XVII REUNION ANUAL SOCIEDAD DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE CHILE

LA SERENA-CHILE
3 al 5 de Agosto de 1994

MUND LAB

EQUIPOS Y ARTICULOS PARA LABORATORIO

REACTIVOS SIGMA

TANQUES CRIOGENICOS TYLOR WHARTON

MICROPIPETAS, DISPENSADORES, JERINGAS HAMILTON, CUBETAS DE CUARZO

SANYO: INCUBADORAS, FREEZER, CAMPANAS DE FLUJO LAMINAR

BALANZAS DIGITALES, PHMETROS

LAMPARAS PARA ABSORCION ATOMICA

MATERIAL PLASTICO PARA LABORATORIO BEL-ART

TELEFONOS: 3412973 3412912 FAX: 2048603

ELEODORO FLORES 2422 ÑUÑOA

ladet

INSTITUTO DE INSTRUMENTACION ANALITICA
Y DESARROLLO TECNOLOGICO LTDA.
INSTITUTO IADET LTDA.

LIDER NACIONAL EN EL DESARROLLO DE METODOS DE SEPARACION, ES AHORA REPRESENTANTE EXCLUSIVO DE WATERS, EMPRESA CON 30 ANOS DE LIDERAZGO MUNDIAL EN EL ***DESARROLLO DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) Y OTRAS TECNICAS DE SEPARACION AFINES COMO LA ELECTROFORESIS CAPILAR PARA BIOMOLECULAS E IONES INORGANICOS.***

WATERS OFRECE, EN EL CAMPO BIOLOGICO, RESPUESTAS COMPLETAS E INTEGRADAS A LAS NECESIDADES DEL INVESTIGADOR DE PEPTIDOS, PROTEINAS, AMINOACIDOS, DNA, EN LA SEPARACION, PURIFICACION, ANALISIS, SECUENCIACION DE SUS PRODUCTOS.

TODOS LOS SISTEMAS WATERS ESTAN CERTIFICADOS DE ACUERDO A LAS ***NORMAS cGMP E ISO 9002.*** *CUMPLEN ADEMAS CON LOS REQUISITOS DE LOS METODOS OFICIALES DE LA* ***AGENCIA DE PROTECCION AMBIENTAL (EPA) DE LAS NORMAS DE LA INDUSTRIA ALEMANA (DIN), DE LA AUTORIDAD NACIONAL DE RIOS DEL REINO UNIDO, DE LA AGENCIA DE PROTECCION AMBIENTAL DEL JAPON Y OTROS, PARA EL CONTROL AMBIENTAL.***

INSTITUTO IADET LTDA. MARIN 0261 PROVIDENCIA SANTIAGO CHILE.
FONOS 6351502 - 6353645 - FAX 6353645.

XVII REUNION ANUAL
SOCIEDAD DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE CHILE

PATROCINA:

DEPARTAMENTO TECNICO DE INVESTIGACION DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE

DIRECCION DE INVESTIGACION PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE

UNIVERSIDAD DE LA SERENA

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE

AUSPICIAN

ACADEMIA DE CIENCIAS DEL TERCER MUNDO (TWA)
BIOS CHILE I.G.S.A.
COASIN
CHIRON Co (E.E.U.U)
DEPARTAMENTO DE QUIMICA, FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO
EQUILAB
FARMANUCLEAR
IADET
IVENS
MERCK
MUNDOLAB
NESTLE CHILE
PARRAGUEZ Y BENEZET

LA SERENA-CHILE
3 al 5 de Agosto de 1994

XVII REUNION ANUAL SOCIEDAD DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE CHILE

La Serena, 3 al 5 de Agosto de 1994

RESUMEN DE PROGRAMA

Miércoles 3

10:00 - 12:00 Incripción

11:00 - 12:00 Café

12:00 - 12:05 Apertura: Emilio Cardemil

12:05 - 13:00 **CONFERENCIA: PROF. OSVALDO CORI:**

Prof. Frank Marcus (Chiron Corporation, Emeryville, California, USA)
Recombinant viral membrane glycoproteins for subunit vaccines.

13:00 - 14:30 Almuerzo

14:35 - 15:15 **CONFERENCIA:**
Apertura sesiones comunicaciones libres:

Prof. Ernesto Bade (U. Konstanz).
Interacción de proteasas, matriz extracelular y síntesis de DNA de células estimuladas por factores de crecimiento.

15:15 - 17:15 **COMUNICACIONES LIBRES I**
Biología Molecular

17:15 - 17:15 Café

17:15 - 19:15 **SIMPOSIO I**
Empleo de mutación sitio-específica en estudios de estructura y función de enzimas.
Coordinador: Emilio Cardemil
Participantes: Perry A. Frey (U. Wisconsin), Jack Preiss (Michigan State U.), Jorge Allende (Universidad de Chile) y Marino Matínez- Carrión (U. Missouri).

19:15 - 19:45 Café

19:45 - 20:40 **CONFERENCIA:**

Prof. Armando Parodi (Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar)
Glucosylation reactions in the endoplasmic reticulum.

Jueves 4

8:45 - 10: 15 **COMUNICACIONES LIBRES II:**
Estructura proteínas

10:15 - 10:45 Café

10:45 - 13:00 **INCORPORACION-COMUNICACIONES LIBRES III**
Enzimología y estructura de proteínas

13:00 - 14:20 Almuerzo

14:00 - 16:00 **COMUNICACIONES LIBRES IV**
Enzimología y Biología Molecular

16:00 - 16:30 Café

16:30 - 17:30 **CEREMONIA ENTREGA MEDALLA PROF. HERMANN NIEMEYER**

16:30 - 16:45 ENTREGA MEDALLA

16:45 - 17:30 **CONFERENCIA:**

Peña, A. (Instituto de Fisiología Celular, Universidad Autónoma de México, México).
El transporte y los efectos de los iones en al levadura.

17:30 - 18:00 Café

18:00 - 20:00 **SIMPOSIO II**
Expresión de genes en sistemas heterólogos.
Coordinador: Pilar Carvallo
Participantes: Juan Olate (Universidad de Concepción), Loreto Holuigue (P. Universidad Católica de Chile), Alberto Kornblihtt (INGEBI- CONICET) y José L. Daniotti (Universidad de Córdoba)

20:30 - 22:00 Cena

Viernes 5

8:45 - 10:45 **AVANCES DE TESIS DE DOCTORADO**

10:45 - 11:15 Café

11:15 - 12:30 **COMUNICACIONES LIBRES V:**
Metabolismo y regulación

12:30 - 13:15 **CONFERENCIA:**
Cierre sesiones comunicaciones libres

Prof. Carlos Coronel (Catedrá de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba).
Estructura y función de las proteínas caltrin de la secreción de vesícula seminal de mamíferos

CONFERENCIAS

RECOMBINAT VIRAL MEMBRANE GLYCOPROTEINS FOR SUBUNIT VACCINES. F. MARCUS. CHIRON CORporation, 4560 Horton Street, Emeryville, California 94608, U.S.A.

