



**XXIV REUNION ANUAL  
SOCIEDAD DE BIOQUIMICA  
Y BIOLOGIA MOLECULAR DE  
CHILE**

**24-27 de Septiembre de 2001  
Termas de Chillán  
CHILE**

XXIV REUNION ANUAL  
DE LA  
SOCIEDAD DE BIOQUIMICA  
Y BIOLOGIA MOLECULAR  
DE CHILE

24-27 de Septiembre de 2001

*Termas de Chillán, CHILE*

**DIRECTORIO:**

<b>PRESIDENTA</b>	: Pilar Carvallo de S. Q.
<b>PRESIDENTE ANTERIOR</b>	: Juan Carlos Slebe T.
<b>VICE PRESIDENTA</b>	: Luz María Perez R.
<b>SECRETARIA</b>	: Jenny Fiedler T.
<b>TESORERA</b>	: Victoria Guixé L.
<b>DIRECTORES</b>	
Santiago	: Xavier Jordana de B. Claudio Vasquez G.
Concepción	: María Imschenetzky P.
Valdivia	: Alejandro Reyes P.

## AUSPICIADORES

### *Instituciones*

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
*Escuela de graduados, Facultad de Ciencias*  
*Dirección de Investigación*

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE  
CHILE  
*Dirección de Investigación, DIPUC.*

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

FONDAP Biomedicina

Instituto MILENIO  
Biología Fundamental y Aplicada

Fundación para la Biología Celular

PABMB

### *Empresas*

Analítica Weisser

BIOS CHILE I.G.S.A.

Fermelo SA.

GeneSys

Merck Química Chile, Sociedad Ltda.

Perkin Elmer Chile Ltda.

TCL Ltda.

W. Reichmann y Cía Ltda.

## AUSPICIADORES

### *Instituciones*

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
*Escuela de graduados, Facultad de Ciencias*  
*Dirección de Investigación*

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE  
CHILE  
*Dirección de Investigación, DIPUC.*

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

FONDAP Biomedicina

Instituto MILENIO  
Biología Fundamental y Aplicada

Fundación para la Biología Celular

PABMB

### *Empresas*

Analítica Weisser

BIOS CHILE I.G.S.A.

Fermelo SA.

GeneSys

Merck Química Chile, Sociedad Ltda.

Perkin Elmer Chile Ltda.

TCL Ltda.

W. Reichmann y Cía Ltda.



**LUNES 24 SEPTIEMBRE**

10:30-13:00 INSCRIPCIÓN

15:00-15:15 INAUGURACIÓN

15:30-17:00 CONFERENCIA INAUGURAL

Salón Pirigallo

**SIGNAL TRANSDUCTION FROM THE MEMBRANE TO THE NUCLEUS: NOVEL MOLECULAR MECHANISMS**

J. Silvio Gutkind, Oral and Pharyngeal Cancer Branch, NIDCR, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA.

17:00-17:30 Café

17:30-19:30 SIMPOSIO I

Salón Pirigallo

**ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y EVOLUCIÓN DE PROTEÍNAS**

*Coordinador: Dr. Emilio Cardemil*

**LA ACETIL XILANO ESTERASA II DE *Penicillium purpurogenum*: ESTRUCTURA DE UNA PROTEÍNA OBTENIDA A UNA RESOLUCIÓN MENOR A 1 ÅNGSTRÖM.** Eyzaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

**MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRÚVICA.** Cardemil, E., Jabalquinto, AM., González-Nilo, F.D. y Bazaes, S. Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile y Departamento de Química, UMCE, Santiago.

**MECANISMO DE RENATURACIÓN *in vitro* DE TUBULINA.** Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

**Conferencia Severo Ochoa:**

**ANÁLISIS EVOLUTIVO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN PROTEÍNAS REDOX FOTOSINTÉTICAS** (Evolutionary analysis of the structure-function relationships in photosynthetic redox proteins) De la Rosa, M.A., Hervás, M., Navarro, J.A., Díaz-Quintana, A., De la Cerda, B., Molina-Heredia, F.P., Balme, A., Murdoch, S.P., Lange, C., Díaz-Moreno, I. Y Durán, R. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla y Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

19:45-20:45 SESIÓN DIAPOSITIVAS I-II

**SESIÓN DIAPOSITIVAS I: EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN SISTEMAS VEGETALES**

Salón: Pirigallo

Presidente: Dra. Luz María Pérez

Secretario: Dr. Xavier Jordana

19:45 I.1 **EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA NPR1 EN LA ACTIVACIÓN TEMPRANA DE GENES INDUCIDA POR ÁCIDO SALICÍLICO EN *Arabidopsis thaliana*.** (Evaluation of the NPR1 protein participation in early activation of genes induced by salicylic acid in *Arabidopsis thaliana*). Uquillas C., Blanco F., Letelier I., Holuigue, L. Dpto. Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

20:00 I.2 **PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNA-G EN LA RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD DE *Citrus limon* FRENTE A *Alternaria alternata*.** (Participation of G-protein in the hypersensitive response of *Citrus limon* against *Alternaria alternata*). Ortega, X<sup>1,2</sup>, Velásquez, JC<sup>1</sup>, Pérez, LM<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Lab. Bioquímica, Fac. Cs. Salud, Universidad Andrés Bello, <sup>2</sup>Universidad de Chile.

20:15 I.3 **FACTORES VIRALES QUE INDUCEN RESPUESTA TIPO-HR EN TABACOS SENSIBLES INFECTADOS POR TMV-Cg.** (Viral factors induce an HR-like response in sensitive tobacco infected with TMV-Cg) **Ehrenfeld, N.**, Stange, C., Medina, C., Cañón, P., Espinoza, C. y Arce-Johnson, P. Dpto. Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

20:30 I.4 **INDUCCIÓN DE UNA DESHIDRINA EN *D. antarctica* Desv. DURANTE LA ACLIMATACIÓN AL FRÍO** (Induction of a dehydrin in *D. antarctica* during cold acclimation). **Olave, N.**, Ruiz, S., Estay, A., Bravo, L.A. y Corcuera, L.J. Departamento de Botánica, Universidad de Concepción. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología. Universidad de Talca.

**SESIÓN DIAPOSITIVAS II: ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS I**

**Salón: Nevado**

**Presidente: Dr. Juan Olate**

**Secretario: Dr. Juan Carlos Slebe**

19:45 II.1 **ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LA CISTEÍNA SINTETASA (CysK) DE *Bacillus stearothermophilus* V** (structural studies about the cysteine synthase (CysK) of *Bacillus stearothermophilus* V). **Saavedra, C.**, Encinas, M.V., Araya, M., González, D. y Vásquez, C., Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

20:00 II.2 **ROL DEL ASP-153 EN LA ACCION CATALÍTICA DE LA AGMATINASA DE *Escherichia coli*: MODIFICACION QUÍMICA, MUTAGÉNESIS SITIO-DIRIGIDA Y MODELAJE MOLECULAR** (Role of Asp-153 in catalysis by *Escherichia coli* agmatinase: Chemical modification, site-directed mutagenesis and homology modelling) **Salas, M.**<sup>1</sup>, Rodríguez, R.<sup>2</sup>, Uribe, E.<sup>1</sup>, López, V.<sup>1</sup>, López, N.<sup>2</sup>, Orellana, M.<sup>1</sup>, Pérez, E.<sup>3</sup>, Carvajal, N.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. <sup>2</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba. <sup>3</sup>Laboratorio de Bioquímica, Universidad de Valencia, España.

20:15 II.3 **IDENTIFICACION DE SUBTIPOS DE ADENILIL CICLASA EN OOCITOS DE *Xenopus laevis*.** (Identification of subtypes of adenylyl cyclase in *Xenopus laevis* oocytes). **Guzmán, L.**, Romo, X., Brito, M., Soto, X., Hinrichs, M.V y Olate, J. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción. Patrocinio: Juan Olate

20:30 II.4 **LA MUTACIÓN S<sup>96</sup>N EN EL DOMINIO HÉLICE DE LA PROTEÍNA *Gas* HUMANA AFECTA EL INTERCAMBIO BASAL GDP/GTP.** (The S<sup>96</sup>N Mutation in the Helical Domain of Human *Gas* Affects Its GDP/GTP Exchange Rate). **Brito, M.**, Soto, X., Guzman, L., Romo, X., Hinrichs, M.V y Olate, J. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción. Patrocinio: Juan Olate.

21.00 **COCKTAIL Y CENA**

**MARTES 25 SEPTIEMBRE**

9:00-11:00 **SIMPOSIO II**

**Salón Pirigallo**

**TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES**

**Coordinador: Dr. Juan Olate**

**SIGNALLING DURING EGG ACTIVATION AT FERTILIZATION.** **Jaffe L.A.**. Department of Physiology, University of Connecticut, Health Center, Farmington, CT 06032 Connecticut, USA.

**THE ROLE OF SRC FAMILY KINASES IN EGG ACTIVATION AT FERTILIZATION.** **Foltz, K.** Department of Molecular, Cell and Developmental Biology, University of California, Santa Barbara, California, USA.

**CELL CYCLE ARREST OF UNFERTILIZED MATURE EGGS: META II-CSF OR G1-CSF.** **Kishimoto T. and Tachibana K.** Laboratory of Cell and Developmental Biology, Tokyo Institute of Technology, Nagatsuta, Midoriku, Yokohama, 226-8501, Japan.

**FERTILIZATION BLOCKS APOPTOSIS OF STARFISH EGGS BY INACTIVATION OF THE MAP KINASE PATHWAY.** Sasaki K. and Chiba K. Department of Biology, Ochanomuzi University, 2-1-1, Bunkyo-ku, 112-8610, Tokyo, Japan.

11:00-11:30 Café

11:30-13:00 CONFERENCIA PABMB

Salón Pirigallo

**ALFA-HIDROXIÁCIDO DEHIDROGENASAS Y METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS EN LOS TRYPANOSOMÁTIDOS.** Cazzulo. J.J., Universidad Nacional del General San Martín, Buenos Aires, Argentina.

13:00-14:30 Almuerzo

14:30-17:00 SESIÓN DIAPOSITIVAS III y IV

**SESIÓN DIAPOSITIVAS III: REGULACIÓN GÉNICA**

Salón: Pirigallo

Presidente: Dra. Jenny L. Fiedler

Secretaria: Dra. Paulina Bull

- 14:30 **III.1 MODELO DE INTERACCIÓN ENTRE EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN RUNX2/PEBP2 $\alpha$ /CBFA1 Y EL DOMINIO DE TRANSACTIVACIÓN MH2 DE SMAD-2** (Interaction model between transcription factor RUNX2/PEBP2 $\alpha$ /CBFA1 and MH2 transactivation domain of Smad-2) Villagra, A., Bunster, M. y Martínez-Oyanedel, J. Laboratorio de Biofísica Molecular, Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción.
- 14:45 **III.2 MAPEO DE LOS DOMINIOS FUNCIONALES DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NURR1.** (Functional domain mapping of the transcription factor Nurr1). Galleguillos, D., Andrés, M.E.. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 15:00 **III.3 PARTICIPACIÓN DE P300 EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DE OSTEOCALCINA DE RATA.** (Involvement of p300 in the regulation of the transcriptional activity in the rat osteocalcin promoter). Sierra, J.; Villagra, A.; Arenas, F.; Puchi, M.; Imschenetzky, M. y Montecino, M. Dpto. Biología Molecular, Universidad de Concepción.
- 15:15 **III.4 REMODELACIÓN NUCLEOSOMAL EN EL PROMOTOR PROXIMAL DEL GEN DE OSTEOCALCINA DE RATA MEDIADA POR COMPLEJOS SWI/SNF.** (Nucleosome remodelling at the rat osteocalcin gene proximal promoter mediated by SWI/SNF complexes). Gutiérrez, J., Imschenetzky, M., Montecino, M. Dpto. Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- 15:30 **III.5 EL RECEPTOR DE VITAMINA D3 INTERACCIONA DIRECTAMENTE CON EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Runx/Cbfa FORMANDO UN COMPLEJO QUE SE UNE AL PROMOTOR DISTAL DE OSTEOCALCINA DE RATA.** (The Vitamin D3 Receptor interacts directly with the transcription factor Runx/Cbfa and forms a complex that binds to the distal rat osteocalcin gene promoter). Paredes, R., Gutiérrez, L., Imschenetsky, M. y Montecino, M. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- 15:45 **III.6 LA EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD NR1 DE LOS RECEPTORES PARA GLUTAMATO TIPO NMDA ES REGULADA DIFERENCIALMENTE POR AGONISTAS GLUTAMATÉRGICOS EN CULTIVOS MESENCÉFÁLICOS.** (The expression of NMDA glutamate receptor subunit 1 is regulated by glutamatergic agonists in mesencephalic cultures). Campusano, J., Tapia-Arancibia, L. Andrés, M. y Bustos, G. Laboratorio Farmacología-Bioquímica, Facultad Ciencias Biológicas, P.Universidad Católica de Chile y Laboratoire de Plasticité Cérébrale, Université de Montpellier II, Francia.

- 16:00 III.7 **CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE ARNm DE FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DE CEREBRO (BDNF) EN SUBSTANTIA NIGRA EN ETAPAS TEMPRANAS DE UN MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON EN RATA.** (Changes in the expression of BDNF mRNA in substantia nigra of a rat model of early Parkinson's disease.) **Bustos V.**, Campusano J., Vecchiola A., Abarca J., Bustos G. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Ciencias Biológicas. Laboratorio de Farmacología-Bioquímica. (Patrocinio por Xavier Jordana).
- 16:15 III.8 **EFEECTO DE LA ADRENALECTOMÍA SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE GENES RELACIONADOS A LA APOPTOSIS EN REGIONES ESPECÍFICAS DEL HIPOCAMPO DE RATA.** (Effect of adrenalectomy in mRNA levels of apoptotic related-genes in specific areas of the hippocampus). **Cárdenas SP**, Bravo JA, Morales P, Lara HE y Fiedler JL. Lab. de Neurobioquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
- 16:30 III.9 **ESTIRAMIENTO MECÁNICO Y ANGIOTENSINA II: MODULADORES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL IGF-I EN CARDIOMIOCITOS NEONATOS *IN VITRO*** (Mechanical strain and angiotensin II: modulators of IGF-I gene expression in neonatal cardiomyocytes *in vitro*). **Salinas M**, González-Jara, F & Meléndez J., Dep. Bioq. y Biol. Mol., Fac. Cs. Qcas. y Farmacéuticas., U. de Chile.
- 16:45 III.10 **EXPRESIÓN DE UROCORTINA EN CEREBRO DEL RATÓN.** (Urocortin expression in the mouse brain) **Haeger, P**, Gysling K., Forray M.I., Daza C, Rojas R. Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. (Patrocinio María Estela Andrés)

**SESIÓN DIAPOSITIVAS IV: BIOMEDICINA**

Salón: Nevado

Presidente: Dra. Pilar Carvallo

Secretaria: Dra. Amalia Sapag

- 14:30 IV.1 **EFEECTO DE FOTOSENSIBILIZADORES FLAVÍNICOS HIDROFÓBICOS SOBRE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS EN CULTIVO.** (Effect of hydrophobic flavinic photosensitizers on human tumoral cell in culture) **Edwards,A.M.\***, Pacheco,A.\*, Chacón,M.\*, Zuñiga,S.\* Deloannes,A.E.\*\*, Becker,M.I.\*\* \*Laboratorio de Química Biológica, Facultad de Química, P.Universidad Católica de Chile. \*\*Biosonda Biotecnología S.A.
- 14:45 IV.2 **ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN BRCA2 EN FAMILIAS CHILENAS CON CÁNCER DE MAMA** (Molecular genetic analysis of the BRCA2 gene in Chilean families with breast cancer). <sup>1</sup>**Palma L.**, <sup>1</sup>Gallardo, M., <sup>1</sup>Egaña, L., <sup>2</sup>Paredes, H., <sup>3</sup>Rodríguez, M., <sup>4</sup>Rousseau, C., <sup>4</sup>King, M-C, <sup>1</sup>Carvallo, P. <sup>1</sup>Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile, <sup>2</sup> Instituto Nacional del Cáncer, <sup>3</sup> Hospital Barros Luco, <sup>4</sup> University of Washington, Seattle, USA
- 15:00 IV.3 **ALTERACIÓN DE LAMININA EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE PACIENTES CON PARAPARESIA ESPÁSTICA ASOCIADA AL HTLV-I.** (Laminin alteration in the cerebrospinal fluid of patients with Spastic Paraparesis associated to HTLV-I). **García<sup>1</sup> L.**, Collados<sup>1</sup> L, Vásquez<sup>1</sup> F, Kettlun<sup>1</sup> AM, Cartier<sup>2</sup> L. y Valenzuela<sup>1</sup> M.A. (1) Depto Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Cs Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile, (2) Depto Cs Neurológicas, Fac. Medicina, U. de Chile.
- 15:15 IV.4 **COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD METALOPROTEINÁSICA Y SUS PROTEÍNAS INHIBIDORAS EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE PACIENTES CON PARAPESIA ESPÁSTICA TROPICAL Y CREUTZFELD-JACOB** (Comparison of metalloproteinase activity and their inhibitory proteins in cerebrospinal fluid of patients with Tropical Spastic Paraparesis and Creutzfeld-Jacob). **Kettlun<sup>1</sup> AM**. Collados, L; García L1., Vásquez<sup>1</sup> F, Cartier L y Valenzuela M.A.(1). Depto Bioquímica y Biología Molecular, Fac, Ciencias Químicas y Farmacéuticas, U. De Chile, (2) Depto Ciencias Neurológicas, Fac. Medicina. U. de Chile.

- 15:30 IV.5 **FORMACIÓN DE TRIPLE HÉLICE ENTRE EL GEN DE LA DESHIDROGENASA ALDEHÍDICA MITOCONDRIAL (ALDH2) DE RATA Y OLIGONUCLEÓTIDOS DE DNA y RNA: PROYECCIONES PARA TERAPIA GÉNICA DEL ALCOHOLISMO.** (Triple helix formation between the rat mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene and oligonucleotides.) Encina G, Sapag A, Torres V, Moncada C, Israel Y. Laboratorio de Farmacoterapia Génica, Fac de Cs. Químicas y Farmacéuticas e Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología. Universidad de Chile.
- 15:45 IV.6 **INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA DESHIDROGENASA ALDEHÍDICA MITOCONDRIAL (ALDH2) DE RATA MEDIANTE OLIGONUCLEÓTIDOS FOSFOROTIOATOS (S-ODNs) DE ANTISENIDO.** (Inhibition of the rat mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene expression by antisense phosphorothioate oligonucleotides.) Lladser A, Sapag A, Moncada C, Israel Y. Laboratorio de Farmacoterapia Génica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas e Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología. Universidad de Chile.
- 16:00 IV.7 **SEROLOGÍA DEL VIRUS HANTA: ESTUDIOS DE EPITOPOS VIRALES MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y SUEROS DE PACIENTES** (Serology of hantavirus: Studies of viral epitopes using monoclonal antibodies and patient sera). Tischler, N., Roseblatt, M., Jamett, A., Galeno H. y Valenzuela, P. Fundación Ciencia para la Vida, Instituto de Salud Pública de Chile e Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada.
- 16:15 IV.8 **EL DOMINIO CARBOXILO TERMINAL DE LA PROTEÍNA VacA DE *Helicobacter pylori* ES AUTOSUFICIENTE PARA SU EXPORTACION A MEMBRANA EXTERNA EN *E. coli*.** (The C-terminus domain of *H. pylori* VacA is self-sufficient for its exportation to the outer membrane in *E. coli*). Martínez, P., Díaz, M.I., Tobar, J., Bruce, E., y Venegas, A. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 16:30 IV.9 **EL GEN *cagA* DE *Helicobacter pylori* EN CEPAS CHILENAS NO PRESENTA VARIACIONES DRÁSTICAS DE TAMAÑO EN LA REGIÓN HIDROFÍLICA (A17) NI EN SUS REGIONES ALEDAÑAS** (The *Helicobacter pylori cagA* gene does not show drastic size variations at the hydrophilic central region neither at the adjacent regions). Palacios<sup>1</sup>, J.L., Valdivia<sup>1</sup>, A., Harris<sup>2</sup>, P. Bruce<sup>1</sup>, E. y Venegas<sup>1</sup>, A. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago. <sup>1</sup>Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas. <sup>2</sup>Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

17:00-17:30 **Café**

17:30-19:30 **SESIÓN DIAPOSITIVAS V y VI**

**SESIÓN DIAPOSITIVAS V: INCORPORACIONES Y MISCELÁNEOS**

Salón: Pirigallo

Presidente: Dr. Luis Burzio

Secretaria: Dra. Virginia Fernández

**TRABAJO DE INCORPORACION**

- 17:30 V.1 **16S rRNA EXTRAMITOCONDRIAL: UNA NUEVA MOLÉCULA RELACIONADA CON PROLIFERACIÓN CELULAR** (Extramitochondrial 16S rRNA: A novel molecule related to cell proliferation). Villegas, J., Muller, I., Burzio, L.O. Fundación Ciencia Para la Vida, Millenium Institute for Fundamental and Applied Biology (MIFAB) y Bioschile Ingeniería Genética S.A.

**TRABAJO DE INCORPORACION**

- 18:00 V.2 **ELEMENTOS INVOLUCRADOS EN LA INDUCCIÓN POR ESTRÉS DEL GEN HSP70 DE TILAPIA (*O. mossambicus*)** (Elements involved in stress induction of the tilapia (*O. mossambicus*) HSP70 gene.) Molina A., Martial J.A\*, Muller M\*. Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias de la Salud, Univ. Andrés Bello e Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada. \* Lab. de Biol. Mol. et Génie Génétique, Université de Liège, Bélgica.
- 18:30 V.3 **FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA CK1 EN LA FORMACIÓN DEL CARTÍLAGO DE LA MANDÍBULA DEL PEZ CEBRA (*Danio rerio*).** (Function of the CK1 protein kinase in cartilage jaw formation). Antonelli, M<sup>1</sup>, Valenzuela, P<sup>1</sup>, Pino, L<sup>1</sup>, Allende, M<sup>2</sup>, Hopkins, N<sup>3</sup>. Programa de Biología celular y Molecular. ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile<sup>1</sup>, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile<sup>2</sup> y Center Cancer Research, MIT<sup>3</sup>.

- 18:45 V.4 **EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO INDUCIDO POR LINDANO SOBRE LOS NIVELES SÉRICOS DE TNF- $\alpha$  EN RATAS** (Effect of liver oxidative stress induced by lindane on serum TNF- $\alpha$  levels in the rat)  
**Cornejo P, Fernández V, Videla L.A, Santander M P, Tapia G.** Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- 19:00 V.5 **EL ESTRÉS OXIDATIVO REPRESENTADO POR LIPOPROTEÍNAS OXIDADAS INDUCE APOPTOSIS EN LINFOCITOS EN REPOSO: PARTICIPACIÓN DE LAS CASCADAS DE MAP QUINASAS** (Oxidized low density lipoproteins induce apoptosis in resting human lymphocytes: involvement of mitogen-activated protein kinases). **<sup>1</sup>Bustamante, M. E., <sup>1</sup>Díaz, F., <sup>1</sup>Pincheira, S., <sup>2</sup>Gross, H-J., <sup>2</sup>Grünert, A., <sup>2</sup>Bachem, M., <sup>1</sup>González, M., <sup>1,4</sup>Ibañez, P., <sup>1,4</sup>Escobar, C., <sup>4</sup>Maulén, N. & <sup>4</sup>Vera, J. C.** <sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Católica de la Santísima Concepción. <sup>2</sup>Instituto de Química Clínica, Universidad de Ulm, Alemania, <sup>3</sup>Departamento de Química Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, <sup>4</sup>Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- 19:15 V.6 **EVIDENCIAS DE ADAPTACIÓN CROMÁTICA EN EL FICOBILISOMA DE *Gracilaria chilensis*** (Evidence of chromatic adaptation in phycobilisomes from *Gracilaria chilensis*) **Bruna, C., Martínez-Oyanedel, J. y Bunster, M.** Laboratorio de Biofísica Molecular. Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

**SESIÓN DIAPOSITIVAS VI: TRANSPORTADORES**

Salón: Nevado

Presidente: Dr. Juan Carlos Vera

Secretario: Dr. Alejandro Reyes

- 17:30 ✓ VI.1 **INTERACCIÓN DIFERENCIAL DE INHIBIDORES DE TIROSINAS QUINASAS CON SITIOS DE UNIÓN ENDO- Y EXOFACIALES DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT1** (Differential interaction of tyrosine kinase inhibitors with endo- and exofacial binding sites of GLUT1). **Reyes, A. M., Andrade, C., Monsalve, R. y Liévenes, A.** Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- 17:45 VI.2 **CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO SVCT2 EN CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO** (Characterization of the ascorbic acid transporter SVCT2 in human melanoma cells). **Godoy, A. S., Montecinos, VP y Vera, JC.** Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- 18:00 VI.3 **EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE MICROVASCULATURA CEREBRAL.** (Glucose transporter expression and function in brain microvascular endothelial cells). **Azócar, L., Vásquez, O., Montecinos, V., Guzmán, C., Vera, J.C., Cárcamo, J.G.** Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- 18:15 VI.4 **PENTOXIFILINA BLOQUEA COMPETITIVAMENTE AL TRANSPORTADOR FACILITATIVO DE HEXOSAS GLUT1 EN ERITROCITOS HUMANOS** (Pentoxifylline competitively blocks the facilitative hexose transporter GLUT1 in human erythrocytes). **Castro, M., Vera, J.C.<sup>1</sup> y Reyes, A.M.** Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia y <sup>1</sup>Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- 18:30 VI.5 **EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DIFERENCIAL DE TRANSPORTADORES DE VITAMINA C EN CÉLULAS INTESTINALES HUMANAS CaCo-2.** (Differential expression and regulation of vitamin C transporters in human intestinal cells CaCo-2). **<sup>1</sup>Henríquez, E.A., <sup>1</sup>Kempe, S.S., <sup>2</sup>Bustamante, M.E., <sup>1</sup>Vera, J.C., y <sup>2</sup>Maulén, N.P.** <sup>1</sup>Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, y <sup>2</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Católica de la Santísima Concepción.
- 18:45 VI.6 **UNIÓN ESPECÍFICA DE PEROXIDASA A LA PROTEÍNA QUE UNE ÁCIDOS GRASOS (I-FABP) EN MEMBRANAS APICALES DE ENTEROCITOS DEL PEZ *Cyprinus carpio*.** (Specific binding of peroxidase to intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) in apical membranes of *Cyprinus carpio* enterocytes). **Santander, C., Concha, M.I., Villanueva, J y Amthauer, R.** Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

19:00 VI.7 PAPEL ESENCIAL DEL TRIPÉPTIDO GLUTATIÓN EN LA ACUMULACIÓN DE VITAMINA C EN CÉLULAS INTESTINALES HUMANAS CaCo-2 (2001). (Vitamin C accumulation in human CaCo-2 cells is critically dependent on glutathione). **Kempe, S.S.**, <sup>1</sup>Henríquez, E.A., <sup>1</sup>Vera, J.C., y <sup>2</sup>Maulén, N.P. <sup>1</sup>Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, y <sup>2</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Católica de la Santísima Concepción.

19.15 VI.8 GENES INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS Y EXCRECIÓN DE GLUTATIÓN ESTÁN COORDINADAMENTE REGULADOS EN EL HÍGADO DE RATÓN. (Genes involved in glutathione synthesis and excretion are coordinately regulated in the mouse liver). **Rocco, C.**, Wielandt, A.M., Vollrath, V. y Chianale, J. Departamento de Gastroenterología. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Patrocinio: P.Carvallo

19:45-20:45 CONFERENCIA

Salón Pirigallo

NUCLEAR ENVELOPE BREAKDOWN.

**Terasaky, M.** Department of Physiology, University of Connecticut Health Center, Farmington, CT 06032, USA.

MIÉRCOLES 26 SEPTIEMBRE

13:00-14:30 Almuerzo

14:30-17:00 SESIÓN DIAPOSITIVAS VII Y VIII

SESIÓN DIAPOSITIVAS VII: BIOLOGÍA MOLECULAR

Salón Pirigallo

Presidente: Dr. Claudio Vásquez

Secretario: Dr. Martín Montecino

14:30 VII.1 LA SECUENCIA COMPLETA DEL GENOMA MITOCONDRIAL DEL SALMÓN CHINOOK *Oncorhynchus tshawytscha*. (The complete sequence of the mitochondrial genome of the chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*). **Wilhelm, V.**, Bernal, B., Villegas, J., Miquel, A., Martínez, R., Engel, E., Burzio, L.O. y Valenzuela, P. Fundación Ciencia para la Vida e Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada.

