

**SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE
VI REUNION ANUAL**

PUNTA DE TRALCA, CHILE
4 AL 7 DE AGOSTO DE 1982

RESUMENES
DE CONFERENCIAS, SIMPOSIOS Y COMUNICACIONES

ABSTRACTS
OF LECTURES, SYMPOSIA AND COMMUNICATIONS

Conferencia Inaugural

LAS MICROCINAS: UNA NUEVA FAMILIA DE ANTIBIOTICOS (The Microcins: A new family of antibiotics).

Asensio, Carlos y Baquero, Fernando.
Instituto de Enzimología (CSIC), Facultad de Medicina, Universidad Autónoma y Servicio de Microbiología, Centro Ramón y Cajal, Madrid, España.

Una alta proporción de enterobacterias aisladas del contenido intestinal humano secretan en los medios de cultivo substancias antibióticas de bajo peso molecular, que han sido denominadas *microcinas* (BBRC 69: 7, 1976). La producción y la autoinmunidad a estos antibióticos en las cepas productoras, están codificadas por plásmidos (JB 135: 342, 1978; 141: 1015, 1980).

La acción antibiótica de las microcinas es muy potente sobre especies filogenéticamente próximas (Salmonella, Proteus, Shigella, Klebsiella y otras) y ocasionalmente son activas sobre otras familias bacterianas. El mecanismo de acción es muy diversificado, dependiendo del tipo de microcina. Pueden afectar el transporte y el nivel energético (Mcc 140 y 509 n), DNA (17), biosíntesis de proteínas (15 m y 509 a) y probablemente otros niveles. Las estructuras de las microcinas que han sido purificadas muestran ser oligopéptidos o derivados de aminoácidos.

La evidencia disponible indica que las microcinas participan activamente en la colonización y homeostasis del ecosistema bacteriano del tracto digestivo humano.

Simposio Internacional

NUCLEOTIDOS CICLICOS EN LA ACCION HORMONAL

MECHANISM OF PROTEIN KINASE ACTIVATION BY HORMONES WHICH ELEVATE CYCLIC AMP OR CYCLIC GMP.

Corbin, J.D.; Rannels, S.R.; Robinson-Steiner, A.M.; Holloway, R. and Beebe, S. Howard Hughes Medical Institute, Department of Physiology, Vanderbilt University, Nashville, TN 37232 USA.

Both of the main isozymic forms (types I and II) of cAMP-dependent protein kinase contain a dimeric regulatory subunit (R) and two catalytic subunits (C). The R subunit inhibits the C subunit, but when hormonal elevation of cAMP occurs, cAMP binds to R and causes release of the active C which then catalyzes various intracellular protein phosphorylation reactions. The cGMP-dependent protein kinase has a structure similar to that of the cAMP enzyme except that the R and C components are linked by peptide bond. Of significant

current interest is the mechanism by which cAMP or cGMP interacts with the respective R to cause C activation. It is now known that the R component of either enzyme contains two intrachain cAMP or cGMP binding sites; thus, there is a total of four sites in each holoenzyme. These intrachain sites are shown to be different with respect to the rate of dissociation of bound cAMP or cGMP, the slower component being denoted as Site 1 and the faster one as Site 2. It is also found that the sites are different with respect to cAMP or cGMP analog specificity. It can also be stated that binding of cyclic nucleotide to either Site 1 or 2 of the cAMP enzyme causes a large stimulation of binding to the other site in a cooperative manner. It is suggested that the site selectivity of the analogs allows for experimental exaggeration of a phenomenon which reflects an

important physiological effect, i.e., cAMP binding to one site stimulates the other to bind during hormonal elevation of this cyclic nucleotide. Using the isolated type I cAMP isozyme, combinations of certain Site 1-selective and Site 2-selective analogs are synergistic in stimulating protein kinase activity. This synergism suggests that both sites are involved in protein kinase activation. Synergism between two different site-selective analogs is also obtained in the lipolytic effect of the exogenous analogs in adipocytes, implying that both cAMP binding sites are involved in the physiological response to hormones which elevate cAMP *in vivo*. This conclusion is also supported by the observation that binding of a Site 2-selective analog in heart extracts is not stimulated by perfusion of the hearts with epinephrine, presumably because after cAMP elevation Sites 1 and 2 are occupied approximately equally in the cell (Supported in part by NIH Grant AM 15988, Juvenile Diabetes Foundation, and Diabetes Research and Training Center Grant AM 07383).

RECENT PROGRESS IN THE KNOWLEDGE OF STRUCTURE AND FUNCTION OF LOWER EUKARYOTIC ADENYLYLATE CYCLASE.

Flavia, Mirtha M., Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", INGEBI-CONICET y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires, Argentina.

Neurospora crassa adenylate cyclase is Mn²⁺-dependent, and insensitive to fluoride and guanyl nucleotides. This enzyme is only partially associated to sedimentable fractions and it can be obtained from *Neurospora* mycelial strains as a soluble entity. In addition, this cyclase has been purified by procedures that do not require the use of detergents; its molecular weight is 202.000.

Purified preparations of *Neurospora* soluble adenylate cyclase has been used for the production of monoclonal antibodies. A monoclonal antibody has been obtained that inhibits adenylate cyclase from *Neurospora*, *Trypanosoma cruzi* and *Muccor*

Rouxii, but not the Mn²⁺ dependent, soluble adenylate cyclase from rat testes.

On the other hand, the *Neurospora*, membrane-associated, adenylate cyclase is able to interact with components of detergent extracts from turkey erythrocyte ghosts. The reconstituted cyclase system is catalytically active in the presence of Mg²⁺ and it is activated by Gpp(NH)p plus isoproterenol and fluoride. Dose-response curves for isoproterenol and fluoride with the reconstituted systems were similar to those reported for avian erythrocyte and liver membranes respectively.

CYCLIC NUCLEOTIDES AND MEIOTIC MATURATION OF AMPHIBIAN OOCYTES.

Jordana, X.; Allende, C.C.; Olate, J.; Allende, J.E.— Departamento de Bioquímica, División Ciencias Médicas Norte y Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

The maturation of amphibian oocytes is induced by progesterone by a mechanism which differs from that generally accepted for steroid hormone action. Progesterone acts on the exterior surface of the oocyte and there is considerable evidence which indicates that the hormone triggers a decrease in the cAMP levels of the cell.

Adenylate cyclase has been characterized in a particulate fraction obtained from full grown oocytes. The enzyme is activated by NaF, GMAP(NH)P and cholera toxin.

The oocyte enzyme, but not that present in the surrounding follicle cell layer, is inhibited 30 to 60% by 10 μM progesterone when measured in the presence of GMP-P(NH)P, or when cholera toxin-activated enzyme is measured in the presence of GTP. No inhibition is observed when cyclase is measured with MnCl₂ or NaF. Progesterone lengthens the lag observed with GMP-P(NH)P activation. Progesterone concentrations which inhibit adenylate cyclase are commensurate with those that induce maturation. Small oocytes which do not mature with hormone, do have adenylate cyclase which is inhibited by progesterone, but to a lesser extent.

Although the mechanism by which proges-

terone inhibits adenylate cyclase is not fully understood, it is clear that guanine nucleotides are required and that the activation of the enzyme by these nucleotides is altered by the hormone (Financed by the Ford Foundation, UNDP/UNESCO project CHI/81/001 and the University of Chile).

AUTOPHOSPHORYLATION OF CYCLIC AMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE FROM *Blas-tocladiella emersonii* ZOOSPORES.

Maia, J.C.C.; Gomes, S.L.*; Juliani, M.H.* and Rangel-AlDAO, R.***

* Departamento de Bioquímica, Instituto de Química-USP-C.P. 20780-S. Paulo-Brasil.

**Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Carabobo-Maracay-Venezuela.

Using a combination of chromatographic and sucrose density gradient techniques, under carefully controlled conditions of pH and protease inhibitors, we demonstrated that there is only one form of cyclic AMP-dependent protein kinase (cAMP-PK)

in the cytosolic fraction of *B. emersonii* zoospores. Through the use of 8-N₃-[³²P]-cAMP, a photoaffinity label for the regulatory subunit of cAMP-PK, a major protein band of Mr = 58,000 could be localized by autoradiography of SDS-polyacrylamide gels of photoaffinity labeled crude extracts. This protein band co-chromatographed on DEAE-cellulose with both cAMP-dependent phosphotransferase and cAMP-binding activities, strongly suggesting that this Mr = 58,000 protein is the regulatory subunit of the cAMP-PK of *B. emersonii*. Furthermore, the regulatory subunit, located by 8-N₃-[³²P]-cAMP incorporation, co-migrated on uni-and bi-dimensional gel electrophoresis with an endogenously phosphorylated protein of Mr = 58,000. cAMP partially inhibited endogenous phosphorylation of the Mr = 58,000 protein in semi-purified cAMP-PK preparations, providing firm evidence that, analogous to the type II cAMP-PK of mammalian cells, the cAMP-PK of *B. emersonii* is able to catalyze the phosphorylation of its 58,000 dalton regulatory subunit. Supported by grants from FAPESP, FINEP, CONICIT & Project PNUD/UNESCO RLA 78/024.

Simposio Internacional

ORGANIZACION Y EXPRESION GENICAS

IN VITRO TRANSCRIPTION OF YEAST tRNAP^{he} GENES (Transcripción *in vitro* de genes de tRNAP^{he} de levadura).

Bull, P.; Sánchez, H.; Valenzuela, P. and Venegas, A. Laboratorio de Bioquímica, Departamento Biología Celular, Pontificia Universidad Católica de Chile.

In eukaryotic organisms, RNA polymerase I transcribes high molecular weight rRNA, RNA polymerase II, hnRNA or mRNA and RNA polymerase III, tRNAs and 5S RNA. These three enzymes differ in sensitivity towards α -amanitin, a fact which has facilitated their study.

When using cloned eukaryotic genes, it has been shown that besides the respective

RNA polymerase, the presence of transcription factors is required for specific transcription. There are at least two factors required for specific tRNA transcription. Another factor, specific for 5S RNA gene, has been purified to homogeneity. It binds to a central region of the cloned gene. This region is essential for transcription initiation (an intragenic promoter). Recently, evidences have been presented which indicate that tRNA genes contain an intragenic split promoter.