Traditional viral vaccines are based on killed or attenuated viruses. A new generation of safer vaccines is being developed and these «subunit-vaccines» use recombinat antigens presented to mimic the infectious agent. At Chiron, several viral subunit vaccines are being developed and these include vaccines against genital herpes, HIV, Hepatitis C, and cytomegalovirus. These vaccines use purified recombinat glycoproteins produced in genetically engineered cells combined with an oil-in-water emulsion as adjuvant. This presentation will give an overview of the vaccine field, but most of this presentation will deal with the purification and characterization of recombinant human cytomegalovirus (HCMV) gB envelope glycoprotein expressed in mammalian cells. This purified protein is going to be used as the antigen in Biocine's (Chiron-Ciba Geigy) HCMV subunit vaccine.

GLUCOSYLATION REACTIONS IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM. A. J. PARODI, Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, A. Machado 151, 1405 Buenos Aires.

Protein N-glycosylation is initiated by the transfer of $Gle_3Man_9GlcNAc_2$ from a dolichol-P-P derivative to nascent polypeptide chains. Processing of the oligosaccharide is then immediately initiated: the three glucose and some mannose residues are removed in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER). We found that glucose-free oligosaccharides in glycoproteins ($Man_{7-9}GleNAc_2$) are reglucosylated in the ER to form $GLc_1Man_{7-9}GlcNAc_2$. The glucoses are immediately removed in vivo by glucosidase II

$Glc_3Man_9GlcNAc_2$-P-P-dolichol
↓
$Glc_3Man_9GlcNAc_2$-Prot
↓
$Glc_2Man_9GlcNAc_2$-Prot
↓
$Glc_1Man_9GlcNAc_2$-Prot
↓
$Man_9GlcNAc_2$-Prot ⇌ $Glc_1Man_9GlcNAc_2$-Prot
↓
$Man_8GlcNAc_2$-Prot ⇌ $Glc_1Man_8GlcNAc_2$-Prot
↓
$Man_7GlcNAc_2$-Prot ⇌ $Glc_1Man_7GlcNAc_2$-Prot
↓

The glucosylating activity responsible for the addition of the single glucose unit (UDP- Gle:glycoprotein glucosyltransferase) was purified to homogeneity from rat liver and Schizosaccharomyces pombe. In cell-free assays the enzymes glucosylated denatured but not native glycoproteins nor glycopeptides. It is proposed that in vivo not properly folded glycoproteins shuttle between monoglucosylated and deglucosylated states catalyzed by the glycosyltransferase and glucosidase II. The monoglucosylated structured are recognized by calnexin, a membrane-bound, lectin-like chaperone of the ER. Upon attaining the proper tertiary structure, glycoproteins are not substrates for the glucosyltransferase. The deglucosylated species are then released from the calnexin anchor and thus freed to be transported to the Golgi apparatus. The glucosyltransferase is therefore, a sensor of not properly folded conformations.

INTERACCION DE PROTEASAS, MATRIZ EXTRACELULAR Y SINTESIS DE DNA DE CELULAS ESTIMULADAS POR FACTORES DE CRECIMIENTO. (Interactions between proteasas, extracellular matrix and DNA replication in growth factor-stimulated cells). E.G. BADE, R. MAYER-JAECKEL, R., M. STREHLE, S. FEINDLER y B. NUSSER. Zellbiologie-Tumorbiologie, Fakultät für Biologie, Universität Konstanz, D-78434, Konstanz, Alemania.

Células epiteliales hepáticas normales expuestas a ciertos factores de crecimiento (EGF) cambian su morfología al fenotipo migratorio. Junto con este cambio se altera la síntesis de proteínas secretadas por las células: inducción de componentes de la matriz extracelular (ECM), proteasas y antiproteasas. Los factores de crecimiento que inducen el fenotipo migratorio modulan además la proliferación, con una primera fase de inhibición de la síntesis de DNA. Luego de una transformación con el oncogen Haras, las células migran en forma constitutiva, es decir, independientemente de factores de crecimiento exógenos y son altamente tumorigénicas e invasivas en animales singénicos o atímicos (nu/nu). Estas células producen un probable factor autocrino, capaz de inducir un fenotipo migratorio en distintas células epiteliales, y cambios de expresión génica similares a los inducidos por EGF. La migración y la expresión de proteinas secretadas inducidas por factores de crecimiento pueden ser moduladas por componentes de la ECM, mientras que la modulación de la síntesis de DNA aparece como independiente de la misma. Las interacciones de las vías de transducción intracelular de señales en estos fenómenos regulatorios está en estudio. Se presentará un modelo derivado de los datos actuales.

(Subsidiado por DFG/Bonn SFB 156)

EL TRANSPORTE Y LOS EFECTOS DE LOS IONES EN LA LEVADURA. (Transport and effects of ions in yeast). A. PEÑA Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado 70-242- 04510 México, D.F.

La levadura impulsa su transporte mediante una ATPasa que bombea H^+ al exterior, para generar un potencial, con un componente eléctrico y un gradiente de pH, negativo y alcalino en el interior, que impulsa a los iones de K^+ hacia el interior, a través de un uniportador (Peña et al., *Arch.Biochem. Biophys.*, 153: 413-425, 1973). Esta ATPasa fue aislada y reconstituida, y posteriormente se clonó y secuenció su gen, principalmente por el grupo de Serrano (*J.Biol. Chem.* 256: 4175-77, 1981; *Nature*, 319: 689-93). El mecanismo, además, se describió luego para diversas levaduras, y también otros hongos como Neurospora (Slayman et al *J. Membr. Biol.* 14:305-338,1973), y otros autores lo han encontrado también válido para las plantas. El sistema de transporte, sólo para el potasio ha demostrado ser más complejo que lo descrito en un principio: Rodríguez Navarro (*J. Bacteriol.* 159: 940-45, 1984) encontró que en la levadura no hay uno, sino dos sistemas de transporte para el potasio, y Gaber clonó y secuenció los genes respectivos (ver *Int.Rev.Cytol.* 137A: 299-353, 1992). Se ha demostrado la existencia de canales iónicos con «patch clamp», por la incorporación en bicapas planas. Nosotros estamos tratando de obtener información sobre un sistema de intercambio de K^+/H^+, que parece funcionar cuando se acumulan concentraciones elevadas de potasio , y que puede llegar a ser un ciclo inútil, que desperdicia energía. La levadura produce grandes cantidades de CO_2, y tratamos de encontrar un mecanismo por el cual el gradiente de pH que pueden generar las levaduras sea utilizado para aumentar la concentración interna del potasio, acumulando bicarbonato, que puede funcionar en un equilibrio de Donnan.
Los cationes monovalentes que son capturados por las células, además tienen diversos papeles, algunos de los cuales ya han sido descritos para otros sistemas; se ha estudiado con mayor detalle también la estimulación de algunas funciones y enzimas mitocondriales, pero también hay una influencia sobre la síntesis de los acarreadores para otras moléculas, entre las que hemos estudiado al fosfato y los aminoácidos.

ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS PROTEINAS CALTRIN DE LA SECRECION DE VESICULA SEMINAL DE MAMIFEROS. (Structure and function of the caltrin protein from mammalian seminal vesicle secretion). C.E. CORONEL. Catedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba C.C. 35. Suc 16, 5016-Córdova, Argentina.

Caltrin (calcium transport inhibitor), define a una familia de proteínas de los fluídos del tracto reproductor que inhiben la incorporación de Ca^{2+} en espermatozoides de mamíferos. Han sido detectadas en toro, cobayo, rata, ratón, hamster, caballo y humano, y purificadas y secuenciadas en las cuatro primeras especies. Son básicas (pI 8-11), pequeñas (5-10 kDa) y, con la excepción de la proteína de toro, poseen una porción glucídica y residuos cistína que se encuentran oxidados posiblemente formando puentes disulfuro. La homología estructural entre ellas es muy baja y solamente caltrin de rata y caltrin I de cobayo comparten un fragmento casi idéntico de 13 residuos. Este fragmento está presente en proteínas inhidoras de tripsina de diferentes orígenes. Esto explica la capacidad de caltrin I de cobayo y caltrin de rata para inhibir la actividad de tripsina. La reducción de los residuos cisteína y la deglicosilación anula la inmunogenicidad y la actividad inhibidoria de la proteínas caltrin. Más aún, la separación de la porción glucídica transforma a las caltrin de cobayo en inductoras de la captación de Ca^{2+} extracelular. Este fenómeno podría estar relacionado con el mecanismo de acción de estas proteínas.
Las proteínas caltrin se sintetizan en el epitelio secretor de la vesícula seminal y se liberan, en algunas especies, en la forma de un precursor inactivo y de mayor tamaño. La proteína precursora de caltrin de rata posee una masa de 54.000.
Las proteínas caltrin actúan sobre la zona acrosomal y la cola de los espermatozoides controlando el movimiento de calcio y, de este modo, el desarrollo de la reacción acrosomal y la hiperactivación, dos procesos previos a la fertilización.

SIMPOSIO I

EMPLEO DE MUTACION SITIO-ESPECIFICA EN ESTUDIOS DE ESTRUCTURA Y FUNCION DE ENZIMAS

ENGINEERING MUTATIONS TO STUDY PROTEIN FOLDING AND MITOCHONDRIAL IMPORT OF ISOZYMES. M. MARTINEZ-CARRION, School of Biological Sciences, University of Missouri-Kansas City, Kansas City, MO 64110 USA

Aspartate aminotransferase (AspAT) are encoded by the nuclear genome and synthesized in the cell cytoplasm. The mitochondrial isozyme mAspAT is synthesized as a precursor protein (pmAspAT), which in rat liver contains a 29 residue amino terminal peptide, which is essential for targeting and import into mitocondria. Both isozymes, upon synthesis in the ribosomes, are released into the cytosol. The path from unfolded polypeptide to that of a folded protein is unknown; yet,with these isozymes, it can be pursued at two levels: **a)** *in vitro* from highly denatured, random, coil-like to folded state regained upon removal of the denaturant, or **b)** *in vivo*-like conditions in a cytosolic environment from *de novo* synthesis to final folded state. The results differ among the various isozymes and isozyme mutants and constructs tested, indicating existence of preferential interactions between cellular chaperones and selected structural elements in each isozyme or chimeric protein. These results will be discussed in terms of protein structure and intracellular protein targeting mechanisms.

STRUCTURAL AND MECHANISTIC CHARACTERIZATION OF GALACTOSE-1-P URIDYLYLTRANSFERASE FROM E. COLI. P. A. FREY, F.J. RUZICKA, J.E. WEDEKIND and I. RAYMENT. Institute for Enzyme Research and Department of Biochemistry, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53705, USA.

Galactose-1-P uridylytransferase catalyzes the reversible reaction UDP-glucose+ galactose-1-P $\rightleftharpoons$ UDP-galactose+glucose-1-P, an essential step in the metabolism of galactose in all cells. The enzyme is defective in galactosemia, an autosomal recessive trait of humans. The chemical and kinetic mechanism of the enzyme from *E. coli* is a double-displacement process that requires the intermediate formation of a covalent uridylyl-enzyme (UMP-enzyme).Chemical characterization of the intermediate showed that UMP is bonded to the imidazole ring of a histidine residue. Site-directed mutation of each histidine residue to asparagine, followed by measurement of enzymatic activity showed that thirteen of the fifteen His residues are not essential for activity. However, H164 and H166 are essential residues, one of which is the nucleophile to which UMP is bonded in the intermediate. To identify the nucleophile, the specific mutants H164G and H166G were prepared and characterized as catalysts for the reaction UMP-imidazolate+ glucose-1-P $\rightleftharpoons$ UDP-glucose+ imidazole. Only H166G catalyzes the latter reaction; therefore, H166 is the nucleophilic histidine. H166G also catalyzes the similar reaction of galactose-1-P with UMP-imidazolate. This is a new enzyme known as UDP-hexose synthase. Analysis of galactose-1-P uridylytransferase purified from E. coli for metals shows that it is a metalloprotein that containst two very tightly bound divalent metal ions per subunit after purification. The sites are preferentially occupied by Zn(II) and Fe(II) when the cells are grown in a rich medium. Growth in a minimal medium supplemented by Zn(II) enhances the zinc content. Upon dialysis against 8 M urea containing o-phenanthroline, the metal ions are removed from the enzyme. Renaturation of the enzyme in the presence of Zn(II), Fe(II), Co(II), or Cd(II) leads to active enzyme containing these divalent ions. The activity of the renatured enzyme is highest when the divalent metal ions is Zn(II), but the other ions also support activity. The crystal structure of galactose-1-P uridylytransferase from *E. coli* is under investigation and will be discussed. Supported by GM30480 from the National Institute of General Medical Sciences, USPHS.

DETERMINATION OF THE NATURE OF THE EFFECTOR SITES OF PLANT AND BACTERIAL ADPGLUCOSE PYROPHOSPHORYLASES USING CHEMICAL MODIFICATION AND SITE-DIRECTED MUTAGENESIS TECHNIQUESE. J. PREISS, Y. CHARNG y C. MEYER. Dept. Biochem, Michigan State University, East Lansing, MI 48824 U.S.A.