14:45 VII.2 RNA QUIMÉRICO MITOCONDRIAL EN HUMANOS (Human Chimeric Mitochondrial RNA) **Villota C.**, Villegas J., Martínez R., Müller I. y Burzio L. O. Fundación Ciencia para la Vida, Millenium Institute for Fundamental and Applied Biology (MIFAB) y Bios Chile Ingeniería Genética S.A.

15:00 VII.3 ELEMENTOS CIS DE RECONOCIMIENTO DE LOS SITIOS DE EDICIÓN EN RNAs MITOCONDRIALES DE PLANTAS (*cis*-recognition elements in plant mitochondria RNA editing). **León, G<sup>1</sup>.**, Farré, J-C.<sup>2</sup>, Jordana, X.<sup>1</sup> y Araya, A.<sup>2</sup> (1) Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. (2) Laboratoire de Réplication et Expression des Gènes Eucaryotes et Rétroviraux. CNRS et Université Victor Segalen-Bordeaux II, France.

15:15 VII.4 CARACTERIZACIÓN DE GENES NUCLEOLARES EN *C. carpio*. (Characterization of *C. carpio* nucleolar genes). **Quezada, C.**, Alvarez, M., Molina, A., Pinto, R., Navarro, C., Vera, Ml. Laboratorio Biología Celular y Molecular, Universidad Andrés Bello e Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada.

15:30 VII.5 CLONAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL COPEPTIN ASOCIADO AL PRECURSOR DE ISOTOCINA EN *Cyprinus carpio*. (Cloning, characterization and purification of the copeptin, associated to the precursor of isotocin in *Cyprinus carpio*.) **Figueroa, J.**, Soto, M., Barra, V. y Kausel, G. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

- 15:45 VII.6 **COPEPTIN, UN POSIBLE FACTOR INDUCTOR DE LIBERACIÓN DE PRL, INMUNOLocaliza EN AXONES ADYACENTES A CÉLULAS LACTOTROPAS EN PITUITARIA DE *C. carpio*.** (Copeptin, a possible PRL releasing factor, localizes in axons adjacent to lactotrophs cells in pituitary of *C. carpio*.) Flores, C., Muñoz, D., Kausel, G., Barra, V., y Figueroa, J. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- 16:00 VII.7 **CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR DE PROLACTINA Y DE SU EXPRESIÓN DURANTE LA ACLIMATIZACIÓN DEL PEZ *C. carpio*.** (Characterization of *C. carpio* prolactin receptor and its expression during acclimatization). San Martín, R., Azócar, R., Molina, A. y Krauskopf, M. Laboratorio Biología Celular y Molecular, Universidad Andrés Bello e Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada.
- 16:15 VII.8 **LA SPH CISTEIN-PROTEASA ES NUCLEAR Y EXHIBE UN COMPORTAMIENTO MIGRATORIO POST-FECUNDACIÓN.** (The SpH cistein-protease is nuclear and it exhibits a behavior migratory post-fecundation). Morín, V.; Concha, C.; Genevière, A.M.; Puchi, M.; Imschenetzky, M. Departamento de Biología Molecular, casilla 160 - C, Universidad de Concepción. Observatorio de Oceanología de Banyuls, UMR, Banyuls sur-Mer, Francia.
- 16:30 VII.9 **LA PERMANENCIA DE HISTONAS ESPERMÁTICAS POST-AMFIMIXIS BLOQUEA LA REPLICACIÓN DE ADN DEL CIGOTO Y ES LETAL PARA EL EMBRIÓN** (Sperm histone permanence after amfimixis blocks DNA replication of zygotes and exhibits a lethal effect on further embryonic development). Concha, M.C., Puchi M., Morin V., Monardes A., Montecino M. e Imschenetzky M. Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- 16:45 VII.10 **LAS VARIANTES DE HISTONAS CS SE LOCALIZAN EN TERRITORIOS ESPECÍFICOS DE LARVAS PLUTEI DE ERIZOS DE MAR** (CS histone variants are located in specific regions of plutei larvae in sea urchins) Oliver M.I., Puchi M., Bustos A., Rodríguez C., Montecino M. e Imschenetzky M. Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

SESIÓN DIAPOSITIVAS VIII: ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS II

Salón : Nevado

Presidente: Dr. Jorge Babul

Secretaria: Dra. Ana María Jabalquinto

- 14:30 VIII.1 **UNIÓN DE 4',6-DIAMIDINO-2-FENILINDOL (DAPI), AL MONÓMERO Y AL OLIGÓMERO DE FTSZ DE *E. coli*.** (Binding of 4',6 Diamidino-2-phenylindole (DAPI), to monomeric and oligomeric *E. coli* FtsZ.) Nova, E. y Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- 14:45 VIII.2 **CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE UNA GLUCO-QUINASA ATP-DEPENDIENTE EN LA ARQUEA HIPERtermófila *Sulfolobus acidocaldarius*** (Preliminary characterization of an ATP-dependent glucokinase in the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus acidocaldarius*). Preller, A., Saavedra, G., Medina, M y Ureta, T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 15:00 VIII.3 **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA DE FORMAS INACTIVAS DE LA MICROCINA E492.** (Biochemical and biological characterization of inactive forms of microcin E492). Baeza, M., \*TSoto C., \*Monasterio O. y \*Lagos R. \*, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. T, Serono Pharmaceutical Research Institute, Ginebra, Suiza.
- 15:15 VIII.4 **EXPRESIÓN EN *Pichia pastoris*, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  $\alpha$ TUBULINA.** (Expression in *Pichia pastoris*, purification and characterization of  $\alpha$ -tubulin). Pérez D. y Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 15:30 VIII.5 **DESNATURACIÓN Y RENATURACIÓN DE MUTANTES DE FRUCTOSA -1,6- BISFOSFATASA QUE CONTIENEN RESIDUOS DE TRIPTÓFANO.** (Unfolding and refolding studies of fructose-1,6-bisphosphatase mutants containing tryptophan residues.) Ludwig, H. C., Yañez, A. J., Asenjo, J. L., y Slebe, J. C. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

- 15:45 VIII.6 ESTUDIO TEÓRICO - EXPERIMENTAL DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRÚVICA DE *Trypanosoma brucei*. (Theoretical and experimental study of *Trypanosoma brucei* phosphoenolpyruvate carboxykinase); González-Nilo D., Navarrete M. y Cardemil E.; Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.
- 16:00 VIII.7 FUNCIÓN DE Thr249 Y Asp262 EN LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRÚVICA DE *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. (Role of Thr249 and Asp262 in *Anaerobiospirillum succiniciproducens* phosphoenolpyruvate carboxykinase). Jabalquinto, A.M., Encinas, M.V., \*Laivenieks, M., \*Zeikus, J.G. y Cardemil, E. Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile y \*Michigan State University.
- 16:15 VIII.8 DETECCIÓN DE CAMBIOS CONFORMACIONALES INDUCIDOS POR LA UNIÓN DE LIGANDOS A LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA. (A fluorescence study of ligand-induced conformational changes in fructose-1,6-bisphosphatase). Asenjo J.L., Yañez A.J., Ludwig H.C., y Slebe J.C. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile.
- 16:30 VIII.9 UNIÓN DE MgATP AL SITIO ALOSTÉRICO DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *E. coli* Y MECANISMO DE TETRAMERIZACIÓN. (MgATP binding to the allosteric site of *E. coli* phosphofructokinase-2 and tetramerization mechanism). Cabrera, R., Babul J. y Guixé, V. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 16:45 VIII.10 IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE CISTEÍNA IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y ESTRUCTURA CUATERNARIA DE FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *E. coli*. (Identification of cysteine residues involved in the enzymatic activity and quaternary structure of *E. coli* phosphofructokinase-2) Báez, M., Guixé, V. y Babul, J., Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 17:00-17:30 Café
- 17:30-19:30 SIMPOSIO III

Salón Pirigallo

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EN CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Coordinador: Dr. Martín Montecino

CHROMATIN REMODELING AND TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF A BONE-SPECIFIC GENE. M. Montecino, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

PERIODICITIES IN NUCLEOSOME POSITIONING ON THE GLOBIN AND BETA-LACTOGLOBULIN GENES: DETERMINANTS OF HIGHER-ORDER CHROMATIN STRUCTURE? J. Allan, Institute of Cell and Molecular Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland.

TRANSCRIPTION BY RNA POL II: THE BASIC TRANSCRIPTION MACHINERY. E. Maldonado, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

DEVELOPMENTAL FUNCTIONS OF THE MAMMALIAN SWI/SNF BAF CHROMATIN REMODELING COMPLEX. G. Crabtree, Howard Hughes Medical Institute, Department of Developmental Biology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA.

19:45-21:00 SESIÓN DIAPOSITIVAS IX, X

SESIÓN DIAPOSITIVAS IX: ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS III

Salón: Pirigallo

Presidente: Dra. Ana Preller

Secretaria: Dra. María Antonieta Valenzuela

- 19:45 IX.1 ESTRUCTURA MÍNIMA DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA  $\alpha$  DE LA PROTEÍNAQUINASA CK2 PARA FUNCIONAR COMO UNA ENZIMA ACTIVA (Minimal structure of the catalytic subunit  $\alpha$  of protein kinase CK2 to function as an active enzyme). Tapia, J., Jacob, G., Connelly, C. y Allende, J.E. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

- 20:00 IX.2 **CARACTERIZACIÓN DE UNA LEVADURA (CLON 44A) TRANSFORMADA CON EL GEN DE LA ENDOXILANASA A DE *PENICILLIUM PURPUROGENUM*** (Characterization of a yeast transformant (clone 44A) containing the endoxylanase A gene from *Penicillium purpurogenum*). Bull, P., Chávez, R., Navarro, C., Peirano, A., Eyzaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 20:15 IX.3 **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS SUBISOFORMAS DE LA PROTEÍNAQUINASA CK1 $\alpha$  de PEZ CEBRA (*Danio rerio*)** (Biochemical characterization of subisoforms of protein kinase CK1 $\alpha$  from zebrafish) Burzio, V., Connelly, C., Allende, JE. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- 20:30 IX.4 **LOS NIVELES DE G $\alpha$ s REGULAN LA MADURACIÓN DEL OOCITO DE *Xenopus laevis***. (G $\alpha$ s and G $\beta$  $\gamma$  levels regulate *Xenopus laevis* oocyte maturation). Romo, X., Guzmán, L., Brito, M., Soto, X., Hinrichs, M.V y Olate, J. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción.
- 20:45 IX.5 **EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA QUIMERA G $\alpha$ 0/G $\alpha$ S**. (Expression, purification and functional analysis of the chimeric protein G $\alpha$ 0/G $\alpha$ S). Soto, X., Brito, M., Guzmán, L., Romo, X., Hinrichs, M.V y Olate, J. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción.

SESIÓN DIAPOSITIVAS X: GENES Y ENZIMAS FÚNGICAS

Salón: Nevado

Presidente: Dr. Jaime Eyzaguirre

Secretaría: Dra. Ana María Edwards

- 19:45 X.1 **EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE UN cDNA DE LACASA DE *Ceriporiopsis subvernipora* en *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger***. (Heterologous expression of *Ceriporiopsis subvernipora* laccase cDNA in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*.) Larrondo L. F., Salas L. y Vicuña R. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
- 20:00 X.2 **CARIOTIPO ELECTROFORÉTICO DEL HONGO FILAMENTOSO *Penicillium purpurogenum* Y UBICACIÓN CROMOSOMAL DE VARIOS GENES XILANOLÍTICOS**. (Electrophoretic karyotype of the filamentous fungus *Penicillium purpurogenum* and chromosomal location of several xylanolytic genes). Chávez, R.<sup>(1)</sup>, Fierro, F.<sup>(2)</sup>, Martín, J.F.<sup>(2)</sup> y Eyzaguirre, J.<sup>(1)</sup> Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Pontificia Universidad Católica de Chile<sup>(1)</sup> y Departamento de Ecología, Genética y Microbiología, Universidad de León e Instituto de Biotecnología (INBIOTEC), León, España<sup>(2)</sup>.
- 20:15 X.3 **REDUCCIÓN DE QUINONAS POR EL HONGO BASIDIOMICETE *Ceriporiopsis subvernisporea***. (Quinone reduction by the fungus basidiomycete *Ceriporiopsis subvernisporea*) Cortínez, G. y Vicuña, R. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 20:30 X.4 **EFFECTO DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE LACASA DE *Trametes versicolor* SOBRE LAS PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS DE *Pinus radiata*** (Effects of *Trametes versicolor*'s laccase enzymatic treatment on viscoelastic properties of *Pinus radiata*) Oses, R., Moya, C., Reyes, N., Burgos, C., Freer, J., Baeza, J., y Rodríguez, J. Laboratorio de Recursos Renovables, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

**JUEVES 27 SEPTIEMBRE**

**9:30-11:30 SIMPOSIO IV**

Salón Pirigallo

**"ESTRÉS OXIDATIVO, RESPUESTAS CELULARES Y FACTORES MODULADORES"**

**Coordinadores: Dr. Luis Videla y Dra. Virginia Fernández**

**HOMEOSTASIS CELULAR DEL HIERRO Y GENERACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO** Núñez, T., Claudia Núñez-Millacura, Victoria Tapia y Patricia Muñoz. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, e Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología.

**VITAMINA C Y ESTRÉS OXIDATIVO: MECANISMO Y FACTORES MODULADORES.** (Vitamin C and oxidative stress: mechanism and modulatory factors). Vera J. C. Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOQUINAS EN EL ENVEJECIMIENTO.** Gómez, C., Walter, R. y Sierra, F. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Universidad de Chile.

**HORMONA TIROIDEA, ESTRÉS OXIDATIVO Y TNF- $\alpha$**  (Thyroid hormone, oxidative stress, and TNF- $\alpha$ ) Videla L.A, Fernández V, Tapia G. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

**11:30-12:00** Café

**12:00-12:30** Entrega Medalla Hermann Niemeyer.

**12:30-13:30 CONFERENCIA OSVALDO CORI.**

Salón Pirigallo

**13:30 TERAPIA GÉNICA POR ANTISENTIDO: BASES Y APLICACIONES EN INVESTIGACIÓN EN ALCOHOLISMO.** Yedy Israel. Fac. de Cs. Químicas y Farmacéuticas y Fac. de Medicina, e Instituto Milenio, Universidad de Chile.

**13:30-14:30** Almuerzo

**13:30-14:30** ESTRUCTURA MÍNIMA DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA DE LA PROTEÍNA QUINASA CK2 PARA FUNCIONAR COMO UNA ENZIMA ACTIVA (Minimal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 to function as an active enzyme). Tapia, J., Jacob, G., Connolly, C. y Allende, J.E. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

# *Conferencias*

## CONFERENCIA INAUGURAL

**SIGNAL TRANSDUCTION FROM THE MEMBRANE TO THE NUCLEUS: NOVEL MOLECULAR MECHANISMS.** J. Silvio Gutkind, Oral and Pharyngeal Cancer Branch, NIDCR, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA.

In the last few years we have witnessed a real explosion in the knowledge of how cell surface receptors transmit signals to the nucleus thereby controlling the expression of genetic programs involved in many cellular processes, including normal and aberrant cell growth. In particular, our laboratory has focused on proliferative signaling through G protein-coupled receptors (GPCRs). We have shown that certain GPCRs can behave as potent ligand-dependent oncogenes and that expression of activated G $\beta$  and G $\gamma$ 12 can induce malignant transformation. In an effort to dissect the pathway linking transforming GPCRs to the nucleus, we found that these receptors activate MAP Kinase by PKC and by G protein  $\beta\gamma$  subunits acting on Ras. However, we observed that GPCRs induce the expression of *c-jun* independently of MAP kinase. This led to the finding that GPCRs can stimulate c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and the discovery that Rac1 and Cdc42 link many cell surface receptors to this novel enzyme. More recently, we have learned that a unique repertoire of signaling molecules link transforming GPCRs to a network of newly discovered MAP kinase cascades, in many cases through the activation of small GTP-binding proteins of the Ras superfamily. In turn, these kinases phosphorylate key molecules, including transcription factors, which ultimately control gene expression. Recent work on the regulation of these MAP kinases by GPCRs as well as on novel molecules linking GPCRs to transcriptional activation and cellular transformation through the small GTP-binding protein Rho will also be presented.

## CONFERENCIA OSVALDO CORI:

**TERAPIA GÉNICA POR ANTISENTIDO: BASES Y APLICACIONES EN INVESTIGACIÓN EN ALCOHOLISMO.** Yedy Israel Fac. de Cs Químicas y Farmacéuticas y Fac. de Medicina, e Instituto Milenio, Universidad de Chile

Se presenta estudios que demuestran un nuevo mecanismo de acción de los oligonucleótidos de antisentido. (a) Los antisentidos (desoxinucleótidos fosforotioatos) más activos hibridizan con el transcrito primario nuclear del RNA, (b) hibridizan con blancos que presentan un tetranucleótido GGGa como parte de la secuencia y (c) destruyen el RNA (posiblemente por la acción de la polimerasa H). Hemos diseñado moléculas de antisentido para inhibir la síntesis del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) responsable de la hepatopatía alcohólica. Oligonucleótidos de antisentido actuando sobre blancos GGGa inhiben en 92% ( $p < 0.001$ ) la liberación de TNF- $\alpha$  por células Kupffer in vitro y entre un 50-70% la liberación in vivo, sugiriendo que este tipo de terapia podrá ser usada en la hepatitis alcohólica humana. Hemos además empleado oligonucleótidos de antisentido para replicar la intolerancia al alcohol existente en ciertas poblaciones en Asia. Un porcentaje reducido de personas en Asia (Japón, China, Corea) no pueden beber grandes cantidades de alcohol y están protegidos entre un 66% a 100% contra el alcoholismo dada la existencia de una mutación puntual dominante inactivante de la deshidrogenasa aldehídica. Ratas a las que se administra un oligonucleótido de antisentido elevan en 400% sus niveles de acetaldehído circulante al beber alcohol y presentan un marcado rechazo al alcohol (-66%  $p < 0.02$ ) después de haberse administrado los medicamentos de antisentido. Estos resultados demuestran que la terapia génica será factible en el futuro, siendo la mantención prolongada de este efecto lo que determinará su uso en humanos. Financiamiento: NIAAA, Fondecyt, Milenio.

## CONFERENCIA PABMB:

**ALFA-HIDROXIACIDO DEHIDROGENASAS Y METABOLISMO DE AMINOACIDOS AROMATICOS EN LOS TRYPANOSOMATIDOS.**

(Alfa-hydroxyacid dehydrogenases and aromatic aminoacid metabolism in Trypanosomatids). **Cazzulo, J.J.** Inst. Inv. Biotecnol. (IIB/INTECH), Univ. Nac. Gral. San Martín, 1360 San Martín, Buenos Aires, Argentina. Los Trypanosomátidos son Protozoarios parásitos que causan enfermedades como la enfermedad de Chagas, la enfermedad del sueño y las leishmaniasis. El metabolismo de los aminoácidos aromáticos en estos organismos es mucho más simple que el de los animales superiores: Phe, Tyr y Trp por transaminación y ulterior reducción dan derivados aromáticos del L-lactato, que son excretados al medio. En el caso mejor estudiado, el de *Trypanosoma cruzi*, las enzimas que intervienen son una tirosina aminotransferasa (TAT) y una L-alfa-hidroxiácido aromático dehidrogenasa (AHADH). La TAT es homóloga con la enzima similar de mamíferos, pero presenta diferente especificidad de sustratos y una alta actividad de alanina aminotransferasa. La AHADH tiene alta homología con las malato dehidrogenasas citosólicas (cMDHs), pero es incapaz de reducir el oxaloacetato. *T. cruzi* contiene dos MDHs, una mitocondrial y la otra glicosomal, pero no se ha encontrado una cMDH. Nuestra hipótesis de que la AHADH proviene de la cMDH a través de un número limitado de mutaciones se ha visto reforzada por estudios de mutagénesis dirigida. Todas las MDHs tienen un residuo de Arg en la posición 102, que liga el carboxilo distal del oxaloacetato. Las lactato deshidrogenasas (LDHs) tienen, en cambio, Gln en esa posición. La AHADH tiene Ala. El reemplazo de esta Ala por Arg lleva a la aparición de actividad de MDH; la doble mutante A102R/Y237G tiene una actividad de MDH comparable a la de AHADH, que es superior a la de la enzima wild type. Estos datos, junto con otros muy recientes de otros autores en *Trichomonas* y *Phytomonas*, contribuyen a nuestras ideas sobre la evolución de las alfa-hidroxiácido deshidrogenasas.

## CONFERENCIA:

**NUCLEAR ENVELOPE BREAKDOWN.** Mark Terasaki. Dept. of Physiology, Univ. of Connecticut Health Center, Farmington, CT 06032 USA.

Starfish oocytes are an excellent system for investigating nuclear envelope breakdown (NEBD). The nucleus is very large (70 microns) and the oocyte is optically transparent, making it convenient for confocal microscopy. NEBD occurs 20-30 min after application of the maturation hormone 1-methyladenine. We monitored the nuclear entry of fluorescent 70 kD dextran, which normally cannot pass the nuclear pores. We also imaged GFP chimeras of nuclear pore and nuclear envelope proteins. Our data suggests that nuclear pores are disassembled before nuclear envelope breakdown, and that the nuclear lamina is disassembled after NEBD. We propose that nuclear pore disassembly, rather than lamina disassembly, causes the disruption of the nuclear envelope membrane permeability barrier. In more recent experiments, we have imaged the entry of cyclin B-GFP, a molecule which is complexed to the cdc2 kinase. Cyclin B-GFP begins to enter the nucleus approximately 5 min before the change in nuclear pore permeability, and appears to enter from the side of the nucleus closest to the centrosomes. This suggests that activation of the cdc2 kinase occurs in the region of the centrosomes.



## SIMPOSIO I: ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y EVOLUCIÓN DE PROTEÍNAS

Coordinador: Dr. Emilio Cardemil

**LA ACETIL XILANO ESTERASA II DE *Penicillium purpurogenum*: ESTRUCTURA DE UNA PROTEÍNA OBTENIDA A UNA RESOLUCIÓN MENOR A 1 ÅNGSTRÖM** (Acetyl xylan esterase II from *Penicillium purpurogenum*: structure of a protein at a resolution better than 1 Ångström). Eyzaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.

El hongo filamentoso *Penicillium purpurogenum* produce una gran variedad de enzimas que degradan las hemicelulosas vegetales, entre ellas dos acetil xilano esterases (AXE I y II). Estas dos enzimas han sido purificadas y caracterizadas y corresponden a proteínas diferentes. AXE II ha sido secuenciada: la proteína madura consiste en 207 residuos, destacando la ausencia de triptofanos y la presencia de 10 cisteínas. La enzima ha sido cristalizada y su estructura determinada por difracción de rayos X utilizando un derivado yodado para resolver el problema de las fases, refinándose la estructura a una resolución de 0,9 Ångström, resolución no obtenida hasta ahora con ninguna proteína de este tamaño. La estructura terciaria consiste en un "sandwich"  $\alpha\beta$  con una hoja  $\beta$  paralela de 6 hebras rodeada por dos  $\alpha$ -hélices paralelas a cada lado. La enzima es una serina esterasa, y la triada catalítica ha sido identificada como ser90, his187 y asp157. Las cys forman 5 puentes disulfuro. La alta resolución permite detectar varias conformaciones de algunos residuos. La triada catalítica está expuesta, a diferencia de una enzima homóloga, la cutinasa, sugiriendo que AXE II es una esterasa que actúa sobre sustratos polares. Expresión heteróloga de la proteína en *Aspergillus nidulans* y el uso de mutagénesis sitio-dirigida abren la posibilidad de realizar estudios funcionales detallados de la enzima. Financiamiento: FONDECYT 19602451 y 8990004; IR 7960006.

**MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRÚVICA** (Mechanism of action of phosphoenolpyruvate carboxykinase). Cardemil, E., Jabalquinto, A. M., González-Nilo, F. D. y Bazaes, S. Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, y Departamento de Química, UMCE.

Las carboxiquinasas fosfoenolpirúvicas catalizan la descarboxilación y fosforilación reversible de oxaloacetato en presencia de un nucleósido trifosfato y un metal divalente para dar fosfoenolpiruvato,  $\text{CO}_2$  y el correspondiente nucleósido difosforilado. En algunas especies, esta reacción forma parte de una de las primeras etapas de la biosíntesis de glucosa, en tanto que en otras especies es una de las etapas finales de la glicólisis. Algunas carboxiquinasas fosfoenolpirúvicas (entre ellas la de *Saccharomyces cerevisiae*) catalizan, además de la reacción fisiológica, dos reacciones minoritarias: una reacción tipo quinasa pirúvica en que ADP es fosforilado por fosfoenolpiruvato con producción de ATP y piruvato, y otra de descarboxilación del oxaloacetato. La relación entre estas reacciones secundarias y la reacción principal ha permitido entender en mejor forma el mecanismo de acción de la enzima, y nuestra visión actual indica que las reacciones secundarias representan dos etapas de la reacción principal, fosforilación y descarboxilación. La conexión entre estas reacciones y la reacción principal parece ser la existencia transiente de enolpiruvato, un posible intermediario común. Si bien no hay aún evidencia física de la formación de enolpiruvato, diversos experimentos realizados tanto en la forma nativa como en mutantes de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de *S. cerevisiae* apoyan su existencia y permiten ofrecer una explicación coherente al mecanismo de acción de esta enzima. Financiado por FONDECYT 1000756 y DICYT-USACH.

**MECANISMO DE RENATURACIÓN *in vitro* DE TUBULINA.** (*In vitro* renaturation mechanism of tubulin). Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La tubulina, un heterodímero formado por  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, autoensambla para formar microtúbulos. Hemos determinado que la denaturación y renaturación *in vitro* del heterodímero de tubulina es reversible. La renaturación de  $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -tubulina,  $\alpha$ - +  $\beta$ -tubulina recombinantes (rec) y del heterodímero nativo muestra una conducta cooperativa. Los valores de las concentraciones medias de GdmCl ( $[\text{D}]^{50\%}$ ), permiten establecer el siguiente orden de estabilidad:  $\alpha$ -tubulina (rec) >  $\alpha$ - +  $\beta$ -tubulina (rec) > heterodímero nativo >  $\beta$ -tubulina (rec). La pérdida de la estructura terciaria respecto a la secundaria, se produce a menores concentraciones de GdmCl lo que sugiere la presencia de intermediarios o múltiples formas durante la renaturación. Mediante espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo y de correlación se determinó que al denaturar el heterodímero este se disocia en sus monómeros, los que al aumentar la concentración de GdmCl aumentan de volumen hasta alcanzar el estado denaturado. La renaturación por filtración rápida muestra que las proteínas recombinantes se autoasocian y forman homodímeros y agregados discretos de mayor masa molecular. Estos resultados indican que el monómero  $\alpha$ -tubulina aislado es capaz de autoasociarse en ausencia de  $\beta$ -tubulina (rec). Los resultados en su conjunto demuestran que la renaturación *in vitro* de la tubulina da origen a dímeros no funcionales lo que justifica la necesidad de diferentes chaperonas para el correcto plegamiento y formación del heterodímero de tubulina. Se discutirán estos resultados en relación a la estabilidad de la proteína FtsZ, responsable de la división de procariontes.

FINANCIADO POR PROYECTO FONDECYT # 1010848

## CONFERENCIA SEVERO OCHOA:

**ANÁLISIS EVOLUTIVO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN PROTEÍNAS REDOX FOTOSINTÉTICAS** (Evolutionary analysis of the structure-function relationships in photosynthetic redox proteins)

De la Rosa, M.A., Hervás, M., Navarro, J.A., Díaz-Quintana, A., De la Cerda, B., Molina-Heredia, F.P., Balme, A., Murdoch, S.P., Lange, C., Díaz-Moreno, I. Y Durán, R. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla y Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Américo Vespucio s/n, 41092, Sevilla, España

En los organismos fotosintéticos oxigénicos, la transferencia de electrones desde el complejo de citocromos b6-f hasta el fotosistema I, inmersos en la membrana, se realiza mediante una metaoproteína soluble localizada en el interior de las vesículas tilacoidales. En plantas superiores, el transportador móvil es la plastocianina, mientras que en algas verdes y cianobacterias esta misma función la realiza de forma alternativa el citocromo c6, sintetizado por las células en ausencia de cobre. Desde el punto de vista evolutivo, las disponibilidades relativas de hierro y cobre en el planeta pudieron ser la causa de esta transición de la proteína hemínica a la proteína de cobre. La plastocianina y el citocromo c6 constituyen, pues, un ejemplo típico de evolución de proteínas que es no sólo convergente (dos estructuras distintas que se adaptan para jugar la misma función), sino también paralela (dos moléculas que evolucionan al unísono en cianobacterias y algas verdes para interactuar con los mismos complejos de membrana). Referencias recientes: De la Cerda et al. JBC (1999) 274, 13292; Sun et al. JBC (1999) 274, 19048; Molina-Heredia et al. JBC (1999) 274, 33565; Molina-Heredia et al. JBC (2001) 276, 601; Navarro et al. JBC (2001) en prensa.