We have been studying the *in vitro* transcription of yeast tRNAP^{he} genes using HeLa cell free extracts, which contain RNA polymerase III and transcription factors, in

order to study, in a second stage, the effect of regions on transcription in the yeast tRNA^{Phe} family.

Two controls were performed for testing transcription specificity. The first one included an assay in the presence of different amounts of α -amanitin, a selective inhibitor of eukaryotic RNA polymerases. RNA polymerase II is very sensitive to this poison; RNA polymerase III shows a moderate sensitivity (200 μ g/ml) and RNA polymerase I is resistant to high concentrations of α -amanitin. The second control consisted in cutting inside the gene with restriction enzymes, thus separating the two control regions necessary for specific transcription. When increasing DNA concentration in the assay mixture, three kinds of behaviour were observed depending on the clone used. The first type presents a linear correlation between DNA concentration and transcript production, the second one reaches a plateau and the third is inhibited by an excess of DNA.

When performing a kinetic study, it was seen that precursor synthesis is linear in some clones, while in others it reaches a plateau after an incubation period.

The sizes of precursor transcripts and processing products of all clones were determined. Also, a probable *in vitro* processing mechanism is proposed.

In conclusion, appropriate conditions were determined for further studying the effect of some regions on transcription in the yeast tRNA^{Phe} family (Supported by DIUC).

SPERMIATION, AS A MODEL OF CELL DIFFERENTIATION.

Burzio, Luis O.; Vera, Juan C.; Concha, Ilona I.; Brito, Mónica and Zuvic, Tatiana. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Spermatogenesis in mammals is a highly complex process of cell differentiation which involves the following steps: migration of the primordial germ cells to the gonadal ridge, active mitotic proliferation and spermatogonia renewal, the meiotic

profase and the two reductive meiotic divisions, and spermiogenesis. To us, the last process represents one of the most dramatic cascade of morphological transformation of a cell (spermatid) to produce the highly differentiated spermatozoa.

To approach the molecular bases of this fascinating process of differentiation we have developed simple procedures to isolated the major fibrillar structures of the mammalian sperm tail, such as the Outer Dense Fiber Complex (ODF) and the Fibrous Sheath (FS). The rat sperm ODF contains six polypeptides with M.W. of 87,000; 30,400; 26,000; 18,400; 13,000 and 11,500. These six polypeptides account for about 35% of the total sperm proteins. The structural features of these fibers as well as their possible functional role will be discussed.

Studies on the biosynthesis *in vivo* of the ODF polypeptides have shown that the incorporation of the newly synthetized polypeptide into the assembling fibers take place primarily in the second half of spermiogenesis. The biosynthesis of these proteins as well as the transcription of their corresponding mRNA will be discussed (Supported by Grant DIUACH RS-79-20 and S-82-01).

METHYLATION OF RIBOSOMAL PROTEINS IN SEVERAL SPECIES.

Jerez, C.A.; Amaro, A.M.; Mardones, E. and Sanhueza, S. Departamento de Bioquímica, División Ciencias Médicas Norte, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

The methylation of the ribosomal components has been described in *Escherichia coli* and although the biological significance of this methylation is not clearly understood, there is evidence indicating that these modifications might be important for the assembly of the ribosomal particle. In addition, several of the *E. coli* methylated proteins are known to have important ribosomal functions.

If these post-translational modifications of the ribosomal proteins have in fact a functional or structural role, one might

expect to find them in most organisms and perhaps methylation sites may be conserved.

We therefore have analyzed and identified the ribosomal proteins that are methylated from several species. In order to compare with *E. coli* we studied the following prokaryotes (eubacteria): *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* and *Alteromonas espejiana*. *Halobacterium cutirubrum* was analyzed as an archaebacteria and the eucaryote *Euglena gracilis* was also studied for both its cytoplasmic and chloroplastic ribosomal proteins.

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic analysis revealed in general a preferential methylation of the larger ribosomal subunit proteins. It was evident that a "typical" pattern of methylation is present in all the eubacteria studied. In addition, several proteins known to be structurally and functionally homologous in eubacteria were methylated in all cases. Analysis of the methylated amino acids in one of these ribosomal proteins showed them to be qualitatively the same in Gram positive and Gram negative bacteria.

The methylation pattern of the chloroplast ribosomal proteins resembled that of eubacteria, supporting the idea of the endosymbiotic origin for this organelle.

Our results indicate a good degree of conservation for the methylation of ribosomal proteins and in general agree with the idea that there is one-for-one homology among the ribosomal proteins of eubacteria (as among the RNAs).

H. cutirubrum ribosomes show a different methylation pattern for the ribosomal proteins when compared with eubacteria and eukaryotes, supporting the postulate that the archaebacteria constitute a new line of descent (Supported by Grant B1065 8234, SDCYCA, University of Chile).

THE STRANGE DIVERSITY OF AMINOACYL-tRNA SYNTHETASES.

Labouesse, B. Institut de Biochimie Cellulaire et Neurochimie. CNRS. Université de Bordeaux II. France.

The aminoacyl-tRNA synthetases are by necessity present in every cell, prokaryotic or eucaryotic, in order to ensure the proper formation of the 20 cognate aminoacyl-tRNAs which have to translate the genetic information. They all carry out the same overall chemical reaction. Yet their MW ranges from 42 kd to 380 kd and their subunit structure from α to $\alpha_2\beta_2$. Most but not all of them synthesize an intermediate aminoacyl adenylate before transferring the aminoacid to tRNA; some of them but not all correct recognition errors by hydrolytic degradation of the wrong adenylate or the wrong aminoacyl-tRNA so that the final error is maintained at a low level (< 0.1%). Depending on the enzyme the 2' or the 3' OH of the accepting terminal adenosine is aminoacylated. Complementary catalytical properties are found in some cases: the phenylalanyl enzyme from *E. coli* makes AppppA in the presence of zinc ions but does not present a high affinity for zinc. The tryptophanyl enzyme from beef binds tightly zinc but does not synthesize Ap₄A. The tryptophanyl enzyme forms a unique complex with DNA polymerase α both in animal and in plants but not in *E. coli*. Half of the twenty synthetases are found in eucaryotic cell homogenates as high molecular weight complexes but some of them are not found in such complexes nor are they found in prokaryotes. Sequence duplications are present in several but not in all; this is not related to the length of the peptide chain.

In the case of oligomeric enzymes of $\alpha_2\beta_2$ type one of the subunit contains the active site but the role of the other subunit is unknown. When the synthetase is of the α , type catalytic equivalence of the two subunits can be observed in one case and on the contrary half of the sites reactivity is exhibited in other cases. Anticooperative behaviour towards the aminoacid is found for the eucaryotic tryptophanyl enzyme. It is not so for the homologous prokaryotic protein. So far each synthetase seems to have developed its own way to operate. In this talk we will describe some of our recent data on the properties of the beef tryptophanyl-tRNA synthetase, concerning

the interactions of this enzyme with the cognate tRNA and the other substrates of the reaction.

THE INVOLVEMENT OF tRNA-SPECIFIC FACTORS IN DNA SYNTHESIS: The examples of DNA polymerase α and reverse transcriptase.

Litvak, Simon; Castroviejo, Michel; Tarragó-Litvak, Laura and Araya, Alejandro. Institut de Biochimie Cellulaire et Neurochimie du C.N.R.S. Bordeaux, France, and Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

The process of DNA replication involves a great number of protein factors like DNA polymerases, gyrases, DNA binding proteins, ATPases, RNA polymerases (primases), etc. Recently it has been found, in the high molecular weight form of animal DNA polymerase α , a close association of this enzyme with a tryptophanyl-tRNA synthetase activity. This finding has been related to the capacity of some amino-acyl tRNA synthetases to synthesize the nucleoside AppppA which is known to bind specifically to DNA polymerase α and is considered as a positive growth signal in proliferative tissues.

In our laboratory we have found that a form of plant polymerase α purified extensively from wheat embryos is closely associated to tryptophanyl-tRNA synthetase. No other synthetase is found in the polymerase complex. The other three DNA polymerases we have purified from wheat germ are free of synthetase activity. When the synthetase and polymerase activities are separated from each other it is possible to observe a strong stimulation of DNA polymerase activity by the specific synthetase. The details of this stimulation will be discussed as well as some preliminary results concerning the association of Xenopus laevis DNA polymerase α and tryptophanyl-tRNA synthetase. We have failed up to now in the search of an AppppA binding protein in our preparations of wheat DNA polymerase α .

We have also studied another type of protein-nucleic acid interactions involving

the specific recognition of tRNA by a RNA-dependant-DNA polymerase (reverse transcriptase) purified from an avian retrovirus. One subunit of reverse transcriptase is involved in the binding of tRNA^{T_rP} which serves as primer for the synthesis of the complementary strand of DNA. This interaction leads to the selection of specific tRNAs into the virion as well as the positioning of primer tRNA on the viral genome template.

The analogies between these two DNA biosynthetic systems will be discussed as well as other examples of the involvement of tRNA-like structures and (or) tRNA-specific protein factors in nucleic acid biosynthesis. This work has been supported by the University of Chile, INSERM (France), and C.N.R.S. (France).

ANALYSIS OF ASSEMBLY AND STRUCTURE OF THE LARGE RIBOSOMAL SUBUNIT BY MEANS OF TOTAL RECONSTITUTION.

Nierhaus, Knud H. and Nowotny, V., Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Abt. Wittmann, Berlin-Dahlem.

The large subunit (50S) from *E. coli* ribosomes consists of 32 different proteins and two RNA molecules (5S and 23S RNA). A fully active particle can be reconstructed from these separated components under defined incubation conditions (total reconstitution). Assembly analysis: Only two proteins can bind independently to 23S RNA thus starting the course of the assembly. Arguments are presented showing that just two "initiator proteins" are optimal in presence of the in excess synthesized rRNA. Five proteins are essential for early assembly reactions. All five proteins bind to the 5'-end of 23S RNA indicating that early assembly reactions already occur during 23S RNA synthesis and before the synthesis of 23S RNA is completed (assembly gradient along 23S RNA). Finally, the assembly dependencies component for component have been unravelled accumulating in the 50S assembly map. This assembly map provides the first explanation for the strange gene organisation of the ribosomal proteins.