The bacterial ADPglucose pyrophosphorylase (ADPGlc PPase) is a homotetramer with a subunit MW of about 49- 55 KDa. The higher plant ADPGlc PPase however, is a heterotetramer of the α,β_2 type. The MW of the plant α,β subunits are slightly different (MW, 50-60 KDa) and are immunologically distinct. Studies done with the *Escherichia coli* wild-type and allosteric mutant enzymes indicate that the is almost absolute conservation of several amino acids shown to be involved in substrate or allosteric effector binding. Lys 195 is involved in the binding of the Glc-1-P residue or of the ß-phosphate of ADPGlc for the *E. coli* enzyme. This Lys is conserved in both the cyano-bacterial and higher plant ADPGlc PPases. The allosteric activator for the enteric enzyme is Fru-1,6-P_2 and for the cyanobacterial and higher plant enzymes is 3-P glycerate (3PGA). Lys 39 has been identified as the amino acid involved in the binding of the activator in the *E. coli* enzyme. The 3PGA binding site has been identified to be near the C-terminal and in the case of the Anabaena enzyme, Lys 382 and 419 are the amino acids involved. Site-directed mutagenesis of K419 with Arg,Ala,Gln or Glu results in mutant ADPGlc PPases with poor affinity for 3PGA. The R419 and A419 mutant enzymes have however, have the same specific activity as the wild-type enzyme. P295 and A44 are also conserved sites among all known ADPGlc PPases. Mutations at those sites, as well as at G336, also affect the regulatory properties of the *E. coli* enzyme. Thus, there are sequences/domains throughout the ADPGlc PPase protein involved in maintaining its regulatory properties. Transformation of plant cells with a bacterial ADPGlc PPase gene having minimal allosteric regulation can increase the quantity of starch in the plant cell.

ESTUDIOS DE ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA PROTEINA QUINASA CK2 EN BASE A MUTACIONES SITIO DIRIGIDAS.(Structure-function studies on Protein Kinase CK2 on the basis of site-directed mutagenesis). M.V. HINRICHS, M. GATICA, A. JEDLICKI, G. JACOB, C. CONNELLY y J.E. ALLENDE. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, y Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 70086, Santiago 7, Chile.

La proteína quinasa CK2 (previamente denominada caseína quinasa II) es una enzima ubicua en eucariontes que es responsable de la fosforilación de más de 100 diferentes proteínas incluyendo muchas enzimas y factores que participan en la regulación y síntesis de los ácidos nucleícos, así como productos de oncogenes y proteínas supresoras de tumores. A pesar de su obvia importancia, se desconocen actualmente el mecanismo fisiológico que regularía su actividad catalítica. Estructuralmente la CK2 se encuentra en forma de un heterotetrámero con una composición $\alpha_2\beta_2$ o $\alpha\alpha'\beta_2$ con una Mr de 130 KDa. Las subunidades α(42KDa) y α' (38KDa) contienen el sitio catalítico y son activas aisladamente. La subunidad ß(26KDa en animales) cumple una función regulatoria, activando 5-7 veces a la subunidad α estabilizándola al calor y proteólisis, y afectando su especificidad hacia sustratos proteícos. En nuestro laboratorio hemos clonado los cDNA codificantes para la CK2α y CK2ß de *X. laevis* y logrado su expresión en *E. coli*, obteniendo subunidades puras capaces de reconstituir la holoenzima totalmente activa. Para estudiar la relación estructura y función de ambas subunidades hemos producido mutaciones en 9 sitios de CK2ß y en 5 loci del gen de la CK2α mediante PCR. Se han expresado la mayoría de las proteínas CK2ß mutadas y la mutación CK2α^{E75E76} y se ha ensayado la actividad de la subunidades alteradas. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la región acídica entre los aminoácidos 55 y 65 de la subunidad ß regula negativamente a la subunidad α, mientras que su sitio de autofosforilación en las serinas 2 y 3 no es necesario para la activación de α. Con respecto a la subunidad α, la región básica (amino-ácidos 71-80) juega un papel importante en la interacción con inhibidores polianiónicos de la enzima pero no con su interacción con ß o con los sustratos proteícos. Nuetros estudios deberían ser complementados con análisis estructurales mediante métodos físico-químicos que permitan determinar los cambios confomacionales causados por las mutaciones.

[Apoyado por The Council for Tobacco Research, The ICGEB y FONDECYT-Chile].

SIMPOSIO II

EXPRESION DE GENES EN SISTEMAS HETEROLOGOS

LA LEVADURA COMO SISTEMA DE EXPRESION DE PROTEINAS QUE PARTICIPAN EN TRANSDUCCION DE SEÑAL.(Yeast as an expression system for proteins that participate in signal transduction). L. HERRERA y OLATE, J. Laboratorio de Genética Molecular, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

La levadura, como sistema de expresión genética, ha sido de gran utilidad para el análisis funcional de diversos tipos de proteínas. Es una célula simple de manipular y puede ser utilizada en forma similar a los sistemas bacterianos: posee una rápida velocidad de crecimiento, crece en medios de cultivo simples y puede ser transformada fácilmente con una gran variedad de vectores de expresión genética. Otra gran ventaja de la levadura radica en que posee una organización celular similar a la de organismos superiores, principalmente la se refiere a modificación post-traduccional, transporte, inserción en membranas y secreción de proteínas. *Saccharomyces cerevisiae* es la cepa más utilizada y se han generado diferentes mutantes que son de gran utilidad en la caracterización de proteínas que participan en transducción de señal acopladas a proteínas G, pues posee una maquinaria de transducción similar a la descrita en organismos superiores. La expresión de receptores acoplados a proteínas G y proteínas G exógenas en levaduras scg1$^-$ (mutante carente de proteína G) permite el estudio de función y acoplamiento para estas proteínas por complementación. Utilizando esta mutante scg1$^-$ se han realizado estudios de complementación con diferentes subunidades α de proteínas G de *Xenopus laevis* y se determinó que αi-1 fué capaz de complementar la mutación, pero no αs y αo. Actualmente se esta expresando en levadura un receptor muscarínico de *Xenopus laevis*, con el objeto de realizar a futuro su caracterización farmacológico y acoplamiento a proteína G.

ESTUDIO DEL MECANISMO DE INDUCCION GENICA ASOCIADA A ESTRES POR PATOGENOS Y HERIDAS EN PLANTAS TRANSGENICAS. I. RAMÍREZ, V. GARRETÓN, R. LOPETEGUI, C. STANGE, y L. HOLUIGUE. Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El estudio del control de la expresión de genes vegetales por factores ambientales se facilitado por la utilización de plantas trangénicas como modelos de estudio *in vivo*. La disección de promotores, utilizando genes reportadores en plantas trasgénicas, ha permitido identificar secuencias muy definidas responsables de la inducción de genes por factores externos. Con estas técnicas hemos identificado una secuencia (as-1) del promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (Ca MV) que es inducible por ácido salicílico, conocido mediador en la respuesta de defensa que montan las plantas frente al ataque de patógenos. Nuestros estudios utilizando esta secuencia as-1 fusionado al gen de la ß-glucoronidasa (GUS) indican que, además de responder a salicilato, es activada por condiciones de estrés por daño mecánico.
La inducción de as-1 se manifiesta a nivel local en las hojas sometidas a heridas y puede ser detectada por aumento de la actividad GUS a las pocas horas post-tratamiento. No fue posible detectar inducción significativa de as-1 a nivel sistémico, aún despúes de 7 días de tratamiento.
El ácido jasmónico ha sido descrito como uno de los mediadores endógenos que participan en la inducción de genes por heridas. El tratamiento de plantas que portan el Trans gen as-1/GUS con ácido jasmónico no provocó activación del as-1 a nivel local ni sistémico.
Estos estudios *in vivo*, complementados con estudios *in vitro*, nos permitirán en el futuro entender la ralación existente entre las vías de transducción de señales que participan en la inducción de genes de defensa y en respuesta a diferentes condiciones de estrés en plantas.

