estados Americanos.

BIOSINTESIS DE HIDROCARBUROS CICLICOS CATALIZADA POR ENZIMAS DIFERENTES. (Biosynthesis of cyclic hydrocarbons catalyzed by different enzymes). Portilla, G., Rojas, M.C. y Cori, O. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Nuestro grupo ha demostrado que la biosíntesis de hidrocarburos monoterpénicos en *Citrus limonum* se realiza a partir de los sustratos geranilpirofosfato (GPP) y nerilpirofosfato (NPP).

Se ha propuesto que el isómero terciario linalilpirofosfato (LPP) podría ser un intermedio durante la ciclación de GPP y NPP a hidrocarburos. Hemos logrado separar por Sephadex G-100 dos actividades enzimáticas: una totalmente específica por GPP y NPP y la otra por LPP. Nuestros resultados apoyan:

- 1) La participación de LPP como sustrato y no como intermediario libre,
- 2) que habría involucradas en la formación de hidrocarburos, por lo menos dos enzimas diferentes.



CARACTERIZACION DEL TRANSPORTE DE Mg^{2+} EN GRANULOS CROMAFINES. (Characterization of Mg^{2+} transport in chromaffin granules). Prieto, A.L., Daniels, A.J. Laboratorio de Farmacología Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La membrana del gránulo cromafin es impermeable a H^+ al igual que a Mg^{2+} *in vitro*, sin embargo cuando los gránulos son incubados en presencia de FCCP o NEM se produce la incorporación de Mg^{2+} al organelo, y salida de catecolaminas en una razón de 2 catecolaminas por cada Mg^{2+} . Esta incorporación es dependiente de t^o , y es saturable. Esto indica un posible transportador para Mg^{2+} . La activación de la entrada de Mg^{2+} , inducida por FCCP, en presencia de NEM no se debería a una inhibición de la ATPasa puesto que inhibidores como DCCD, quercetina y $(CH_3)_3SnCl$ no producen efecto alguno. PMB, que tiene reactividad con grupos SH al igual que NEM, sí produce efecto.

Atractilósida, inhibidor de transporte de nucleótidos en gránulo, es capaz de bloquear la incorporación de Mg^{2+} producida por FCCP solo en presencia de NEM. ATP inhibe competitivamente la incorporación de Mg^{2+} inducida por FCCP. Como atractilósida y ATP están asociados a sitios aniónicos, se estudió el efecto del inhibidor del transporte de aniones, SITS, el que fue capaz de bloquear completamente la incorporación de Mg^{2+} en presencia de FCCP y NEM. NaCl y KCl inhiben la incorporación de Mg^{2+} inducida por FCCP siendo ésta aún mayor en presencia de NEM. Esto indica que este último, estaría abriendo canales aniónicos, que aumentarían la entrada de Mg^{2+} por cotransporte. Cuando Na^+ es reemplazado por colina, la inhibición no ocurre.

Estos resultados indican que Mg^{2+} estaría entrando por un canal de Na^+ o K^+ y que sería cotransportado con un anión.

FUNCIONES DE LA γ -GLUTAMILTRANSPEPTIDASA Y DEL GSH EN LA GLANDULA MAMARIA DE RATA. (γ -Glutamyltranspeptidase and GSH functions in the rat mammary gland). Ríos, M., Villanueva, S., Puente, J. y Sapag-Hagar, M. Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Las principales funciones del ciclo del γ -glutamilo son, entre otras, el transporte de aminoácidos y la mantención del glutatión reducido (GSH) tisular. Este ciclo y el GSH aumentan significativamente en la lactancia en la glándula mamaria. En este trabajo iniciamos el estudio del papel de la γ -glutamyltranspeptidasa (γ -GT) y GSH glandulares *in vivo* y en cultivo de explantes y acinos mamarios.

Se determinó la actividad de la γ -GT y niveles de GSH en presencia y ausencia de inhibidores del ciclo del γ -glutamilo; y la determinación de caseína y lactosa sintetasa como parámetros de lactancia.