## SIMPOSIO II: TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Coordinador: Dr. Juan Olate

## SIGNALLING DURING EGG ACTIVATION AT FERTILIZATION

Laurinda A. Jaffe, Dept. of Physiology, Univ. of Connecticut Health Center, Farmington, CT 06032 USA.

At fertilization, the sperm activates the egg to reenter the cell cycle and begin embryonic development. The egg activation process is mediated by a rise in cytosolic free  $Ca^{2+}$ , which results from the release of  $Ca^{2+}$  from the egg's endoplasmic reticulum in response to inositol trisphosphate ( $IP_3$ ). In echinoderm and ascidian eggs, the production of  $IP_3$  requires the sequential activation of a Src family kinase and phospholipase C<sup>2</sup>.<sup>1</sup> Recent evidence from studies of ascidian fertilization supports the hypothesis that these events are initiated when fusion of the sperm and egg plasma membranes allows a protein from the sperm cytoplasm to enter the egg cytoplasm.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jaffe, L.A., Giusti, A.F., Carroll, D.J., and Foltz, K.R. (2001) *Sem. Cell Develop. Biol.* 12: 45-51.

<sup>2</sup>Runft, L.L., and Jaffe, L.A. (2000) *Development* 127: 3227-3236.

## THE ROLE OF SRC FAMILY KINASES IN EGG ACTIVATION AT FERTILIZATION

Kathy Foltz, Department of Molecular, Cell and Developmental Biology, UCSB, Santa Barbara, CA 93106 USA.

In echinoderm eggs, the sequential activation of a Src family kinase (SFK) and PLC is both necessary and sufficient for the release of  $Ca^{2+}$  from the egg endoplasmic reticulum at fertilization.<sup>1</sup> Microinjection of Src inhibitors or dominant-interfering Src family proteins specifically inhibits  $Ca^{2+}$  release while microinjection of active Src causes  $Ca^{2+}$  release through the PLC<sup>2</sup> mediated pathway. However, the endogenous Src family tyrosine kinase(s) responsible for this activity has not yet been identified. Using homology-based screening of an arrayed cDNA library, we have cloned a full-length *Strongylocentrotus purpuratus* cDNA (designated SpSFK1) encoding an SFK. The conceptual translation predicts a protein of Mr 57 K exhibiting ~68% similarity and ~59% identity to human c-Src, Fyn and Yes. Northern blot analyses confirm the presence of the SpSFK1 transcript (estimated size ~10 kb) in *S. purpuratus* eggs. An antibody raised against the C-terminal peptide of the SpSFK1 protein recognizes a protein of ca. Mr 57 K in eggs, which is highly enriched in the particulate fraction. Interestingly, the antibody specifically stimulates SFK activity when added to egg lysates. When microinjected into unfertilized eggs, the affinity-purified antibody triggers release of  $Ca^{2+}$  through the PLC<sup>2</sup>-mediated pathway. Recombinant SpSFK1 SH2 domains are being produced for use as dominant-interfering reagents to investigate the necessity of SpSFK1 in the regulation of calcium release at fertilization in sea urchin eggs. We also are investigating the localization of this protein in specialized egg membrane microdomains (rafts) that have been implicated in fertilization.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jaffe, L.A., Giusti, A.F., Carroll, D.J., and Foltz, K.R. (2001) *Sem. Cell Develop. Biol.* 12: 45-51.

<sup>2</sup>Belton, R.J., Adams, N.L., and Foltz, K.R. (2001) *Mol. Reprod. Develop.* In Press.

## CELL CYCLE ARREST OF UNFERTILIZED MATURE EGGS: META II-CSF OR G1-CSF

Takeo Kishimoto and KAZUNORI TACHIBANA. Laboratory of Cell and Developmental Biology, Tokyo Institute of Technology, Nagatsuta, Midoriku, Yokohama 226-8501, Japan.

In most animals, immature oocytes are arrested at prophase of meiosis I. After release from the prophase arrest by maturation-inducing hormone, mature eggs are, unless fertilized, again arrested at a stage depending on animal species. In vertebrates, unfertilized mature eggs are arrested at metaphase of meiosis II (meta-II), and the activity responsible for the meta-II arrest has been called CSF (cytostatic factor). A major component of CSF is c-mos proto-oncogene product (Mos), and accordingly, Mos functions as "meta II-CSF" in vertebrate eggs. In contrast, unfertilized mature eggs of the starfish are arrested at the egg pronucleus stage which corresponds to G1-phase. The G1 arrest depends on MAP kinase activity, and in search of the upstream regulator for MAP kinase in starfish eggs, we have isolated starfish Mos as the first invertebrate homolog. In the absence of Mos, starfish meiosis I is followed directly by repeated embryonic mitotic cycles, while recovery of Mos restores meiosis II and the arrest at the egg pronucleus stage. These observations imply that Mos functions as "G1-CSF" in starfish eggs. We propose that a conserved role of Mos in invertebrate and vertebrate eggs is to function as "CSF" irrespective of the arrest phase, thus preventing the parthenogenetic activation until fertilization.

## FERTILIZATION BLOCKS APOPTOSIS OF STARFISH EGGS BY INACTIVATION OF THE MAP KINASE PATHWAY

Kayoko Sasaki AND KAZUYOSHI CHIBA. Department of Biology, Ochanomizu University, 2-1-1 Ohtsuka, Bunkyo-ku, Tokyo, 112-8610, Japan.

Removal of unnecessary or damaged cells through apoptosis is crucial to the normal development and the health of multicellular organisms. Occurrence of apoptosis is regulated by extracellular death-activating signals, such as cytokines, adhesion molecules, or molecules on the surface of other cells. While apoptotic signaling pathways seem to differ between cell types, there are only a few cases where the mechanism is known. Fully grown starfish oocytes are arrested at prophase of meiosis I. The hormonal stimulation of 1-methyladenine (1-MA) induces meiosis reinitiation and germinal vesicle breakdown (GVBD). Optimal development occurs when maturing oocytes are fertilized between GVBD and first polar body emission. In the absence of sperm, oocytes complete both meiotic divisions to yield haploid G1 phase-arrested eggs. Entry into S-phase is blocked by MAP kinase activity in the starfish eggs, while it stimulates proliferation of mammalian somatic cells without preventing DNA synthesis. MAP kinase in starfish oocytes is activated after GVBD by a newly synthesized starfish homolog of Mos functioning as a MAP kinase kinase kinase (MEK kinase). MAP kinase activity is maintained even after meiotic divisions unless fertilization occurs. Fertilization triggers a disappearance of Mos and a decrease in MAP kinase activity, which initiates DNA synthesis and embryonic development. In this study, we found that spontaneous and synchronous activation of caspase-3 in starfish eggs occurs 9-12 h after 1-MA stimulation. Then caspase-dependent membrane blebbing and egg fragmentation occur, indicating that mature eggs undergo apoptosis if not fertilized. Activation of caspase-3 and induction of apoptosis are blocked both by a MEK inhibitor and by emetine treatment which inhibits MEK kinase (Mos) synthesis. Conversely, when recombinant GST-Mos is injected into the emetine-treated eggs, apoptosis is induced. These results indicate that persistent activation of the Mos/MEK/MAP kinase cascade gives the death-activating signal in starfish eggs. Fertilization inactivates the MAP kinase pathway and suppresses apoptosis, followed by normal development. Starfish eggs may undergo apoptosis and then may be degraded and absorbed, when maturation occurs accidentally in the ovary without spawning.

### SIMPOSIO III: REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EN CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Coordinador: Dr. Martín Montecino

**CHROMATIN REMODELING AND TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF A BONE-SPECIFIC GENE.** M. Montecino, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

The rat osteocalcin (OC) gene encodes for a 10 KDa bone-specific protein that is expressed at onset of mineralization during osteoblast differentiation. Transcription of the OC gene is controlled by modularly distributed regulatory elements which are included within two DNase I hypersensitive sites that are only present in the promoter region (-600 to -400 and -170 to -70) of bone-derived cells expressing this gene. Hence, chromatin remodeling accompanies transcriptional activation of the OC gene.

Here, we address the molecular mechanisms involved in this chromatin remodeling process. Using experimental approaches that include either cell-free or intact cell systems, we found that the bone-specific transcription factor CBFA/RUNX may play a principal role in the early events that lead to both changes in chromatin structure and transcription activity of the OC gene in osteoblastic cells. In addition, we defined how the activity of chromatin remodeling complexes from the SWI/SNF family combined with nucleosome positioning sequences present at the OC promoter can produce a specific chromatin organization that supports basal and steroid-enhanced OC expression. Together our results support a model where distal and proximal promoter regions of the OC gene functionally interact through protein-protein interactions to regulate the tissue-specific expression of this gene.

FONDECYT 1000361

**PERIODICITIES IN NUCLEOSOME POSITIONING ON THE GLOBIN AND BETA-LACTOGLOBULIN GENES: DETERMINANTS OF HIGHER-ORDER CHROMATIN STRUCTURE?** J. Allan, Institute of Cell and Molecular Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland.

As the bulk of DNA in eukaryotic cells is packaged into nucleosomes and folded into higher order structures, the regulation of transcription must take place within this context. A complete explanation of regulatory events has therefore to consider not only the binding of sequence-specific proteins, but must ultimately deal with aspects of chromatin structure such as nucleosome placement and the conformation of the nucleoprotein fibre over regions of DNA many kilobases long. A detailed understanding of the nature of the chromatin fibre, particularly with reference to specific genes or domains, would enhance our understanding of gene regulation.

We have developed techniques which permit the mapping of histone octamer binding sites on DNA to be determined at high resolution and over long stretches of DNA. Using this approach we have mapped histone octamer binding sites throughout the entire  $\beta$ -globin gene and its flanking sequence. This map has now been extended to include the adjacent,  $\alpha$ -globin gene. Results from these studies suggest a function for non-coding, non-regulatory DNA sequences in controlling gene expression by determining inactive, higher order chromatin structure (Davey et al., (1995) PNAS, 92, 11210-11214).

Recently, we have been studying the chromatin structure of the ovine  $\beta$ -lactoglobulin (BLG) gene. This gene is contained within a 10 kb DNA fragment which embodies all the sequence information required to direct its specific expression and to protect it from position effects. We have investigated how the BLG gene sequence organises chromatin both *in vitro* and *in vivo*. The results again suggest that a periodic distribution of nucleosome positioning sites inherent in the DNA sequence contributes to the distinctive structure of the gene when packaged into chromatin *in vivo*. Further studies on a series of well characterised BLG transgenes have allowed us to assess the specific roles of flanking DNA and introns.

**TRANSCRIPTION BY RNA POL II: THE BASIC TRANSCRIPTION MACHINERY.** E. Maldonado, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Transcription by RNA polymerase II requires of six factors named TFIIA, TFIIB, TFIID, TFII E, TFII F and TFII H. These factors form a complex on the promoter DNA, which is called preinitiation complex. The first factor that binds to the TATA box of the promoter is the factor TFIID through the TATA-binding protein which is a subunit of TFIID. After TFIID binds the TATA box follows the binding of TFIIB. To the complex formed by TFIID-TFIIB-promoter DNA follows the binding of TFII F-RNA polymerase II. The preinitiation complex is completed by the binding of TFII E and TFII F. Recently, it has been found that mammalian RNA polymerase II can be purified as preassembled complex from nuclear extracts that contains TFIIB, TFII E, TFII F, TFII H and several polypeptides named the mediator. Transcription on naked DNA templates *in vitro* require the general transcription factors and RNA polymerase. However, the general transcription factors and RNA polymerase is not sufficient to transcribe when the template is assembled into chromatin. Two other complexes are necessary to transcribe templates assembled into chromatin. The RSF factor which remodelates the chromatin at the promoter and FACT which facilitates the elongation of the transcript.

**DEVELOPMENTAL FUNCTIONS OF THE MAMMALIAN SWI/SNF BAF CHROMATIN REMODELING COMPLEX.** Gerald Crabtree, Howard Hughes Medical Institute, Department of Developmental Biology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA.

Several chromatin remodeling complexes have been identified in recent years. Most of these are related to the yeast SWI/SNF complex by virtue of the fact that they contain a catalytic subunit that is homologous to SWI2 or SNF2. Mammalian cells contain at least two of these genes, BRM and BRG1 that are part of independent complexes, which have chromatin remodeling activity similar to yeast complex. Furthermore, a group of proteins tightly associated with BRG1 and BRM called BAFs (BRG or BRM associated factors) are related to subunits of the yeast complex. In this presentation, the functions of the SWI/SNF BAF complex in mammalian cells will be analyzed. The studies presented will be specially focused on the role of the components of this complex during development.

## SIMPOSIO IV: "ESTRÉS OXIDATIVO, RESPUESTAS CELULARES Y FACTORES MODULADORES"

Coordinadores: Dr. Luis Videla y Dra. Virginia Fernández

**VITAMINA C Y ESTRÉS OXIDATIVO: MECANISMO Y FACTORES MODULADORES.** (Vitamin C and oxidative stress: mechanism and modulatory factors). Juan Carlos Vera. Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

La vitamina C es un antioxidante cuyo rol preciso en la defensa celular contra el estrés oxidativo es aún motivo de controversia. Estudios de suplementación *in vivo* han fallado en demostrar un efecto protector de la vitamina C. Por otro lado, la interpretación de resultados *in vitro* ha sido dificultada por una acción pro-oxidante de la vitamina C, el rol complementario del glutatión como antioxidante, la generación de oxidantes biológicas que conllevan a la consiguiente oxidación y consumo de la vitamina, y la existencia de mecanismos de reducción específicos que permiten el reciclaje y recuperación de la vitamina C. Hemos utilizado como modelo experimental diversas células leucémicas para determinar el rol de la vitamina C y del glutatión en los mecanismos celulares de defensa contra el estrés oxidativo, y el posible papel modulador de citoquinas y factores estimuladores de colonia en estos procesos. Además de lo anterior, hemos analizado el rol de interacciones específicas célula-célula y de fenómenos de activación celular, y de la expresión de los diferentes transportadores de vitamina C en la adquisición, reciclaje y función de la vitamina C como antioxidante. Nuestros resultados sugieren que la vitamina C es un potente antioxidante que ejerce una función protectora a través de mecanismos que parecen ser tanto dependientes como independientes de glutatión, y que un elevado contenido intracelular de vitamina C estaría directamente asociado a un aumento en la capacidad de defensa celular contra el estrés oxidativo. En este contexto, las propiedades antioxidantes de una célula dependerán de un delicado equilibrio entre la generación de especies oxidantes intra- y extracelulares, las que tienen un efecto pro-oxidante, y el contenido intracelular de moléculas antioxidantes tales como la vitamina C y el glutatión y sus enzimas asociadas.

FONDECYT 1990333, 3000024, 3990007, DIUC 201034006-14.

**HORMONA TIROIDEA, ESTRÉS OXIDATIVO Y TNF- $\alpha$**  (Thyroid hormone, oxidative stress, and TNF- $\alpha$ ) Videla L.A, Fernández V, Tapia G. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La calorificación tiroidea involucra una mayor generación de especies reactivas del O<sub>2</sub> en tejidos blanco que aumenta el consumo de antioxidantes e inactiva enzimas antioxidantes, determinando así una condición de estrés oxidativo celular. En el hígado, el estrés oxidativo inducido por la hormona tiroidea (T<sub>3</sub>) provoca daño celular, exacerba la toxicidad del hierro, xenobióticos o de la isquemia-reperfusión, y altera varias funciones hepáticas. En esta situación, T<sub>3</sub> provoca una hiperplasia e hipertrofia de las células de Kupffer, con el consecuente aumento en su capacidad de fagocitosis de partículas y la respuesta respiratoria asociada [Videla LA, Redox Report 2000;5:265-275]. Debido a la mayor actividad pro-oxidativa inducida en las células de Kupffer en esta situación, se podría estimular la expresión génica de varios productos bioactivos. Es así como el incremento en los niveles circulantes de TNF- $\alpha$ , inducido por la administración de T<sub>3</sub> a ratas, es prácticamente abolido por el pre-tratamiento con cloruro de gadolinio (inactivador de células de Kupffer), con  $\alpha$ -tocoferol o N-acetilcisteína, o con un oligonucleótido antisentido cuyo blanco es el RNAm para el TNF- $\alpha$ . Estos resultados demuestran que (i) T<sub>3</sub> provoca un marcado aumento en la producción de TNF- $\alpha$ , (ii) este efecto es ejercido principalmente en las células de Kupffer y (iii) el estrés oxidativo media la producción y liberación de TNF- $\alpha$  en el estado hipertiroideo. Además, ellos podrían explicar cómo el efecto hepatotóxico del acetaminofeno, tetracloruro de carbono o del etanol es exacerbado por el hipertiroidismo o eliminado por la terapia antitiroidea, agentes tóxicos que promueven el estrés oxidativo y cuya toxicidad está mediada por las células de Kupffer con liberación de TNF- $\alpha$ .

(Financiado por FONDECYT 1000887).

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOQUINAS EN EL ENVEJECIMIENTO:** Christian Gómez, Robin Walter y Felipe Sierra. ICBM, Universidad de Chile.

El envejecimiento es un fenómeno que afecta a la mayoría de los organismos vivientes, en el cual participan componentes tanto extrínsecos como intrínsecos. El proceso en su conjunto está caracterizado por una declinación general en varias funciones fisiológicas y por una progresiva y acumulativa pérdida de la capacidad del organismo para responder a los desafíos del medio ambiente. Frente a una variedad de injurias como infección o daño tisular se generan profundos cambios en las concentraciones de varias proteínas plasmáticas sintetizadas principalmente en el hígado.

Esta respuesta inflamatoria fisiológica, temprana e inespecífica se conoce como "respuesta hepática de fase aguda" y tiene un efecto benéfico, pues contribuye a destruir patógenos microbianos, y a la activación de mecanismos de reparación. Una serie de antecedentes señalan que la respuesta de fase aguda (APR) está atenuada en individuos de edad avanzada. Utilizando el modelo de inyección de lipopolisacárido, hemos demostrado que las ratas de edad avanzada presentan una significativa disminución en la expresión hepática de proteínas de fase aguda, así como en la activación de vías de transducción de señales involucradas. Estos datos sugieren que alteraciones en la capacidad de respuesta de determinadas rutas de comunicación intracelular pueden ser parcialmente responsables de la declinación de la APR observada durante la edad. Muy recientemente, el uso de cDNA microarrays nos ha permitido detectar expresión génica diferencial durante la APR hepática de animales de edad avanzada, con respecto a sus contrapartes más jóvenes. Las principales diferencias de expresión corresponden a mensajeros de factores transcripcionales, receptores, proteínas involucradas en el recambio proteico, así como mensajeros intracelulares. En particular, la proteína inflamatoria de macrófagos-1 a (MIP-1a), citoquina quimiotáctica involucrada en quimiotaxis y hematopoyesis, mostró la mayor inducción en su expresión desde sus niveles basales, así como una disminución significativa de éstos en ratas senescentes.

**HOMEOSTASIS CELULAR DEL HIERRO Y GENERACION DE ESTRES OXIDATIVO.** Marco Tulio Núñez, Claudia Núñez-Millacura, Victoria Tapia y Patricia Muñoz. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, e Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología.

Por su capacidad de catalizar la generación de especies reactivas del oxígeno, el hierro intracelular es un potencial promotor de daño oxidativo. Este daño puede ser prevenido por un mecanismo traduccional que regula la homeostasis celular del hierro, denominado sistema IRE/IRP. En este trabajo analizamos los componentes de la homeostasis celular de hierro y el posible daño oxidativo generado por su acumulación en células de epitelio intestinal (Caco-2) y células de neuroblastoma 2 A (N2A). Ambos tipos celulares presentaron características propias de regulación del hierro intracelular. Sin embargo, ambos tipos celulares acumularon hierro en el tiempo, lo que se correlacionó con daño oxidativo. Esta acumulación pudo ser consecuencia de la continua actividad de IRP2 (Caco-2) o de IRP1 (N2A) a altas concentraciones de hierro intracelular. Estas observaciones indican que el sistema de homeostasis celular de hierro no responden efectivamente a condiciones de sobrecarga de este, e implican al hierro como un importante promotor de daño oxidativo. Financiado por proyectos FONDECYT 1010657 (MTN) y 2000100 (CNM) y por proyecto P99-031 al Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología.

# *Resumenes*

## I. EXPRESION DE PROTEÍNAS EN SISTEMAS VEGETALES

**I-1 Evaluación de la participación de la proteína NPR1 en la activación temprana de genes inducida por ácido salicílico en *Arabidopsis thaliana*.** (Evaluation of the NPR1 protein participation in early activation of genes induced by salicylic acid in *Arabidopsis thaliana*). Uquillas C., Blanco F., Letelier I., Holuigue, L. Dpto. Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El ácido salicílico (SA) y otras hormonas vegetales activan la transcripción de genes tempranos con actividad detoxificante y antioxidante, como el gen que codifica para la enzima glutatión S-transferasa (GST). La expresión de estos genes está regulada por la secuencia promotora *as-1* que responde a SA y auxinas. Esta secuencia se ha encontrado también en promotores de genes *PR* (proteínas relacionadas con patogénesis) los cuales son activados tardíamente por SA. Se ha identificado una proteína NPR1 que interacciona con factores de transcripción que unen a la secuencia *as-1* y que participa en la vía de activación de genes *PR* por SA. En este trabajo se evalúa la participación de NPR1 en la vía de transducción que lleva a la activación de genes tempranos por SA. Al tratar plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana npr1* con SA y auxina (2,4D) se activó la transcripción del gen *gst6*, al igual como ocurre en plantas silvestres. Esto indicaría que SA activa los genes *PR* por una vía distinta a la que comparte con auxinas para activar los genes *GST* y que la proteína NPR1 no estaría involucrada en el mecanismo de activación transcripcional de este gen *GST*. Con el propósito de caracterizar el grupo de genes que se activa por SA en forma concertada con *gst6*, se analizó la información disponible sobre perfiles de expresión realizados mediante experimentos de *microarrays* en *Arabidopsis* por otros investigadores. De este análisis se seleccionaron 7 genes que podrían cumplir un papel en defensas antioxidantes y detoxificantes. Se realizará un análisis de perfiles y cinéticas de expresión de estos genes por efecto de condiciones de estrés, mediante hibridación tipo *Northern*.

Financiado por Proyecto Fondecyt en Líneas Complementarias N° 8980005

**I-2 PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNA-G EN LA RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD DE *Citrus limon* FRENTE A *Alternaria alternata*** (Participation of G-protein in the hypersensitive response of *Citrus limon* against *Alternaria alternata*). Ortega, X<sup>1,2</sup>, Velásquez, JC<sup>1</sup>, Pérez, LM<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Lab. Bioquímica, Fac. Cs. Salud, Universidad Andrés Bello, <sup>2</sup>Universidad de Chile.

Las plántulas de limonero enfrentadas al hongo *A. alternata* desarrollan una respuesta de hipersensibilidad que incluye la inducción de la vía fenilpropanoide cuantificada por la inducción de la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la síntesis de la fitoalexina escoparona. En el desarrollo de esta respuesta defensiva participan Calcio, calmodulina, y se produce un aumento en los niveles de IP<sub>3</sub> de la planta a los 7 y 25 minutos de inoculación con el hongo. Este IP<sub>3</sub> sería producido por una fosfolipasa-C, la que puede ser dependiente de proteína-G o estar asociada a un receptor con actividad de proteína tirosina quinasa. Para estudiar la participación de una proteína-G en el desarrollo de esta respuesta, las plántulas de limonero se inocularon con los activadores de proteína-G toxina de cólera y mastoparín y en ellas se cuantificó IP<sub>3</sub>, actividad de PAL y síntesis de escoparona. Las plántulas sometidas a este tratamiento indujeron a la PAL y sintetizaron escoparona; sin embargo no aumentaron sus niveles de IP<sub>3</sub>, a diferencia de lo que ocurre en respuesta a la inoculación con el hongo. Estos resultados sugieren que la fosfolipasa-C involucrada en la transducción de la señal generada por *A. alternata* sería independiente de proteína-G, sin embargo, ésta participaría en una ruta alternativa para la inducción de PAL y síntesis de escoparona.

FONDECYT 2990090 y DI 75-00 Universidad Andrés Bello.

**I-3 FACTORES VIRALES QUE INDUCEN RESPUESTA TIPO-HR EN TABACOS SENSIBLES INFECTADOS POR TMV-Cg.** (Viral factors induce an HR-like response in sensitive tobacco infected with TMV-Cg) Ehrenfeld, N., Stange, C., Medina, C., Cañón, P., Espinoza, C. y Arce-Johnson, P., Dpto. Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

La interacción planta-patógeno está determinada por el reconocimiento de factores de avirulencia (*avr*) del patógeno y el producto del gen de resistencia (*R*) en la planta. Cuando los correspondientes genes *avr* y *R* están presentes, la planta induce una respuesta de resistencia activa, conocida como respuesta de hipersensibilidad (HR). Una de las HR mejor caracterizada es la que se produce en plantas de tabaco que llevan el gen de resistencia N, ante la infección con la cepa silvestre del virus del mosaico del tabaco (TMV-U1). En plantas de tabaco Xanthi NN se induce la activación de una serie de genes de defensa con la formación de lesiones locales, restringiendo al virus al sitio de la infección. En plantas de tabaco sensibles Xanthi nn el virus se disemina, estableciendo una infección sistémica. Nosotros hemos clonado el virus TMV-Cg, una cepa de tobamovirus que infecta normalmente crucíferas y actualmente estamos caracterizando su desplazamiento y desarrollo de síntomas en plantas de tabaco. La inoculación de TMV-Cg en tabaco Xanthi NN indujo HR en la hoja inoculada. En cambio, en plantas tabaco sensibles Xanthi nn inesperadamente el virus indujo la formación de lesiones locales en la hoja inoculada y mosaico con líneas necróticas a nivel sistémico, síntoma cuya intensidad es dependiente de la temperatura. Estudios histoquímicos muestran muerte celular y depósito de callosa asociada a estas lesiones necróticas, además, de la inducción de proteínas PRs, características de la respuesta HR. Hemos construido virus híbridos entre TMV-U1 y TMV-Cg que son capaces de replicarse en protoplastos de células BY-2 y se mueven sistémicamente en plantas de tabaco sensibles. La infección de tabaco con estos virus híbridos indica que la proteína de la cápside del TMV-Cg participaría en la inducción de una respuesta tipo HR en plantas de tabaco sensibles. Esta respuesta podría estar asociada a la presencia de un gen análogo al gen N en plantas de tabaco sensibles. Fondecyt L.C. N° 8980005 y Fondecyt N° 2000-078.

**I-4 INDUCCION DE UNA DESHIDRINA EN *D. antarctica* Desv. DURANTE LA ACLIMATACION AL FRÍO** (Induction of a dehydrin in *D. antarctica* during cold acclimation). Olave, N., Ruiz, S., Estay, A., Bravo, L.A. y Corcuera, L.J. Departamento de Botánica, Universidad de Concepción. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología. Universidad de Talca.