Financiado por Proyecto FONDECYT 563-93.

REGULACION DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN DE LA FIBRONECTINA (Regulation of the fibronectin gene transcription) C. ALONSO, C.G. PESCE, A.F. MURO, A. SREBROW, S. WERBAJH. and A. KORNBLIHTT. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI) CONICET y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Vuelta de Obligado 2490, 22 piso (1428) Buenos Aires, Argentina.

En el promotor del gen de la fibronectina el "cAMP reponse element" CRE y la CCAAT box están separados por sólo veinte pare de bases. Mostramos aquí que existe una interacción molecular entre las proteínas que se unen al CRE y a la CCAAT box en el promotor de FN: competiciones con exceso de oligonucleótidos de CRE de FN impiden la unión al DNA de ambos factores, mientras que competiciones con exceso de oligonucleótidos de CCAAT de FN sólo anulan la unión a la CCAAT box. La interacción se modifica al aumentar la distancia entre los elementos CRE y CCAAT en una serie de mutantes de espaciamiento en los cuales fueron insertados fragmentos de DNA de 20,28 o 44 pares de bases. La afinidad de la unión de la proteína ligadora de CCAAT a su DNA blanco se ve sensiblemente disminuida en los mutantes de espaciamiento. Además, los mutantes son menos eficientes que la construcción salvaje para actuar como molde en ensayos de transcripción in vitro con extractos nucleares de hígado.
La unión al CRE de un factor específico actúa cooperativamente sobre la ocupación de la CCAAT box adyacente por su proteína (Muro *et al .J.Biol. Chem.* 267, 12767-12774, 1992). Hemos demostrado que el factor que se une al CRE es un heterodímero entre una proteína de 43 kDa y otra de 73 kDa, tratándose esta última del factor ATF-2 (también llamado CRE-BP1), una proteína implicada en el reclutamiento de activadores de la transcripción hacia los promotores, capaz de formar heterodímeros con la proteína Jun y para la cual se había informado un peso molecular de 55 kDa, deducido de su secuencia aminoacídica (Srebrow *et al. FEBS Lett.* 327, 25-28, 1993). Por otra parte, entre las proteínas que se unen al sitio CCAAT se encuentran los factores NFI y CP1, haciéndose descartado a la CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP).

ACTIVACION DE LA VIA MITOGENICA c-raf→MERK→MAPK POR RECEPTORES COLINERGICOS ACOPLADOS A PROTEINA G. J.L. DANIOTTI+, P. CRESPO*, N.XU* y S. GULKIND*, +Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, *Molecular Signalling Unit, NIH, Bethesda, USA. +Dirección actual:CIQUIBIC, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, CC61, CP 5016, Argentina.

El control de la proliferación celular es mediado en parte por la actividad de receptores de factores de crecimiento. Estos receptores con actividad tirosina quinasa transmiten señales mitogénicas a MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) en un proceso queinvolucra Ras y un número limitado de moléculas. Por otro lado, es conocido que receptores acoplados a proteína G participan principalmente en funciones propias de células diferenciadas tales como fotorrecepción, quimiorrecepción y neurotransmisión. No obstante, la activación de ciertos receptores acoplados a proteínas G pueden inducir síntesis de DNA por un mecanismo que es poco conocido. Con el fin de dilucidar este fenómeno, hemos usado la expresión de receptores colinérgicos muscarínicos (mAChR) en células HIH 3T3 como modelo para el estudio de señales proliferativas a través de receptores acoplados a proteína G.
Células transfectadas con m1 mAChR y estimuladas con el agonista carbacol, mostraron un incremento en función del tiempo de la actividad enzimática de c-Raf (Ser/Thr quinasa), utilizando como sustrato MEK recombinante (MAPK o ERK quinasa). En las mismas condiciones, se determinó la actividad de MEK midiendo los incrementos en la actividad del sustrato MAPK cuando es fosforilado por MEK en residuos Thr/Tyr. MAPK se obtuvo mediante expresión en *E. coli* como proteína de fusión con glutatión transferasa. La inducción de MAPK con carbacol solo se observó en células que co-expresan m1 mAChR. Este último efecto fue drasticamente disminuido cuando se transfectaron las células con un dominante negativo de c-Raf. Resultados recientes sugieren que la activación de MAPK sería, además, mediado por un mecanismo que dependería de Ras y sería independiente de PKC.

AVANCES DE TESIS

ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA ACTIVIDAD NATURAL KILLER (NK). (Regulation of natural killer activity). D. MIRANDA y J. PUENTE. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. (Avance de Tesis).

Las células Natural Killer (NK) (o Agresoras Naturales) corresponden a una subpoblación de linfocitos definidos como CD2+,CD3+,CD4-,CD8-,CD16+ y CD56+, que se caracterizan por ejercer lisis espontánea (CMCNK) indepediente del complejo mayor de histocompatibilidad.
La CMCNK puede dividirse en cuatro etapas: 1) Reconocimiento y Unión, 2) Activación, 3) Secreción y 4) Lisis. La etapa de activación es determinante para que la acción lítica tenga lugar.
El objetivo central de esta Tesis consiste en determinar la participación de proteínas quinasas y sus sustratos endógenos en la regulación de la CMCNK. Para ello se han realizado experimentos de fosforilación *in vivo*, marcando con 32-P linfocitos periféricos y fracciones enriquecidas en células NK. El análisis e identificación de las proteínas fosforiladas se realizó mediante electroforesis bidimensional. De acuerdo a nuestrso resultados, el contacto de las células NK con células sensibles induce la fosforilación de proteínas de 96,86,64,49 y 58 kDa. La citoquina IL-2 aumenta la CMCNK e induce la fosforilación de una proteína de 84 kDa. Inhibidores de las PKC inducen la desforilación de la proteínas de 96 y 84 kDa. Por otro lado, la inhibición de proteína fosfatasas provoca un aumento de la fosforilación de las proteínas de 64 kDa. (pI 5,5 y pI 5,4) junto con estimular la CMCNK. En etapas termpranas la CMCNK es dependiente de la actividad tirosina quinasa ya que genisteina inhibe la fosforilación de las proteínas antes descrita. Por otro lado muestras patológicas donde la CMCNK está muy baja o nula presentan una muy disminuída fosforilación de proteínas. Estos resultados nos permiten concluir que el mecanismo de activación de las células NK es un proceso complejo donde participan proteínas tirosina quinasas, PKC y fosfatasas regulando la fosforilación y desfosforilación de proteínas claves en la función lítica de las células NK.