Structure analysis: Neutrons are differently scattered by protons (^1H) on the one hand and by deuterons (^2H) and all other elements occurring frequently in biological specimen on the other hand. This effect has been utilized in the following experimental strategy: RNA and proteins of the 50S subunit were derived from two different cell batches which had been fermented at two different D_2O concentrations, respectively. The result was that deuterated proteins and deuterated RNA had now the same density for a neutron beam. 50S subunits were reconstituted from these deuterated materials containing either two or one protonated proteins. The concept has been proven successfully for both distance measurements between the two protonated proteins within the 50S subunit and, for the first time, determination of form parameters of individual ribosomal proteins *in situ*.

more than one peptidyl-tRNA can be present per ribosome (exclusion principle for peptidyl-tRNA binding). Two aminoacyl-tRNA's can be bound simultaneously to the classical A and P sites, whereas for deacylated tRNA's three binding sites exist, besides A and P sites an additional site which we term E site (E from exit). The filling sequence is P, then E and finally A site. Kinetic experiments of protein synthesis and analyses of the translocation reaction have proven that 1) in the pre- and post-translocational state statistically two tRNA molecules are present per ribosome, and 2) deacylated tRNA is not released from the P site but translocated to the E site. Furthermore, evidence is presented that the trigger for the release of deacylated tRNA from the E site is not the EF-G dependent translocation but the codon-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site.

NEW ASPECTS OF THE RIBOSOMAL ELONGATION CYCLE.

Rheinberger, Hans-Jörg; Schulze, Hartmut and Nierhaus, Knud H., Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Abt. Wittmann, Berlin-Dahlem.

The question which of the 34 different components of the large subunit (50S) are involved in the peptidyltransferase activity has been analyzed by means of total reconstitution. Two strategies were employed, single omission tests and the analysis of a 'minimal particle'. The results revealed that only five proteins and 23S RNA were essential for reconstitution of peptidyltransferase activity thus defining these components as peptidyltransferase candidates. Furthermore, a first molecular model for the ribosomal peptidyltransferase was derived from the known proteolytic mechanism of serine proteases.

The number of tRNA binding sites was determined separately for peptidyl-tRNA (AcPhe-tRNA), aminoacyl-tRNA (Phe-tRNA) and deacylated tRNA^{Phe}. Surprising results were obtained: Peptidyl-tRNA can be bound to either A or P site, but under physiological conditions not

OCCURRENCE AND PROBABLE ORIGIN OF PSEUDOGENES IN THE HUMAN β TUBULIN GENE FAMILY.

Venegas, Alejandro; Pichuantes, Sergio; Gómez, Isabel; Bull, Paulina and Valenzuela, Pablo. Laboratorio de Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile.

From a human' gene bank constructed in the vector phage Charon 4A, we have isolated nine clones carrying complementary sequences to β tubulin chicken cDNA. A preliminary structural analysis of some of these clones, based on restriction digests followed by Southern hybridization, indicates that this is a dispersed gene family. We have obtained the complete sequence of clone β -9, and partial sequence information for clone β 2-3. Both structures appear to be pseudogenes. In the case of clone β -9, the coding sequence is altered by four stop codons, six short deletions and two one-base insertions. Clone β 2-3 contains so far two stop codons and one base deletion. Recently another group has reported an additional β tubulin pseudogene distinct from ours, which carries one stop codon and one base deletion. These changes are located at different positions in the coding

regions of the these pseudogenes. We have used DNA from clone β -9 as a template for *in vitro* transcription and no RNA synthesis was detected.

In addition to the changes in the coding region, this gene seems to have lost its capacity to be transcribed.

It is well known that most eukaryotic genes contain introns; interestingly the β tubulin pseudogenes studied so far do not have them. This characteristics was until now shared only by a few eukaryotic genes coding for proteins like human histones, yeast cytochrome c, human interferon and pseudogenes derived from sequences coding for mouse α globin and immunoglobulin chain. Electron microscope observations from others seems to indicate that some introns are present in β tubulin genes.

It has been suggested that pseudogenes arise from duplicated genes (wide occurrence in multigene families) by accumulation of point mutations and some insertion and deletion events. This explanation however, will hardly account for the existence of pseudogenes which have cleanly lost their original introns as is the case for an α globin pseudogene and as it also appears to be the case for β tubulin pseudogenes.

We and others have suggested that human β tubulin pseudogenes lacking introns may have arisen via retrovirus transposition. A processed β tubulin mRNA was probably reverse transcribed, recombined with viral DNA and somehow put back into the cellular genome. Some structural features of the surrounding sequences support this hypothesis.

Our current work is focused to determine the actual structure of the human β tubulin gene(s). Supported by DIUC.

Columbia University — New York — USA.)

A investigação do genoma mitocondrial da levedura dependeu da utilização de mutantes citoplasmáticos próprios que facilitaram sobremaneira a sua análise funcional e molecular. Resultados surpreendentes foram obtidos como o encontro de genes divididos; a presença de regiões codificadoras em introns, sugerindo a existência de produtos primários e secundários de tradução; o uso particular de certos codons abrindo exceções na universalidade do código genético e o funcionamento da maquinaria de tradução utilizando um número reduzido de tRNAs o que permite contemplar possibilidades de interação codon-anticodon mais flexíveis do que as postuladas pela hipótese clássica do "wobble".

Esses achados dependeram em grande parte da determinação da estrutura primária da região codificadora de genes mitocondriais. No momento nossos estudos se orientam no sentido de caracterizar os produtos de transcrição e seu processamento, assim como localizar, ao nível da sequência de DNA, as alterações existentes em mutantes mitocondriais de interesse, para estabelecer uma correlação estrutura-função precisa. Verificouse que:

1. O "leader" do mRNA do citocromo b tem cerca de 940 nucleotídeos e sua extremidade 3' apresenta uma cauda de 110 nucleotídeos. Para os genes oli 1 e oxi 1 o comprimento do "leader" é de 195 e 56 nucleotídeos respectivamente.
2. O mRNA do citocromo b é processado pela eliminação sucessiva dos dois introns em qualquer ordem.
3. O mutante de exon M17-162 (citocromo b) apresenta três alterações de uma única base numa extensão de 169 nucleotídeos configurando as substituições $\text{Thr}_{112} \rightarrow \text{Leu}$; $\text{Thr}_{127} \rightarrow \text{Ileu}$ e $\text{Gly}_{168} \rightarrow \text{Arg}$.
4. O mutante syn⁻ G116-40 corresponde a alteração no gene do tirosil-tRNA mitocondrial. Não há aminoacilação de tirosina no mutante embora o tRNA defeituoso apresente mobilidade eletroforética normal e extremidade 5' idêntica ao tipo selvagem. Auxílio financeiro: FAPESP, CNPq e FINEP.

CARACTERIZAÇÃO DAS EXTREMIDADES 5' E 3' DA MENSAGEM E DE MUTACOES NO GENE DO CITOCROMO b E NO syn⁻ G116-40 NA MITOCONDRIA DE LEVEDURA.

Nóbrega, Marina P., Bonjardim, Claudio A. e Nóbrega, F.G. Bioquímica — Instituto de Química — Universidade de São Paulo — Brasil. *Tzagoloff, Alexander* (Department of Biological Sciences —

FOSFORILACION DE FOSFOFRUCTOQUINASA DE MUSCULO EN RATO NORMALES Y DIABETICOS. (Phosphorylation of muscle phosphofructokinase in normal and diabetic mice). Ba
zaes, S. y Robert Kemp. - The Chicago Medical School, North Chicago y Universidad Católica, Santiago, Chile.

La fosfofructoquinasa de músculo y de hígado es fosforilada in vitro o in vivo y la fosforilación de la enzima de hígado está asociada con una menor actividad catalítica. Con el objeto de conocer las propiedades de la enzima fosforilada de músculo y comparar el estado de fosforilación con el animal diabético, se purificó la fosfofructoquinasa de músculo de ratones normales (C57BL/KsJ) y genéticamente diabéticos (C57BL/KsJ-db), inyectados con fosfato-P³².

La enzima de ambos grupos de animales, homogénea por PAGE-SDS, en DEAE Sephadex se resolvió en formas con bajo y con alto contenido de fosfato. La actividad específica de cualquier forma de enzima a pH 8.2 es la misma, pero no así las propiedades alóstéricas medidas a pH 7.4, en que las formas con alto contenido de fosfato presentaron mayor sensibilidad a la inactivación por ATP y un mayor S_{0.5} para la fructosa-6-fosfato. El contenido de fosfato encontrado en la enzima fue de 0.13 ± 0.032 y de 0.275 ± 0.102 moles de P/mol de subunidad, para los animales normales y diabéticos respectivamente.

Se concluye que la fosfofructoquinasa de músculo presenta actividad disminuida cuando está fosforilada, a pH fisiológico. Además, el mayor contenido de fosfato encontrado en la enzima del animal diabético puede estar asociado con una menor actividad glicolítica en el músculo de estos animales.

LOS AMINOACIDOS EXCITATORIOS GLUTAMATO, KAINATO Y N-METIL ASPARTATO AUMENTAN LA ENTRADA DE CALCIO A CELULAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA IN VITRO. (Effects of the excitatory amino acids glutamate, Kainate and N-methyl aspartate on the entry of calcium ions into rat cerebral cortex cells, *in vitro*.) E. Berdiche-
wsky, N. Riveros, S. Sanchez-Armass y F. Orrego. Depto. Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Un gran número de aminoácidos ácidos son poderosos excitadores neuronales. Al inducirlos una excitación intensa y prolongada, son también capaces de producir destrucción neuronal, fenómeno llamado "excitotóxico". No se conoce cuál es el mecanismo preciso por el cual estas sustancias inducen excitación o destrucción. Hemos investigado qué efecto tienen los aminoácidos excitatorios L-glutamato, kainato, N-metil-DL-aspartato y DL-homo-cisteato sobre la cinética de entrada de ⁴⁵Ca al espacio intracelular de rebanadas finas de corteza cerebral de rata incubadas *in vitro*. Hemos encontrado que todas estas sustancias, dentro de un determinado rango de concentraciones, son capaces de aumentar marcadamente la velocidad inicial de influxo de ⁴⁵Ca al espacio celular, presumiblemente neuronal. También hemos hallado algo similar con el efecto de kainato sobre la entrada de ²²Na a las células.

ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN GLANDULA MAMARIA DE RATA EN INVOLUCION. (Proteolytic activity in involuting rat mammary gland. Bravo, P., Puente, J. y Sapag-Hagar, M. -Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Inmediatamente después del destete, la glándula mamaria entra en la etapa de involución tisular. En este período (3-5 días), la glándula vuelve a un estado similar al de la rata vírgen con una disminución de su peso hasta llegar a sólo 1/5 del de la glándula en lactancia.