Las deshidrinas son proteínas que se sintetizan durante la aclimatación al frío y otros estreses. Sus genes se expresan tardíamente en la embriogénesis y desecación de las semillas. La *Deschampsia antarctica* es una de las dos plantas vasculares de la Antártida. Se propone que *D. antarctica* presenta genes para deshidrinas y que su expresión está regulada por frío. Los análisis Southern, con una sonda heteróloga para deshidrinas, muestran 14 bandas en *D. antarctica*, sugiriendo la existencia de múltiples genes para deshidrinas. Para confirmar este resultado, se obtuvo una sonda homóloga por PCR, utilizando partidores específicos para deshidrinas. El fragmento producido (426pb) fue clonado en el vector pGEM-T, tuvo un 60-85% de homología con otras deshidrinas. El análisis Southern con dicho fragmento, mostró 7 bandas, confirmando la existencia de uno o más genes para deshidrinas. Para saber si su expresión está modulada por frío, se realizó análisis Northern en plantas aclimatadas a 4°C. Se detectó expresión a las 24 horas. El análisis Western mostró que la proteína se detectó también a las 24 horas. La inducción de deshidrinas inducidas por frío es tardía y por ello su función no sería importante en las primeras horas del estrés. FONDECYT 2000144.

## II. ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS I

**II.1 Estudios estructurales de la cisteína sintetasa (CysK) de *Bacillus stearothermophilus* V** (Structural studies about the cysteine synthase (CysK) of *Bacillus stearothermophilus* V). Saavedra, C., Encinas, M.V., Araya, M., González, D. y Vásquez, C., Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

Durante nuestros estudios sobre resistencia a telurito de potasio ( $K_2TeO_3$ ) en *B. stearothermophilus* V se encontró que la enzima cisteína sintetasa dependiente de piridoxal fosfato (PLP) confiere cierto grado de resistencia a esta sal tóxica cuando su gen estructural (*cysK*) es expresado en *Escherichia coli*. La proteína recombinante fue purificada a homogeneidad y un estudio cinético mostró que la catálisis sigue un mecanismo de tipo ping-pong.

En este trabajo se evaluó la estabilidad de la enzima frente a los agentes desnaturantes urea e hidrócloruro de guanidina. Se encontró que al tratar la proteína con estos agentes pierde el cofactor, obteniéndose la apoenzima. Interesantemente la desnaturación es un proceso reversible ya que la proteína recupera su actividad al ser incubada en la presencia de PLP a 50°C.

Paralelamente, se construyó un modelo molecular de la CysK de *B. stearothermophilus* V por homología, utilizando como estructura de referencia los datos cristalográficos de la CysK de *S. typhimurium*. Este modelo fue utilizado para establecer la extensión del extremo carboxilo terminal requerida para que la enzima retenga la capacidad de unir el cofactor. Los resultados obtenidos con enzimas mutantes (truncadas en 40 y 60 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal) indican que éstas son inactivas y no retienen el PLP. Recientemente hemos obtenido un gen *cysK* delecionado en 30 pb y se espera que el análisis de la proteína correspondiente permita definir mejor el problema. De acuerdo a la predicción del modelo, ésta nueva enzima debería retener el cofactor y ser activa.

Agradecimientos: Proyecto Fondecyt 1990917 y Dicyt.

**II.2 ROL DEL ASP-153 EN LA ACCION CATALITICA DE LA AGMATINASA DE *Escherichia coli*: MODIFICACION QUIMICA, MUTAGENESIS SITIO-DIRIGIDA Y MODELAJE MOLECULAR** (Role of Asp-153 in catalysis by *E. coli* agmatinase: Chemical modification, site-directed mutagenesis and homology modelling) Salas, M.<sup>1</sup>, Rodríguez, R.<sup>2</sup>, Uribe, E.<sup>1</sup>, López, V.<sup>1</sup>, López, N.<sup>2</sup>, Orellana, M.<sup>1</sup>, Pérez, E.<sup>3</sup>, Carvajal, N.<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. <sup>2</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba. <sup>3</sup>Laboratorio de Bioquímica, Universidad de Valencia, España.

La agmatinasa (EC 3.5.3.11) de *E. coli* es inactivada por modificación de un residuo con el reactivo K de Woodward y la inactivación desaparece al reemplazar el Asp153 por Asn. La mutación genera especies que expresan ~5 % de la actividad de la enzima silvestre y no implica cambios en la fluorescencia de triptofanos ni en los espectros de dicroísmo circular. Tampoco varían los valores de  $K_m$  para agmatina ( $1.6 \pm 0.1$  mM),  $K_i$  para la inhibición por putrescina ( $12 \pm 2$  mM), ni la interacción con el metal activador. Un modelo tridimensional, generado por técnicas de modelaje molecular, indica que las cadenas laterales de Asp-153 y Asn-153 se acomodan perfectamente en la misma posición en el sitio activo de la agmatinasa, manteniéndose prácticamente inalteradas las distancias con el sustrato y los iones metálicos. Considerando la disposición del nitrógeno N $\delta$ 2 de la Asn en el modelo, las diferencias de actividad, y los mecanismos postulados para la reacción homóloga catalizada por la arginasa, sugerimos que el Asp-153 participa ya sea en la estabilización de un hidroxilo unido a metal, favoreciendo su ataque nucleofílico sobre el carbono guanidínico de la agmatina, o en la generación del hidroxilo nucleofílico, actuando como una base.

Proyecto FONDECYT 2990049

**II.3 IDENTIFICACION DE SUBTIPOS DE ADENILIL CICLASA EN OCITOS DE *Xenopus laevis***. (Identification of Subtypes of Adenylyl Cyclase in *Xenopus laevis* oocytes). Guzmán, L., Romo, X., Brito, M., Soto, X., Hinrichs, M.V y Olate, J. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción.

El proceso de maduración del oocito de *Xenopus laevis* inducido por progesterona es un evento temprano e involucra la inhibición del sistema efector adenilil ciclasa (AC). Se ha propuesto que la hormona esteroidea interfiere, a través de un mecanismo desconocido aún, con la activación constitutiva de la AC por la subunidad *G $\alpha$*  y el heterodímero *G $\beta\gamma$* . En mamíferos solamente las AC de tipo II y IV son activadas por *G $\beta\gamma$*  en presencia de la subunidad *G $\alpha$*  activa (*G $\alpha$* -GTP), las cuales podrían ser la proteína blanco para progesterona. Hasta el momento en oocitos de *Xenopus laevis* ha sido clonada solamente la AC de tipo IX (Torrejón y col., FEBS Letters 404:91-94, 1997). Como una manera de identificar otros posibles subtipos de AC presentes en el oocito de *Xenopus laevis*, en este trabajo se utilizó la técnica de RT-PCR para amplificar, a partir de RNA total de oocito, una región presente en todas la AC, pero característica para casa isotipo. Esta estrategia experimental permitió identificar dos nuevas AC, el subtipo V y VI. De los 52 fragmentos de ADN analizados por restricción y secuenciación, 14 correspondieron a la AC de tipo IX, 11 al subtipo V y 4 al subtipo VI. No se detectó por RT-PCR, como se esperaba, el subtipo II y IV. Sin embargo por análisis de "Western blot", utilizando anticuerpos específicos para AC de mamíferos, se detectaron los tipos II y IV. Lo anterior permite sugerir que: a) el nivel de mRNA para las AC de tipo II y IV es muy bajo para ser detectados por RT-PCR, pero suficientes para ser traducidos, b) los mRNA se traducen en etapas tempranas de la oogenesis, para posteriormente ser degradados en el estado VI.

Financiado por Proyecto HUMAN FRONTIER N° RG0112/2000-M 103.

**II.4 LA MUTACION S<sup>96N</sup> EN EL DOMINIO HÉLICE DE LA PROTEÍNA *G $\alpha$*  HUMANA AFECTA EL INTERCAMBIO BASAL GDP/GTP.** (The S<sup>96N</sup> Mutation in the Helical Domain of Human *G $\alpha$*  Affects Its GDP/GTP Exchange Rate). Brito, M., Soto, X., Guzmán, L., Romo, X., Hinrichs, M.V y Olate, J. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción.

Las proteínas G están formadas por un dominio conservado similar al oncogen ras (*Dras*) y por un dominio más variable y único para las proteínas heterotriméricas, denominado dominio hélice (DH). Existen en la estructura tridimensional de la subunidad *G $\beta$*  cuatro regiones que sufren cambio conformacional al unir la proteína GTP, denominadas regiones "switch" I, II, III y IV. Las switch I, II y III están presentes en el *Dras* y la switch IV en el DH. Recientemente hemos encontrado que la mutación de residuos en el switch IV afecta el intercambio del nucleótido de guanina (J. Cell. Biochem. 76:368-375, 2000). En relación a esto, otros grupos han propuesto que el intercambio basal GDP/GTP puede estar controlado por la interacción entre el dominio *Dras* y DH, a través de residuos localizados en la interfase entre estos dos dominios. Durante la construcción de quimeras *G $\alpha$* , hemos identificado una nueva mutante *G $\alpha$* , S96N, la cual presenta una reducida afinidad por GTPyS, una disminuida velocidad de disociación de GDP y una disminuida capacidad de activación de la adenilil ciclasa. Lo anterior indica que esta mutante tiene afectada su velocidad basal de intercambio de GDP por GTP. La mutación S96N está localizada en el extremo carboxilo de la hélice  $\alpha A$  del DH, la cual es una estructura importante que contribuye a estabilizar el DH y su interacción con el *DRas*.

Financiado por Proyecto FONDECYT N° 1000359

### III. REGULACIÓN GÉNICA

**III.1 MODELO DE INTERACCIÓN ENTRE EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN RUNX2/PEBP2 $\alpha$ A/CBFA1 Y EL DOMINIO DE TRANSACTIVACIÓN MH2 DE SMAD-2** (Interaction model between transcription factor RUNX2/PEBP2 $\alpha$ A/CBFA1 and MH2 transactivation domain of Smad-2) Villagra, A., Bunster, M. y Martínez-Oyanedel, J. Laboratorio de Biofísica Molecular, Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción. (jmartine@udec.cl)

El factor de transcripción RUNX2/PEBP2 $\alpha$ A/CBFA1 es una proteína de gran importancia en procesos de diferenciación osteoblástica. La asociación de distintas isoformas de ella a otras proteínas reguladoras, dirigiría diferencialmente la expresión de genes involucrados en osteogénesis. Cbfa1 interaccionaría, entre otras, con proteínas de la familia R-Smad, las que mediarían señales desde receptores de membrana al núcleo. Nosotros estamos interesados en conocer la estructura del complejo Cbfa1-Smad como modelo de transactivación para genes blanco de Cbfa1. Se conoce la estructura del dominio MH2 de Smad que interaccionaría con Cbfa1, pero solo se conoce la zona de la proteína Cbfa1 que interacciona con el ADN. Por ello se obtuvo un modelo mediante modelaje molecular para la región 340-424 de Cbfa1 potencialmente responsable de la interacción con Smad. Este modelo se utilizó para estudiar la posible interacción con el dominio MH2 de Smad2 mediante "docking" utilizando el programa Gramm v1.03. El modelo de interacción entre ambas proteínas, una interacción de hojas beta, fue muy semejante al encontrado en otros factores de transcripción de estructura conocida. Nuestros resultados nos permiten postular un modelo de interacción entre ambas proteínas que intentaría explicar la participación directa de proteínas Smad en la arquitectura local de complejos transcripcionales en los que participe Cbfa1.

**III.2 MAPEO DE LOS DOMINIOS FUNCIONALES DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NURR1.** (Functional domain mapping of the transcription factor Nurr1). Galleguillos, D., Andrés, M.E., Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El factor de transcripción Nurr1 pertenece a la superfamilia de receptores nucleares, al subconjunto huérfano o sin ligando conocido. Ratones deficientes en Nurr1 carecen de neuronas dopaminérgicas ventrales, estableciendo un papel fundamental de este factor en la adquisición de este fenotipo neuronal. Nurr1 junto a sus homólogos Nurr77 y Nor1 corresponden al producto de genes tempranos. Dentro de esta subfamilia se ha determinado la existencia de dominios de activación transcripcional tanto en el extremo carboxilo, estructuralmente conservado, como en el amino, altamente divergente. Por otra parte, Nurr1 presenta dos variantes alternativas con deleciones tanto en el amino como en el carboxilo terminal. Dado el potencial de una compleja regulación transcripcional ejercida por Nurr1, hemos mapeado sus dominios funcionales usando ensayos de transactivación. Para ello, una familia de proteínas de fusión entre los dominios de unión a ADN de LexA, Gal4 y diferentes segmentos de Nurr1 fue transfectada transitoriamente en levaduras y en células 293, respectivamente. Encontramos que tanto el dominio amino como el carboxilo terminal de Nurr1 poseen capacidad transactivadora. Los últimos 110 aminoácidos de Nurr1, son esenciales en la actividad del dominio carboxilo terminal, sugiriendo que las variantes alternativas, carentes de ellos, podrían tener un rol regulatorio sobre la actividad de Nurr1. Además, para establecer el papel jugado por los distintos dominios de Nurr1 en un gen blanco, hemos subclonado el promotor de la tirosina hidroxilasa, enzima limitante de la síntesis de dopamina, en un vector reportero, para realizar ensayos de transactivación y competencia.

FONDECYT 1000722

**III.3 PARTICIPACIÓN DE P300 EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DE OSTEOCALCINA DE RATA.** (involvement of p300 in the regulation of the transcriptional activity in the rat osteocalcin promoter). Sierra, J.; Villagra, A.; Arenas, F.; Puchi, M.; Imschenetzky, M. y Montecino, M. Dpto. Biología Molecular, Universidad de Concepción. Casilla 160-C, Concepción.

La proteína p300 tiene una función clave en procesos como la diferenciación celular y control del crecimiento. A través de sus regiones N y C-terminal esta proteína es capaz de interaccionar con una serie de activadores transcripcionales que poseen dominios de unión a DNA. Además p300 tiene actividad acetiltransferasa (AT), la cual es capaz de acetilar histonas y factores de transcripción, modulando la función de estos.

Osteocalcina (OC), es la proteína nocológica más abundante de la matriz extracelular ósea, se expresa primariamente durante la etapa de mineralización del tejido óseo y esta expresión es estimulada por vitamina D3.

Para estudiar la participación de coactivadores como p300 en la regulación tejido-específica de OC, hemos realizado experimentos de transfección transiente en los que se ha evaluado el efecto de la sobreexpresión de p300 sobre la actividad transcripcional del promotor de OC.

Nuestros resultados demuestran que p300 produce un incremento significativo en la estimulación de la transcripción de OC por vitamina D3. También se observó un efecto menor de p300 sobre la actividad basal de este promotor. Estos resultados indican que el coactivador transcripcional p300, tendría una participación relevante en la regulación de la actividad transcripcional de OC en células óseas.

Fondecyt: 2000140 y 1000361

**III.4 REMODELACION NUCLEOSOMAL EN EL PROMOTOR PROXIMAL DEL GEN DE OSTEOCALCINA DE RATA MEDIADA POR COMPLEJOS SWI/SNF.** (Nucleosome remodeling at the rat osteocalcin gene proximal promoter mediated by SWI/SNF complexes). Gutiérrez, J., Imschenetzky, M., Montecino, M. Dpto. Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

La región promotora del gen de osteocalcina (OC) activo transcripcionalmente posee una estructuración nucleosomal distinta de la que posee el gen inactivo. El gen activo contiene una región proximal del promotor (-170 a -70) libre de estructuración nucleosomal, mientras que en el gen inactivo esta región se presenta como parte de un nucleosoma. En la transición entre un estado y otro podrían participar complejos con actividad remodeladora de nucleosomas. Se estudió la influencia que el complejo remodelador de nucleosomas SWI/SNF posee sobre segmentos del promotor proximal de OC reconstituidos como nucleosomas *in vitro*, definiendo los tipos de remodelación que permitan la interacción de factores de transcripción de OC con sus secuencias de reconocimiento específicas. Para estudiar la actividad que posee SWI/SNF de movilizar octámeros de histonas *in cis*, se trabajó con nucleosomas traslacionalmente posicionados sobre los segmentos de ADN en estudio. Los resultados obtenidos nos permiten postular que la acción de complejos con actividad remodeladora puede contribuir a definir la estructuración nucleosomal en el promotor del gen activo y facilitar la unión de factores de transcripción específicos, necesarios para la expresión del gen.

FONDECYT 2990066 y 1000361

**III.5 EL RECEPTOR DE VITAMINA D3 INTERACCIONA DIRECTAMENTE CON EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Runx/Cbfa FORMANDO UN COMPLEJO QUE SE UNE AL PROMOTOR DISTAL DE OSTEOCALCINA DE RATA.** (The Vitamin D3 Receptor interacts directly with the transcription factor Runx/Cbfa and forms a complex that binds to the distal rat osteocalcin gene promoter). Paredes, R., Gutiérrez, L., Imschenetsky, M. y Montecino, M. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

La proteína osteocalcina (OC) se expresa en los estados tardíos de la diferenciación osteoblástica y participa activamente en la formación de la matriz extracelular del tejido óseo. Su expresión es regulada por el factor de transcripción tejido específico Runx/Cbfa y es estimulada por vitamina D3 a través del Receptor de Vitamina D (VDR) que se une a un elemento de respuesta a vitamina D (VDRE) en el promotor de OC. El VDRE se encuentra flanqueado por dos sitios de unión para Runx-Cbfa (CBFA-A y CBFA-B), sugiriendo que existiría algún tipo de interacción entre ambas proteínas. Además, *in vivo* el VDRE y el elemento CBFA-B forman parte de un sitio hipersensible a DNasa I, reflejando un remodelamiento previo de este promotor.

Mediante ensayos de *GST-Pull down* y *His-Pull down* demostramos que VDR y Runx/Cbfa pueden interactuar directamente. A su vez, se observó que VDR y Runx/Cbfa, forman un complejo que se une al promotor de OC. Además, utilizando nucleosomas reconstituidos *in vitro*, demostramos que Runx-Cbfa puede unirse a sus sitios CBFA-A y CBFA-B cuando se encuentran en el borde interior del nucleosoma, lo que podría representar un evento temprano en el proceso de remodelación del promotor y posterior reclutamiento de VDR, facilitando la estimulación por vitamina D3.

Financiado por FONDECYT 2010103 y FUNDACIÓN ANDES.

**III.6 LA EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD NR1 DE LOS RECEPTORES PARA GLUTAMATO TIPO NMDA ES REGULADA DIFERENCIALMENTE POR AGONISTAS GLUTAMATÉRGICOS EN CULTIVOS MESENFÁLICOS.** (The expression of NMDA glutamate receptor subunit 1 is regulated by glutamatergic agonists in mesencephalic cultures). Campusano, J., Tapia-Arancibia, L. Andrés, M. y Bustos, G. Laboratorio Farmacología-Bioquímica, Facultad Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile y Laboratoire de Plasticité Cérébrale, Université de Montpellier II, Francia. Patrocinio: Dr. Xavier Jordana.

Los receptores para glutamato (Glu) han sido clasificados en dos grupos, ionotrópicos (iGluR) y metabotrópicos (mGluR). Es sabido que el ARNm de los receptores para Glu puede sufrir modificaciones post-transcripcionales que son reguladas en el desarrollo. El objetivo de este trabajo es evaluar la expresión génica de la subunidad NR1 de los iGluR tipo NMDA, en cultivos mesencefálicos expuestos a ligandos glutamatérgicos.

Cultivos mesencefálicos fueron expuestos durante 48 horas a distintas concentraciones de los agonistas t-ACPD (ligando de mGluR) y NMDA. La expresión del transcrito fue evaluada por RT-PCR semicuantitativo, utilizando partidores dirigidos contra los exones 10 y 11 de NR1, separados en el gen por 5 Kb.

Nuestros resultados demuestran la aparición de dos bandas en proporción 1:1; una esperable de 213 pb y una segunda de 295 pb. La secuenciación de esta última indica la existencia, entre los exones 10 y 11, de 82 pb adicionales que contienen secuencias consenso de «splicing». En cultivos estimulados con t-ACPD, aparece aumentada la de 213 pb. Por otro lado, en animales adultos sólo es detectada la banda de 213 pb, mientras que en mesencefalo de fetos de rata se aprecia principalmente la de 295 pb. Nuestros resultados sugieren que el ARNm inmaduro para NR1 sufre un mecanismo de «splicing» recurrente o «resplicing», que puede ser regulado por agonistas de Glu y por el estadio del desarrollo. (FONDECYT 1010986).

**III.7 CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE ARNm DE FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DE CEREBRO (BDNF) EN SUBSTANCIA NIGRA EN ETAPAS TEMPRANAS DE UN MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON EN RATA.** (Changes in the expression of BDNF mRNA in substantia nigra of a rat model of early Parkinson's disease.) Bustos V., Campusano J., Vecchiola A., Abarca J., Bustos G. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Ciencias Biológicas. Laboratorio de Farmacología-Bioquímica. (Patrocinado por Dr. Xavier Jordana de Buen)

El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) es una proteína de la familia de las neurotrofinas capaz de proteger a las neuronas dopaminérgicas del daño inducido por 6-OH-DA. Durante la enfermedad de Parkinson se produce una degeneración progresiva de la vía dopaminérgica nigroestriatal, y se ha postulado un efecto de BDNF sobre los fenómenos de plasticidad y remodelación sináptica que allí se han descrito. El gen de BDNF contiene cinco exones. En 5' de cada uno de los cuatro primeros exones (I, II, III y IV) están presentes promotores independientes. Cada uno de estos exones se une mediante «splicing» a un exón común (exón V) generándose cuatro transcritos distintos (I-V, II-V, III-V, IV-V).

En el presente trabajo se ha estudiado mediante RT-PCR los niveles relativos de los transcritos II-V, III-V y V en sustancia nigra (SN) de ratas con lesiones parciales de la vía nigroestriatal. Se encontró una inducción temprana (1, 3 y 7 días) de los ARNm de BDNF proveniente de los exones II y V en la SN ipsilateral de la rata lesionada. Además, se observó una inducción transitoria del ARNm III-V a un día postlesión, que se normaliza a cuatro días, y luego disminuye bilateralmente hasta niveles no detectables a siete días postlesión. Los resultados presentados apoyan la hipótesis que BDNF en SN participa en eventos neuronales tempranos que permiten la compensación funcional en respuesta al daño dopaminérgico nigroestriatal de tipo parcial. (Fondecyt 1010986)

**III.8 EFECTO DE LA ADRENALECTOMÍA SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE GENES RELACIONADOS A LA APOPTOSIS EN REGIONES ESPECÍFICAS DEL HIPOCAMPO DE RATA.** (Effect of adrenalectomy in mRNA levels of apoptotic related-genes in specific areas of the hippocampus). Cárdenas SP, Bravo JA, Morales P, Lara HE y Fiedler JL. Lab. de Neurobioquímica. Facultad de Cs Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

El hipocampo es una estructura esencial en aprendizaje y memoria y es sensible a glucocorticoides adrenales mediante la participación de receptores a corticosterona definidos como GR y MR, los cuales presentan baja y alta afinidad por la hormona respectivamente. Estos actúan como factores transcripcionales modulando la expresión de genes neuronales. Hemos observado que luego de 5 días de adrenalectomía (ADX) se induce apoptosis en el hipocampo, específicamente en el giro dentado (GD) evidenciado por técnicas morfológicas y de TUNEL.

Al estudiar cambios en los niveles de ARNm de genes de la familia *bcl-2* por hibridación *in situ*, observamos que la ADX induce un aumento en los niveles del ARNm del gen pro-apoptótico *bax* en el GD, efecto que es prevenido por niveles altos de corticosterona. Esto sugiere un efecto represor de GR sobre la expresión de *bax*. Este aumento en los niveles de *bax*, explicarían la inducción de apoptosis por la ADX en el GD. También observamos que el nivel de ARNm de *bcl-2* es regulado en forma dependiente de la concentración de corticosterona. Así, la ADX promueve un leve aumento del ARNm y en animales ADX con un suplemento hormonal que activa preferencialmente a MR se observa una mayor expresión de este gen. En cambio animales suplementados con altos niveles de corticosterona, presentan una represión en la expresión de *bcl-2*. Se sugiere que la corticosterona es capaz de inducir un aumento de *bcl-2* a través de su receptor MR y es capaz de reprimir este efecto a través de su receptor GR. En el GD aparece otro mecanismo, que también induciría un aumento en *bcl-2*, el cual sería activado por la ADX lo que podría explicar la protección de apoptosis a los 5 días post-operación. Memorias 2000.

**III.9 ESTIRAMIENTO MECÁNICO Y ANGIOTENSINA II: MODULADORES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL IGF-I EN CARDIOMIOCITOS NEONATOS *IN VITRO*** (Mechanical strain and angiotensin II: modulators of IGF-I gene expression in neonatal cardiomyocytes *in vitro*). Salinas M, Gonzalez-Jara, F & Melendez J., Dep. Bioq. y Biol. Mol., Fac. Cs. Qcas. y Farmacéuticas., U. de Chile.

El estiramiento mecánico (EM) y la angiotensina II (Ang II) inducen *per se* el desarrollo de la hipertrofia cardíaca *in vivo* e *in vitro*, sin embargo, se desconoce si regulan la expresión y síntesis de otros mediadores de acción hipertrofica como el factor de crecimiento análogo a insulina tipo I (IGF-I). Este trabajo postula que el EM y Ang II modulan la expresión génica del IGF-I y que su expresión se correlaciona con el desarrollo de la hipertrofia en el cardiomiocito neonato de rata *in vitro*.

Cardiomiocitos neonatos de rata, en ausencia de suero, fueron sometidos a estiramiento estático biaxial (12%) o tratados con Ang II (1  $\mu$ M) entre 3-12h y se determinaron los cambios en los niveles del mRNA para IGF-I por RT-PCR semicuantitativo. La correlación con la hipertrofia cardíaca ejercida por el estiramiento mecánico y la Ang II se evaluó a través de la expresión y contenido de  $\beta$ -MHC y la evaluación de la síntesis de proteínas totales.

Los resultados mostraron que: 1.- el cardiomiocito es el componente celular responsable de la síntesis del IGF-I. 2.- los cardiomiocitos estirados biaxialmente o tratados con Ang II inducen tempranamente (3h) la expresión del mRNA para IGF-I. 3.- La expresión génica del IGF-I precedió el desarrollo de la hipertrofia del cardiomiocito bajo las condiciones de estudio.

Se concluye que el cardiomiocito es el componente celular responsable de la síntesis del IGF-I y que el EM y la Ang II actúan como moduladores de su expresión génica en el miocardio de rata neonata.

Memorias 2000 Fac. Cs. Qcas y Facs, U. de Chile y FONDECYT 2960046

**III.10 EXPRESIÓN DE UROCORTINA EN CEREBRO DEL RATÓN.** (Urocortin expression in the mouse brain) Haeger, P, Gysling K., Forray M.I., Daza C, Rojas R. Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. [phaeger@genes.bio.puc.cl](mailto:phaeger@genes.bio.puc.cl) (Patrocinio: M.E. Andrés).

Urocortina (UCN) es un neuropéptido con alta afinidad por los receptores del factor liberador de corticotrofina (CRF). Los núcleos del sistema límbico como Septum presentan alta densidad de dichos receptores. Se ha mostrado que los receptores a CRF participan en la respuesta de ansiedad. Recientemente, se ha informado que ratones deficientes en CRF presentan las mismas características ansiogénicas que ratones normales, sugiriendo que UCN podría estar involucrada en la modulación de respuestas conductuales como ansiedad. Nuestro objetivo es estudiar la expresión de UCN en cerebro de ratón. Para ello, usamos las técnicas de hibridación *in situ*, RT-PCR e inmunocitoquímica (ICC). Los resultados muestran una significativa expresión *in situ* de UCN y su ARNm en neuronas localizadas en Septum latero dorsal y medial del ratón. Por ICC se observó una alta densidad de fibras y terminales nerviosos positivos a UCN en el Lecho de la estría terminal. Para confirmar la expresión de ARNm de UCN en Septum, se aisló ARN total y se amplificó por RT-PCR anidado un fragmento de 400 pb de dicho gen. La secuenciación del fragmento amplificado confirmó la expresión de ARNm de UCN en Septum. Adicionalmente, por RT-PCR se amplificó ARNm de UCN en cuerpo estriado, región donde no se observó expresión evidente por las otras técnicas utilizadas. Finalmente, el estrés inducido por restricción de movimiento incrementó la expresión de ARNm de UCN en el Septum medial y latero dorsal del ratón. Este estudio sugiere que UCN estaría participando en conductas relacionadas al estrés que previamente se le habían atribuido a CRF. Financiado por proyecto Fondecyt 1011017

#### IV. BIOMEDICINA

**IV.1 EFECTO DE FOTSENSIBILIZADORES FLAVINICOS HIDROFOBICOS SOBRE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS EN CULTIVO.** (Effect of hydrophobic flavinic photosensitizers on human tumoral cell in culture) Edwards, A.M.\*, Pacheco, A.\*, Chacón, M.\*, Zuñiga, S.\* DeIoannes, A.E.\*\*, Becker, M.I.\*\* \*Laboratorio de Química Biológica, Facultad de Química, P. Universidad Católica de Chile. \*\*Biosonda Biotecnología S.A.