De los resultados obtenidos es posible concluir:

- 1) Que *in vitro* la disminución del GSH tisular disminuye los parámetros de lactancia; 2) que el GSH fluye al medio extracelular, fenómeno acrecentado en presencia de inactivadores de la γ -GT y 3) que inactivadores de la γ -GT disminuyen el ingreso y la incorporación de aminoácidos al tejido. Estos resultados permiten postular al GSH tanto en un papel protector como en la transpeptidación y transporte de aminoácidos en la glándula mamaria.

(Proyecto D.I.B. B2116-8513 Universidad de Chile).

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE PLASMIDIOS DE CEPAS AUTOCTONAS DE *T. ferrooxidans* Y SU POSIBLE ROL EN RESISTENCIA A METALES. (Isolation and characterization of plasmids from native *T. ferrooxidans* strains and their putative role in metal resistance). Sánchez, H., Hevia, E. y Venegas, A. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

T. ferrooxidans es una bacteria quimiolitotrófica acidófila, que está siendo usada en procesos extracción de metales, siendo especialmente útil, debido al bajo costo, en el caso minerales de baja ley o marginales, donde los métodos clásicos de extracción química resultan antieconómicos. Algunas cepas de este microorganismo pueden crecer en presencia de elevadas concentraciones de varios cationes o aniones de metales pesados. Las bases moleculares de este tipo de resistencia no han sido determinadas. En otras especies bacterianas la resistencia a algunos elementos como Hg, Cd, Ag y As está codificada en plasmidios.

Hemos iniciado la detección de plasmidios en cepas autóctonas de *T. ferrooxidans*, encontrando en algunas de ellas, uno o más plasmidios. Entre los métodos de aislamiento ensayados, el alcalino resultó el más adecuado. Se encontró además que el congelamiento de las células previo a la extracción afecta notablemente la integridad del plasmidio. Estos plasmidios han sido purificados y algunas de sus propiedades estudiadas.

Se ha intentado relacionar la presencia de algunos plasmidios en cepas particularmente resistentes a metales pesados.

Financiado por DIUC (Universidad Católica) y PNUD-UNESCO.

PROLIFERACION CELULAR Y EXPRESION DE ANTIGENO T EN LA SUPERFICIE DE CELULAS TRANSFORMADAS POR SV40. (Cell proliferation and expression of T-antigen on the surface of SV40-transformed cells). Santos, M. y Butel, J. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y Baylor College of Medicine, Houston, Texas, U.S.A.

El antígeno T (Ag-T), proteína viral transformante, se expresa en núcleo y superficie de células transformadas por SV40. Se postula que el Ag-T de superficie participaría en la regulación de la proliferación y/o en la mantención del estado transformado de estas células. El objetivo de este estudio fue correlacionar la expresión del Ag-T en la superficie celular con la actividad proliferativa y/o el fenotipo transformado de células de ratón transformadas por SV40. Se determinó la presencia de Ag-T en la superficie de células en poblaciones asincrónicas y en células transformadas por mutantes termosensibles del SV40, cultivadas a temperaturas permisivas y restrictivas. El Ag-T de superficie fue analizado por inmunoprecipitación, electroforesis y autorradiografía. La máxima expresión de Ag-T se observa en la superficie de células en activa proliferación. Una disminución significativa se correlaciona con una menor actividad proliferativa. Por otra parte, la presencia del Ag-T en la superficie celular es independiente del fenotipo transformado. Estos datos sugieren que el Ag-T de superficie podría participar en el control de la proliferación de células transformadas por SV40 y hacen necesario revisar su rol en la mantención del estado transformado.