Para analizar este fenómeno se inició el estudio de enzimas proteolíticas, particularmente de las implicadas en la reabsorción de tejido conjuntivo.

Se utilizaron enzima purificada (Sephadex G-150, DEAE celulosa) y sustrato general de proteasas (azocoll) encontrándose la máxima actividad proteolítica a pH 9,6 con las características de ser activada por tripsina e inhibida por antiproteasas (aprotinina, antiproteasas vegetales, etc.) y EDTA. La actividad no se alteró con reactivos modificadores de grupos-SH y OH. El mayor nivel de actividad correspondió al tercer día de involución.

De acuerdo con estos resultados se trataría de una enzima proteolítica en estado latente y susceptible de activación al iniciarse la involución, posiblemente por factores regulatorios endocrinos. Sus características la señalan como una actividad proteolítica diferente a la de colagenasa de útero en involución. (Proyecto B1138-8223, Univ. de Chile).

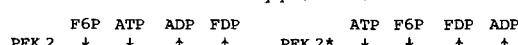
FOSFOFRUCTOQUINASAS TIPO 2 DE MUTANTES DE *E. coli* DIFEREN EN SU MECANISMO CINETICO. (Type 2 phosphofructokinases from *E. coli* mutants differ in their kinetic mechanism).

Campos, G., Guijé, V. y Babul, J. Departamento de Biología y Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

La mutación *pfkB1* aumenta la cantidad de PFK 2, mientras que la mutación *pfkB10* modifica su estructura resultando una enzima de mayor actividad (PFK 2*). PFK 2 y PFK 2* difieren en el tipo de inhibición por fructosa bisfosfato (FDP), lo que implica diferencias estructurales entre los sitios activos de las enzimas, las que se pueden establecer mediante estudios del mecanismo cinético.

La velocidad de la reacción se determinó espectrofotométricamente midiendo la formación de producto en ensayos acoplados. El análisis de los resultados se efectuó mediante las transformaciones de Lineweaver-Burk, Dixon y Cornish-Bowden.

Estudios en velocidad inicial indican que ambas enzimas presentan un mecanismo en secuencia. Experimentos de inhibición por producto sugieren el siguiente orden de interacción de sustratos y productos con las enzimas



Estos mecanismos en secuencia ordenada se pudieron confirmar mediante el uso de ribosa-5-P, sorbitol-6-P y adenilil imidodifosfato como inhibidores de punto muerto. Estudios estructurales de ambas enzimas darán información acerca del cambio producido por la mutación *pfkB10*. Financiado por Universidad de Chile, PNUD-UNESCO y OEA

CONSERVACION DE LA COOPERATIVIDAD CINETICA DE LA GLU-COQUINASA DE HIGADO DE RATA EN PRESENCIA DE AGENTES DESNATURALIZADORES. (Preservation of kinetic cooperativity of rat liver glucokinase in the presence of denaturing agents). Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. Depto. Biología. Fac. Cs. Bás. Farm. U. Chile.

La glucoquinasa (GK) es una enzima monomérica que presenta cooperatividad positiva con glucosa. Se intentó alterar esta cooperatividad mediante agentes desnaturalizadores, como la urea y el Tritón X-100.

En presencia de urea disminuía la actividad enzimática; la inhibición era dependiente de la concentración de urea y de glucosa y podía llegar a ser completa. La determinación de los parámetros cinéticos de la GK indicó disminución de V_{max} , aumento de $K_{0.5}$ y conservación del n_H . Así, con urea 1 M V_{max} disminuía en 50%, $K_{0.5}$ aumentaba de 8,7 a 17,4 mM y el n_H no varía significativamente (1,58 sin urea; 1,47 con urea). La inhibición por urea era inmediata (dentro de las posibilidades de su estimación) y también era revertida en forma instantánea al disminuir la urea. La preincubación hasta 60 min de la GK con urea en presencia de sustratos no cambiaba las propiedades del sistema. La actividad en presencia de urea y de glucosa se mantenía constante por al menos 80 min. Los efectos del Tritón X-100 diferían en que al aumentar su concentración no se lograba una inhibición completa. El Tritón no modificaba V_{max} ni el n_H , pero aumentaba $K_{0.5}$.

Se concluye que los agentes desnaturalizadores producen modificaciones conformacionales de GK, con retención parcial de actividad, pero sin cambios en la cooperatividad, lo que permite postular que en la medida en que hay catálisis hay cooperatividad.

Financiado por SDCACI (U. de Chile) y OEA.

FORMACION DE UN ADUCTO GLUTATION-ACETALDEHIDO COMO UN PRODUCTO DE LA INTOXICACION AGUDA CON ETANOL. Formation of an acetaldehyde-glutathione adduct as a product of the acute intoxication with ethanol. Fluxá M*, Valenzuela A*, Videala L.A.* *Laboratorio de Bioquímica División de Ciencias Básicas. INTA. Universidad de Chile. [†]Unidad de Bioquímica División Ciencias Médicas Occidente. Fac. Medicina. Universidad de Chile.

La intoxicación aguda con etanol (5gr/kg) produce en el hígado de la rata una disminución del contenido de glutatión reducido (GSH) que se correlaciona con un aumento del daño lipoperoxidativo. La transformación de GSH a su forma oxidada (GSSG) solo da cuenta de un 20% de la disminución del triénido y si bien, las condiciones de intoxicación producen un aumento del contenido plasmático de GSH y GSSG, este aumento no da cuenta de la pérdida hepática. La secreción biliar de GSH y GSSG disminuye en condiciones de intoxicación. Se postula que el GSH formaría con el acetaldehído, producto de la metabolización del etanol, un aducto que podría ser excretado al plasma o a la bilis como un producto de desintoxicación y que daría cuenta de la disminución de la concentración intrahépatica de GSH. En este trabajo se demuestra, mediante experimentos *in vitro*, que la reacción de GSH con acetaldehído conduce a la formación de varios productos de sustitución, dependiendo del pH del medio, que son caracterizados mediante cromatografía en capa fina y fraccionamiento de columnas de silice gel. Se intenta, además, la caracterización de estos productos "in vivo" en la secreción biliar, plasma y homogenizado hepático de ratas sometidas a intoxicación con etanol y acetaldehído. Trabajo financiado por el Servicio de Desarrollo Científico. Proyecto N° B 1162.

EFFECTO DE METILACION EN LA EXPRESION DE GENES VIRALES (Effect of methylation in the expression of viral genes). Galanti, N., Waechter, D. y Baserga, R. Depto. Patología, U. Temple, Filadelfia, USA.

En DNA de mamífero, entre 2-7% de citosina y 0.02% de adenina se encuentran metiladas. Se ha sugerido que la metilación de bases está involucrada en la regulación de la expresión génica.

Se microinyectó en células ts13TK- los siguientes genes, metilados (ECOR₁ metilasa) o no metilados: a) El gen temprano de SV40; b) El gen de Herpes para timidina quinasa, y c) Ambos genes insertos en PBR322. La expresión de SV40 se determinó por detección del antígeno T (inmunofluorescencia). La expresión del gen para timidina quinasa se cuantificó por incorporación de timidina-H₃ (autoradiografía).

La metilación del gen temprano de SV40 no afectó el número de células T positivas. La metilación del gen para timidina quinasa disminuyó el número de células con marca autoradiográfica.

Se concluye que la metilación tiene efectos diferentes en genes distintos. Por otra parte la metilación directa de genes virales y su microinyección manual a células de mamíferos constituye una herramienta importante para elucidar el rol de la metilación del DNA.

MODIFICACION DE LA FUNCION PLAQUETARIA POR UN NUEVO ACTIVADOR DE LA ADENIL CICLA SA. (Modification of platelet by a new adenylate cyclase activator). A. González, E. Aranda, M. Sapag, D. Mezzano y J. Garrido. Depto. Biología Celular y Depto. Hematología, P. U. Católica de Chile. Fac. Cs. Básicas y Farm. Depto. Bioquímica Universidad de Chile.

Las plaquetas contribuyen a la formación del coágulo hemostático reaccionando a estímulos fisiológicos como colágeno y trombina con dos respuestas características: agregándose y secretando el contenido de sus gránulos. Estas respuestas parecen estar reguladas por AMPc, ya que son inhibidas por activadores de la adenil ciclase plaquetaria tales como PGE₁ y prostaciclina. En cambio ADP, un agente agregante, inhibe esta enzima en plaquetas.

Forskolin es un diterpeno activador de la subunidad catalítica de la adenil ciclase que actúa en membranas y células intactas de diverso origen. Inhibió *in vitro* (10-100 μ M) la agregación inducida en plaquetas humanas por ADP, colágeno, epinefrina, ionóforo de calcio A-23187 y ac. araquidónico. Inhibió también la secreción medida por el eflujo de serotonina ¹⁴C. Además, la inyección E. V. de forskolin (2,5-5 mg/kg) a ratas impide rápida y reversiblemente la agregación inducida por ADP, efecto que evidencia su potencial como droga antitrombótica.

Estos efectos se pueden correlacionar con un aumento rápido en los niveles de AMPc intraplaquetarios.

ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA EN PEROXIDASA DE RABANO. (Fluorescence studies in horseradish peroxidase). González, G., Brunet, J. y Sotomayor, C. Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso.

La peroxidasa del rábano es una enzima globular de 40.000 daltons que contiene un grupo heme como grupo prostético y una secuencia conocida de aminoácidos. En este trabajo se realizó un estudio de su fluorescencia para obtener información acerca de la distancia entre su único residuo triptofanil y el grupo heme, la polaridad del entorno del triptófano y la accesibilidad de agentes colisionales desde el medio externo al lugar en que se encuentra este aminoácido dentro de la estructura tridimensional de peroxidasa.

Los espectros de fluorescencia se obtuvieron irradiando a 295 nm para excitar selectivamente al triptófano. La absorbancia de las soluciones fue de 0.05 y los apagadores acrilamida, CsCl y NaI se utilizaron en el rango de concentraciones de 0.05 a 0.5 M. La apoperoxidasa se preparó extrayendo el grupo heme con butanol.