La riboflavina (RF) es una vitamina hidrosoluble, que forma parte del complejo vitamínico B<sub>2</sub> y es esencial para las células aeróbicas ya que es precursora de importantes cofactores redox (FMN y FAD). Al mismo tiempo, RF es un sensibilizador fotoquímico: Absorbe la luz visible provocando la modificación de otras moléculas las que en su ausencia no serían alteradas por la luz. Al irradiar directamente cultivos de células tumorales en presencia de RF se provoca muerte celular la que aumenta considerablemente al adicionar aminoácidos como Tyr y Trp, y algunos de sus derivados como el ácido 3-indol acético (I<sub>3</sub>A). Debido a la función catalítica de los cofactores flavinicos, los requerimientos celulares de RF son muy bajos lo mismo que su incorporación a la célula. Con el objeto de aumentar la incorporación del fotosensibilizador a células tumorales hemos sintetizado ésteres de RF para aumentar el carácter hidrofóbico, los que conservan las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de RF. Los ésteres de cadena larga se adicionaron al cultivo celular incorporados en liposomas. La incorporación aumentó con la hidrofobicidad del compuesto, y se observó la mayor toxicidad para los cultivos a los que se adicionó el tetrapropionato de RF. La toxicidad aumenta cuando las células se incuban por 24 h con el éster flavínico, antes de la irradiación. Al adicionar Trp junto a los ésteres se observó un importante aumento en la toxicidad, el que también es mayor si se irradia después de 24 h de incubación.

Se agradece el financiamiento Proy. Fondecyt 1000310

**IV.2 ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN BRCA2 EN FAMILIAS CHILENAS CON CÁNCER DE MAMA** (Molecular genetic analysis of the BRCA2 gene in Chilean families with breast cancer). <sup>1</sup>Palma L., <sup>1</sup>Gallardo, M., <sup>1</sup>Egaña, L., <sup>2</sup>Paredes, H., <sup>3</sup>Rodríguez, M., <sup>4</sup>Rousseau, C., <sup>4</sup>King, M-C, <sup>1</sup>Carvallo, P. <sup>1</sup>Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, <sup>2</sup>Instituto Nacional del Cáncer, <sup>3</sup>Hospital Barros Luco, <sup>4</sup>University of Washington, Seattle, USA.

Se estima que cerca del 5% de los casos de cáncer mamario son hereditarios; y una parte de éstos se explica por mutaciones en dos genes supresores de tumores conocidos hasta ahora, BRCA1 y BRCA2. La frecuencia de mutaciones en uno u otro gen varía según el origen étnico de la población analizada. Estos genes han sido implicados en mantener la integridad genómica y en la reparación del DNA. El gen BRCA2 se localiza en el cromosoma 13q12, codificando una proteína de 3418 aminoácidos, presenta exones centrales de gran tamaño y contiene señales de localización nuclear, por lo que en condiciones normales se localiza en el núcleo. En este trabajo se analizó la estructura molecular del gen BRCA2 en pacientes de 12 familias Chilenas. El estudio incluyó amplificación por PCR de todos los exones del gen, incluyendo las regiones de unión intrón-exón, y su análisis posterior por SSCP o por formación de heterodobletes. Posteriormente se secuenciaron todos los fragmentos de DNA que sugerían tener alguna mutación. Se encontraron dos pacientes que presentaban mutación en el gen BRCA2. Una de éstas, 6174delT está presente en el exón 11 y es muy frecuente en familias con ancestros Judío-Ashkenazi. La otra mutación 6857delAA, está también presente en el exón 11 del gen, y ha sido descrita previamente en tres familias Españolas. Es muy probable que la mutación encontrada en esta familia Chilena, y en las familias Españolas tenga un origen común. (Financiado por Fondecyt 1011076)

**IV.3 ALTERACIÓN DE LAMININA EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE PACIENTES CON PARAPARESIA ESPÁSTICA ASOCIADA AL HTLV-I.** (Laminin alteration in the cerebrospinal fluid of patients with Spastic Paraparesis associated to HTLV-I). **García<sup>1</sup> L., Collados<sup>1</sup> L., Vásquez<sup>1</sup> F., Kettlun<sup>1</sup> AM, Cartier<sup>2</sup> L. y Valenzuela<sup>1</sup> M.A.** (1) Depto Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Cs Químicas y Farmaceuticas, U. de Chile, (2) Depto Cs Neurológicas, Fac. Medicina, U. de Chile.

En el 1-2% de los individuos infectados con el virus HTLV-I se produce la enfermedad crónica conocida como Paraparesia Espástica Tropical, caracterizada por la degeneración de los axones de los haces corticales. El mecanismo de este daño axonal no se conoce, pero pensamos que en parte podría deberse a la alteración continua de la matriz extracelular (MEC), cambiando el medio ambiente favorable para la regeneración axonal. Laminina es uno de los constituyentes de la MEC que promueve el crecimiento axonal. La proteinasa de matriz extracelular conocida como MMP-3 tiene como sustrato preferencial la laminina. En consecuencia, se midieron los cambios en los niveles de MMP-3 y laminina en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes y se determinó si habían diferencias en el patrón de productos proteolíticos de laminina mediante inmunoanálisis; y finalmente, en el LCR se midió actividad proteolítica sobre laminina estándar, comparando con el efecto de MMP-3 pura. Nuestros resultados indican que en el LCR de pacientes hay un aumento de MMP-3 y de laminina comparado con los controles. Estos resultados junto con el efecto proteolítico del LCR de pacientes sobre laminina pura sugieren que hay una mayor degradación o modificación de la laminina en ellos, lo que podría estar dificultando la regeneración axonal por disminución local de dicha proteína en la MEC. Los cambios en el nivel de MMP-3 podrían explicarse por la acción transactivadora de genes de la proteína reguladora viral conocida como Tax. Financiado por proyecto Fondecyt N° 1000-874.

**IV.4 COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD METALOPROTEINÁSICA Y SUS PROTEÍNAS INHIBIDORAS EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE PACIENTES CON PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL Y CREUTZFELD-JACOB.** (Comparison of metalloproteinase activity and their inhibitory proteins in cerebrospinal fluid of patients with Tropical Spastic Paraparesis and Creutzfeld-Jacob). **Kettlun<sup>1</sup> AM, Collados<sup>1</sup> L, García<sup>1</sup> L., Vásquez<sup>1</sup> F., Cartier<sup>2</sup> L. y Valenzuela<sup>1</sup> M.A.** (1) Depto Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Ciencias Químicas y Farmaceuticas, U. de Chile, (2) Depto Ciencias Neurológicas, Fac. Medicina, U. de Chile.

En Chile existe una alta incidencia mundial de infección por el virus HTLV-I que produce la denominada Paraparesia Espástica Tropical (TSP/HAM) y también de Creutzfeld-Jacob, enfermedad producida por prion. En ambas enfermedades existe neuro-degeneración, por lo que se ha propuesto que podría haber daños en la matriz extracelular (MEC) del SNC que dificultaría la regeneración neuronal. Las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) junto con sus proteínas tisulares inhibitorias (TIMPs) tienen un papel fundamental en el recambio normal de la MEC, por lo que alteraciones en el balance de MMPs y TIMPs podrían ser responsables de la dificultad en la neuroregeneración después de dichas infecciones.

Se ha determinado en líquido cefalorraquídeo (LCR) de ambos tipos de pacientes (HTLV-I, n=21; Creutzfeld-Jacob, n=5) y en controles, la presencia de MMP-2 y MMP-9 mediante análisis zimográfico, y los niveles de TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4, junto con MMP-7 mediante inmunoanálisis.

En este estudio preliminar de 5 pacientes con Creutzfeld-Jacob hemos encontrado que no hay aumento de TIMP-4 y hay una tendencia (aunque no estadísticamente significativa) de mayor nivel de TIMP-1, a diferencia de lo encontrado en LCR de pacientes con TSP/HAM. Además, en estos últimos enfermos hay una mayor incidencia de actividad de MMP-9 y mayor proporción de forma activa de MMP-2.

Financiado por Proyecto Fondecyt N° 1000-874.

**IV.5 FORMACIÓN DE TRIPLE HÉLICE ENTRE EL GEN DE LA DESHIDROGENASA ALDEHÍDICA MITOCONDRIAL (ALDH2) DE RATA Y OLIGONUCLEÓTIDOS DE DNA Y RNA: PROYECCIONES PARA TERAPIA GÉNICA DEL ALCOHOLISMO.** (Triple helix formation between the rat mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene and oligonucleotides.) **Encina G, Sapag A, Torres V, Moncada C, Israel Y.** Laboratorio de Farmacoterapia Génica, Fac de Cs. Químicas y Farmacéuticas e Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología. Univ. de Chile.

La inactivación farmacológica de la ALDH2 con disulfiram se utiliza como terapia para el alcoholismo porque resulta en una acumulación del acetaldehído circulante cuyos efectos sintomáticos producen aversión al consumo de alcohol. Una alternativa de mayor especificidad y menos efectos secundarios es el uso de oligonucleótidos formadores de triple hélice (OFTs) para inhibir la transcripción del gen. Los OFTs se unen antiparalelamente a secuencias de bases purínicas en el surco mayor del DNA blanco de doble hebra. Se diseñaron 6 OFTs fosforotioatos según las reglas G·G:C y T·A:T y se estudió la unión a sus secuencias blanco mediante ensayos de retardo electroforético. Uno de ellos se une específicamente a su secuencia blanco en el intrón 8. Se diseñaron dos OFTs adicionales dirigidos al mismo blanco: uno de RNA (fosfodiéster) según las reglas G·G:C y U·A:T y otro de DNA (fosforotioato) según las reglas G·G:C y A·A:T. Ambos forman triple hélice aunque con menor afinidad que el primero. Se determinó la expresión del gen en un cultivo de la línea celular H4-II-E-C3 de hepatoma de rata transfectado con los OFTs midiendo: a) los niveles de transcrito mediante RT-PCR y análisis con nucleasa S1 y b) la actividad enzimática mediante un ensayo con <sup>14</sup>C-etanol en el que se cuantifica la producción de <sup>14</sup>C-acetato.

Proyecto Milenio P-99-031-F; FONDECYT 1981047; Cátedra Presidente de la República.

**IV.6 INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA DESHIDROGENASA ALDEHÍDICA MITOCONDRIAL (ALDH2) DE RATA MEDIANTE OLIGONUCLEÓTIDOS FOSFOROTIOATOS (S-ODNs) DE ANTISENTIDO.** (Inhibition of the rat mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene expression by antisense phosphorothioate oligonucleotides.) **Lladser A, Sapag A, Moncada C, Israel Y.** Laboratorio de Farmacoterapia Génica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas e Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología. Universidad de Chile.

El etanol es oxidado en el hígado a acetaldehído por la deshidrogenasa alcohólica y luego a acetato por la ALDH2 (homotetrámero). La variante alélica ALDH2-2 (E487K), presente en la población asiática, genera una proteína inactiva (dominante negativa) que produce una acumulación de acetaldehído luego del consumo de alcohol. Sus efectos, enrojecimiento facial, disforia, náuseas, generan aversión a la ingesta de alcohol y una protección contra el alcoholismo.

El objetivo de este trabajo es desarrollar una terapia de aversión al alcohol inhibiendo específicamente la expresión del gen *ALDH2* mediante S-ODNs de antisentido. Se diseñaron 19 S-ODNs contra 4 regiones blanco del RNA (3 intrónicas y una exónica) con uno o más motivos GGGa en su secuencia. La inhibición se determinó en cultivo de células de hepatoma de rata H4IIIEC3 previamente transfectadas con los S-ODNs, cuantificando la cantidad de <sup>14</sup>C-acetato producido a partir de <sup>14</sup>C-etanol. Tres S-ODNs (dirigidos a los intrones 6, 4 y 11, con 1, 2 y 3 GGGAs respectivamente) son los más potentes en reducir la actividad de la ALDH2 (~50%) y son candidatos para estudios *in vivo*. Los resultados se confirmaron determinando por HPLC la acumulación de acetaldehído no metabolizado y cuantificando los niveles de mRNA. Proyecto Milenio P99-031F, FONDECYT 1981047, Cátedra Presidente de la República.

**IV.7 SEROLOGÍA DEL VIRUS HANTA: ESTUDIOS DE EPITOPOS VIRALES MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y SUEROS DE PACIENTES** (Serology of hantavirus: Studies of viral epitopes using monoclonal antibodies and patient sera). Tischler, N., Roseblatt, M., Jamett, A., Galeno H. y Valenzuela, P. Fundación Ciencia para la Vida, Instituto de Salud Pública de Chile e Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada, Av. Maratón 1943, Santiago.

El virus Hanta causa el Síndrome Pulmonar Agudo que es mortal en aproximadamente un 50% de los pacientes. Este virus pertenece a la familia Bunyaviridae y tiene tres hebras de RNA que codifican cuatro proteínas. Estas son las glicoproteínas G1 y G2 que forman la envoltura y dos proteínas internas, la nucleoproteína y la RNA polimerasa. En un primer esfuerzo hacia el desarrollo de una posible inmunoterapia estamos estudiando la localización de áreas inmunodominantes dentro las proteínas virales con el fin de identificar epitopos que nos orienten en la preparación de anticuerpos monoclonales que permitan la neutralización del virus durante la fase aguda de la infección. Para estos estudios se prepararon anticuerpos monoclonales contra péptidos sintéticos y proteínas de la nucleoproteína y la glicoproteína G1. Se obtuvieron 10 anticuerpos monoclonales contra la nucleoproteína que pertenecen a seis grupos epitópicos distintos demostrados por sus reactividades en ensayos de Western blot de la proteína viral digerida con enzimas proteolíticas y por ensayos con péptidos sintéticos. Además se obtuvieron 11 anticuerpos monoclonales contra un péptido de 42 aa, que representa un área aparentemente inmunodominante de la nucleoproteína. Estos anticuerpos forman 2 grupos epitópicos diferentes. Contra la glicoproteína G1 se obtuvieron tres anticuerpos monoclonales, los cuales reconocen a dos epitopos diferentes. La caracterización de 10 hibridomas adicionales para G1 está en progreso. Epitopos reconocidos por anticuerpos de pacientes se identificarán mediante dot-blot con 137 dodecapéptidos sintéticos que representan la secuencia completa de la nucleoproteína y de las 2 glicoproteínas. Resultados preliminares indican una posible diferencia entre pacientes fallecidos y sobrevivientes.

**IV.8 EL DOMINIO CARBOXILO TERMINAL DE LA PROTEÍNA VacA DE *Helicobacter pylori* ES AUTOSUFICIENTE PARA SU EXPORTACION A MEMBRANA EXTERNA EN *E. coli***. (The C-terminus domain of *H. pylori* VacA is self-sufficient for its exportation to the outer membrane in *E. coli*). Martínez, P., Díaz, M.I., Tobar, J., Bruce, E., y Venegas, A. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, Alameda 340, Santiago.

*H. pylori* exporta una citotoxina que causa vacuolización de las células epiteliales con el consiguiente daño para el epitelio gástrico. La citotoxina (VacA) es un oligómero con estructura hepta o hexamérica semejante a una flor que deja un poro central. Cada monómero está formado por 2 subunidades disímiles. El monómero se produce como un precursor de 140 kDa que es autosecretado. Esta función reside en el extremo carboxilo terminal del precursor (aproximadamente últimos 340 aa). Hemos aislado el gen VacA de una cepa chilena CHCTX-1 para estudiar independientemente los dominios presentes en el precursor. Mediante PCR se amplificaron las regiones correspondientes a las 2 subunidades y al extremo carboxilo terminal. Estas se clonaron y expresaron en *E. coli* JM109(DE3). Se aislaron 5 clones que expresan el carboxilo terminal (340 aa) de 39kDa detectado por PAGE-SDS. A pesar de carecer de un péptido señal, este dominio polipeptídico es detectado en la fracción de membrana externa de *E. coli*. Curiosamente, su expresión inhibe la expresión de las porinas OmpF y OmpC de *E. coli* detectables por Western blot. Previamente se ha detectado que sobreexpresión en *E. coli* de porinas heterólogas inhibe la síntesis de las porinas del hospedero. Se sugiere que la estructura beta plegada del dominio C-terminal de VacA imita una estructura de porina, lo que explicaría en parte la inhibición. A la fecha se realizan estudios de RT-PCR para determinar si la inhibición ocurre a nivel transcripcional o traduccional. Financiado por FONDECYT 1000730.

**IV.9 EL GEN *cagA* DE *Helicobacter pylori* EN CEPAS CHILENAS NO PRESENTA VARIACIONES DRÁSTICAS DE TAMAÑO EN LA REGION HIDROFÍLICA (A17) NI EN SUS REGIONES ALEDAÑAS** (The *Helicobacter pylori cagA* gene does not show drastic size variations at the hydrophilic central region neither at the adjacent regions). Palacios<sup>1</sup>, J.L., Valdivia<sup>1</sup>, A., Harris<sup>2</sup>, P. Bruce<sup>1</sup>, E. y Venegas<sup>1</sup>, A. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago. <sup>1</sup>Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas. <sup>2</sup>Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina.

Las cepas de *H. pylori* más agresivas (CagA+) transfieren la proteína CagA al epitelio gástrico luego de contacto directo. CagA es fosforilada por una Tirosina-quinasa eucariótica, interfiriendo en vías regulatorias de proliferación celular y del proceso inflamatorio post-infección. El gen *cagA* se ubica en un islote de patogenicidad de 40 kb que contiene los genes del aparato secretor de esta proteína. Existe gran variabilidad en la arquitectónica de los genes del islote de cepas de diverso origen geográfico, lo que se ha relacionado con variaciones en la agresividad microbiana. Un análisis de PCR del gen *cagA* y sus regiones aledañas en cepas de pacientes chilenos con diversas afecciones gástricas reveló que su secuencia y arreglo en el islote no difiere marcadamente. Esto contrasta con hallazgos en otros países que indican gran variabilidad. Al secuenciar el gen de una cepa chilena se encontró gran similitud con *cagA* de la cepa *H. pylori* 26695 (uno de los genomas bacterianos secuenciados). Un análisis de restricción preliminar de *cagA* de 8 cepas chilenas reveló patrones muy conservados. La comparación de secuencias aminoacídicas de CagA de cepas de diverso origen permite proponer la ocurrencia de deleciones que explican diversos genotipos.

Financiado por grants FONDECYT 1000730 y 1000734.

## V. INCORPORACIONES Y MISCELÁNEOS

## INCORPORACION

**V.1 16S rRNA EXTRAMITOCONDRIAL: UNA NUEVA MOLÉCULA RELACIONADA CON PROLIFERACIÓN CELULAR.** (Extramitochondrial 16S rRNA: A novel molecule related to cell proliferation) Villegas, J., Muller, I y Burzio, L. O. Fundación Ciencia Para La Vida, Millenium Institute for Fundamental and Applied Biology (MIFAB) y Bioschile Ingeniería Genética S.A. Av. Marathon 1943, Ñuñoa. Santiago.

Amplificación mediante RT-PCR de RNA extraído de cabezas de espermatozoides humanos y ensayos de hibridación in situ en esparcidos de espermatozoides demostraron claramente la localización nuclear del rRNA 16S mitocondrial. Esta localización nuclear no corresponde a la transcripción de un pseudogen mitocondrial presente en el núcleo lo que sugiere un fenómeno de transferencia de este RNA desde el organelo al núcleo del gameto. Nuestra hipótesis es que este RNA "paterno" tendría un rol en proliferación celular posterior a fecundación. Linfocitos humanos estimulados con el mitógeno PHA mostraron un alto nivel de expresión del rRNA 16S cuando se compararon con las células controles no estimuladas. Células HL-60 mostraron un alto nivel de expresión de este RNA. Cuando estas células son diferenciadas a macrófagos por tratamiento con ésteres de forbol (TPA), el nivel de expresión disminuyó drásticamente. De igual modo, células HeLa depletadas de suero fetal por 24 hr mostraron un bajo nivel del rRNA 16S. Expresión que es rápidamente recuperada posterior a la adición de suero. Por otro lado, células HeLa incubadas con oligos correspondientes al rRNA 16S muestran evidencias morfológicas características de apoptosis. Este efecto es específico, ya que tratamiento con oligos correspondientes al rRNA 12S o para el mRNA de ND1 no mostró efecto. Estos resultados sugieren que el rRNA 16S extramitocondrial tendría un rol activo en proliferación celular. FONDECYT 199-0230, 296-0062, MIFAB P-99007-F.

## INCORPORACION

**V.2 ELEMENTOS INVOLUCRADOS EN LA INDUCCIÓN POR ESTRÉS DEL GEN HSP70 DE TILAPIA (*O. mossambicus*)** (Elements involved in stress induction of the tilapia (*O. mossambicus*) HSP70 gene.) Molina A., Martial J.A\*, Muller M\*. Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias de la Salud, Univ. Andrés Bello e Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada. \* Lab. de Biol. Mol. et Génie Génétique, Université de Liège, Bélgica.

La proteína de shock térmico HSP70 está involucrada en el plegamiento de polipéptidos durante la síntesis de novo, el ensamblaje de proteínas a multi-subunidades, la translocación de proteínas a través de membranas, la estabilización de formas inactivas de ciertas proteínas (algunos receptores nucleares) y principalmente la estabilización de proteínas durante estrés celular.

Se aisló el gen, incluyendo 1kb de región reguladora, que codifica para la forma nuclear/citosólica de la proteína HSP70 de tilapia (tiHSP70) y se elaboró el primer estudio funcional de un promotor HSP en peces. Estudios de expresión transitoria en células en cultivo y en embriones de pez cebra revelaron que el promotor aislado es capaz de conferir una regulación transcripcional por estrés térmico a un gen reportero. Por otro lado, vía experimentos de deleciones y mutaciones puntuales, se demostró que el elemento HSE (heat shock element) distal es absolutamente necesario para la respuesta al shock térmico del gen tiHSP70.

Adicionalmente se obtuvo una línea celular conteniendo el promotor tiHSP70 fusionado a un gen reportero y se evaluó su capacidad de detectar una amplia variedad de inductores de estrés celular. El conjunto de estudios presentados revelan que el promotor tiHSP70 puede representar una interesante herramienta para dirigir la expresión, en células de peces, de un gen de interés en condiciones controladas y para la detección de estrés celular.

**V.3 FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA CK1 EN LA FORMACIÓN DEL CARTILAGO DE LA MANDÍBULA DEL PEZ CEBRA (*Danio rerio*).** (Function of the CK1 protein kinase in cartilage jaw formation). Antonelli, M<sup>1</sup>, Valenzuela, P<sup>1</sup>, Pino, L<sup>1</sup>, Allende, M<sup>2</sup>, Hopkins, N<sup>3</sup>. Programa de Biología celular y Molecular. ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile<sup>1</sup>, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile<sup>2</sup> y Center Cancer Research, MIT<sup>3</sup>. PEW, Latin American Fellows Program, Proyecto DID REIN-02/2001.

El progreso en el estudio del desarrollo embrionario de los organismos pluricelulares se ha fundamentado en la caracterización de un pequeño grupo de sistemas vivientes que nos han permitido utilizar una batería de técnicas moleculares, bioquímicas y genéticas. El sistema del pez cebra es el candidato ideal para la búsqueda y el estudio de genes reguladores involucrados en el control del desarrollo. Durante los últimos años ha sido desarrollada una técnica que consiste en mutagenizar el genoma del pez cebra en gran escala utilizando secuencias de DNA retrovirales para interrumpir los genes importantes para el desarrollo y producir un fenotipo anormal observable. Esta nueva tecnología permite identificar el gen responsable de un determinado fenotipo. La secuencia exógena de DNA insertada (o retrovirus) en el genoma del pez cebra, presenta la ventaja de permitir la rápida identificación molecular del gen mutado. De las mutantes encontradas, una de ellas presenta un fenotipo que afecta el desarrollo de las estructuras cartilaginosas relacionadas con la formación de la mandíbula y de las aletas pectorales del pez cebra. Análisis de PCR y secuenciación del DNA que rodea el segmento retroviral insertado en el genoma del pez cebra, muestra que esta inserción produce una interrupción dentro de un intrón en el gen codificante de la proteína quinasa CK1 $\alpha$ . Una segunda mutante con características similares en el desarrollo del cartilago de la mandíbula y de la aleta pectoral fue aislada dentro del mismo screening. El gen interrumpido en esta segunda mutante por la inserción viral es también CK1 $\alpha$ , en el mismo intrón de la primera mutante encontrada. El aislamiento de estas dos mutantes confirman que el fenotipo encontrado es efectivamente producido por una interrupción del gen de CK1. En estos momentos nos encontramos en la etapa de caracterización de estas mutantes.

**V.4 EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO INDUCIDO POR LINDANO SOBRE LOS NIVELES SÉRICOS DE TNF- $\alpha$  EN RATAS** (Effect of liver oxidative stress induced by lindane on serum TNF- $\alpha$  levels in the rat) Cornejo P, Fernández V, Videla L.A, Santander M P, Tapia G. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La administración de lindano desencadena un estrés oxidativo hepático en la rata, aumentando la producción de especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno y disminuyendo la actividad antioxidante del tejido. Esta condición pro-oxidativa activaría a NF- $\kappa$ B, factor de transcripción que regula la expresión de diversos genes relacionados con la respuesta inflamatoria, entre ellos el de TNF- $\alpha$ .

Para evaluar el efecto del estrés oxidativo, inducido por lindano, sobre la liberación de TNF- $\alpha$ , se cuantificaron los niveles séricos de la citoquina (ELISA) luego de la administración ip del insecticida (50 mg/kg) como también luego del pre-tratamiento con los antioxidantes  $\alpha$ -tocoferol (100 mg/kg) o N-acetilcisteína (1 g/kg), resultados que fueron correlacionados con la oxidación de proteínas hepáticas (índice de estrés oxidativo). Ratas Sprague Dawley recibieron (a) lindano; (b)  $\alpha$ -tocoferol; (c) N-acetilcisteína; (d)  $\alpha$ -tocoferol y lindano (e) N-acetilcisteína y lindano y (f) vehiculos de lindano,  $\alpha$ -tocoferol y N-acetilcisteína (controles). Los resultados muestran incrementos significativos en la oxidación de proteínas (4,6 veces) y del TNF- $\alpha$  sérico (45 veces), con disminución a valores control luego del pre-tratamiento con antioxidantes, lo que permite concluir que la mayor liberación de la citoquina estaría mediada por el estrés oxidativo inducido por lindano. Financiado por FONDECYT 1000887.

## V.5 EL ESTRÉS OXIDATIVO REPRESENTADO POR LIPOPROTEÍNAS OXIDADAS INDUCE APOPTOSIS EN LINFOCITOS EN REPOSO: PARTICIPACIÓN DE LAS CASCADAS DE MAP QUINASAS

(Oxidized low density lipoproteins induce apoptosis in resting human lymphocytes: involvement of mitogen-activated protein kinases). <sup>1</sup>Bustamante, M. E., <sup>1</sup>Díaz, F., <sup>1</sup>Pincheira, S., <sup>2</sup>Gross, H.-J., <sup>2</sup>Grünert, A., <sup>2</sup>Bachem, M., <sup>1</sup>González, M., <sup>1,4</sup>Ibañez, P., <sup>1,4</sup>Escobar, C., <sup>4</sup>Maulén, N. & <sup>4</sup>Vera, J. C. <sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Católica de la Santísima Concepción. <sup>2</sup>Instituto de Química Clínica, Universidad de Ulm, Alemania, <sup>3</sup>Departamento de Química Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, <sup>4</sup>Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

La apoptosis juega un importante rol en varios procesos biológicos, tales como la homeostasis tisular, desarrollo fetal o diferenciación de células inmunes. El estrés oxidativo aumenta las especies reactivas del oxígeno, lo que provoca la oxidación de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y baja densidad (LDL). Las lipoproteínas oxidadas son citotóxicas e inducen la apoptosis celular, activando las cascadas de transducción de señales. Hemos investigado la participación de las cascadas de MAP quinasas ( $p^{42-44}$  y  $p^{38}$ ) sobre la apoptosis inducida por VLDL y LDL oxidadas en linfocitos humanos en reposo. Para ello, ensayamos el efecto de inhibidores de las MAP quinasas (Inhibidor de MEK e inhibidor de p38 MAP) sobre linfocitos aislados de sangre periférica. La apoptosis se monitoreó por microscopía de inmunofluorescencia y citometría de flujo, determinándose unión de anexina V, expresión de Apo 2.7 y TUNEL. Se complementó, con ensayos Western blot, el clivaje de Poli ADP ribosa polimerasa (PARP) y la expresión de BCL-2. Nuestros resultados demuestran que las lipoproteínas oxidadas inducen la apoptosis de linfocitos, aumentan el clivaje de PARP y disminuyen la expresión de BCL-2. Más aún, estos efectos pueden ser bloqueados por inhibidores de las cascadas de MAP quinasas. En conclusión, el estrés oxidativo, representado por las lipoproteínas oxidadas, es capaz de inducir apoptosis en linfocitos humanos en reposo y en este proceso apoptótico participarían las cascadas de las MAP quinasas.