Proyecto B1651-8533, D.I.B., Universidad de Chile (Parcial)

ASOCIACION DE DNA POLIMERASA α EN NUCLEOS DE OOCITOS DE X. LAEVIS (ASSOCIATION OF DNA-POLYMERASE α IN NUCLEI OF X. LAEVIS OOCYTES). Solari A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La DNA polimerasa de tipo α es la DNA polimerasa involucrada en la replicación del material genético nuclear y generalmente se la encuentra en el núcleo dependiendo del sistema biológico y metódica de purificación empleada. Si bien la ubicación subcelular de ésta enzima está bien determinada, no existe información sobre los mecanismos que determinan su exclusiva localización en el núcleo. En esta comunicación se entrega información sobre las interacciones que mantienen a la enzima ligada a estructuras del núcleo de oocitos.

El oocito crecido de X. laevis (etapa V y VI) es un excelente sistema biológico para estudiar éste aspecto pues contiene grandes cantidades de DNA polimerasa α en el núcleo. En este sistema además es posible obtener núcleos por disección manual en corto tiempo lo cual permite obtener organelos con máxima integridad en sus constituyentes macromoleculares.

Núcleos aislados manualmente e incubados en diferentes condiciones de fuerza iónica y tiempo, permitieron concluir que la enzima escapa del núcleo a concentraciones moderadas y altas de NH_4Cl , sin embargo la presencia de polivinil pirrolidona en el medio de incubación logra bloquear dicho escape. Al analizar diferentes estructuras nucleares obtenidas por disección manual, se encontró que la DNA polimerasa α está asociada al llamado gel nuclear. Estudios posteriores con estos gels nucleares permitieron concluir que la enzima está debilmente unida a estas estructuras, ya que el lavado de ellas con soluciones crecientes de NH_4Cl permitieron detectar a la enzima en la fracción soluble.

Proyecto financiado por la Universidad de Chile (Proyecto B-1444-853 F).-

ESTUDIOS DE SECUENCIAS PARTICIPANTES EN LA EXPRESION IN VITRO DE GENES DE trn^{Phe} DE LEVADURA POR ENSAYOS DE COMPETENCIA. (A study on sequences participating in the in vitro expression of yeast trn^{Phe} genes by competition assays). Thorikay, M., Hinrichs, M.V. y Bull, P. Laboratorio de Bioquímica, Dpto. Biología Celular, P. Universidad Católica de Chile.

Se estudió la participación de los promotores intragénicos y secuencias adyacentes en la unión de factores de transcripción a través de experimentos de competencia, en los cuales se midió la transcripción in vitro de un clon activo (pYPT-4) en presencia de concentraciones crecientes de uno inactivo (pYPT-5 ó 9).

Se obtuvieron a partir de pYPT-5 y 9, los insertos de DNA de levadura y fragmentos lineales derivados de ellos que contienen los bloques promotores intragénicos A y B en una molécula o separados. Se incubaron concentraciones adecuadas de genes de trn^{Phe} y competidores con extracto de levadura como fuente de RNA polimerasa III y factores de transcripción. El RNA sintetizado se extrajo y se separó por electroforesis en gels de poliacrilamida-urea. Las bandas se localizaron y cuantificaron en cada caso. Cada punto se hizo en cuadruplicado.

Ambos clones inactivos son capaces de competir por los factores de transcripción. Esta competencia es más efectiva cuando los DNA están a la forma sobre enrollada. La mitad 3' del inserto 9 compete en forma similar que el inserto 9 completo, mientras que la mitad 5' lo hace en menor grado. Al eliminar las 8 últimas bases del gen del inserto 5 y región 3' adyacente, se pierde la capacidad competitiva del inserto 5.

Estos resultados confirman la importancia de los bloques promotores intragénicos y de las secuencias adyacentes en la unión de los factores de transcripción.

Financiado por Proyecto DIUC 78/84.

EFFECTO DIFERENCIAL PROOXIDATIVO DE LAS HEMOGLOBINAS HUMANAS FETAL Y ADULTA. (Differential prooxidant effect of human fetal and adult hemoglobin) Valenzuela A, Guerra R. y Cañas P. INTA, Universidad de Chile. División de Ciencias Básicas, Casilla 15138, Santiago 11. Chile

El comportamiento fisiológico de los eritrocitos fetales (EF) es diferente al de los eritrocitos adultos (EA). Se conoce que la vida media del EF es cercana a la mitad de la del EA y los niveles de actividad de las enzimas involucradas en la protección de estas células contra el stress oxidativo son diferentes. Por otra parte se ha descrito que la transformación de la oxihemoglobina a metahemoglobina involucra la liberación al medio intracelular de radicales libres del O_2 de carácter prooxidante.