La distancia entre el residuo triptofanil y el grupo heme se obtuvo a partir de los espectros de fluorescencia de peroxidasa y la apoperoxidasa, utilizando el mecanismo de transferencia de energía tipo Förster, dando un valor de 19 Å. Los espectros muestran también que el residuo triptofanil se encuentra en la proteína en un entorno moderadamente apolar y que este no cambia con la extracción del heme. El estudio del apagamiento de la fluorescencia del grupo triptofanil por acrilamida y yoduro indica que se encuentra relativamente protegido de colisiones con especies en solución y que el yoduro presenta menor accesibilidad que la acrilamida al residuo de triptófano tanto en la peroxidasa como en la apoperoxidasa.

ESTUDIOS CINETICOS EN CRISTALES DE ASPARTATO AMINO-TRANSFERASA (Kinetics studies of crystalline aspartate aminotransferase). Hubert, E. y Martínez-Carrión, M. Inst. Bioquím., Fac. Ciencias, UACH, y Dept. Biochem., Med. Coll. of VA, VA Comm. University, Richmond, VA, U.S.A.

Aspartato aminotransferasa (AAT) cataliza la reacción de transaminación entre los sustratos aspartato y α -cetoglutarato. La enzima ha sido cristalizada por el método de difusión de vapor.

Para efectuar estudios cinéticos se incuba el cristal en una solución que contiene PEG 20% y sustrato o pseudosustrato. Transcurrida la reacción el cristal se monta en un tubo capilar y se registra el espectro de absorción. Al tratar la enzima cristalina en su forma de piridoxal fosfato (máximo de absorción a 360 nm) con ác. cisteinsulfínico, se observa que este máximo se desplaza a 325 nm, característico de la enzima en su forma de piridoxamina fosfato. Titulación de los cristales a distintos pH, permitió calcular un pK de 7.15. También fue posible detectar los complejos enzima sustrato formados al hacer reaccionar el cristal de AAT con glutamato y α -cetoglutarato, obteniéndose una constante de disociación aparente para glutamato de 1 mM, que es igual al valor para la enzima en solución. α -cetoglutarato forma un complejo abortivo con la enzima en forma de PLP; Se obtuvo una constante de disociación igual a 2 mM tanto para la enzima en cristal como en solución.

Se puede concluir que cristales de AAT catalizan la transaminación y que la afinidad para los sustratos y algunos inhibidores no ha sido afectada por la cristalización.

Grant HL-22265 de U.S. Public Health Service.

INACTIVACION DE LA DESCARBOXILASA PIROFOSFOMÉVALONICA POR FENILGLIOXAL. (Inactivation of pyrophosphomévalonate decarboxilase by phenylglyoxal). Jabalquinto, A. M., Ezaguirre, J. y Cardemil, E. Dpto Química, Fac. Ciencia, Universidad de Santiago de Chile & Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica de Chile.

Estudios de modificación química han establecido que los residuos de arginina tienen un papel esencial en enzimas cuyos sustratos son aniónicos. Este hecho nos llevó a estudiar la modificación de la descarboxilasa pirofosfomévalónica de hígado de pollo con fenilglioxal.

Se usó enzima 80% pura y la actividad enzimática se determinó mediante un ensayo espectrofotométrico. La enzima se inactiva con fenilglioxal en tampon trietanolamina pH 8,15 con una cinética de pseudo primer orden, indicando una reacción irreversible entre la enzima y el modificador. Tanto MVAPP como ATP protegen de la inactivación y en ambos casos se observa que la protección ejercida por la presencia combinada de sustrato y Mg⁺⁺ es menor. La enzima parcialmente modificada no presenta variación en las Km aparentes para los dos sustratos. El hecho que el efecto protector de los sustratos sea función de su concentración, permite determinar las constantes de disociación de los complejos enzima-sustrato, encontrándose valores de 5,5 x 10⁻⁵ M para E-ATP y de 1,7 x 10⁻⁶ M para E-MVAPP.

Estos resultados sugieren la presencia de residuos de arginina en o cerca del sitio activo de la descarboxilasa pirofosfomévalónica.

CELULAS INTESTINALES AISLADAS: UN MODELO IN VITRO PARA CARACTERIZAR TRANSPORTE ACTIVO A NIVEL DE INTESTINO. Isolated intestinal cells: Amiable model for studying active transport by the intestine. López del Pino, V., Hepaty, E., y Schwenk, M. Instituto de Toxicología, Universidad de Tübingen, RFA.

Hepatocitos aislados se han mostrado como un modelo *in vitro* adecuado para caracterizar la translocación de ácidos biliares. En este estudio demostramos la aplicabilidad de células intestinales aisladas para caracterizar el transporte de ácido taurocólico.

El intestino delgado de un cuy se disecó y posteriormente incubó con citrato y ditiotreitol. Las células obtenidas son polares, excluyen azul de tripan (>90%), respiran (8nmoles O₂mg prot x min) y sintetizan ATP (35 nmole x mg prot x min). Estas células fueron incubadas con ³H-uridina y ³H-taurocolato a 37°C, bajo rotación y separados a tiempos determinados del fluido circundante por medio de centrifugación a través de una fase de aceite de silicona.

Al cabo de 20 min de incubación, el ácido taurocólico acumuló x 30 al interior de las células intestinales. La captación celular fue saturable ($K_m = 231 \mu M$, $V = 7 \text{ nmole} \times \text{mg prot}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). Tanto el ácido cárlico como el tauroquenodeoxicárlico inhibieron en forma competitiva su captación. Colesterol inhibió escasamente y taurina no afectó la captación de ácido taurocárlico. Además la captación fue dependiente de energía metabólica y concentración de Na⁺, requiriendo de una energía de activación de 66 KJ/mole. Se concluye que células aisladas de intestino constituyen un modelo *in vitro* apropiado para la caracterización bioquímica del transporte intestinal de ácidos biliares y probablemente otras substancias endógenas y exógenas.

DETECCION DE POLIPEPTIDOS RELACIONADOS A SECRECION, SINTESIS DE DNA E HIPERTROFIA EN GLANDULAS PAROTIDAS DE RATON. (Detection of polypeptides related to secretion, DNA synthesis and hyperrophy in mouse parotid glanda). López Solís, R.O., González, M.J., Allende, C. y Miranda, D., Depto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Las células de las glándulas parótidas pueden ser estimuladas a secretar, sintetizar DNA e hipertrófiarse mediante isoproterenol, según sea el diseño experimental utilizado. En estas glándulas, todas estas respuestas celulares están asociadas al metabolismo proteico. Por esta razón, se evaluó mediante separación en acrilamida-SDS y detección con Coomassie Blue R-250 la modificación en el contenido de polipéptidos particulares, en relación a cada uno de estos eventos inducidos.

Se detectó la existencia de tres polipéptidos que se secretan y reaparecen sincrónicamente en la glándula. Asimismo se encontró la aparición de un polipéptido diferente en el período preroativo tardío de las glándulas estimuladas a sintetizar DNA. Finalmente se ha establecido una conceptualización del fenómeno de hipertrofia en glándula parótida en relación a la modificación de componentes proteicos particulares de las células.

Proyectos B1245-8222, Universidad de Chile
y 1/82 PNUD/UNESCO RLA 78-024

MECANISMO DE TRANSPORTE DE SACAROSA POR COTILEDONES DE Araucaria araucana (MOL.) KOCH.
(Mechanism of Sucrose Transport by Araucaria araucana Cotyledons). Lozada, R. y Cardemil, L. Fac. de Cs.Bás. y Farms. U. de Chile-Santiago.

La sacarosa proveniente del tejido de reserva de semillas de algunas angiospermas, es absorbida a través de los cotiledones. En nuestro laboratorio se ha identificado a la sacarosa como la principal azúcar que se moviliza desde el gametofito al embrión vía cotiledones en semillas en germinación en el género Araucaria. Cotiledones de plántulas de A. araucana de 160-180 h de edad, absorben ¹⁴C-Sacarosa siguiendo una cinética no-michaeliana. - Gráficos de Eadie-Scatchard indican que el proceso de absorción se lleva a cabo a través de un mecanismo de transporte bifásico. Experimentos de inhibición con 2,4-Dinitrofenol y Azida de sodio apoyan un transporte activo para la absorción de sacarosa. Los cotiledones transportan además ¹⁴C-Glucosa y ¹⁴C-Fructosa, incluso a mayor velocidad. Experimentos de competencia con glucosa y fructosa permiten postular que el proceso de absorción de estos azúcares por los cotiledones es mediado por dos sistemas diferentes de transportadores, uno para sacarosa y otro para glucosa.

ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DE ISOAPIRASAS DE S. tuberosum (Structural study of isoapyrases from S. tuberosum) M.Mancilla, A.M.Kettun, M.A.Valenzuela, A.Traverso-Corí. Depto. de Bioquímica. Fac. de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Se ha realizado un estudio estructural comparativo entre dos isoenzimas aisladas del tubérculo de S. tuberosum que presentan distinto cuociente ATPásico/ADPásico: apirasa var. Pimpernel (cuociente=10) y var. Desirée (cuociente=1). Se estableció por electroenfoque el pH de ambas isoapiratas y se encontró una diferencia de dos unidades de pH. La cuantificación de aminoácidos por el método de Spackman y cols. mostró que el porcentaje de aminoácidos ácidos y básicos es el mismo, lo que no da cuenta de la diferencia de pH. Sin embargo, el distintivo grado de amidación de glutámico y aspártico podría explicar la diferencia de estas dos unidades de pH. Por métodos enzimáticos y electroenfoque se determinó cuantitativamente glutamina y asparagina.

Además, se cuantificó por métodos espectrofotométricos el contenido de triptofanos y cisteinas.

Se identificó el residuo del extremo NH₂ terminal por modificación con DNS-C1 y correspondió a leucina en ambas isoapiratas.

Este trabajo ha sido financiado por el Departamento de Desarrollo de la Investigación por el proyecto B-008-803 y B-1144-8113.

CARACTERISTICAS DEL CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS DE MÉDULA ÓSEA LEUCÉMICA. - Growth pattern of leukemic bone marrow fibroblasts. Martínez J. y Minguell J.J. División de Ciencias Básicas, INTA. Universidad de Chile.