## V.6 EVIDENCIAS DE ADAPTACION CROMÁTICA EN EL FICOBILISOMA DE *Gracilaria chilensis* (Evidence of chromatic adaptation in phycobilisomes from *Gracilaria chilensis*)

Bruna, C.; Martínez-Oyanedel, J. y Bunster, M. Laboratorio de Biofísica Molecular, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. DIUC 99081084-1.0

Los Ficobilisomas (PBS), o complejos auxiliares de fotosíntesis, están compuestos por proteínas fluorescentes o ficobiliproteínas (PBPs) y proteínas de unión, las cuales se organizan formando un sistema que capta y conduce luz eficientemente hacia los centros fotoactivos en cloroplastos de algas eucarióticas.

Se estandarizó un protocolo de extracción de PBS desde el alga roja pluricelular *Gracilaria chilensis*. Estos contienen 3 PBPs: ficoeritrina (PE), ficocianina (PC) y aloficocianina (APC); y la espectroscopia de fluorescencia confirma que APC es el aceptor final de energía. Utilizando SDS-PAGE se determinó que además está compuesto por 8 proteínas de unión. Al cuantificar las PBPs de PBS obtenidos en distintas épocas del año, se detectaron diferencias en la relación porcentual entre estas, revelando que la PE unida disminuye de invierno a verano. Lo cual se confirma, en micrografías de muestras de verano, en las que se observan complejos incompletos. Ficoeritrina es la PBP periférica. Debido a que es la que contiene el mayor número de cromóforos/mol, su liberación desde el PBS constituye una adaptación a la diferente calidad y cantidad de luz.

Se han planteado evidencias de adaptación cromática en algas unicelulares, y nuestros resultados indican que este concepto también es aplicable a algas eucarióticas pluricelulares, demostrando que el PBS de *Gracilaria chilensis* es un complejo dinámico que responde a las condiciones luminosas con cambios en su composición ficobiliproteica.

## VI. TRANSPORTADORES

### VI.1 INTERACCIÓN DIFERENCIAL DE INHIBIDORES DE TIROSINAS QUINASAS CON SITIOS DE UNIÓN ENDO- Y EXOFACIALES DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT1 (Differential interaction of tyrosine kinase inhibitors with endo- and exofacial binding sites of GLUT1).

Reyes, A. M., Andrade, C., Monsalve, R. y Llénenes, A. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia (email: areyes@uach.cl).

Inhibidores de tirosinas quinasas, tanto naturales como sintéticos, inhiben el transporte de hexosas mediado por GLUT1 (Vera *et al.* Biochemistry 40, 777-790, 2001). Estos inhibidores pueden catalogarse en dos tipos, dependiendo de sus efectos sobre el transporte: los de tipo I bloquean en forma competitiva la actividad de transporte de GLUT1, mientras los de tipo II lo hacen en forma no competitiva. Estas diferencias pueden explicarse por interacción selectiva de los distintos inhibidores a sitios de unión endo- o exo-faciales en GLUT1. Analizamos este punto estudiando el transporte de metilglucosa en eritrocitos humanos, en condiciones de intercambio en equilibrio y trans-cero de entrada y salida en presencia de los inhibidores. Seleccionamos como inhibidores de tipo I genisteína y tirfostina B46, y tirfostina A47 como inhibidor tipo II. Genisteína y las tirfostinas inhibieron competitivamente el intercambio en equilibrio de metilglucosa a 4°C. con valores de  $K_i$  entre 10 y 30  $\mu$ M, indicando que estos compuestos compiten por la unión con el sustrato en un sitio externo o interno del transportador. Asimismo, genisteína y tirfostina B46 fueron capaces de bloquear competitivamente en ensayos de entrada de metilglucosa, pero ambos mostraron ser inhibidores no-competitivos en ensayos de salida. En contraste, tirfostina A47 se comportó como un inhibidor no-competitivo en ensayos de entrada, pero inhibió competitivamente la salida de metilglucosa desde las células. Nuestros datos indican que genisteína y tirfostina B46 se unirían a un sitio accesible externamente en GLUT1, mientras tirfostina A47 se ligaría a un sitio del transportador accesible por su cara interna. (Financiado por FONDECYT 1981018 y DID-UACH PEF 2001-02.)

### VI.2 CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE ACIDO ASCORBICO SVCT2 EN CELULAS DE MELANOMA HUMANO (Characterization of the Ascorbic Acid Transporter SVCT2 in Human Melanoma Cells).

Godoy, AS., Montecinos, VP y Vera, JC. Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

La forma reducida de la vitamina C (ácido ascórbico), es transportada por una familia de proteínas denominadas SVCTs, con dos miembros descritos hasta el momento, SVCT1 y SVCT2. Estudios preliminares de caracterización funcional en ovocitos de *X. laevis* han revelado resultados contradictorios respecto a los parámetros cinéticos asociados al transporte de L-ascorbato. Asimismo, no existen estudios funcionales detallados en células que expresen endógenamente cada uno de estos transportadores en forma aislada. Hemos llevado a cabo un completo análisis funcional para caracterizar el transporte de L-ácido ascórbico en células de melanoma humano (GMEL). Los experimentos de transporte, RT-PCR e inmunolocalización revelaron la presencia de SVCT2 en células GMEL. La  $K_m$  de transporte fue de 18  $\mu$ M, con una  $V_{max}$  de 230 pmoles/10<sup>6</sup> células/min. La dependencia de la dosis para la activación por sodio demostró una relación sigmoidal entre la velocidad de captación de ascorbato y la concentración de sodio. El coeficiente de Hill para el efecto del sodio fue de 1.9, lo que sugiere una cooperatividad positiva. La  $K_m$  para el transporte de ascorbato fue fuertemente dependiente de la concentración de iones sodio bajo 50 mM, sugiriendo que la acción del sodio estaría relacionada con la modificación de la afinidad del transportador por el sustrato. El transporte de ascorbato fue afectado por valores de pH bajo 7.0, con un pH óptimo entre 7 y 7.5, lo que estaría relacionado con el efecto del sodio. La importancia de estos estudios radica en la obtención de información básica inicial para futuros análisis de estructura-función. FONDECYT 1990333 y DIUC 201034006-14.

**VI.3 EXPRESION DIFERENCIAL DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN CELULAS ENDOTELIALES DE MICROVASCULATURA CEREBRAL.** (Glucose transporter expression and function in brain microvascular endothelial cells). Azócar, L., Vásquez, O., Montecinos, V., Guzmán, C., Vera, J.C., Cárcamo, J.G. Departamento de Fisiopatología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Para modelar *in vitro* el comportamiento de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica hemos utilizado líneas celulares inmortalizadas de endotelio de microvasculatura de cerebro humano. Estudios cinéticos del transporte de los análogos de glucosa DOG y OMG en dos líneas endoteliales de cerebro humano revelan la presencia de dos componentes cinéticos, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad, mientras que sólo un componente se detecta en una línea celular de endotelio vascular periférico. El componente de alta afinidad correspondería a GLUT1, previamente descrito en endotelio cerebral y endotelio periférico, mientras que el componente de menor afinidad pareciera no corresponder a alguno de los transportadores de glucosa caracterizados hasta ahora. Estudios de captación en presencia del inhibidor genisteína muestran un efecto diferencial sobre estos componentes, permitiendo caracterizar funcionalmente el componente de baja afinidad. Estudios de RT-PCR e inmunofluorescencia revelaron la expresión de GLUT1 y GLUT9 en las dos líneas de endotelio cerebral, mientras que solamente GLUT1 estaría presente en las células de endotelio periférico. Así, GLUT9 sería expresado selectivamente en las células endoteliales de barrera hematoencefálica pero no en endotelio periférico. Estos estudios sugieren que la captación de glucosa a nivel del endotelio cerebral, y por ende el transporte vectorial de glucosa desde la circulación hacia el cerebro, sería a un proceso altamente complejo que requeriría la participación de al menos dos transportadores de glucosa.

FONDECYT 1990333 y 3000024, y DIUC 201034006-14.

**VI.4 PENTOXIFILINA BLOQUEA COMPETITIVAMENTE AL TRANSPORTADOR FACILITATIVO DE HEXOSAS GLUT1 EN ERITROCITOS HUMANOS** (Pentoxifylline competitively blocks the facilitative hexose transporter GLUT1 in human erythrocytes). Castro, M., Vera, J.C.<sup>1</sup> y Reyes, A.M. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia y <sup>1</sup>Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. (email: [areyes@uach.cl](mailto:areyes@uach.cl)).

GLUT1 es una proteína transportadora de hexosas que se expresa ubicuamente en células y que es responsable del transporte basal de glucosa. GLUT1 transporta también vitamina C oxidada. En esta comunicación presentamos evidencia indicando que pentoxifilina, una metilxantina que se ha empleado en el tratamiento de enfermedades vasculares periféricas, es un eficiente inhibidor de la actividad funcional de GLUT1. Con el propósito de caracterizar el mecanismo de la inhibición por pentoxifilina, estudiamos el efecto de esta molécula en el transporte de metilglucosa, desoxiglucosa y de ácido deshidroascórbico en eritrocitos humanos, células que contienen niveles elevados de GLUT1. Pentoxifilina inhibió la entrada de los sustratos de GLUT1 con un valor de  $K=3$  mM, el bloqueo fue de carácter competitivo y la acción inhibitoria fue instantánea. Al probar otras metilxantinas encontramos que cafeína fue menos eficiente en bloquear la actividad de GLUT1 ( $K=30$  mM), mientras teofilina y teobromina no inhibieron. Asimismo, estudios de unión muestran que pentoxifilina inhibió en forma competitiva la unión desplazable por D-glucosa de citocalasina B a las membranas de eritrocitos. Los datos indican entonces que estos compuestos bloquean la actividad del transportador GLUT1 por unión directa con la proteína. Estos resultados enfatizan la propiedad de GLUT1 de interactuar con moléculas no relacionadas estructuralmente con los sustratos transportables.

FONDECYT 1981018, 1990333, DID-UACH PEF 2001-02 y DIUC 201034006-1.4.

**VI.5 EXPRESIÓN Y REGULACION DIFERENCIAL DE TRANSPORTADORES DE VITAMINA C EN CELULAS INTESTINALES HUMANAS CaCo-2.** (Differential expression and regulation of Vitamin C transporters in human intestinal cells CaCo-2). <sup>1</sup>Henríquez, E.A., <sup>1</sup>Kempe, S.S., <sup>2</sup>Bustamante, M.E., <sup>1</sup>Vera, J.C., y <sup>2</sup>Maulén, N.P. <sup>1</sup>Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, y <sup>2</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Católica de la Santísima Concepción.

El transporte transcelular a través de la barrera intestinal es la etapa limitante en la adquisición de la vitamina C por los seres humanos. Las células CaCo-2 han sido utilizadas para modelar el comportamiento *in vitro* de células de intestino humano. Hemos identificado y caracterizado las propiedades funcionales, y estudiado la expresión de transportadores de vitamina C en células CaCo-2. Estudios de transporte revelaron que las células CaCo-2 transportan vitamina C reducida (ácido ascórbico) a través de transportadores de sodio-ácido ascórbico, y vitamina C oxidada (ácido deshidroascórbico) a través de transportadores facilitativos de glucosa. Análisis de expresión utilizando RT-PCR e inmunolocalización permitió identificar los transportadores de sodio-ascorbato SVCT1 y SVCT2, y los transportadores de ácido deshidroascórbico GLUT1 y GLUT2 en las células CaCo-2. Cuantificación por RT-PCR de tiempo real seguida por análisis funcional reveló que la diferenciación *in vitro* de las células CaCo-2 está asociada a la regulación de la expresión de los transportadores SVCT1 y SVCT2. Estos resultados tienen un impacto directo sobre nuestro entendimiento de la regulación de la adquisición de vitamina C a nivel intestinal. Así, es posible que la expresión y segregación diferencial de transportadores SVCT/GLUT en el enterocito diferenciado permita el transporte vectorial de vitamina C desde el lumen intestinal a la sangre, similar al fenómeno descrito en el sistema SGLT/GLUT para el transporte de glucosa. FONDECYT 3990007 y 1990333, y DIUC 201034006-14.

**VI.6 UNIÓN ESPECÍFICA DE PEROXIDASA A LA PROTEÍNA QUE UNE ÁCIDOS GRASOS (I-FABP) EN MEMBRANAS APICALES DE ENTEROCITOS DEL PEZ *Cyprinus carpio*.** (Specific binding of peroxidase to intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) in apical membranes of *Cyprinus carpio* enterocytes). Santander, C., Concha, M.I., Villanueva, J y Amthauer, R. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

En el intestino del pez *Cyprinus carpio*, peroxidasa (HRP) es endocitada y luego por transcitosis alcanza la membrana basolateral donde es liberada en forma intacta. Estos antecedentes sugieren la participación de receptores en la internalización de HRP. Consistente con esta hipótesis hemos demostrado que HRP se une en forma específica a membranas de ribete en cepillo (BBM) aisladas del intestino de la carpa. Más aún, utilizando un ensayo de "ligand blot", hemos detectado en diferentes preparaciones de BBM, la unión de HRP en forma específica a una sola banda de proteína de 15,3 kDa. Adicionalmente, se demostró que ésta corresponde a una proteína periférica de membrana. La identificación de esta proteína se realizó mediante una digestión triptica *in situ* de la banda y secuenciación de los péptidos generados. Estos representaron en conjunto el 25% de la secuencia total y presentaron sobre un 90% de identidad de residuos con la I-FABP del pez cebra. I-FABP pertenece a una familia conservada de proteínas de 14-15 kDa de localización preferentemente citoplasmática, que unen ácidos grasos y otros ligandos. Análisis de Western e inmunohistoquímica demostraron que en la carpa, I-FABP se localiza tanto en el citoplasma como en membrana apical en enterocitos. Además se demostró que ambas fracciones de I-FABP unen ácido palmítico. Los resultados sugieren que I-FABP corresponde al putativo receptor para HRP y que en la carpa esta proteína tiene una localización atípica.

Financiamiento: Fondecyt 1980993. DID-UACH S-200121

**VI.7 PAPEL ESENCIAL DEL TRIPÉPTIDO GLUTATIÓN EN LA ACUMULACION DE VITAMINA C EN CELULAS INTESTINALES HUMANAS CaCo-2 (2001).** (Vitamin C accumulation in human CaCo-2 cells is critically dependent on glutathione). <sup>1</sup>Kempe, S.S., <sup>1</sup>Henríquez, E.A., <sup>2</sup>Vera, J.C., y <sup>2</sup>Maulén, N.P. <sup>1</sup>Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, y <sup>2</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Católica de la Santísima Concepción.

Estudios de acumulación de vitamina C en distintos tipos celulares apuntan a la existencia de una serie de mecanismos celulares distintos, dependientes e independientes de glutatión, con la capacidad para mantener la vitamina C intracelular en su forma reducida. Las células CaCo-2 representan un modelo ampliamente utilizado para el estudio *in vitro* de las propiedades de células intestinales humanas. Las células CaCo-2 transportan las formas reducida (ácido ascórbico) y oxidada (ácido deshidroascórbico) de la vitamina C, pero aparentemente acumulan solamente vitamina C reducida. Evaluamos el rol del glutatión en la captación y acumulación de vitamina C en las células CaCo-2 utilizando tratamiento con L-Butioninsulfoximina (BSO), un inhibidor de la síntesis de glutatión. El tratamiento con BSO disminuyó el contenido intracelular de glutatión desde aproximadamente 15 mM a valores inferiores a 0.1 mM, sin afectar el crecimiento y la viabilidad celular. Células CaCo-2 depletadas de glutatión fueron incapaces de acumular concentraciones elevadas de vitamina C intracelular, y también mostraron cambios en su capacidad para reciclar la vitamina sin que, por otro lado, se afecte el transporte de la vitamina. Nuestros resultados indican que el elevado contenido de glutatión de las células CaCo-2 estaría relacionado con su participación en los mecanismos que regulan la capacidad de estas células para reciclar y mantener elevadas concentraciones intracelulares de vitamina C. FONDECYT 3990007 y 1990333, y DIUC 201034006-14.

**VI.8 GENES INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS Y EXCRECIÓN DE GLUTATIÓN ESTÁN COORDINADAMENTE REGULADOS EN EL HÍGADO DE RATÓN.** (Genes involved in glutathione synthesis and excretion are coordinately regulated in the mouse liver). Rocco, C., Wielandt, A.M., Vollrath, V. y Chianale, J. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Patrocinante: P. Carvallo

La excreción de diversos aniones orgánicos conjugados con glutatión (GSH) a la bilis está mediada por el transportador canalicular de aniones orgánicos multiespecífico (cMoat). Hemos mostrado previamente que el antioxidante fenólico BHA aumenta la excreción y síntesis de GSH en el hígado de ratón debido a una inducción transcripcional de los genes cMoat y  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa ( $\gamma$ GCS-HS), enzima limitante de la síntesis de GSH. Observamos además, un aumento de la expresión del gen GST-Ya, responsable de la conjugación de xenobióticos con GSH, sugiriendo que estos tres genes están coordinadamente regulados en el hígado de ratón. Por otro lado, se ha comunicado que la expresión de mRNA de cMoat está disminuida en hígado de ratas inyectadas con endotoxina (lipopolisacárido, LPS). Con estos antecedentes, estudiamos el efecto de LPS en la regulación de la expresión de los genes cMoat,  $\gamma$ GCS-HS y GST-Ya, en el hígado de ratones que consumieron dieta suplementada con BHA. En ratones tratados con BHA y que fueron inyectados con LPS i.p. observamos, a las 16 h., una significativa inhibición de la sobreexpresión, mediada por BHA, de los tres genes estudiados.

Estos resultados sugieren que los genes involucrados en la síntesis y excreción de GSH comparten mecanismos comunes de regulación transcripcional en respuesta a xenobióticos. Trabajo financiado por FONDECYT 1990510.

## VII. BIOLOGÍA MOLECULAR

**VII.1 LA SECUENCIA COMPLETA DEL GENOMA MITOCONDRIAL DEL SALMÓN CHINOOK ONCORHYNCHUS TSHAWYTSCHA.** (The complete sequence of the mitochondrial genome of the chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*). Wilhelm, V., Bernales, B., Villegas, J., Miquel, A., Martínez, R., Engel, E., Burzio, L.O. y Valenzuela, P. Fundación Ciencia para la Vida e Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada, Av. Maratón 1943, Santiago.

El salmón chinook es una especie importante en la industria salmonicultora en Chile. El genoma mitocondrial es un excelente marcador para estudios filogenéticos y poblacionales de esta especie. Esto debido a su escasa actividad de recombinación y a su modo de herencia de tipo maternal.

Recientemente hemos determinado la secuencia completa del genoma mitocondrial de esta especie. El DNA mitocondrial se purificó mediante un procedimiento que utiliza desoxirribonucleasa para eliminar el DNA cromosomal. La secuencia se realizó en fragmentos de aproximadamente 1000 pares de bases obtenidos por nebulización y clonados en el vector pIK-96.

El genoma circular consiste de 16.664 pares de bases las cuales codifican para 13 proteínas, los RNA ribosomales de 12S y 16S y 22 RNA de transferencia. Estos genes están ordenados del mismo modo que en el genoma mitocondrial de otros vertebrados. La secuencia nucleotídica de los genes y las secuencias aminoacídica de las proteínas correspondientes se han comparado con aquellas de otros peces, incluyendo especies salmonídeas tales como *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar*, *Salvelinus alpinus* y *Coregonus lavaretus*. Se describen y discuten las características estructurales de la región de control y el origen de la replicación de la hebra L. La secuencia se ha depositado en Gene Bank bajo el número AF 392054.

**VII.2 RNA QUIMÉRICO MITOCONDRIAL EN HUMANOS** (Human Chimeric Mitochondrial RNA) Villota C., Villegas J., Martínez R., Müller I. y Burzio L. O. Fundación Ciencia para la Vida, Millenium Institute for Fundamental and Applied Biology (MIFAB) y Bios Chile Ingeniería Genética S.A. Avenida Marathon 1943 Nuñoa, Santiago, Chile

Previamente se aisló de testículo de ratón clones correspondiente al RNA mitocondrial 16S más un repetido invertido (RI) de 120 nucleótidos unido al extremo 5'. Como la transcripción de ambos componentes del transcrito dependen de diferentes promotores mitocondriales, hemos sugerido denominarlo RNA quimérico. Hemos clonado el RNA quimérico humano a partir de RNA total de testículo y de células HL-60, HepG2 y HeLa. Las secuencias nucleotídicas de 14 clones tienen un 100% de identidad y muestran que el RI es de 184 nucleótidos. Estos resultados sugieren que el tamaño del RI parece estar relacionado con la especie, lo cual ha sido confirmado con la secuencia de algunos clones obtenidos de células COS-7 de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). En esta especie el RI es de 189 nucleótidos muy semejante al humano y mayor que el de roedores que fluctúa entre 110 y 120 nucleótidos. Mediante hibridación *in situ*, se determinó que el RNA quimérico esta localizado en el núcleo de espermios y células espermatogónicas humanas. Además en células tumorales existe una marcada sobreexpresión de este RNA, lo que sugiere una correlación funcional entre la presencia de este y proliferación celular. Se discutirán resultados que muestran la importancia de la expresión de este novedoso transcrito mitocondrial y la mantención del estado proliferativo de la célula (FONDECYT 1990230; MIFAB P-99007-F)

**VII.3 ELEMENTOS *cis* DE RECONOCIMIENTO DE LOS SITIOS DE EDICIÓN EN RNAs MITOCONDRIALES DE PLANTAS** (*cis*-recognition elements in plant mitochondria RNA editing). León, G.<sup>1</sup>, Farré, J.-C.<sup>2</sup>, Jordana, X.<sup>1</sup> y Araya, A.<sup>2</sup>

(1) Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. (2) Laboratoire de Réplication et Expression des Gènes Eucaryotes et Rétroviraux. CNRS et Université Victor Segalen-Bordeaux II, France.

La edición de RNAs en mitocondrias de plantas consiste en la modificación de C a U en sitios específicos de los RNAs. Para determinar los elementos en *cis* involucrados en el reconocimiento de un sitio de edición se utilizaron construcciones que contenían al gen mitocondrial *coxII* silvestre y al gen *coxII* en que se modificó el entorno de un sitio de edición por mutagénesis sitio dirigida o deleciones. Estas construcciones fueron introducidas mediante electroporación en mitocondrias aisladas, una técnica recientemente descrita en nuestro laboratorio (Farré y Araya, *Nucl. Acids Res.* 29, 2484, 2001). Se demostró que los genes introducidos son transcritos, los transcritos son procesados (splicing de un intrón) y editados. El análisis de los mutantes estableció que solo un número restringido de nucleótidos adyacentes a la C editada son necesarios para el reconocimiento del sitio de edición. Estos estudios constituyen por ahora los más detallados respecto a la definición de los elementos de secuencia que determinan la especificidad de la edición. Financiado por el "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" (Francia), el "Conseil Régional d'Aquitaine (Pôle Génie Biologique et Médical)" (Francia) y el proyecto C98B01 ECOS-CONICYT.

**VII.4 CARACTERIZACIÓN DE GENES NUCLEOLARES EN *C. carpio*.** (Characterization of *C. carpio* nucleolar genes). Quezada, C., Alvarez, M., Molina, A., Pinto, R., Navarro, C., Vera, M. Laboratorio Biología Celular y Molecular, Universidad Andrés Bello e Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada.

La segregación de los componentes nucleolares en células hepáticas y de pituitaria es uno de los rasgos fenotípicos más peculiares que se observa en carpas adaptadas a las condiciones ambientales de invierno. La segregación nucleolar refleja la inactivación temporal de la biogénesis ribosomal. No obstante en verano, los componentes nucleolares entremezclados muestran una actividad de síntesis normal.

La regulación estacional de la expresión génica nucleolar de la carpa se ha abordado a través de la caracterización de genes como el que codifica para la proteína ribosomal L41 y nucleolina. Ésta última es la proteína más abundante en nucléolo y participa en múltiples etapas de la biogénesis ribosomal, incluyendo la regulación de la transcripción de rRNA. Así, es de particular interés correlacionar la reprogramación nucleolar observada en la carpa con la actividad de nucleolina durante aclimatización.

Con este propósito, hemos aislado y secuenciado un clon de cDNA de nucleolina en hígado de carpa que codifica para los cuatro dominios de unión a RNA además del dominio rico en glicina y arginina del extremo C-terminal, existiendo aparentemente dos transcritos de distinto tamaño. Asimismo, utilizando como sonda un clon de cDNA conteniendo la totalidad de la región codificante del gen de L41, se rastreó una biblioteca genómica de carpa obteniéndose dos recombinantes positivos que están siendo caracterizados. La expresión estacional de ambos genes está siendo evaluada por northern blot y RT-PCR en diferentes tejidos. FONDECYT 1000-061, DI-UNAB 58-A/99, 59-A/99, 61-A/99. (E-mail: mvera@abello.unab.cl)

**VII.5 CLONAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL COPEPTIN ASOCIADO AL PRECURSOR DE ISOTOCINA EN *Cyprinus carpio*.** (Cloning, characterization and purification of the copeptin, associated to the precursor of isotocin in *Cyprinus carpio*.)

Figueroa, J., Soto, M., Barra, V. y Kausel, G. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. (jfigueroa@mercurio.uach.cl)

Prolactina (PRL) hipofisaria en el pez *C. carpio*, presenta un dramático cambio en su expresión durante la aclimatización estacional reversible motivada por el fotoperíodo y la temperatura, lo que sugiere un rol vital de esta hormona en la adaptación de este pez. Entre los factores que afectan la liberación de PRL se ha postulado al Copeptin, un motivo polipeptídico de aproximadamente 30-40 amino ácidos que forma parte del extremo carboxilo terminal de las poliproteínas arginina-vasotocina e isotocina.

A partir de una biblioteca genómica de carpa se aisló, subclonó y obtuvo la secuencia parcial de Isotocina (Ac.Nº AF32651). De la secuencia aminoácídica deducida, se generaron anticuerpos policlonales contra un péptido sintético de 16 amino ácidos correspondiente al extremo carboxilo del Copeptin (cCp).

A partir de extractos en ácido acético de proteínas de pituitaria de carpa, se purificó este polipéptido por HPLC a través de una columna de C18 utilizando el anticuerpo cCp como herramienta para identificar el pick correspondiente. Paralelamente, se montó la técnica de cultivo in vitro de explantes de pituitaria en medio L199 a 24°C, en los cuales estamos probando el efecto inductor del Copeptin en la liberación de PRL por métodos inmunocitoquímicos y análisis de Western-blot con anticuerpos anti-PRL de carpa.

Financiado por Proyecto FONDECYT 1990710

**VII.6 COPEPTIN, UN POSIBLE FACTOR INDUCTOR DE LIBERACIÓN DE PRL, INMUNOLocaliza EN AXONES ADYACENTES A CÉLULAS LACTOTROPAS EN PITUITARIA DE *C. carpio*.** (Copeptin, a possible PRL releasing factor, localizes in axons adjacent to lactotrophs cells in pituitary of *C. carpio*.)

Flores, C., Muñoz, D., Kausel, G., Barra, V., y Figueroa, J. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. (jfigueroa@mercurio.uach.cl)

En el ectotermo *C. carpio*, prolactina (PRL) presenta una dramática variación en su expresión durante su aclimatización. En la regulación podría estar involucrado el copeptin, un dominio de aproximadamente 30 amino-ácidos que en peces está presente en el carboxilo terminal de los precursores polipeptídicos de arginina-vasotocina (AVT) e isotocina (IT).