El propósito del presente trabajo fue medir la diferente capacidad prooxidante de las formas de oxi y metahemoglobina fetal (HbF) y adulta (HbA). Para ello, se separaron previamente ambas hemoglobinas por técnicas cromatográficas a partir de muestras provenientes de sangre de cordón de recién nacidos y sus respectivas madres. Una vez que ambas hemoglobinas fueron separadas y purificadas se convirtieron a su forma de oxi y metahemoglobina respectivamente y se ensayo su efecto prooxidante en un sistema modelo de peroxidación constituido por linoleato de potasio. La HbF y la HbA en la forma de oxihemoglobina presentan un efecto prooxidante diferente, siendo superior aquel de HbF. Sin embargo, ambas hemoglobinas en la forma de metahemoglobina no presentaron efecto prooxidante.

Se postula que el diferente efecto prooxidante de la HbF con respecto a HbA en la forma de oxihemoglobina se correlacionaría con la mayor tendencia a formar metahemoglobina del EF y podría explicar la mayor sensibilidad de estas células al stress oxidativo lo cual a su vez puede ser uno de los factores importantes en la etiología de diversos tipos de anemia que afectan al recién nacido y especialmente al prematuro cuyo origen es aún poco conocido. (Financiado por Grants B-1765-8533 y B-2019 8522 del DIB.)

PROTEINAS REGULADORAS DE *S.tuberosum* DEPENDIENTES DE Ca^{2+} (Ca^{2+} dependent regulatory proteins from *S.tuberosum*). Valenzuela, M.A., Mancilla, M., Kettler, A.M., Jara, O., Pizarro, J. y Traverso-Cori, A. Dep. Bioquímica, Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Hemos aislado del tubérculo de *S.tuberosum* proteínas dependientes de Ca^{2+} que son reguladoras de algunas enzimas. Anteriormente habíamos descrito una preparación parcialmente purificada de *S.tuberosum* con características calmodulínicas la cual estimulaba las actividades ATPásica y ADPásica de la apirasa.

Después de una cromatografía en Sepharosa-trifluoperazina esta preparación se resolvió en tres fracciones proteicas: Fr-A que activa a la apirasa; Fr-I que inhibe a la apirasa y Fr-C que activa a la fosfodiesterasa de AMPc.

La Fr-C tiene una sola banda de proteínas tanto por electroforesis (pI 4,4) como por electroforesis en SDS (PM 16.000). Por estos valores y por el efecto estimulante de fosfodiesterasa de AMPc dependiente de Ca^{2+} y la inhibición de este efecto por la trifluoperazina, concluimos que esta fracción es calmodulina. Esta calmodulina pura de papa no tiene ningún efecto sobre la apirasa.

La Fr-A presenta al menos tres bandas de proteínas por electroforesis (pI 4,8;5,6;5,9) y por electroforesis en SDS (PM entre 20000 y 30000) además no tiene actividad calmodulínica, pero sí presenta acción estimulante sobre la apirasa en presencia de Ca^{2+} .

La Fr-I no ha podido ser caracterizada por su aparente inestabilidad y escasa concentración de proteínas.

Proyecto financiado por D.I.B. N°B-2079-8514.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE ENDONUCLEASAS TERMOESTABLES: BstVI, UN ISOSQUIZOMERO DE XhoI (Isolation and characterization of thermostable endonucleases: BstVI, an isoschizomer of XhoI). Vásquez, C.¹; Adasme, A.¹ y González, E.² ¹Departamento de Química, Universidad de Santiago de Chile y ²Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica de Chile.