En la diferenciación de células basales de médula ósea, además de factores hormonales, participan fibroblastos los que junto a otras células constituyen un microambiente celular. En el presente trabajo se caracteriza el crecimiento de fibroblastos de médula ósea de niños leucémicos sin tratamiento (FL) y se compara con el de fibroblastos normales (FN). Cultivos adherentes de aspirados de médula ósea son mantenidos en un medio que contiene 15 % suero fetal. Desde el punto de vista morfológico las células presentan diferencias significativas, presentando los FN la típica forma fusiforme, alargada con varios nucleolos y gran cantidad de procesos, en cambio los FL tienen menos procesos y probablemente un citoplasma más extendido. Cultivos de FN normales tienen una fase de crecimiento lento rítmico de alrededor de 6 días y las de FL una de 8 a 9 días. El tiempo de duplicación de la población es de 40 horas y 4 días, respectivamente. En cultivos sincronizados de ambos tipos de células se estudió el estímulo en la síntesis de DNA, nor adición de suero y de hidrocortisona (HC) 10⁻⁸M. La síntesis de DNA en FN es estimulada 30 veces por adición de suero y es inhibida en un 40-50 % por hidrocortisona. FL muestran un estímulo menor (7 veces) y no son inhibidas por HC. Se discute el significado diferencial de la acción hormonal desde el punto de vista de la presencia de receptores específicos para la hormona.

Proyecto financiado por el Depto. de Desarrollo de la Investigación. U. de Chile. B 1328-8112.

CARACTERISTICAS DE LA INHIBICION DE ADENILATO CICLASA DE OOCITO DE ANFIBIO POR PROGESTERONA. (Characteristics of the progesterone inhibition of amphibian oocyte adenylate cyclase). Olate, J., Jordana, X. y Allende, J. Depto. Bioquímica, Fac. de Medicina (División Norte), Universidad de Chile.

Progesterona inhibe en un 50-60% la actividad de adenilato ciclase (AC) presente en membranas de oocitos de estado VI de *Xenopus laevis*. La inhibición de AC requiere las mismas concentraciones de hormona (0.1-1 μ M) que se utilizan en la inducción de la maduración meiótica de estas células. Este efecto de progesterona sobre la actividad AC requiere la presencia de nucleótidos de guanosina y no se observa con la enzima activada ya sea por 5 mM NaF o 5 mM MnCl₂. La progesterona aumenta la concentración de guanil-5'-il-imido-difosfato[Gpp(NH)p]_n necesaria para activar a la AC de membranas de oocitos y este efecto se debe, al menos en parte, a un aumento en la latencia inicial de esta reacción. La AC presente en los oocitos de estados tempranos de la pogenésis (cuya maduración no puede ser inducida por hormona) es inhibida por progesterona en menor grado (25-30%) que la enzima de oocitos de estado VI. Por otro lado la AC de células foliculares del mismo ovario no es afectada por progesterona 10 μ M. Se ha observado también que la AC de oocitos es inhibida en un 60-80% por inhibidores de la acción de la calmodulina. Está en estudio la posible participación de esta proteína en el proceso de maduración.

Financiado por la Fundación Ford, Organización de Estados Americanos, UNDP/Unesco proyecto CHI/81/001 y la Universidad de Chile.

ROL DE SULFATIDOS EN EL MECANISMO ENZIMATICO DEL TRANSPORTE ACTIVO DE Ca⁺⁺ EN GLOBULOS ROJOS (Role of sulphatide in Ca⁺⁺ pump of human red blood cells). Oliva, C. y Zambrano, F. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Es bien conocido que en glóbulos rojos la baja concentración de calcio es mantenida por un mecanismo de transporte activo, cuya energía para la traslocación proviene de la hidrólisis de ATP, proceso que ocurre en el lado interno de la membrana. Sin embargo, aún no ha sido dilucidado el requerimiento lipídico en las actividades enzimáticas involucradas en el transporte activo.

En membranas de glóbulos rojos obtenidas por centrifugación diferencial, después de una hemólisis gradual, se estudió la actividad Ca⁺⁺ATPasa y K⁺ fosfatasa en presencia y ausencia de arilsulfatasa, enzima que hidroliza cerebrósido-3-sulfato (sulfátido) a cerebrósido y sulfato libre.

Se observa que tanto la Ca⁺⁺ATPasa como la K⁺ fosfatasa son inactivadas en un 100% cuando los sulfátidos son hidrolizados en un 60%.

Esto demostraría que sulfátidos están involucrados en el transporte activo de Ca⁺⁺ en glóbulos rojos y al igual que en transporte activo de sodio, el sulfátido constituiría el sitio de unión al K⁺ y la ausencia de éste implicaría que tanto la K⁺ fosfatasa como la hidrólisis del esterofoforilado de la enzima, no cursarían.

TRIPSINA ACTIVA LA FOSFODIESTERASA DE NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS, SENSIBLE A CALMODULINA, DE OVARIO DE XENOPUS LAEVIS. (Trypsin activates the CaM sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Xenopus laevis* ovary). Orellana, O. y Allende, J.E. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina (Div. Norte), Universidad de Chile.

Durante el proceso de maduración meiótica de oocitos de *Xenopus laevis* se produce un aumento rápido y temporal de los niveles de ión calcio (Ca²⁺) libre y una posterior disminución de los niveles de nucleótidos cíclicos. La separación chromatográfica de la actividad fosfodiesterasa (FDE) de un extracto de ovario en columnas de DEAE-cellulosa ha permitido distinguir dos formas enzimáticas; una de ellas (FDE I) hidroliza cAMP y cGMP y es estimulada 6 a 10 veces por calmodulina (CaM) y Ca²⁺; la otra enzima (FDE II) sólo hidroliza cAMP y es insensible a estos efectores.

Se ha observado que la digestión parcial de la FDE I con tripsina provoca un aumento de la actividad basal de la enzima y una pérdida de la capacidad de ser estimulada por CaM y Ca²⁺, al medir la actividad con cAMP y cGMP como sustratos. La presencia de CaM y Ca²⁺ en el medio de incubación protege a la FDE I de la acción de la tripsina.

Estudios de saturación de la enzima con cGMP como sustrato indican que la actividad basal de la reacción enzimática posee una Vmax de 1 nmol/min/mg proteína, en cambio la actividad estimulada por tratamiento con tripsina de la FDE I o incubación con CaM y Ca²⁺ provocan un aumento de la Vmax de la reacción a 15 y 28 nmol/min/mg proteína respectivamente. No se observaron cambios significativos en la Km de la reacción enzimática (2-5 μ M).

El tratamiento de la FDE I con tripsina provoca una disminución del tamaño de la enzima, al analizarlo por filtración en geles de Sephadex.

Estos experimentos sugieren que la FDE I posee una o más regiones reguladoras de la actividad enzimática en su estructura. Financiado por Fundación Ford y Universidad de Chile.

A METHOD FOR PREPARING ANTISERA SPECIFIC FOR THE FOUR HUMAN IgG SUBCLASSES.

I.M. Outschoor, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

Several methods have been described in the literature for the preparation of antisera against the human IgG subclasses in various animal species. Most of these methods have used either myeloma proteins or Staph. Protein A binding fractions as antigens and to date the rabbit has not been considered an ideal animal. In this study, rabbits were immunized with purified human antibodies to microbial polysaccharide. These antibodies were of the IgG2 subclass, mostly kappa light chain type and of defined specificity and allotype, in the hope that the anti-antibodies elicited would be both subclass and donor specific. The antisera obtained however were not only donor specific but with some absorption using purified myeloma proteins, could be rendered both subclass specific and capable of distinguishing light chain types differentially. The method is particularly useful for making potent IgG2 and IgG4 kappa and lambda specific antisera as well as sera that can react with combinations of two or three subclasses in incompletely absorbed preparations. The sera specific for single subclasses were more potent than the commercial subclass specific antisera that are routinely available.

Immunochemical studies also showed them to be more sensitive for the characterization of Ab subpopulations.

FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE FLAVEDO DE NARANJA. (Subcellular fractionation of orange flavedo). Pérez, L.M. (Dep. Bioquímica, Fac. Cs. Básicas y Farm. U. de Chile) y Garrido, J. (Lab. Histología, Inst. Cs. Biológicas, Univ. Católica de Chile).

Se elaboró una metódica de fraccionamiento del flavedo de naranja, con el fin de determinar la ubicación subcelular de las enzimas responsables de la biosíntesis de sesquiterpenos en este tejido.

Un homogenizado del flavedo de naranja se fraccionó mediante centrifugación diferencial a 1085 x g, 4340 x g, 9750 x g y 39100 x g. En cada una de estas cuatro fracciones y en el sobrenadante, se ensayaron las actividades marcadoras de ATPasa-K (memb. plasmática), citocromo oxidasa (mitocondria), NADPH cit.c reductasa (ret. endoplásmico), catalasa (perox. y glicoximomas). Además, cada fracción se observó al microscopio electrónico después de fijar con glutaraldehído y OsO₄, incluir en Epon y teñir con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se aprovechó de caracterizar los distintos tipos de membranas presentes en la fracción que se dimentó a 39100 x g.

Las actividades de C₁₅ preniltransferasa e IPP isomerasa, se encontraron en el sobrenadante de 39100 x g, que corresponde a una fracción soluble.

Proyecto B 1127, Univ. de Chile y Proyecto CHI 81/01 PNUD/UNESCO.

CONTROL HORMONAL DE LA SINTESIS Y PROCESAMIENTO DE DIVERSOS TIPOS DE RNA. EFECTO DE ERITROPOYETINA Y TESTOSTERONA. (Hormonal control of the synthesis and processing of diverse RNA types. Effect of erythropoietin and testosterone). Perretta, M., Chevesich, J., Garrido, F., Garrido, A. y Rojas, P. División de Ciencias Básicas. INTA Universidad de Chile.

Eritropoyetina (Epo) y testosterona (Ta) regulan la síntesis de RNA. Mientras, Epo induce la de RNA m, Ta aumenta la de RNA r. Otros tipos de RNA parecen ser estimulados, también. Se estudió el efecto de ambas hormonas en la síntesis de diferentes especies de RNA de médula ósea de ratas castradas-policitómicas (CP), que presentan concentraciones muy bajas de hormonas circulantes. La síntesis de los RNA se efectuó en núcleos aislados de médula ósea de ratas, tratadas IN VIVO con las hormonas, a alta (FIA) y baja (FIB) fuerza iónica. Los RNAs se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida. Los resultados señalan que Epo induce la formación de RNA 30 S en ratas CP, en cambio, Ta activa la producción de RNA r 26, 18 y 5-6 S y los RNA t 4 S. La acción conjunta de Epo y Ta provoca la aparición de RNAs 9, 22 y 15 S, posibles precursores del 30 S. El estímulo de la síntesis de RNAs 5-6 S por Ta o la acción conjunta de ambas hormonas sugiere que estos RNAs podrían corresponderse con los RNA U (U1 al U6), que como ribonucleoproteínas participan en el procesamiento de pre-RNAs (splicing). Como Ta aumenta la actividad de ribonucleasas nucleares, su participación en este proceso parece muy improbable.