De la secuencia aminoácídica derivada de la secuencia génica del precursor de IT (Ac.Nº:AF322651), se diseñaron oligopéptidos y se prepararon dos anticuerpos, uno contra el dominio copeptin (cCp) y otro contra el dominio neurofina (cNp). Por Western blot ambos sueros, detectan una banda de 29kDa en extractos de proteínas totales de pituitaria de carpa, sugiriendo que el copeptin no está disociado del precursor polipeptídico. En cortes de hipófisis los anticuerpos cCp y cNp claramente inmunotifien axones que ingresan a la pituitaria y que se desvían hacia la *rostral pars distalis*. La relación morfológica de células que producen PRL con los axones que reaccionan con cCp y/o cNp se corrobora por inmunocitoquímica doble, estableciendo una intimidad estructural entre células lactotropas (anti-PRL) y los axones hipotalámicos (anti-cCp y/o -cNp). Actualmente realizamos ensayos in vitro de inducción de la liberación de prolactina en explantes de pituitaria. Financiado por Proyecto FONDECYT 1990710.

**VII.7 CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR DE PROLACTINA Y DE SU EXPRESIÓN DURANTE LA ACLIMATIZACIÓN DEL PEZ *C. carpio*.** (Characterization of *C. carpio* prolactin receptor and its expression during acclimatization) **San Martín, R., Azocar, R., Molina, A. y Krauskopf, M.** Laboratorio Biología Celular y Molecular, Universidad Andrés Bello e Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada.

El pez teleosteo euritermal *C. carpio* es capaz de compensar las variaciones estacionales de su hábitat, donde la temperatura y el fotoperiodo son de particular relevancia. A nivel molecular, postulamos que la hipófisis juega un importante papel en la transducción de las señales ambientales. En particular, la hormona prolactina sería un mediador de la respuesta sistémica del pez. Estudios previos han demostrado que en carpas aclimatizadas a invierno tanto la transcripción como el contenido de la hormona decrece. Del mismo modo, en carpas aclimatadas a cortos fotoperiodos y temperaturas invernales la expresión de prolactina disminuye.

Con el propósito de correlacionar la expresión de la hormona con su señalización, durante la aclimatización del pez, hemos abordado el estudio del receptor de prolactina de carpa (cPRLR). Consecuentemente, hemos obtenido una secuencia de cDNA correspondiente al cPRLR. Este cDNA codifica para una proteína de 604 aminoácidos similar a la forma larga del receptor descrito previamente en mamíferos y peces. Mediante análisis de hidrofobicidad determinamos que cPRLR consiste de un péptido señal (22 aa), un dominio extracelular (208 aa), un solo dominio de transmembrana (24 aa) y un dominio intracelular (350 aa). La proteína receptora presenta los dominios conservados que activan la vía Jak-Stat. Ensayos de northern blot revelan la existencia de isoformas del transcrito del receptor. Consistente con nuestra hipótesis demostramos que la expresión de cPRLR en diferentes tipos celulares es modulada estacionalmente. UNAB DI 60-A/99

**VII.8 LA SPH CISTEIN-PROTEASA ES NUCLEAR Y EXHIBE UN COMPORTAMIENTO MIGRATORIO POST-FECUNDACIÓN.** (The SpH cysteine-protease is nuclear and it exhibits a behavior migratory post-fecundation). **Morin, V.; Concha, C.; Genevière, A.M.; Puchi, M.; Imschenetzky, M.** Departamento de Biología Molecular, casilla 160 - C, Universidad de Concepción. Observatorio de Oceanología de Banyuls, UMR, Banyuls sur-Mer, Francia.

Hemos caracterizado una cistein-proteasa (SpH-proteasa) que participa en la remodelación del pronúcleo masculino en cigotos de erizo de mar. Esta enzima se activa post-fecundación y degrada en forma selectiva histonas de espermatozoides (SpH), sin afectar a las variantes de histonas maternas (CS). Estas variantes de histonas CS se protegen de la proteólisis debido a que se encuentran extensamente poli-ADP-(ribosiladas). Paralelamente se ha determinado que la presencia de fosforilación en histonas de espermatozoide las protege transitoriamente de la proteólisis. La SpH-proteasa se purificó a homogeneidad y se determinó la secuencia aminoácida parcial a partir de su extremo N-terminal. Análisis en la base de datos indican que esta secuencia presenta homología con cistein-proteasas de otros orígenes. En base a esta secuencia se obtuvieron anticuerpos anti-SpH-proteasa que reconoce específicamente a la SpH-proteasa en la fracción cromatina tanto en óvulos no fecundados como en cigotos presentes durante el primer ciclo celular post-fecundación. Análisis de inmunolocalización utilizando este anticuerpo, mostró que la proteasa presenta una distribución perinuclear en óvulos no fecundados. Post-fecundación y previo a la primera mitosis la proteasa se localiza al interior del núcleo (10-50 min.), distribución que varía durante las dos primeras mitosis (60 min. y 120 min.), donde se localiza en los centriolos del huso mitótico, volviendo posteriormente a su posición intranuclear.

Proyectos: FONDECYT 2990038; 1980141; 1011073

**VII.9 LA PERMANENCIA DE HISTONAS ESPERMÁTICAS POST-AMFIMIXIS BLOQUEA LA REPLICACIÓN DE ADN DEL CIGOTO Y ES LETAL PARA EL EMBRIÓN** (Sperm histone permanence after amfimixis blocks DNA replication of zygotes and exhibits a lethal effect on further embryonic development). **Concha, M.C., Puchi M., Morin V., Monardes A., Montecino M. e Imschenetzky M.** Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Post-fecundación el núcleo espermático se decondensa transformándose en pronúcleo masculino, el cual al fusionarse con el pronúcleo femenino restablece la diploidía del embrión. Durante este proceso las histonas espermáticas (SpH) son normalmente degradadas y reemplazadas por variantes de histonas CS de origen materno. Hemos postulado que tal degradación es catalizada por una SpH-cistein proteasa. Esta enzima se encuentra a la forma de zimógeno en óvulos sin fecundar y es activada post-fecundación. Además su actividad es modulada por modificaciones post-traduccionales de su sustrato. Al inhibir la actividad de la SpH-cistein proteasa con E64-d se bloquea la degradación de SpH post-amfimixis, manteniéndose éstas en el núcleo del cigoto. Con el fin de investigar el efecto de la mantención de SpH post-amfimixis sobre la primera onda replicativa se incubaron cigotos con E-64-d y se siguió la replicación determinando la incorporación de  $H^3$ -timidina y de bromodeoxiuridina (Budur) al ADN. Con el objeto de descartar potenciales controles en que óvulos sin fecundar fueron activados con ionóforo A23187 (Ca II) y sometidos a E64-d. Tal activación induce normalmente la primera onda replicativa en ausencia de espermatozoides. Los resultados obtenidos demuestran que E-64-d bloquea totalmente la primera onda replicativa embrionaria en óvulos fecundados, en cambio no la altera en óvulos activados con ionóforo A23187. Adicionalmente se observó que aunque ocurre la amfimixis, la cromatina del cigoto permanece condensada y se frena el desarrollo embrionario. Estos resultados nos conducen a la conclusión que la persistencia de histonas espermáticas post-amfimixis bloquea la primera onda replicativa y aborta el desarrollo embrionario. Proyectos FONDECYT 1011073 y DIUC 200.031.088-1.0

**VII.10 LAS VARIANTES DE HISTONAS CS SE LOCALIZAN EN TERRITORIOS ESPECÍFICOS DE LARVAS PLUTEI DE ERIZOS DE MAR** (CS histone variants are located in specific regions of plutei larvae in sea urchins) **Oliver M.I., Puchi M., Bustos A., Rodríguez C., Montecino M., e Imschenetzky M.** Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Tres grupos de genes para histonas son secuencialmente expresados durante el desarrollo embrionario de erizos de mar: las variantes CS son particulares de óvulos sin fecundar y se expresan durante los ciclos iniciales de segmentación embrionaria. Luego las variantes tempranas (E) aumentan su expresión hasta la etapa de 16/32 blastómeros y finalmente las variantes tardías (L) se expresan post-eclosión. Con el fin de investigar el destino de las variantes CS en etapas tardías de desarrollo se obtuvo anticuerpos policlonales contra estas variantes. Estos fueron ensayados contra histonas tardías obtenidas desde larvas plutei demostrándose por western blots que ambos grupos de histonas no presentaban reacciones cruzadas entre sí. Subsecuentemente utilizando los anticuerpos anti variantes-CS se realizó su inmuno-detección en larvas plutei observándose que estas variantes se localizan en territorios específicos de la larva. Paralelamente se marcó el ADN replicado *in vivo* durante los ciclos iniciales de segmentación, concordantes con la expresión de variantes CS, con bromodeoxiuridina (Budur). EL ADN replicado fue posteriormente localizado en territorios específicos de la larva plutei con anticuerpos anti-Budur acoplados a un fluorocromo. Al confrontar la localización de las variantes de histonas CS en larvas plutei con la obtenida para el ADN sintetizado durante el primer ciclo de segmentación embrionaria se constata que ambas señales se localizan en la misma región del embrión. Consecuentemente postulamos segregación de variantes CS constituye una señal de diferenciación de cromatina que se genera desde los primeros ciclos de segmentación embrionaria.

Proyectos FONDECYT: 2990067; 1980141

## VIII. ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS II

**VIII.1 UNIÓN DE 4', 6-DIAMIDINO-2-FENILINDOL (DAPI), AL MONOMERO Y AL OLIGOMERO DE FTSZ DE *E. coli*.** (Binding of 4',6 Diamidino-2-phenylindole (DAPI), to monomeric and oligomeric *E. coli* FtsZ.) Nova, E. y Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

La FtsZ es una GTPasa, muy conservada presente en todos los organismos procariontes, mitocondrias y cloroplastos de eucariontes, que forma un anillo (anillo Z) en la mitad de la célula, para dirigir el proceso de septación de la membrana celular durante la división bacteriana. Hemos determinado que FtsZc de *E. coli* (FtsZc), en su estado monomérico y oligomérico, al igual que tubulina, une la sonda fluorescente DAPI. El máximo de excitación y de emisión de la sonda libre es 344 nm y 454 nm, respectivamente y presenta un rendimiento cuántico (Q) de 0,023. En presencia de la proteína se observa un pequeño corrimiento de la emisión hacia el azul y un aumento de Q a 0,051. La sonda se une a un sitio de FtsZc con una constante de afinidad de  $9,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . La unión de la sonda al oligómero induce un aumento de Q a 0,06 y no perturba su morfología. La oligomerización inducida por GTP en presencia de DAPI muestra una disminución de la concentración crítica. Los parámetros cinéticos de la actividad GTPasa de FtsZc muestran que  $10 \mu\text{M}$  DAPI no afecta la  $K_m$  ( $35 \mu\text{M}$ ) pero sí la  $V_{m\text{ax}}$  que varía de  $25$  a  $21,4 \mu\text{M min}^{-1}$  en presencia de DAPI. Estos resultados indican que DAPI es una sonda fluorescente apropiada para caracterizar la estructura, la cinética y el mecanismo de oligomerización de FtsZc.

Financiado por el proyecto FONDECYT N° 1010848

**VIII.2 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE UNA GLUCO-QUINASA ATP-DEPENDIENTE EN LA ARQUEA HIPERTERMÓFILA *Sulfolobus acidocaldarius*** (Preliminary characterization of an ATP-dependent glucokinase in the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus acidocaldarius*). Preller, A., Saavedra, G., Medina, M y Ureta, T. (Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile).

En los genomas de 10 micro-organismos del dominio Archaea no se detectan genes con secuencias similares a los genes para enzimas fosforilantes de glucosa de eucariontes o bacterias. Sin embargo, esos genomas contienen los genes para enzimas de la vía de Entner-Doudoroff que degrada la glucosa a gliceraldehído y piruvato. En *Pyrococcus furiosus* y *Thermococcus littoralis* se ha identificado una glucoquinasa inusual, ya que utiliza ADP y no ATP como las enzimas fosforilantes de glucosa de la mayoría de los organismos. Estas enzimas no presentan similitud de secuencia con ninguna de las proteínas existentes en las bases de datos.

En un esfuerzo por entender la evolución de las enzimas fosforilantes de glucosa en los tres dominios de los seres vivos (Archaea, Bacteria y Eucarya) hemos detectado una actividad fosforilante de glucosa en *Sulfolobus acidocaldarius*. Se presentará la caracterización preliminar de la enzima parcialmente purificada. Como era esperable, la enzima de *Sulfolobus* funciona muy bien entre  $60$  y  $80^\circ$ . Al igual que algunas hexoquinasa de vertebrados, la  $K_m$  aparente para glucosa es  $60 \mu\text{M}$ . A diferencia de otras arqueas, el donador de fosforilo es ATP-Mg, aunque GTP y UTP pueden reemplazarlo con menor eficiencia. CTP, ADP, UDP y pirofosfato no fosforilan glucosa. La glucoquinasa de *Sulfolobus* por lo tanto es diferente a las glucoquinasa ADP dependientes conocidas en arqueas.

Financiado por FONDECYT, Proyecto 1000804.

**VIII.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA DE FORMAS INACTIVAS DE LA MICROCINA E492.** (Biochemical and biological characterization of inactive forms of microcin E492). Baeza, M., \*TSoto C., \*Monasterio O. y \*Lagos R. \*, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. T, Serono Pharmaceutical Research Institute, Ginebra, Suiza.

La microcina E492 presenta actividad bactericida sobre bacterias gram negativas mediante la formación de canales iónicos en la membrana interna. Para ello, debe reconocer un receptor en la membrana externa y ser translocada a través de ésta. La producción de microcina activa requiere de los productos de los genes *mceC* y *mceJ*, ya que mutantes por transposición en dichos genes (*np133* y *np221*) producen una forma inactiva de la microcina. En estudios de competencia, las microcinas aisladas desde las mutantes no presentaron un efecto inhibitorio sobre la actividad de la microcina silvestre, sugiriendo que la forma inactiva no reconocería el receptor. La microcina silvestre presentó una masa de  $7886,3$ , que es la esperada a partir de su secuencia de DNA ( $7886,5$ ), lo que descarta la existencia de modificaciones postraduccionales. Las masas de las formas inactivas de la microcina fueron prácticamente idénticas a la silvestre (*np133* =  $7885,5$ , *np221* =  $7886,8$ ), por tanto la falta de actividad de estas formas no se debería a la ausencia o presencia de modificaciones de tipo covalente. Mediante análisis por UV-CD la microcina silvestre mostró un espectro característico de estructura hoja- $\beta$  mientras que las formas inactivas presentaron espectros característicos de hélice- $\alpha$ . Estas diferencias en estructura secundaria serían responsables de la pérdida de actividad de las microcinas producidas por las mutantes *np133* y *np221*.

Financiado por Proyecto FONDECYT 1991017 y 2990028.

**VIII.4 EXPRESIÓN EN *Pichia pastoris*, PURIFICACION Y CARACTERIZACIÓN DE  $\gamma$ -TUBULINA.** (Expression in *Pichia pastoris*, purification and characterization of  $\gamma$ -tubulin). Pérez D. y Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El cDNA de  $\gamma$ -tubulina humana fue insertado en el vector de expresión pIB4. Células de *P. pastoris* fueron transformadas por electroporación y se probaron varias condiciones de crecimiento. Las curvas de crecimiento muestran que a una temperatura de  $28^\circ\text{C}$  el cultivo alcanza la fase estacionaria al cabo de 20h. Para su purificación se diseñó un protocolo, pues aunque se ha intentado, no se ha logrado obtener la proteína recombinante pura a homogeneidad con características funcionales. La ruptura, homogeneización y centrifugación del extracto de levadura muestran que la proteína existe como agregado o unida a una fracción particulada coloreada. Para solubilizar la  $\gamma$ -tubulina se trató el extracto con detergentes y agente reductor y aun la proteína permaneció en la pella de la centrifugación a  $6.000.000 \text{ g min}$ . Este resultado sugirió que la proteína se encontraba mas bien agregada, por esto se utilizó alta fuerza iónica a una concentración de  $\text{MgCl}_2$  de  $4 \text{ M}$  con lo que se logro solubilizar la proteína. Esta solución se filtró por una columna de afinidad de níquel aprovechando que la proteína posee en su extremo amino-terminal un péptido de polihistidina de 6 residuos y la proteína no se retuvo. Para eliminar el agente que interfería con la unión se intentaron varios pasos tradicionales de purificación en bioquímica siguiendo el protocolo de purificación del heterodímero de tubulina, como precipitación con sulfato de amonio. Se mostrará una tabla de purificación y la caracterización realizada mediante espectroscopia de fluorescencia, inmunodetección y funcionalidad in vivo. Con esta proteína se validarán los modelos de interacción con  $\alpha\beta$ -tubulina derivados del modelo estructural obtenido por modelaje comparativo.

Financiado por proyecto FONDECYT # 1010848

**VIII.5 DESNATURACIÓN Y RENATURACIÓN DE MUTANTES DE FRUCTOSA -1,6- BISFOSFATASA QUE CONTIENEN RESIDUOS DE TRIPTÓFANO.** (Unfolding and refolding studies of fructose-1,6-bisphosphatase mutants containing tryptophan residues.) Ludwig, H. C., Yañez, A. J., Asenjo, J. L., y Slebe, J. C. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Se empleó a la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) como modelo para caracterizar el plegamiento de una proteína oligomérica, proceso que involucra, además del plegamiento de las subunidades, su asociación específica para lograr una estructura estable. Para analizar el mecanismo de asociación entre las subunidades de la FBPasa hemos usado mutantes de la enzima. Por mutagénesis sitio dirigida reemplazamos por triptófano los residuos de fenilalanina 6 y 89, adyacentes a la interfase intersubunidades C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, y los residuos de fenilalanina 219 y 232, adyacentes a la interfase C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>. Este reemplazo nos permitió sentir mediante la fluorescencia de los triptófanos, los cambios conformacionales locales que suceden en la proteína durante los procesos de su desnaturalación y plegamiento *in vitro*, caracterizando las perturbaciones que afectan a cada interfase en forma específica. Al analizar los espectros de emisión de los mutantes F219W y F232W, se detectaron transiciones a concentraciones de GdnCl entre 1 y 1,2 M. Por otra parte, al estudiar el desplegamiento por cromatografía de exclusión molecular de HPLC, se detectó la aparición de dímeros a partir de una concentración de 1,2 M del desnaturalante. Los resultados sugieren que la interfase C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> sería la primera en disociar. La renaturación de las mutantes muestra una cinética de primer orden, independiente de la concentración de proteína, lo que sugiere que la etapa limitante de la reactivación corresponde a la isomerización de un intermediario tetramérico inactivo a tetramero activo. (FONDECYT 1010720 y DID-UACH 199901; 200178).

**VIII.6 ESTUDIO TEÓRICO - EXPERIMENTAL DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE *Trypanosoma brucei*.** (Theoretical and experimental study of *Trypanosoma brucei* phosphoenolpyruvate carboxykinase); González-Nilo D., Navarrete M. y Cardemil E.; Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

En este trabajo se presenta un análisis exhaustivo de 21 secuencias de las carboxiquinasas fosfoenolpirúvicas (PEPCKs) dependientes de ATP. El alineamiento de estas secuencias de PEPCKs nos ha permitido caracterizar los motivos de mayor relevancia estadística (GCG, SeqWeb2). Estas proteínas se encuentran agrupadas en una familia que presenta secuencias altamente conservadas, estas secuencias están organizadas espacialmente en torno al sitio activo, las cuales son analizadas según su relevancia estructural y funcional. Este alineamiento de secuencias ha permitido construir diferentes modelos por homología de esta familia. En este trabajo, se presenta el modelo estructural PEPCK de *T. brucei*. Esta proteína ha sido recientemente expresada en nuestro laboratorio, y debido a su importancia farmacológica es de nuestro interés la búsqueda de inhibidores para esta proteína. Una etapa preliminar a la búsqueda de inhibidores es el estudio estructural de la proteína. Estudios teóricos nos han permitido proponer la posible zona de contacto para la formación del complejo dimerico de esta proteína. La zona de contacto proteína-proteína, junto con el sitio activo, podrían ser de importancia en la interacción de los inhibidores. De esta forma, la actividad de los mejores inhibidores encontrados experimentalmente (HPLC, UV-visible) son contrastadas con la caracterización estructural y energética del complejo *T. brucei* -inhibidor hecha a través de simulación molecular (Discover, MSI). Financiado por FONDECYT 1000756 y DICYT-USACH # 020141GN.

**VIII.7 FUNCIÓN DE Thr249 Y Asp262 EN LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE *Anaerobiospirillum succiniciproducens*.** (Role of Thr249 and Asp262 in *Anaerobiospirillum succiniciproducens* phosphoenolpyruvate carboxykinase). Jabalquinto, A.M., Encinas, M.V., Laivenieks, M., Zeikus, J.G. y Cardemil, E. Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile y \*Michigan State University.

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica cataliza la descarboxilación y fosforilación de oxaloacetato en presencia de ATP y Mn<sup>2+</sup> para dar fosfoenolpiruvato, ADP y CO<sub>2</sub>. Estudios de difracción de rayos X en la enzima de *E. coli* han indicado que el metal en el complejo metal-nucleótido está coordinado a los oxígenos de los grupos fosforilos β y γ del ATP, al Oγ de una treonina y a tres moléculas de agua, una de las cuales está unida a un ácido aspártico.

Para dilucidar la función de estos residuos de aminoácidos se obtuvieron las siguientes mutantes: Thr249Asn, Thr249Ala, Asp262Asn y Asp262Glu. El análisis cinético mostró disminuciones de 3 a 4 ordenes de magnitud en la V<sub>máx</sub> para las mutantes, excepto para la enzima Asp262Glu. Todas las enzimas unen al mant-ADP con constantes de disociación que son comparables a las determinadas para la enzima nativa, lo que indica que los sitios activos de todas las mutantes están intactos y permite sugerir una función catalítica para Thr249 y Asp262. Financiado por DICYT-USACH 029941JL y FONDECYT1000756.

**VIII.8 DETECCIÓN DE CAMBIOS CONFORMACIONALES INDUCIDOS POR LA UNIÓN DE LIGANDOS A LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.** (A fluorescence study of ligand-induced conformational changes in fructose-1,6-bisphosphatase). Asenjo J.L., Yañez A.J., Ludwig H.C., y Slebe J.C. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile.

Un aspecto fundamental en el estudio de la regulación de las enzimas alostéricas es la comprensión de los mecanismos de interacción entre los distintos sitios funcionales de la enzima. Debido a que la fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo no contiene residuos triptófano, decidimos introducir por mutación sitio dirigida esta sonda fluorescente cercana al sitio de unión del inhibidor AMP (F6W y F89W) y al sitio activo (F219W y F232W). Los datos cinéticos indican que los residuos triptófanos introducidos no alteraron la actividad catalítica o la estructura de la enzima en forma importante. Los cambios en la fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano permitieron estudiar la unión de AMP, Fru-1,6-P<sub>2</sub> y Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Las mutantes F6W, F89W y F219W fueron capaces de sentir la unión del AMP, lo que indica que el AMP induce cambios en la región amino terminal, sitio activo y sitio de unión a AMP. Es destacable que los triptófanos 219 y 232, cercanos al sitio activo, mostraron diferentes respuestas frente al sustrato y al inhibidor Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Aunque se ha sugerido que ambos azúcares se unen al mismo sitio, nuestro laboratorio ha postulado, en base a estudios de modificación química, que estos ligandos se unirían a sitios diferentes. Los estudios de fluorescencia mostraron que la mutante F219W fue capaz de sentir la unión de Fru-1,6-P<sub>2</sub> pero no la unión de Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Además, Fru-2,6-P<sub>2</sub> no impidió la transición de fluorescencia debido a la unión del sustrato. En cambio, la mutante F232W sentó la unión de Fru-1,6-P<sub>2</sub> y Fru-2,6-P<sub>2</sub>, y no la unión de AMP. Estos datos apoyan la existencia de dos sitios de unión con características diferentes, los cuales podrían compartir algunos determinantes de unión del sitio catalítico. (FONDECYT 1010720 y DID-UACH 200178).

### VIII.9 UNIÓN DE MgATP AL SITIO ALOSTÉRICO DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *E. coli* Y MECANISMO DE TETRAMERIZACIÓN. (MgATP binding to the allosteric site of *E. coli* phosphofructokinase-2 and tetramerization mechanism)

Cabrera, R., Babul J. y Guixé, V. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La unión de MgATP a un sitio alostérico en la Pfk-2 de *E. coli* está relacionada con la inhibición de la actividad enzimática y con el cambio de un dímero a tetrámero. En este trabajo se estudiaron las propiedades del sitio alostérico para MgATP (número de sitios y constante de disociación) y se determinó si el mecanismo de agregación corresponde a uno mediado o facilitado por la unión del ligando. El análisis de Scatchard de la unión de MgATP a la Pfk-2, utilizando el método de Hummel y Dryer, muestra una curva convexa, lo que sugeriría unión del ligando a múltiples sitios con cooperatividad positiva. Sin embargo, la unión es dependiente de la concentración de proteína, de manera que la oligomerización incrementa la unión a todas las concentraciones de MgATP utilizadas. El intercepto con la ordenada es independiente de la concentración de proteína, en concordancia con la predicción analítica para sistemas con agregación mediada por ligando. Los resultados indican que existe sólo un sitio alostérico por monómero con una constante de disociación de 70  $\mu$ M. Por otra parte, estudios de filtración molecular mostraron que en ausencia de MgATP, la Pfk-2 eluye como un dímero en un amplio intervalo de concentración de proteína (0,05-30mg/ml). Para determinar la constante de formación del tetrámero, se estudió el efecto de la concentración de proteína sobre la oligomerización en presencia de diferentes concentraciones de MgATP y se extrapoló a concentración cero. Los resultados están de acuerdo con un mecanismo de tetramerización mediado por ligando donde la unión de MgATP al dímero induce la formación del tetrámero.

(Proyecto Fondecyt 1010645)

### VIII.10 IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE CISTEÍNA IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y ESTRUCTURA CUATERNARIA DE FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *E. coli*. (Identification of cysteine residues involved in the enzymatic activity and quaternary structure of *E. coli* phosphofructokinase-2)

Báez, M., Guixé, V. y Babul, J., Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La unión de MgATP al sitio alostérico Pfk-2 de *E. coli* provoca la inhibición de su actividad y el cambio del estado de agregación de dímero a tetrámero. La modificación de 2 grupos SH con pirenomaleimida provoca la inactivación de la enzima y su disociación a monómeros que no tetramerizan en presencia de MgATP. En este trabajo se identificaron los residuos modificados y se determinó su importancia en la actividad enzimática y en el estado de agregación de la enzima. En ausencia de ligandos los residuos modificados son C295 y C238, en tanto que en presencia de MgATP se modifica sólo C238. La modificación de la C238 no inactiva la enzima ni afecta la inhibición alostérica por MgATP. Experimentos de filtración molecular muestran que en ausencia de ligandos la enzima modificada es un monómero, mientras que en presencia de MgATP es un tetrámero y en presencia de fructosa-6-P y ATP<sup>-4</sup> (complejo ternario) es un dímero, lo que sugiere que la actividad de la enzima modificada resulta de la asociación de los monómeros para generar un dímero activo en presencia de los sustratos. Por otra parte, experimentos de apagamiento de fluorescencia por acrilamida, muestran un aumento en la accesibilidad al solvente de C238 modificada en el monómero con respecto al tetrámero. Los resultados muestran que C238 es esencial para la mantención de la estructura dimérica y que su modificación no interfiere con la actividad catalítica, la inhibición alostérica y la tetramerización provocada por MgATP.

(Proyecto Fondecyt 1010645)

### IX. ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS III

#### IX.1 ESTRUCTURA MÍNIMA DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA $\alpha$ DE LA PROTEINAQUINASA CK2 PARA FUNCIONAR COMO UNA ENZIMA ACTIVA (Minimal structure of the catalytic subunit $\alpha$ of protein kinase CK2 to function as an active enzyme).

Tapia, J., Jacob, G., Connelly, C. y Allende, J.E. Programa de Biología Celular y Molecular, ICMB, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Patrocinado por Fondecyt: 1000624, 2000066; ICGB.