Recientemente hemos purificado una endonucleasa de restricción tipo II, la cual fue aislada de un bacilo termofílico gram positivo. De acuerdo a pruebas microbiológicas estándares, la bacteria resultó ser del tipo *Bacillus stearothermophilus* y la enzima fue denominada BstVI.

Sobre la base de los patrones de digestión de los diversos DNAs utilizados como sustrato, hemos concluido que BstVI es un isosquizomero de XhoI, aislada originalmente de *Xanthomonas holcicola*. Además de ser muy termoestable (temperatura óptima de 75°C), BstVI es producida en gran cantidad por esta cepa bacteriana. Prácticamente un solo paso de purificación hace posible la eliminación de nucleasas inespecíficas y por lo tanto, su uso con fines de análisis de restricción y de clonamiento molecular.

Se han determinado algunas de las condiciones óptimas para la actividad enzimática, además de probar la estabilidad de la enzima frente a una serie de agentes desnaturantes de proteínas.

Financiado parcialmente por Dirección de Investigación, Universidad de Santiago de Chile.

PURIFICACION Y PROPIEDADES DE UNA FORMA DE P-450 CON UN ALTO RECAMBIO PARA LA OXIDACION DE BENZO(a)PIRENO. PURIFICATION AND PROPERTIES OF A CYTOCHROME P-450 FORM EXHIBITING A HIGH TURNOVER RATE FOR BENZO(a)PYRENE OXIDATION. Vásquez, H., Strobel, H. and Gil, L. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile Department of Biochemistry and Molecular Biology. The University of Texas, Medical School at Houston.

Una isoenzima de citocromo P-450 activa en un sistema reconstituido y que presenta un recambio muy alto para la oxidación de Benzo(a)pireno (BP) ha sido purificada de ratas con desnutrición proteico-energética inducidas con 8-Naftoflavona.

Las etapas de purificación incluyeron: Solubilización en buffer Tris HCl pH 7.7 que contenía 36% de glicerol, DTT, EDTA y Renex 690, luego cromatografía en DEAE-Sephadex A-25, DEAE-celulosa, hidroxilapatita y CM-sephadex. Caracterización de esta forma permitió establecer que el espectro diferencial reducido en presencia de CO presenta un pico máximo a 446,5 nm; las λ max. para los espectros oxidados y reducidos fueron 416 y 408 nm respectivamente. Citocromo P-446 en la forma aislada corresponde a una de bajo spin, tiene una actividad específica de 14 nmoles/mg de proteína. En gel electroforesis aparece como una sola banda de PM 56.000.-

P-446 oxida diferentes sustratos a diferentes velocidades en un sistema reconstituido que contiene además NADPH citocromo P-450 reductasa y dilaurilfosfatidilcolina. P-446 oxida BP con un número de recambio de 83 nmoles producto/min/mg de proteína. P-446 parece ser diferente a la forma P-450c inducida con 3MC y que también oxida preferentemente BP aunque a una velocidad menor.

Financiado por proyecto B-1970-8525 del DIB, Universidad de Chile y 1004 del Fondo Nacional de Ciencias.-

CLONADO MOLECULAR DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA FIBRE AFTOSA. ANDINO, Raúl H.º, VAZQUEZ M.V.º, MANDEL M.A.º, KAPLAN G.º, PALMA E.º y TORRES H.N.º, *INGEBI-CONICET, **CICV-INTA.

El Virus de la Fiebre Aftosa (VFA) es un picornavirus cuyo genoma está constituido por una única molécula de RNA monocatenario de aproximadamente 8500 bases, el cual presenta un tracto de poliA en el extremo 3', uno de poliC en las cercanías del 5' y un polipeptido ligado a este último extremo. Dicho RNA actúa como mensajero.

Las proteínas virales son el resultado del procesamiento postraduccional de una poliproteína única.

Las proteínas que componen la capsida viral (proteínas estructurales: Vp1, Vp2, Vp3 y Vp4) se encuentran codificadas en un "cluster" ubicado entre los nucleótidos 2000 a 4000 del RNA, siendo la proteína Vp1 la responsable de la respuesta inmune.