Se postula que Epo induce la síntesis de pre-RNA m 30 S, el cual es procesado por RNP estimuladas por Ta, para dar origen al RNA m funcional 9 S. Financiado por Dep. Des. Inv. U. de Chile. N°B1242 - 8223

TRYPANOSOMA CRUZI. ACTIVIDAD ESTERASA "IN VIVO". (T. cruzi. "In vivo" esterase activity). Repetto, Y., Aldunate, J., Silva, I., Morello, A. Dpto. de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

Trypanosoma cruzi es el parásito causante de la enfermedad de Chagas. Las drogas en uso son poco efectivas, posiblemente debido a sistemas de detoxificación muy activos en el parásito.

T. cruzi, cepa Tulahuen, (epimastigotes) se cultivó en medio líquido. (Diamond's más 5% de suero fetal bovino). La actividad esterasa se midió usando como sustrato el p-nitrofenil acetato. El para-nitrofenol formado se determinó en un espectrofotómetro de doble haz a 420 nm y pH 7.5 ($\Delta\text{A} 0 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1} = 8,33$).

La actividad enzimática fue directamente proporcional al tiempo y al número de T. cruzi por ml de incubación. La velocidad de la reacción aumentó a medida que aumentó la concentración de sustrato, llegando a un máximo a 2 mM. La actividad fue de 2,22 n moles de producto formado por minuto y por ml de incubación a 25°C, pH 7.5 y p-nitrofenil acetato 2,5 mM y T. cruzi $4,3 \times 10^6$ por ml de incubación.

Paraoxon 10⁻⁶M inhibió irreversiblemente la actividad (50% en 30 minutos) indicando que parte de la actividad se debe a esterasas del tipo serina.

Experimentos "in vitro" indicaron que la actividad se encuentra localizada en la fracción microsomal y soluble en aproximadamente la misma proporción.

Los resultados presentados sugieren que las esterasas podrían tener un rol en la resistencia a drogas del parásito.

Financiado por grant 810174 RE de la OMS y B-930-8234 de la Universidad de Chile.

PAPEL DE METALES EN EL MECANISMO DE LA CARBOCICLASA DE CITRUS LIMONUM. (Role of metal ions in the mechanism of carbocyclase from Citrus limonum). Rojas, M.C., Chavet, L. y Cori, O.- Departamento de Bioquímica, Fac. de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

La carbociclasa de flavedo de limón, transforma los pirofosfatos alílicos, neril y geranilpirofosfato (NPP y GPP) en hidrocarburos monoterpenicos cílicos. La reacción requiere un ión metálico bivalente.

Mn²⁺ es el metal más efectivo con ambos sustratos, Mg²⁺ y Co²⁺ presentan menos de un 13% de efectividad. La enzima es inactiva con Zn²⁺, Ni²⁺ y Cu²⁺. Hemos demostrado que GPP forma con Mn²⁺ los complejos de estequiometría GPP-(Mn²⁺)₁ GPP-(Mn²⁺)₂. Los valores de Km para la especie GPP Mn₂ obtenidos variando Mn en presencia de GPP constante y variando este último con exceso de Mn fueron iguales (0,67 y 0,70 μM). Esto indica que GPP-(Mn²⁺)₂ es el sustrato de la enzima y que las concentraciones de GPP-(Mn²⁺)₁ y Mn²⁺ no influyen en la velocidad observada.

De la misma manera se demostró que NPP-(Mg²⁺)₂ y GPP-(Mg²⁺)₂ son los complejos utilizados por la enzima.

El papel del metal en la reacción de la carbociclasa sería el de formar un complejo con el sustrato y de este modo neutralizar las cargas negativas del grupo saliente. Esta interpretación coincide con los datos obtenidos para la solvólisis no enzimática de GPP.

Efecto de Benzopireno(BP) sobre la síntesis de DNA y la DNA polimerasa mitocondrial. (Effect of BP on mitochondrial DNA Synthesis and DNA polymerase).
 I.Salazar, L.Torrago-Litvak, L.Gil y S.Litvak. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad de Chile.

Hemos estudiado el efecto de un agente cancerogénico como el Benzopireno(BP), sobre la síntesis de DNA en mitocondrias aisladas de hígado de ratas normales y tratados con BP, así como los niveles y propiedades de la DNA polimerasa α solubilizada de ambos tipos de organelo. Nuestros resultados muestran que:
 1) Las mitocondrias de animales inyectados con BP tienen menor capacidad para sintetizar DNA que los organelos controles. 2) La actividad DNAPolimerasa α solubilizada de mitocondrias de animales tratados es mucho mayor que la actividad de las mitocondrias controles. 3) La síntesis de DNA en mitocondrias normales es fuertemente inhibida por ddITP, mientras que en mitocondrias tratadas la extensión de esta inhibición es mucho menor. 4) La permeabilidad para ddITP no está afectada en los organelos de los animales tratados.
 5) Aphidicolina no tiene efecto sobre la síntesis de DNA mitocondrial en ambos tipos de animales. 6) Los efectos inhibitorios de ddITP, aphidicolina y bromuro de etidio son muy similares para ambos tipos de polimerasa solubilizada, así como las concentraciones óptimas de Mn y KCl.

Proyecto: B-1407.821.3.

Financiado por SDCACI, Universidad de Chile.

PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD Y PROPIEDADES DE UNA PROTEASA ACIDICA DE HUEVO DE ERIZO DE MAR. (Purification by affinity chromatography and properties of an acidic protease from unfertilized sea urchin egg). Sánchez, L.; Landsberger, E.; Ponce, O. and Enríquez, S. Depto. Biología Molecular, Universidad de Concepción, Chile.

Estudios previos han demostrado la purificación parcial de una actividad proteolítica ácida con características de catepsina D en el huevo no fecundado de erizo de mar.

En esta comunicación se informa sobre la purificación de esta actividad mediante el uso de hemoglobina agarosa y de algunas de sus propiedades.

La actividad parcialmente purificada obtenida por cromatografía en Sephadex G-200, fue recromatografiada en una columna de hemoglobina agarosa. La actividad enzimática se determinó por el método de Anson modificado.

Una fracción de la actividad fue retenida y eluida con aumento de pH y fuerza iónica.

La fracción así purificada presenta un pH óptimo de 3,9; es inhibida por exceso de hemoglobina; presenta una K_m app=5,2 x 10⁻⁶ M y es inhibida totalmente por pepstatin. Con esta actividad se realizaron también estudios de termoestabilidad a 37 y 50 °C.

En conclusión, sólo una parte de la actividad proteolítica ácida parcialmente purificada en Sephadex G-200 es retenida por hemoglobina agarosa y corresponde a una proteasa tipo catepsina D.

AISLACION DE LA CELULAS MESOFILAS Y DE LA VAINA DE ATRIPLEX REPANDA Y CARACTERIZACION DE LOS FOTOSISTEMAS PRESENTES. Isolation of both mesophyll and bundle sheath cells of Atriplex repanda and characterization of the present photosystems).
 Silva, E., Risi, S. y Dose, K. Departamento de Macromoléculas, Facultad de Química, Universidad Católica de Chile (*Universität Mainz, W-Germany).

El Atriplex repanda es un arbusto C-4 chileno utilizado en la reforestación de zonas áridas. Se plantea el estudio de los fotosistemas presentes en esta especie C-4.

Se separaron las células mesófilas de las de la vaina mediante el empleo del sistema enzimático macerózima y celulasa, acompañado de la acción mecánica de un homogeneizador y de un mortero. Las fracciones celulares se aislaron con el uso de tamices de nylon y posterior centrifugación. Los cloroplastos de las células mesófilas poseen un fotosistema II activo el cual a través del fotosistema I sirve para la formación de NADPH. Los cloroplastos de las células de la vaina carecen del fotosistema II, y su fotosistema I está acoplado a la fotofosforilación cíclica.

Los cloroplastos de las células de la vaina muestran una fotofosforilación y un transporte de electrones mayor, cuando las hojas de Atriplex son iluminadas adicionalmente previo a la separación de las células. Esto es una indicación de que las células de la vaina dependen en gran medida de los sustratos provenientes de las células mesófilas.

Nota: E.Silva agradece la colaboración prestada por la Fundación Alexander von Humboldt.

ANALISIS DE LA COMPOSICION QUIMICA DE LA FRACCION I DE LA PARED CELULAR EN CEFAS DE NEUROSPORA CRASSA. (Chemical composition of the fraction I from cell wall of different strains of Neurospora crassa). Silva, M. y Pincheira, G. Departamento de Ramos Básicos, División Ciencias Médicas Oriente, Facultad de Medicina y Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

El propósito de este trabajo es correlacionar la composición química de azúcares del principal constituyente de la fracción I de la pared celular de N. crassa con la morfogénesis del hongo. Para ello se trabaja con simples y dobles mutantes de genes seleccionados, en busca de alguna posible interacción genética a nivel del análisis cualitativo y cuantitativo de los componentes químicos de la fracción I.

El análisis por cromatografía de gases de los derivados de alditoles acetilados que constituyen el heteropolímero muestran glucosa, manosa, y galactosa como principales constituyentes. Los derivados de alditoles acetilados parcialmente metilados evidencian que la fracción I es un glucano 1-3 que presenta manosa lineal y ramificada con galactosa, como azúcar terminal.

Las mutantes muestran un incremento de manosa ramificada 2,6 y de 4-glucosa en desmedro de 3-glucosa, variación que al parecer está correlacionada con la morfología del hongo.

El análisis de las dobles mutantes sugieren posibles efectos de complementación y adición génica, a nivel de la composición química.

Se propone además la existencia de otro polisacárido constituyente de la fracción I de la pared celular de N. crassa.

ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LA REGION INVOLUCRADA EN LA COOPERATIVIDAD HACIA AMP DE LA FRUCTOSA 1,6-BIFOSFATASA (Structural study of the region involved in the AMP-cooperativity of Fructose 1,6-bisphosphatase). Slebe,J.C., Herrera,R., Hubert,E., Peterson,D. y Martínez-Carrón,M.- Instituto Bioquímica, Facultad Ciencias, Universidad Austral de Chile y Virginia Commonwealth University, U.S.A.