Proyectos Fondecyt 920050 y 90-1115.

CLONAMIENTO DE GENES DE PMPs DE (MEMBRANA PEROXISIMAL) HUMANOS. (Cloning of human PMP genes) C. METZ. Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. (Avance Tesis)

La posible participación de las proteínas de membrana peroxisomal (PMPs) en la biogénesis de los peroxisomas y en la generación de enfermedades genéticas humanas letales, como el sindrome de Zellweger, las hace muy activas como modelo de estudio.
Para esto se ha propuesto aislar y caracterizar genes que codifiquen PMPs humanas. Con este fin se han utilizado distintas estrategias. Como primer ensayo se utilizaron anticuerpos policlonales y monoclonales que son capaces de reconocer PMPs humanas y de rata, para hacer inmunoanálisis de genotecas de cDNA de hígado humano. Otro enfoque fue usar la secuencia publicada de PMP de 70kDa humana para el diseño de oligonucleótidos que permiten la amplificación de esta secuencia a partir de cDNA preparado con RNA total de una línea celular derivada de un hepatoma (HepG2). Los oligos diseñados en principio, permiten amplificar la secuencia codificante correspondiente a la proteína completa y las mitades amino y carboxilo terminal. Soló esta última secuencia fue amplificada. Esta región está siendo utilizada como sonda en la búsqueda de la secuencia completa dentro de una genoteca de cDNA de hígado humano. Por otro lado se ha abordado el problema de la identificación de señales de destinación para PMP70. Con este fin, se están construyendo genes quiméricos que contienen la secuencia correspondiente a la mitad carboxilo terminal de PMP70 junto con algún reportador (CAT, ß-galactosidasa, c-myc), dentro de un vector de expresión de células eucarióticas y posterior transfección. Esto permitirá acotar la(s) región(es) donde se encontrarían las señales de destinación al peroxisoma dentro de estas proteínas.
Por último se está intentando secuenciar parte de otras proteínas aisladas de membranas de peroxisomas humanos. Estas secuencias se utilizarán en el diseño de sondas oligonucleotídicas para la detección de las secuencias codificantes en genotecas de cDNA humano.

Financiado por beca de Postgrado Conicyt.

SECUENCIACION PRELIMINAR DE PEPTIDOS DERIVADOS DE Tc45: AUSENCIA DE HOMOLOGIA CON CRUZIPAINA, CRUZAINA Y UNA PROTEINA DE 46 kDa. (Preliminary sequencing of Tc45 peptides: Absence of homology with cruzipain, cruzain and a 46 KDa protein). J.C. AGUILLÓN y A. FERREIRA. Unidad de Inmunología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. (Avance de Tesis)

Por medio de cromatografía líquida de alta presión (intercambio iónico e hidroxilapatita), se purificó Tc45, un antígeno inmunodominante e inmunogenéticamente (H-2) definido de *T. cruzi*. La presencia de Tc45 purificada se confirmó usando anticuerpos anti-*T. cruzi*, generados en (A.SW, H-2^), una cepa congénica de ratón. El material purificado fue corrido por sextuplicado en SDS-PAGE, transferido a nitrocelulosa y teñido con Ponceau S. Las bandas proteícas contenidas en la nitrocelulosa fueron cortada, picadas y lavadas intensamente para proceder a la digestión con proteasa de *Achromobacter lyticus*. Los fragmentos polipeptidos generados fueron purificados por HPLC en fase reersa y microsecuenciados por procedimiento estándar en un secuenciador de fase gaseosa. Se obtuvo la secuencia preliminar de un heptapéptido y un octapéptido, las cuales fueron comparadas con la secuencia completa de cruzipaína, cruzaína y Tc46 (todos antígenos de *T. cruzi*). No se encontró homología, lo cual indica que se trataría de un nuevo antígeno parasitario.

Financiado por: FONCECYT-CHILE; SAREC-SWEDEN; DTI/U.DE CHILE.

MORFOLOGIA DE GAMETOS EN MYTILIDOS-BIVALVOS CHILENOS DE IMPORTANCIA ECONOMICA. (Mophology of gametes in commercial Chilean Mussels). O. GARRIDO. Instituto de Embriología, Universidad Austral de Chile.

Con el objeto de correlacionar la morfología de los gametos y las características reproductivas de los Bivalvos Mytilidos chilenos se estudió tanto a nivel de Microscopía Optíca como de Microscopía Electrónica (MET y MEB), los ovocitos y espermatozoides de *Semimytilus algosus, Perumytilus purpuratus, Choromytilus chorus, Mytilus chilensis* y *Auliacoma ater.*
Los gametos femeninos presentan una morfología similar en las especies analizadas, pero difieren en su diámetro promedio. Los ovocitos maduros ováricos, presentan forma irregular, el núcleo tiene ubicación central con numerosos poros en su cisterna perinuclear y un contenido rico en eucromatina, su nucleólo es prominente. El citoplasma contiene abundantes gránulos de vitelo e inclusiones lipídicas, además destacan el gran número de mitocondrias y cisternas de RER., las que en algunos casos adquieren la forma de núcleos vitelinos. Todos los gametos maduros están rodeados por envolturas 1ras. y 2ras.
En los espermatozoides se estableció un patrón morfológico general en el que los gametos presentan: cabeza, alargada con acrosoma apical y núcleo basal. Pieza intermedia, corta, compuesta por un solo anillo mitocondrial (5 mitocondrias), centríolo proximal y distal el cuál origina un flagelo 9+2 microtúbulos rodeado por unidad membrana. Existen claras diferencias interespecíficas, tanto en la forma, afinidad por los colorantes y dimensiones de estos gametos. Esta diversidad morfológica puede ser de utilidad taxonómica.
La variedad morfológica de los espermatozoides estaría correlacionada con diferencias tanto en las evolturas como en calidad y cantidad del contenido de los ovocitos, Las diferencias presentadas por los gametos serían un reflejo de las estrategías reproductivas selecionadas por las distintas especies durante su proceso evolutivo.

Financiado por Proy. FONDECYT 2930005 y Proy. S-94-27 DID UACH.

COMUNICACIONES LIBRES I

BIOLOGIA MOLECULAR

REGULADOR TRANSCRIPCIONAL PhoP EN *Salmonella typhi*:PRESENCIA Y FUNCIONALIDAD. (PhoP-like regulator in *Salmonella typhi).* J. ROMERO, L.P. BLANCO, G. MORA. Unidad de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile (Patrocinio: González B.).