Utilizando como molde el RNA viral se ha sintetizado el cDNA correspondiente utilizando como "primer" oligo dT12-18. Posteriormente el cDNA fue clonado en plásmidos vectores (pBR322, pAT153/PvuII-8, etc.).

De esta manera se ha obtenido plásmidos portando fragmentos de cDNA que representan el 90% del genoma viral.

Finalmente se han obtenido secuencias parciales del RNA genómico (proteína inmunogénica) y se las ha comparado con las publicadas para otras cepas, encontrando variaciones que se corresponden con las diferencias serotípicas observadas.

PRENILTRANSFERASA DE FLAVEDO DE *Citrus sinensis*: DIFERENTES FORMAS DE ENZIMA. (Prenyltransferase from *Citrus sinensis* flavedo: different forms of enzyme). M.V. Vial*, A. Ouaas, C. Bravo y L.M. Pérez (Dep. Bioquím. Pac. Cs. Quím. y Farm., U. de Chile e *Instituto Profesional de Osorno).

Un S₃₉₁₀₀ obtenido por centrifugación diferencial de homogenizados de flavedo naranja, contiene la actividad de la preniltransferasa y forma E y Z farnesoles y E-Farnesilpifosfato (E-FPP). Al filtrar este S₃₉₁₀₀ por una columna de Sefarosa-2B, aparece más de una forma de preniltransferasa, de masas moleculares de 465 KDa y 96 KDa.

La preniltransferasa de 465 KDa coeluye con la actividad de la IPP isomerasa; mientras que la de 96 KDa es capaz de interconvertirse a formas de mayor o menor masas moleculares dependiendo de la concentración de proteínas. Las diferentes formas de preniltransferasa, eluidas de Sefarosa-2B, forman solamente E-farnesol y E-FPP.

Un electroenfoque del S₃₉₁₀₀ separa también diferentes formas de preniltransferasa, con puntos isoeléctricos distintos.

Los resultados sugieren que en el S₃₉₁₀₀ existen diferentes formas de preniltransferasa, las que podrían estar asociadas entre sí o con otras proteínas presentes en esta "fracción soluble", y que la filtración en Sefarosa-2B desestabiliza algún tipo de asociación de esta enzima con otras proteínas, que serían las responsables de la biosíntesis del Z-farnesol por el S₃₉₁₀₀.

Proyecto B 2078-8512 del D.I.P. y Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología.

ACCION HORMONAL SOBRE LA γ -GLUTAMILTRANSFERASA DE GLANDULA MAMARIA (Hormonal action on γ -glutamyltransferase of mammary gland). Villanueva, S., Puente, J. y Sapag-Hagar, M. Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

En estudios anteriores hemos demostrado que la actividad γ -glutamyltransferasa de glándula mamaria sufre un sustancial aumento en la transición virgen-preñez-lactancia. Parte de este aumento puede alcanzarse mediante la inyección de estradiol a ratas vírgenes ovariectomizadas. Sin embargo, en cultivo de tejido mamario el estradiol no tiene efecto sobre la actividad de la enzima.

En el presente trabajo hemos establecido que:

- Tanto la hipofisectomía como el uso de bromocriptina previenen la acción del estradiol.
- La administración de agentes liberadores de prolactina (metoclopramida y perfenazina) a ratas vírgenes provoca un aumento en la actividad γ -glutamyltransferasa similar al observado con estradiol.
- La adición de prolactina a cultivo de tejido (ex-plantos) causa un aumento significativo en la actividad de la enzima.

El conjunto de estos hechos indicaría que la prolactina sería la principal responsable del control hormonal sobre la enzima de glándula mamaria.

(Proyecto D.I.B. B2116-8513 Universidad de Chile)

EXPRESION Y ENSAMBLE DE RUBISCO DE *Chromatium vinosum* en *Escherichia coli* (Expression and assembly of RuBisCO from *Chromatium vinosum* in *Escherichia coli*). Viale, A., Kobayashi, H. y Akazawa, T. Research Institute for Biochemical Regulation. Nagoya University. Nagoya. Japón.

La ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) cataliza el primer evento tanto en la fijación fotosintética de CO₂ como en la fotorespiración en los organismos fotosintéticos. La enzima está constituida por dos tipos distintos de subunidades, las cuales forman una estructura hexadecamérica (A₆B₆). En la bacteria fotosintética *C. vinosum*, los genes que codifican dichas subunidades son adyacentes y probablemente cotranscritos.

Un fragmento de DNA de *C. vinosum* conteniendo ambos genes fue ligado a vectores de expresión, colocándolo bajo control transcripcional del promotor *tac* de los plásmidos *ptac* 12 ó pKK 223-3, e introducido en *E. coli*. Las bacterias que expresaron la proteína fueron detectadas mediante anticuerpos específicos anti-RuBisCO. En dichas bacterias, la transcripción y traducción de ambos genes fue observada mediante técnicas de electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa y utilización de anticuerpos específicos (western blotting). La cantidad máxima de RuBisCO producida por *E. coli* fue de aproximadamente 15% de la proteína soluble total, luego de la inducción con isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG). La actividad carboxilásica de la enzima sintetizada por *E. coli* fue la misma que la de la enzima aislada de *C. vinosum*. Ambas enzimas mostraron igual perfil de elución al ser analizadas mediante cromatografía líquida de alta presión, utilizando columnas de filtración por gel.

Estos resultados indican que RuBisCO puede ser sintetizada y ensamblada en una estructura hexadecamérica A₆B₆ en forma catalíticamente activa por *E. coli*, sin ser necesarios factores específicos para el ensamble.

*Dirección actual: Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI). Suipacha 531. Rosario. Argentina.

EL METABOLISMO DEL GLUCONATO EN *E. coli*. ESTUDIO DE UNA CEPA NORMAL EN CULTIVOS CONTINUOS. (The Gluconate metabolism in *E. coli*. Study of a normal strain in continuous cultures). Coello, MN e Istúriz, T. Centro de Biología Celular. Universidad Central de Venezuela. Caracas. El metabolismo inicial del gluconato (gnto) en *E. coli*, comprende su incorporación a la célula y su fosforilación. El gnto-6-P formado es catabolizado por la vía de las pentosas y/o Entner Doudoroff, la cual incluye una dehidrasa y una aldolasa. Cultivos en tanda de células normales en gnto, muestran inducción de las actividades de transporte, fosforilación y dehidrasa, la gnto-6-P-dehidrogenasa y KDP aldolasa son constitutiva y semi-constitutiva respectivamente. Evidencias fisiológicas y genéticas con células normales y mutantes muestran la presencia de dos sistemas diferentemente regulados *GntM* y *GntS*, que duplican las actividades iniciales y han sido ubicados en los min 75 y 96 del mapa. Los cultivos en tanda no permiten un control riguroso de las condiciones de crecimiento, debido a esta limitación y en nuestro caso, estos cultivos impiden conocer la relación de expresión entre los sistemas descritos. Para esclarecerlo hemos iniciado el estudio de la cepa normal de *E. coli* (HfrG6), en condiciones controladas de crecimiento y limitadas por gluconato, tanto en aerobiosis como anaerobiosis en un quimiostato. Las actividades de interés fueron determinadas para diversos estados estacionarios. Los resultados muestran un incremento gradual en la actividad de un transporte de alta afinidad y de gluconocinasa. Esta última resulta ser termosensible a bajas tasas de dilución y fue progresivamente sustituida por la termosensible a medida que la tasa de dilución aumentó. En anaerobiosis se logran mejores condiciones de inducción de la dehidrasa y la gluconocinasa inducida fue la termosensible. Los resultados sugieren la expresión diferencial de ambos sistemas y suministran información acerca de como podrían ellos expresarse durante la utilización de gluconato por *E. coli* en condiciones de laboratorio.