Hemos demostrado que la carbamilación de la Fructosa 1,6-bifosfatasa, en presencia de Fructosa 1,6-bifosfato (25 mM), conduce a la obtención de una enzima que aún es sensible al inhibidor AMP ($K_i = 30 \mu M$), pero la cual no muestra interacción entre los sitios del nucleótido ($n_H = 1.0$). La cinética de pérdida de cooperatividad mostró ser de primer orden y fue causada por la modificación de un grupo ϵ -amino de lisina por subunidad (Arch. Biol. Med. Exp. 13, 468 (1980); 14, 200 (1981)).

Se han usado estas condiciones para marcar la proteína con ^{14}C -cianato y, aislar y caracterizar el fragmento involucrado en la cooperatividad de la enzima hacia AMP.

La hidrólisis trópica de la enzima carbamilada rindió un péptido radioactivo que fue purificado mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La composición de aminoácidos de este fragmento muestra que contiene aproximadamente 21 residuos. Su secuencia parcial reveló que la lisina modificada corresponde al amino terminal de este péptido y es el residuo 50 de la Fructosa 1,6-bifosfatasa.

Financiado por D.I. Universidad Austral de Chile, PNUD/UNESCO y NIH.

ENDONUCLEASAS ESPECÍFICAS DE EXTREMO 3' EN OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS. (3' end specific endonucleases in Xenopus laevis oocytes). Solari,A. y Deutscher,M.- Department of Biochemistry, University of Connecticut, Connecticut, U.S.A.

En los organismos eucariontes los genes de tRNA no codifican la secuencia 3' terminal CCA común a todos ellos, de modo que se transcriben precursores de tRNA con largo y secuencias variables en dicho extremo. Existen etapas post-transcripcionales medidas por a) endonucleasa(s) y b) tRNA nucleotidil transferasa capaces de remover las secuencias anormales así como la posterior síntesis del extremo CCA respectivamente.

Como un intento de caracterizar a la(s) nucleasas involucradas en el procesamiento del extremo 3' de los tRNAs, hemos desarrollado un ensayo simple que involucra hidrólisis de un precursor artificial como sería tRNA-C [^{14}C]UC. Utilizando otros ensayos para nucleasas así como fraccionamiento por cromatografía en DEAE cel, hidroxiapatita y AGA 44, hemos podido purificar parcialmente desde ovario de Xenopus laevis una endonucleasa que hidroliza a los tRNAs en su extremo 3'.

Posteriores intentos hechos para estudiar la distribución subcelular de la nucleasa nos indica que en núcleo se encuentran 2 formas de endonucleasa mientras que en citoplasma existen varias actividades principalmente de tipo exonucleasas.

Estudios preliminares sobre la caracterización de las endonucleasas nucleares indican que la especificidad de hidrólisis depende de la presencia de Mg^{2+} .

ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD DNA POLIMERASICA DURANTE LA OGENESIS Y LA MADURACIÓN MEIÓTICA DE OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS. (Studies on DNA polymerase activity during oogenesis and meiotic maturation in Xenopus laevis oocytes). Solari,A., Zourghy,L., Carvalho,P. y Tarragó-Litvak,L.- Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile; IBCN-CNRS, Bordeaux, Francia.

Los oocitos de *Xenopus laevis* poseen sólo dos tipos de DNA polimerasa-DNA dependientes (α y γ). Durante la oogenésis se ha estudiado el perfil cromatográfico de las actividades polimerásicas y se ha observado un aumento importante en la heterogeneidad de la DNA polimerasa α .

La DNA polimerasa α de células animales es un complejo de alto peso molecular que posee una subunidad catalítica y otras proteínas accesorias como la triptofanil-tRNA sintetasa y una proteína capaz de unirse a la diadenosina tetrafosfato, un activador de la síntesis de DNA. En el caso de los oocitos estadio VI la actividad DNA polimerasa α está confinada en el compartimiento nuclear y la triptofanil-tRNA sintetasa en la fracción soluble del citoplasma. Al estudiar el comportamiento cromatográfico de un extracto total de oocitos durante la oogenésis se observa la aparición de un segundo pico coincidiendo con una de las formas de la DNA polimerasa. Algunas evidencias inmunológicas del complejo sintetasa-polimerasa así como las implicaciones fisiológicas de tal complejo serán discutidas.

La maduración meiótica del oocito de *Xenopus laevis* trae como consecuencia la ruptura de la vesícula germinal (núcleo) y la aparición de una capacidad de síntesis de DNA que no existe hasta el estadio VI. Dada la altísima cantidad de DNA polimerasa α en oocitos de estadio VI es muy posible que esta activación de la síntesis de DNA sea mediada por un factor diferente a la DNA polimerasa α . En nuestro laboratorio hemos puesto en evidencia un factor proteico capaz de estimular la DNA polimerasa α in vitro. Este factor se encuentra a bajo nivel en oocitos de estadios V y VI pero su nivel se encuentra muy aumentado por efecto de las hormonas progesterona y HCG. Las propiedades de este activador serán descritas y discutidas.

Este trabajo ha sido financiado por la Universidad de Chile (Proyecto B-1444-8213), por el Institut National de la Santé et Recherche Médicale (Francia) y por el C.N.R.S. (Francia).

PRESENCIA DE UNA PROTEÍNA SIMILAR A CALMODULINA EN PROCARIOTOS (Presence of a calmodulin-like protein in prokaryotes). Toledo,H. y Jerez,C.A.- Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Div. Ciencias Med. Norte, Universidad de Chile.

Calmodulina es una proteína metilada que une Ca^{2+} y que desempeña un importante papel en la regulación de diversos procesos en la célula eucariote. Estudiando la metilación de proteínas en bacterias, encontramos una proteína con propiedades similares a calmodulina.

La proteína se purificó parcialmente a partir de *Escherichia coli* D-10(RNAseI⁻,met⁻,rel A) mediante electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida y cromatografía de exclusión. Su metilación *in vivo* se determinó después de someter las bacterias a la presencia de H^3 -metyl-metionina y cloramfenicol por un corto período.

Encontramos que la proteína en estudio es metilada posee un peso molecular de 17,000 y co-migra con calmodulina de cerebro en geles de poliacrilamida. La proteína era además altamente ácida (pH 4) y termoestable (5min en baño hirviendo). Experimentos preliminares mostraron que la proteína parcialmente purificada tiene actividad estimuladora de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de cerebro en presencia de calcio. Por otro lado, detectamos también la presencia de proteínas ácidas debajo P.M. y termoestables en varias especies de bacterias.

Nuestros resultados sugieren la existencia de un modulador enzimático tipo calmodulina en procariotas.

Financiado por Univ. de Chile. Proyecto B.1065.8234

MODIFICACION QUIMICA DE ARGININAS ESENCIALES EN LA FOSFOMEVALONATO QUINASA DE HIGADO DE CERDO. (Chemical modification of essential arginines in pig liver phosphomevalonate kinase). Vergara, M[‡], Alvear, M[‡], Cardemil, E[#], Jabalquinto, A.[#] y Eyzaguirre, J.^{*} Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica de Chile* y Facultad de Medicina, Universidad de Chile.[†]

La fosfomevalonato quinasa, cataliza la transferencia de fosfato del ATP al fosfomevalonato con formación de pirofosfomevalonato y ADP. Dicha enzima, monómero de PM 20.000, posee un grupo sulfhidrilo esencial.

Utilizando una preparación parcialmente purificada, se ha estudiado la participación de residuos de arginina en el sitio activo mediante butanodiona y fenilgioxal.

Ambos reactivos inactivan la enzima con una cinética compleja, sugiriendo así que reaccionan con más de una arginina, directa o indirectamente asociadas al sitio activo. Ambos sustratos, fosfomevalonato y ATP-Mg²⁺, protegen de la inactivación, aunque en distinto grado. Frente a butanodiona, el ATP-Mg²⁺ es capaz de proteger en forma total, mientras que el MVAP lo hace parcialmente. La inactivación por fenilgioxal es protegida parcialmente por ambos sustratos en las condiciones empleadas. Con fenilgioxal, la cinética de inactivación es irreversible, mientras que el mecanismo cinético seguido por butanodiona es reversible.

En conclusión, la fosfomevalonato quinasa utilizados o más residuos de arginina en su sitio activo, uno de los cuales está asociado al sitio de unión del ATP-Mg y otro residuo estaría posiblemente vecino al sitio de unión del MVAP.

Proyecto DIUC 69/81.

CONDICIONES QUE AFECTAN LA RUPTURA DEL DNA POR LA ENDONUCLEADA TthI EN SITIOS MODIFICADOS POR LA METILASA dam. (Conditions affecting DNA cleavage by TthI at a TthI endonuclease-dam methylase overlapping sequence). Vicuña, R., Vásquez, C., Yudelevich, A. y Venegas, A.-Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica de Chile.

Previamente nos hemos referido a la purificación y algunas propiedades de la endonucleasa de restricción TthI, presente en la cepa bacteriana termofílica Thermus thermophilus HB8. La secuencia que reconoce esta enzima es TCGA. El análisis de los productos de digestión obtenidos con diversos DNAs, reveló que en algunos casos la enzima TthI corta esta secuencia en forma muy inefficiente.

Con el fin de hacer estos sitios más sensibles a la acción enzimática, se realizaron digestiones en diversas condiciones, observándose que la ruptura del DNA aumenta cuando se usan concentraciones altas de enzima y también a pH alcalino. Defeciones de secuencias cercanas a estos sitios demostraron no tener ninguna influencia en la velocidad de corte.

Debido a que sólo DNAs provenientes de Escherichia coli muestran esta propiedad, pensamos en algún tipo de modificación química específica. E. coli posee una metilasa de DNA constitutiva llamada dam, la que metila adenina en la secuencia GATC. Una revisión de las secuencias inmediatamente vecinas a los sitios refractarios a la digestión, mostró que la inhibición del corte se produce sólo cuando se sobreponen las secuencias de reconocimiento de la metilasa dam y la endonucleasa TthI, esto es en la secuencia TCGATC. Esto fue corroborado preparando DNA de cepas de E. coli con genotipo dam⁻, el que es digerido completamente en condiciones normales.

Los resúmenes de las páginas R-63 a R-71 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.