Salmonell typhi es el agente etiológico de la fiebre tifoidea. Este bacilo Gram negativo es capaz de sobrevivir dentro de los macrófagos del sistema inmune humano, desconciéndose los mecanismos moleculares por los cuales la bacteria logra resistir el ambiente intracelular.
En *S. typhimurium* se ha descrito el sistema regulador PhoP-PhoQ, el cual responde a las condiciones impuestas por el macrófago murino mediante cambios en la expresión génica y es indispensable para que la bacteria logre sobrevivir intracelularmente. Mutantes de *S. typhimurium* en phoP o phoQ presentan una reducida sobrevida intracelular y son avirulentas en ratones. Dada la importancia del sistema *Phop-Php*Q, el objetivo de este estudio es determinar la presencia y funcionalidad de *pho*P en *S.Typhi.* Para esto la mutación *pho*P::Tn10 fue llevada desde *S.typhimurium* MST223 a *S. typhi* Ty2 vía transducción con el fago P22. La incorporación de la marca Tet^r indicó que existe homología entre el DNA transducido y secuencias cromosomales de *S. typhi*, lo cual sugeriría la presencia de *pho*P en esta bacteria. En ensayos *in vitro* con células monocíticas humanas U937, la hipotética mutante Ty2 PhoP$^-$, presentó una sobrevida intracelular menor que la cepa silvestre. Esto se correlaciona con que la mutante no es capaz de crecer *in vitro* a pH 5.0, una condición preponderante en el ambiente intracelular del macrófago. Además mostró una reducida actividad fosfatasa ácida, concordando con otros reportes en mutantes *pho*P$^-$ de S.typhimurium. Estos resultados sugieren la existencia de un sistema análogo a PhoP-PhoQ en *S.typhi*, que participaría en la resistencia y adaptación al ambiente interno del macrófago humano.

Financiado por proyecto FONDECYT 694/91

PRODUCCION DE XILANASAS DE *Penicillium purpurogenum* POR UNA LEVADURA TRANSFORTADA CON DNA DEL HONGO. (Xylanase production by a yeast transformed with *P. purpuogenum* DNA). J. EYZAGUIRRE, A. PEIRANO, I. CALDERÓN, P. BULL, J. *STEINER. Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica de Chile, y *Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Las xilanasas son un grupo de enzimas producidas por hongos y bacterias que degradan el xilano de las hemicelulosas vegetales. Estas enzimas tienen una creciente importancia biotecnológica. p. ej. en el bioblanqueamiento de la celulosa, para lo que deben estar libres de celulasas. Esto puede lograrse clonando genes de xilanasas en cepas de microorganismos que no produzcan celulasas. En este trabajo se ha clonado en levadura genes de xilanasas de *P. purpurogenum*, un hongo productor de celulasa y xilanasas.
DNA cromosomal del hongo fue digerido parcialmente con Sau 3A1. Se clonó fragmentos de 4 a 10 Kb en *Saccharomyces cerevisiae* YM 335 usando el plasmidio YEplac 181. Se identificó 7 clones xilanasa-positivos; uno de ellos (clon 44) ha sido utilizado en estos estudios. Este clon muestra una morfología muy diferente a la cepa parental al microscopio de barrido. Mediante Southern blots se muestra que su DNA hibridiza con DNA del hongo. El clon crece en glucosa, xilano y hemicelulosa como única fuente de carbono. La producción de xilanasas es inducible: no se observa actividad al crecerlo en glucosa, y hasta 17 U/ml son secretadas en un medio con xilano (cantidad similar a la producida por el hongo). Anticuerpo contra 2 xilanasas de *P.purpurogenum* (que no muestran reacción cruzada) dan un Western blot positivo con sobrenadantes de cultivo. El clon no produce celulasas ni mananasas.
Los resultados sugieren que al menos 2 genes de xilanasas se estan expresando en el transformante, el que puede ser un modelo interesante para estudiar la producción de xilanasas y su regulación.

Financiamiento: DIUC,UNIDO (91/065) y FONDECYT (0822-90, 1930673)

ORGANIZACION MOLECULAR DE ALGUNOS FACTORES DETERMINANTES DE LA CAPACIDAD INVASORA DE *R.salmoninaru* EN CULTIVOS CELULAS CHSE.(Molecular organization of some *R.salmoninarum* factors involved in the invasive capacity into CHSE culture cells). P. MORALES, R. FELMER, J. FIGUEROA, M. CONCHA y G. LEÓN. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Entre los patógenos Gram positivos para la especie salmonidea, sin duda que el de mayor relevancia es *R. salmoninarum*, causante de la enfermedad bacteriana del riñón (BKD). La capacidad de penetrar en las células del hospedador, configura uno de los aspectos más complejos de la patogenicidad de este microorganismo.
Con el objeto de conocer los factores genéticos que determinan el carácter invasivo de *R. salmoninarum*, en nuestro laboratorio se exploró un banco de genes de la bacteria construido en pBR322 mediante un ensayo de invasividad sobre células crecidas en monocapa. Por identificación de las bacterias internalizadas a través del test de IFAT, se aisló ocho recombinantes que confieren un fenotipo invasor a *E. coli* HB101, cuando los ensayos se realizan en la línea de células embrionarias de salmón chinoock, CHSE-214. La localización intracelular de las bacterias se confirmó luego por microscopía electrónica. El mapa físico de cada uno de los recombinantes invasores indica que las secuencias génicas no presentan ninguna analogía, al menos respecto al patrón de restricción.
El análisis computacional de la secuencia nucleotídica de uno de los recombinantes, pDAI-189 cuyo inserto tiene 2.281 pb, señaló la presencia de regiones codificantes en ambas hebras del fragmento clonado. Esta región se identificó mediante el test de invasividad realizado con derivados delecionados del clon. La estructura primaria de la región invasora indica productos génicos cuyos tamaños fluctúan entre 16 y 33 kDa. Uno de estos productos (28kDa)presenta una secuencia de señal secretora en el extremo amino terminal, además de dos regiones de transmembrana hacia el extremo carboxilo. Actualmente se está obteniendo las distintas fracciones proteicas a fin de analizar por PAGE/SDS, el perfil de proteínas de membrana del recombinante en búsqueda de la aparición de alguna banda proteica extra respecto del control. Paralelamente se está examinando la organización del resto de los clones comprometidos con la invasividad de *R. salomoninarum*, a fin de establecer una posible relación funcional en la virulencia de la bacteria.

Financiado por Proyecto Fondecyt 190/92 y DID-UACH S/93/22.