La proteínaquinasa CK2 participa en el control de la proliferación celular. Está formada por subunidades catalíticas ( $\alpha$  o  $\alpha'$ ) y reguladoras ( $\beta$ ), constituyendo tetrámeros  $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha\alpha'\beta_2$  o  $\alpha'\beta_2$ . Se ha demostrado que la CK2 $\alpha$  de *Zea mays*, carente de 60 aminoácidos en su extremo carboxilo comparada con otras CK2 $\alpha$  que generalmente poseen entre 391 o más aminoácidos, muestra una actividad semejante a la de la holoenzima humana y otros vertebrados. Más aún, la CK2 $\alpha'$ , que es más corta que la CK2 $\alpha$  en 43 residuos, es igualmente activa al formar una holoenzima. Por estas razones, el rol que cumple el extremo carboxiloterminale de la subunidad  $\alpha$  es importante de estudiar. Hemos analizado un número de mutantes de delección del extremo carboxilo de la CK2 $\alpha$  de *Xenopus laevis* (392 aminoácidos), diseñadas sobre la base de la estructura cristalina de la proteína de *Z. mays*. Un estudio cinético de las mutantes  $\alpha_{1-328}$  y  $\alpha_{1-331}$  mostró sólo una leve diferencia en sus valores de kcat con respecto a la subunidad nativa. La subunidad  $\alpha_{1-325}$ , sola o en asociación con CK2 $\beta$ , no mostró diferencias significativas de estabilidad térmica con respecto a la forma nativa. Se observó que la mutante  $\alpha_{1-328}$  no tiene actividad propia detectable pero, analizada en presencia de la subunidad CK2 $\beta$ , muestra una respuesta débil de actividad. Estos estudios muestran que los aminoácidos 328 a 391 no son esenciales para una estructura activa mínima de la CK2. Por su parte, el papel de la isoleucina 327 en mantener la forma de la quinasa activa está en estudio.

#### IX.2 CARACTERIZACIÓN DE UNA LEVADURA (CLON 44A) TRANSFORMADA CON EL GEN DE LA ENDOXILANASA A DE *PENICILLIUM PURPURIGENUM* (Characterization of a yeast transformant (clone 44A) containing the endoxylanase A gene from *Penicillium purpurogenum*).

Bull, P., Chávez, R., Navarro, C., Peirano, A., Eyzaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

*Saccharomyces cerevisiae* ha sido transformada con un plásmido que contiene insertado un fragmento de DNA genómico de *Penicillium purpurogenum*, y se ha obtenido una levadura transformante que crece en xilano y xilosa como única fuente de carbono. Este clon, llamado 44A, se estudió con más detalle. Haciendo un zimograma, se demostró que se secreta al medio de cultivo una actividad endoxilanasica, y por Western blot que se trata de la endoxilanasica A de *P. purpurogenum*. Además, por CHEF y por Southern blot usando DNA genómico digerido con varias enzimas de restricción, se demostró que el clon 44A contiene el gen *xynA*. Con el objeto de determinar si la regulación de la expresión en la levadura es a nivel transcripcional como en el caso del hongo, se determinó por northern blot que hay expresión del RNA mensajero de *xynA* al crecer en xilosa o xilano, no así en glucosa o fructosa; por lo tanto, se mantiene la regulación a nivel transcripcional. Por otro lado, se aisló RNA mensajero del clon 44A crecido en xilosa y se obtuvo el cDNA. DNA genómico y cDNA de la 44A se amplificaron por PCR usando partidores específicos del gen, y se demostró que en el primer caso, todos los intrones (8 en total) están presentes en el genoma de la levadura transformada así como la región río arriba y que en el segundo caso, el gen es transcrito y procesado correctamente. Esto último se confirmó por secuenciación.

Financiamiento: FONDECYT 2990078 y 8990004.

**IX.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS SUBISOFORMAS DE LA PROTEÍNAQUINASA CK1 $\alpha$  DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*)** (Biochemical characterization of subisoforms of protein kinase CK1 $\alpha$  from zebrafish) **Burzio, V., Connelly, C., Allende, J.E.** Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Proyectos Fondecyt 1970253 e ICGEB CRP/CHI99-04(t1) CRP/BRA99-03(t2)

La Proteínaquinasa CK1 es una familia de 7 isoformas en vertebrados, denominadas CK1 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3,  $\delta$  y  $\epsilon$ . De CK1 $\alpha$  existen cuatro subisoformas generadas por el procesamiento alternativo de su mensajero. Estas se definen según la presencia o ausencia de una o dos inserciones, denominadas L y S. La inserción L comprende una extensión de 28 residuos aminoacídicos ubicados en medio del dominio catalítico de la enzima, específicamente en la región bisagra y la inserción S está formada por 12 residuos en la región carboxiterminal. En este trabajo, se aislaron, de una genoteca de cDNA de embrión de pez cebra (*Danio rerio*), clones de las cuatro subisoformas, CK1 $\alpha$ , CK1 $\alpha$ S, CK1 $\alpha$ L y CK1 $\alpha$ LS, las que fueron subclonadas en vectores de expresión en *E. coli*. Las proteínas expresadas fueron sometidas a una serie de estudios bioquímicos para definir las características particulares de cada subisoforma. Se pudo determinar que, mientras todas ellas exhibían una cinética similar de fosforilación de sustratos proteicos o peptídicos como caseína, fosvitina, péptido PPI2 y péptidos derivados de NFAT4, el comportamiento con ATP era diferente, observándose un aumento de la Km en las subisoformas que contienen la inserción L. Estas también mostraban una menor sensibilidad a los inhibidores específicos de CK1, CKI-7 y CKI-8. Las propiedades físicas también se ven alteradas por la presencia de esta inserción, ya que las formas que la contienen exhiben una menor termoestabilidad y una temperatura óptima de fosforilación levemente menor que las que no la poseen. Estas diferencias podrían explicarse por la posición de la inserción L.

**IX.4 LOS NIVELES DE G $\alpha$ s REGULAN LA MADURACION DEL OOCITO DE *Xenopus laevis*.** (G $\alpha$ s and G $\beta$  levels regulate *Xenopus laevis* oocyte maturation). **Romo, X., Guzman, L., Brito, M., Soto, X., Hinrichs, M.V y Olate, J.** Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción.

Progesterona, producida por las células foliculares, induce la maduración del oocito de *Xenopus laevis* a través de un evento temprano, que es la inhibición de la actividad del sistema efector adenilil ciclasa. Esta inhibición es dependiente de GTP, por lo que se ha propuesto que progesterona inhibe la proteína G $\alpha$ s presente en la membrana plasmática. En este trabajo se analizó como la variación en los niveles de G $\alpha$ s pueden afectar el proceso de maduración inducido por progesterona. Sobreexpresión de la proteína G $\alpha$ s silvestre y mutante G(s)QL bloquearon la maduración inducida por progesterona, resultando ser más efectiva la mutante G $\alpha$ s(QL). Por otra parte, la depleción de G $\alpha$ s, utilizando oligonucleótidos sin sentido, causó activación de la vía de las MAPK. Expresión de dos receptores muscarínicos, m4 y m5, que se acoplan a las proteínas G $\alpha$ i y G $\alpha$ q respectivamente, inhibieron la maduración, indicando que estos receptores al inducir la liberación de G $\beta$  desde G $\alpha$ i y G $\alpha$ q, activarían la adenilil ciclasa en conjunto con G $\alpha$ s. Al contrario, la sobreexpresión de G $\alpha$ i y G $\alpha$ o silvestre causaron maduración, indicando que estas proteínas secuestran G $\beta$  e inducen la inhibición de la adenilil ciclasa. Estos hallazgos demuestran una directa correlación entre los niveles de G $\alpha$ s y G $\beta$  y la acción de progesterona, sugiriendo la presencia de un mecanismo donde G $\alpha$ s y G $\beta$  en conjunto activan la adenilil ciclasa, manteniendo altos niveles intracelulares de cAMP los cuales bloquean la maduración del oocito. Progesterona a través de un mecanismo aún no determinado, inhibiría la acción conjunta de G $\alpha$ s y G $\beta$ . Financiado por Proyecto HUMAN FRONTIER N° RG0112/2000-M 103.

**IX.5 EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA QUIMERA G $\alpha$ (o)G $\beta$ (S).** (Expression, purification and functional analysis of the chimeric protein G $\alpha$ (o)G $\beta$ (S)). **Soto, X., Brito, M., Guzmán, L., Romo, X., Hinrichs, M.V y Olate, J.** Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción.

La estructura terciaria de la subunidad G $\alpha$  de la proteína G ha sido determinada recientemente y se han identificado dos dominios, uno denominado dominio similar a ras (DRAs) y otro único para las proteínas G heterotriméricas, denominado dominio hélice (DH). La interfase entre estos dos dominios forma una cavidad donde se realiza el intercambio GDP/GTP. Distintas subunidades G $\alpha$  poseen diferentes velocidades basales de intercambio GDP/GTP, y se ha propuesto la hipótesis que la interfase y los residuos que la forman estarían determinando esta característica. Para comprobar esta hipótesis, hemos construido una proteína quimera que posee el DRAs de la proteína G $\alpha$ s humana y el DH de la proteína G $\alpha$ o de ratón (G $\alpha$ o/G $\alpha$ s). Ambas proteínas silvestre poseen una velocidad de intercambio de nucleótido similar (0.2 min<sup>-1</sup>), por lo que la quimera G $\alpha$ o/G $\alpha$ s debería mantener esa propiedad. En este trabajo se construyó la quimera G $\alpha$ o/G $\alpha$ s y se expresó en *E. coli*, la cual presentó una baja solubilidad (entre un 15-30%). El análisis a través de digestión con tripsina no permitió visualizar el cambio conformacional inducido por la unión del nucleótido, indicando posiblemente una baja proporción de proteína funcional. Sin embargo, los estudios cinéticos de unión de GTP $\gamma$ S permitieron obtener la constante aparente de unión (Kapp), cuyo valor fué menor al esperado (0,046 min<sup>-1</sup>).

Estos resultados indicarían que: a) el DH de G $\alpha$ o y el DRAs de G $\alpha$ s estarían formando una interfase diferente a la encontrada en las respectivas proteínas silvestres, con la consecuente disminución en la velocidad de intercambio GDP/GTP, y b) es necesaria una correcta interacción entre los residuos que forman la interfase para poder mantener la velocidad de intercambio de las proteínas silvestres. Financiado por Proyecto FONDECYT N° 1000359

## X. GENES Y ENZIMAS FÚNGICAS

**X.1 EXPRESION HETEROLOGA DE UN cDNA DE LACASA DE *Ceriporiopsis subvermispora* en *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger*.** (Heterologous expression of *Ceriporiopsis subvermispora* laccase cDNA in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*.) Larrondo L. F., Salas L. y Vicuña R. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

El sistema ligninolítico de *C. subvermispora* está constituido por las enzimas extracelulares Mn-peroxidasa (MnP) y lacasa (fenol oxidasa). Ambas proteínas se expresan como un conjunto de isoenzimas cuyo patrón de isoelectroenfoque varía de acuerdo al medio de crecimiento utilizado. Para MnP se ha detectado la presencia de al menos 3 genes, con sus respectivos alelos, que pueden dar cuenta de la multiplicidad enzimática observada. Por otra parte, sólo se ha detectado la presencia de un gen para lacasa (*lcs-1*), no siendo claras las causas que explican la presencia de varias isoformas con marcadas diferencias catalíticas. Con el objetivo de poder entender mejor este fenómeno, así como también de estudiar en forma más detallada el producto génico codificado por *lcs-1*, se procedió a su expresión en *Aspergillus nidulans* así como en *A. niger*. Para esto se sometió el cDNA *lcs-1* al control del promotor para alfa-amilasa y de un terminador propio de *Aspergillus*. En ambos hospederos se logró la eficiente producción de lacasa recombinante activa y extracelular. La lacasa producida en *A. nidulans* mostró la misma masa molecular que la enzima nativa. Este sistema heterólogo nos permitió también comprobar que el cobre, además de jugar un rol fundamental en la transcripción de *lcs-1*, es también vital a nivel postranscripcional para la correcta producción de la enzima activa.

Trabajo financiado por FONDECYT 2000076 y 8990004. \*Becario Fundación Andes

**X.2 CARIOTIPO ELECTROFORÉTICO DEL HONGO FILAMENTOSO *Penicillium purpurogenum* Y UBICACIÓN CROMOSOMAL DE VARIOS GENES XILANOLÍTICOS.** (Electrophoretic karyotype of the filamentous fungus *Penicillium purpurogenum* and chromosomal location of several xylanolytic genes). Chávez, R.<sup>(1)</sup>, Fierro, F.<sup>(2)</sup>, Martín, J.F.<sup>(2)</sup> y Eyzaguirre, J.<sup>(1)</sup> Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Pontificia Universidad Católica de Chile<sup>(1)</sup> y Departamento de Ecología, Genética y Microbiología, Universidad de León e Instituto de Biotecnología (INBIOTEC), León, España<sup>(2)</sup>.

*Penicillium purpurogenum* secreta numerosas enzimas xilanolíticas, entre ellas 3 arabinofuranosidasas, 2 acetil xilano esterases y varias endoxilanasas, sin que el porqué de la existencia de isoenzimas o la función biológica de ellas haya sido aclarado. Para estudiar si a nivel genético existe algún tipo de relación estructural que ayude a comprender la función de este sistema, se determinó el cariotipo electroforético del hongo por CHEF (contour-clamped homogeneous electric field). Se generaron matrices de agarosa con cromosomas intactos usando diversas soluciones líticas. Las electroforesis se realizaron aplicando distintos programas de voltaje y pulso por varios días, determinándose la existencia de 5 cromosomas de 7,1 (I), 5,2 (II), 3,7 (III), 2,9 (IV) y 2,3 (V) Mb, con un tamaño total del genoma de 21,2 Mb, el más pequeño registrado a la fecha para una especie de *Penicillium*. Experimentos de Southern blot usando sondas de genes xilanolíticos de *P. purpurogenum* demostraron que el gen de acetil xilano esterasa II se ubica en el cromosoma III, el gen de endoxilanasas A se encuentra en el cromosoma II y los genes de endoxilanasas B y arabinofuranosidasas se encuentran en el cromosoma I. Este es el primer trabajo en el que se establece la ubicación cromosomal de enzimas xilanolíticas en un genoma fúngico.

Financiamiento: DIPUC y FONDECYT N° 2990078 y 8990004.

**X.3 REDUCCIÓN DE QUINONAS POR EL HONGO BASIDIOMICETE *Ceriporiopsis subvermispora*.** (Quinone reduction by the fungus basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*) Cortínez, G. y Vicuña, R. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

*Ceriporiopsis subvermispora* es un basidiomicete ligninolítico de pudrición blanca altamente selectivo para la degradación de la lignina. Su sistema ligninolítico está formado por una fenoloxidasa (lacasa) y una peroxidasa dependiente de manganeso (MnP). La despolimerización de la lignina ocurre en el medio extracelular del hongo a través de mecanismos oxidativos no específicos. La degradación del polímero da origen a quinonas, las cuales son altamente tóxicas para los organismos debido a que pueden experimentar reacciones de oxido-reducción generando especies reactivas de oxígeno. La reducción de las quinonas es un primer paso para su eliminación. En este trabajo se establece la existencia de un mecanismo asociado a la membrana de *C. subvermispora*, el cual es capaz de reducir duroquinona (DQ), benzoquinona (BQ) y metil-benzoquinona (MBQ). Los estudios no mostraron una variación significativa de su poder reductor en función del pH. Los K para la reducción de BQ y DQ son 1,12 mM y 2,90 mM respectivamente presentando inhibición por Fe(CN). Además se demostró que estas quinonas reducidas pueden experimentar oxidación, regenerando a la quinona y produciendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual puede ser utilizado por la MnP del hongo para degradar la lignina, constituyendo de este modo un mecanismo alternativo de generación de H<sub>2</sub>O.

FONDECYT 8990004 en líneas complementarias.

**X.4 EFECTO DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE LACASA DE *Trametes versicolor* SOBRE LAS PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS DE *Pinus radiata*** (Effects of *Trametes versicolor*'s laccase enzymatic treatment on viscoelastic properties of *Pinus radiata*) Osés, R., Moya, C., Reyes, N., Burgos, C., Freer, J., Baeza, J. y Rodríguez, J. Laboratorio de Recursos Renovables, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. Casilla 160-C FAX 56-41-247517 email: [roses@udec.cl](mailto:roses@udec.cl).

La madera como material viscoelástico muestra baja plasticidad tanto bajo condiciones naturales como de modificación. Las modificaciones de la plasticidad a través de tratamientos químicos y enzimáticos pueden mejorar sus aplicaciones con especial énfasis en procesos de transformación vía temperatura y esfuerzo de cizallamiento. La técnica de Análisis Dinámico Mecánico (DMA) es capaz de monitorear la viscoelasticidad de materiales sometidos a algún tipo de tratamiento. Se realizaron tratamientos enzimáticos sobre hojas de madera usando extractos de lacasa del hongo *Trametes versicolor*. El objetivo fue modificar *in situ* la madera y evaluar sus cambios en viscoelasticidad. Las maderas ensayadas corresponden a madera de primavera y verano de *Pinus radiata*. Se evaluó el efecto del pH sobre la modificación de la madera. Ambas muestras presentaron distintos patrones de curva en el módulo de almacenamiento así como el de pérdida. Las muestras tratadas mostraron aumento de la termoplasticidad y rigidez bajo los 110°C. El análisis de pH sugiere que los procesos de difusión y reacciones enzimáticas dentro de la matriz fueron mejorados. Diferencias entre la termoplasticidad de las maderas de primavera y verano después del tratamiento enzimático fueron atribuidas a las diferencias en las proporciones de los componentes químicos de las maderas tratadas y no tratadas.

## INDICE GENERAL

Programa .....	5	Bustos, G. ....	28	Figuerola, J. ....	36
Conferencia .....	17	Cabrera, R. ....	40	Figuerola, J. ....	36
Simpósios .....	19	Campusano J. ....	28	Flores, C. ....	36
Resúmenes .....	24	Campusano, J. ....	28	Foltz, K. ....	21
Abarca, J. ....	28	Cañón, P. ....	25	Forray M.I. ....	29
Allende, J.E. ....	40	Cárcamo, J.G. ....	34	Freer, J. ....	42
Allende, J.E. ....	41	Cardemil, E. ....	39	Galeno H. ....	31
Allende, M. ....	32	Cardemil, E. ....	39	Gallardo, M. ....	29
Alvarez, M. ....	36	Cardemil, E. ....	20	Galleguillos, D. ....	27
Amthauer, R. ....	34	Cárdenas SP. ....	28	García L. ....	30
Andrade, C. ....	33	Cartier L. ....	30	García L. ....	30
Andrés, M. ....	28	Cartier L. ....	30	Genevière, A.M. ....	37
Andrés, M.E. ....	27	Carvajal, N. ....	26	Godoy, A.S. ....	33
Antonelli, M. ....	32	Carvalho, P. ....	29	Gómez, C. ....	23
Araya, A. ....	36	Castro, M. ....	34	González, D. ....	26
Araya, M. ....	26	Cazzulo, J.J. ....	18	González, M. ....	33
Arce-Johnson, P. ....	25	Chacón, M. ....	29	Gonzalez-Jara, F. ....	29
Arenas, F. ....	27	Chávez, R. ....	40	González-Nilo, D. ....	39
Asenjo, J.L. ....	39	Chávez, R. ....	42	González-Nilo, F.D. ....	20
Asenjo, J.L. ....	40	Chianale, J. ....	35	Gross, H-J. ....	33
Azócar, L. ....	34	Collados L. ....	30	Grünert, A. ....	33
Azocar, R. ....	37	Collados, L. ....	30	Guixé, V. ....	40
Babul, J. ....	40	Concha, C. ....	37	Gutiérrez, J. ....	27
Bachem, M. ....	33	Concha, M.C. ....	37	Gutiérrez, L. ....	28
Báez, M. ....	40	Concha, M.I. ....	34	Gutkind, S. ....	18
Baeza, J. ....	42	Connelly, C. ....	40	Guzmán, C. ....	34
Baeza, M. ....	38	Connelly, C. ....	41	Guzmán, L. ....	41
Balme, A. ....	20	Corcuera, L.J. ....	25	Guzmán, L. ....	26
Barra, V. ....	36	Cornejo P. ....	32	Guzmán, L. ....	26
Barra, V. ....	36	Cortínez, G. ....	42	Guzmán, L. ....	41
Bazaes, S. ....	20	Crabtree, G. ....	22	Gysling K. ....	29
Becker, M.I. ....	29	Daza C. ....	29	Haeger, P. ....	29
Bernales, B. ....	35	De la Cerda, B. ....	20	Harris, P. ....	31
Blanco F. ....	25	De la Rosa, M.A. ....	20	Henríquez, E.A. ....	34
Bravo J.A. ....	28	Deloannes, A.E. ....	29	Henríquez, E.A. ....	34
Bravo, L.A. ....	25	Díaz, F. ....	33	Hervás, M. ....	20
Brito, M. ....	41	Díaz, M.I. ....	31	Hinrichs, M.V. ....	26
Brito, M. ....	41	Díaz-Moreno, I. ....	20	Hinrichs, M.V. ....	26
Brito, M. ....	26	Díaz-Quintana, A. ....	20	Hinrichs, M.V. ....	41
Brito, M. ....	26	Durán, R. ....	20	Hinrichs, M.V. ....	41
Bruce, E. ....	31	E. Maldonado ....	22	Holuigue, L. ....	25
Bruce, E. ....	31	Edwards, A.M. ....	29	Hopkins, N. ....	32
Bruna, C. ....	33	Egaña, L. ....	29	Ibañez, P. ....	33
Bull, P. ....	40	Ehrenfeld, N. ....	25	Imschenetsky, M. ....	28
Bunster, M. ....	33	Encina G. ....	30	Imschenetzky, M. ....	37
Bunster, M. ....	27	Encinas, M.V. ....	26	Imschenetzky, M. ....	37
Burgos, C. ....	42	Encinas, M.V. ....	39	Imschenetzky, M. ....	27
Burzio, L.O. ....	32	Engel, E. ....	35	Imschenetzky, M. ....	27
Burzio, L.O. ....	35	Escobar, C. ....	33	Israel Y. ....	30
Burzio, L.O. ....	35	Espinoza, C. ....	25	Israel Y. ....	30
Burzio, V. ....	41	Estay, A. ....	25	Israel, Y. ....	18
Bustamante, M.E. ....	33	Eyzaguirre, J. ....	40	J. Allan ....	22
Bustamante, M.E. ....	34	Eyzaguirre, J. ....	42	Jabalquinto, A. M. ....	20
Bustos G. ....	28	Eyzaguirre, J. ....	20	Jabalquinto, A.M. ....	39
Bustos V. ....	28	Farré, J-C. ....	36	Jacob, G. ....	40
		Fernández V. ....	23	Jaffe L.A. ....	21
		Fernández V. ....	32	Jamett, A. ....	31
		Fiedler J.L. ....	28	Jordana, X. ....	36
		Fierro, F. ....	42	Kausel, G. ....	36

Kausel, G. ....	36	Navarrete, M. ....	39	Soto, M. ....	36
Kempe, S.S. ....	34	Navarro, C. ....	36	Soto, X. ....	26
Kempe, S.S. ....	34	Navarro, C. ....	40	Soto, X. ....	26
Kettlun AM. ....	30	Navarro, J.A. ....	20	Soto, X. ....	41
Kettlun AM. ....	30	Nova, E. ....	38	Soto, X. ....	41
King, M-C. ....	29	Núñez-Millacura, C. ....	23	Stange, C. ....	25
Kishimoto, K. ....	21	Olate, J. ....	41	Tapia G. ....	23
Lagos R. ....	38	Olate, J. ....	41	Tapia G. ....	32
Laivenieks, M. ....	39	Olate, J. ....	26	Tapia, J. ....	40
Lange, C. ....	20	Olate, J. ....	26	Tapia, V. ....	23
Lara H.E. ....	28	Olave, N. ....	25	Tapia-Arancibia, L. ....	28
Larrondo, L.F. ....	42	Orellana, M. ....	26	Terasaki M. ....	18
León, G. ....	36	Ortega, X. ....	25	Tischler, N. ....	31
Letelier I. ....	25	Oses, R. ....	42	Tobar, J. ....	31
Lladser A. ....	30	Pacheco, A. ....	29	Torres V. ....	30
Llévenes, A. ....	33	Palacios, J.L. ....	31	Tulio Núñez, M. ....	23
López, N. ....	26	Palma L. ....	29	Uquillas C. ....	25
López, V. ....	26	Paredes, H. ....	29	Ureta, T. ....	38
Ludwig, H.C. ....	39	Paredes, R. ....	28	Uribe, E. ....	26
Ludwig, H.C. ....	40	Peirano, A. ....	40	Valdivia, A. ....	31
Martial J.A. ....	32	Pérez D. ....	38	Valenzuela M.A. ....	30
Martín, J.F. ....	42	Pérez, E. ....	26	Valenzuela M.A. ....	30
Martínez, P. ....	31	Pérez, LM. ....	25	Valenzuela, P. ....	31
Martínez, R. ....	35	Pincheira, S. ....	33	Valenzuela, P. ....	32
Martínez, R. ....	35	Pino, L. ....	32	Valenzuela, P. ....	35
Martínez-Oyanedel, J. ....	27	Pinto, R. ....	36	Vásquez F. ....	30
Martínez-Oyanedel, J. ....	33	Preller, A. ....	38	Vásquez F. ....	30
Maulén, N. ....	33	Puchi, M. ....	37	Vásquez, C. ....	26
Maulén, N.P. ....	35	Puchi, M. ....	37	Vásquez, O. ....	34
Medina, C. ....	25	Puchi, M. ....	27	Vecchiola A. ....	28
Medina, M. ....	38	Quezada, C. ....	36	Velásquez, J.C. ....	25
Melendez J. ....	29	Reyes, A.M. ....	33	Venegas, A. ....	31
Miquel, A. ....	35	Reyes, A.M. ....	34	Venegas, A. ....	31
Molina A. ....	32	Reyes, N. ....	42	Vera, J.C. ....	34
Molina, A. ....	36	Rocco, C. ....	35	Vera, J.C. ....	23
Molina, A. ....	37	Rodríguez, J. ....	42	Vera, J.C. ....	33
Molina-Heredia, F.P. ....	20	Rodríguez, M. ....	29	Vera, J.C. ....	34
Monardes, A. ....	37	Rodríguez, R. ....	26	Vera, J.C. ....	34
Monasterio O. ....	38	Rojas R. ....	29	Vera, J.C. ....	34
Monasterio, O. ....	38	Romo, X. ....	26	Vera, J.C. ....	34
Monasterio, O. ....	38	Romo, X. ....	26	Vera, J.C. ....	34
Monasterio, O. ....	20	Romo, X. ....	41	Vera, Ml. ....	36
Moncada C. ....	30	Romo, X. ....	41	Vicuña, R. ....	42
Moncada C. ....	30	Roseblatt, M. ....	31	Vicuña, R. ....	42
Monsalve, R. ....	33	Rousseau, C. ....	29	Videla L.A. ....	32
Montecino, M. ....	37	Ruiz, S. ....	25	Videla L.A. ....	23
Montecino, M. ....	22	Saavedra, C. ....	26	Villagra, A. ....	27
Montecino, M. ....	27	Saavedra, G. ....	38	Villagra, A. ....	27
Montecino, M. ....	27	Salas, L. ....	42	Villanueva, J. ....	34
Montecino, M. ....	28	Salas, M. ....	26	Villegas, J. ....	32
Montecinos, V. ....	34	Salinas M. ....	29	Villegas, J. ....	35
Montecinos, V.P. ....	33	San Martín, R. ....	37	Villegas, J. ....	35
Morales P. ....	28	Santander M.P. ....	32	Villota, C. ....	35
Morin, V. ....	37	Santander, C. ....	34	Vollrath, V. ....	35
Morín, V. ....	37	Sapag A. ....	30	Walter, R. ....	23
Moya, C. ....	42	Sapag A. ....	30	Wielandt, A.M. ....	35
Muller M. ....	32	Sasaki, K. ....	21	Wilhelm, V. ....	35
Muller, I. ....	32	Sierra, F. ....	23	Yañez, A.J. ....	39
Müller, I. ....	35	Sierra, J. ....	27	Yañez, A.J. ....	40
Muñoz, D. ....	36	Slebe, J.C. ....	39	Zeikus, J.G. ....	39
Muñoz, P. ....	23	Slebe, J.C. ....	40	Zuñiga, S. ....	29
Murdoch, S.P. ....	20	Soto C. ....	38		