ESTUDIO SOBRE LA ORGANIZACION DE LOS GENES DE RNA RIBOSOMALES DEL PEZ *C. Carpio*.(Studies about the organization of the *C. carpio* ribosoma RNA genes). M.I. VERA, KAUSEL,GUDRUN, H.M.RÍOS, M. KRAUSKOPF. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

El pez *c. carpio* habita en un ambiente que está sometido a cambios cíclicos estacionales a los cuales esta especie debe adaptarse para poder sobrevivir. Nuestra hipótesis de trabajo supone que este proceso de aclimatización se conforma a través de una reprogramación coordinada que compromete conmutaciones de la expresión génica.
Entre los genes que se encontrarían afectados por esta reprogramación están los genes de RNA ribosomal de la carpa. En efecto, se ha determinado que la cantidad de rRNA sintetizada por los hepatocitos disminuye notoriamente en invierno. Así mismo, se ha observado que en cortes ultrafinos de hígado provenientes de carpas aclimatizadas a invierno los componentes nucleolares están completamente segregados. En verano, no obstante, éstos se encuentran totalmente integrados. Experimentalmente se ha demostrado que no existen diferencias significativas en la actividad de transcripción mediada por la RNA polimerasa I en núcleos aislados de hepatocitos de carpas adaptadas a invierno y a verano. Estudios in situ de la transcripción, mediante la técnica de RNAsa-oro coloidal en cortes ultrafinos de hígado de carpas aclimatizadas a ambas estaciones, indican que existen diferencias semicuantitativas especialmente a nivel nucleolar entre los dos estados adaptativos.
En base a estos antecedentes postulamos que en la regulación de la expresión de los genes de RNA ribosomal podrían estar comprometidos factores de transcripción específicos para lo cual es necesario conocer en detalle la estructura y organización de los genes de rRNA de la carpa. Con este objetivo se clonó DNA genómico en el vector λDash y se aisló un clon (λCRR) conteniendo secuencias de rDNA. Este se caracterizó a través de su mapa de restricción y se subclonaron ambos extremos en el vector pUC19. Los subclones se han secuenciado parcialmente y uno de ellos (pCRR 3.2P= contiene aproximadamente 1000pb correspondientemente a la región 5' codificante de la secuencia del rRNA 28S. Actualemte se está caracterizando, en estos clones, la región río arriba del 28S donde se está ubicando, la secuencia codificante del rRNA 5.8S.

Financiado por Proyectos FONDECYT 1940845 y DID UACh 1330-2-09.

ANALISIS DE POLIMORFISMOS DE RESTRICCION Y DE SECUENCIA EN EL DNA MITOCONDRIAL DE DOS POBLACIONES ABORIGENES CHILENAS.(Mitochondrial DNA polymorphism analysis in two chilean aborigen population). M. MORAGA y P. CARVALLO. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El DNA mitocondrial (mtDNA) resulta extremadamente útil en el estudio de poblaciones debido a su modalidad de herencia, fundamentalmente materna, a la ausencia de recombinanción y a su mayor tasa de fijación de mutaciones; características que generan un alto grado de polimorfismo en su secuencia. Nuestro trabajo involucra el estudio de polimorfismos en la secuencia del mtDNA para dos poblaciones aborigenes chilenas; tanto por la detección de sitios de restricción polimórficos, como por secuenciación directa de regiones hipervariables. El objetivo es conocer el origen de estas poblaciones y la posible vinculación entre ellas y con poblaciones asiáticas y americanas en el contexto del poblamiento de América. Hemos estudiado 105 **Pehuenches** del centro-sur de Chile y 21 **Yamanes** del extremo sur del país, analizando 4 regiones polimorficas del mtDNA, ampliamente estudiadas en poblaciones amerindias.
Esta regiones (3 sitios de restricción y una deleción de 9pb) definen 4 haplotipos, A,B,C y D propios de poblaciones asiáticas y americanas. Hemos realizado este análisis por amplificación con la técnica de PCR de las regiones ya descritas y posterior digestión con las enzimas de restricción específicas. De los 105 Pehuenches estudiados 3 presentan el haplotipo A,11 el B,43 el C y 48 el D. En los Yamanes 10 individuos presentan el haplotipo C y 11 el D, no encontrandose los haplotipos A y B. Los resultados obtenidos por secuenciación de la región hipervariable, D-loop, tanto para los 21 Yamanes como para 32 Pehuenches indican una estrecha correlación entre los haplotipos definidos por el análisis de restricción, y permitirían establecer un posible patrón de migración local de estas poblaciones. Además nuestros resultados estan en concordancia con las frecuencias publicadas para los 4 haplotipos en el resto de América y confirman la disminución de los haplotipos A y B hacia el extremo sur del continente.

(FONDECYT 193-1028).

CONSTRUCCION Y EXPRESION DE GENES HIBRIDOS DE *Omp* DE *Salmonella typhimurium* Y EPITODOS DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B.(Construction and expression studies of hybrid genes derived from the *Salmonella typhimurium ompF* genes containig epitopes from hepatitis B surface antigen). M. TORREJÓN, S. URRA y A. VENEGAS. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile

La porina OmpF de *Salmonellla typhimurium* es una proteína de membrana externa, que forma poros hidrofilicos que permiten la entrada de solutos de un peso menor de 600 daltons. La estructrua de OmpF de *Escherichia coli* ha revelado que la proteina es rica en estructura ß plegada y atraviesa 16 veces la membrana externa dejando 8 «loops» expuestos hacia el exterior. OmpF constituye una de las proteínas más abundantes de la envoltura bacteriana y podría servir de soporte para presentación de epitopos foráneos, que se podrían insertar en los loops mediante la construcción de genes hibridos. Para esto, se ha utilizado la existencia de dos sitios de restricción (NruI y NaeI) ubicados en la zona codificadora de los loops #5 y #7 del gen ompF. Se han insertado segmentos de 27 y 21 pares de bases que codifican para un epitopo definido del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Los óligos fueron sintetizados quimicamente, fosforilados y ligados al plásmido pSTMPF91 (que contiene el gen ompF) linearizado en los sitios unicos NruI y NaeI. Luego de transformación de la cepa *E. coli* HB101, se aislaron transformantes verificando la inserción de los epitopos mediante incremento del tamaño de los plásmidos, reacción de PCR y detección de los hibridos por Western blots. Se ailaron 9 clones con insertos en el sitio NaeI que expresan la proteína hibrida y la exportan a membrana externa. Entre éstos, 3 de ellos dieron la orientación correcta del inserto mediante análisis por PCR. Un estudio preliminar indica que en algunos clones se ha incorporado más de una copia del epitopo. Además, se aislaron 2 clones NruI, de los cuales uno expresa el producto, a un nivel menor que los otros clones, el cual se va a membrana externa y con el epítopo en orientación correcta. Resultados de expresión similares se obtuvieron al introducir estos plásmidos con genes híbridos en *S.typhi* mediante electroporación.
Se concluyo que es más expedito incorporar epitopos en el loop #7 que en el #5 del gen *ompF* de *S. Typhimurium y*, aparentemente, la inserción no afecta el proceso de destinación a membrana externa. Sin embargo, en algunos clones se advierte un mayor proporción del producto que aún contiene el péptido señal. La utilización de la porina OmpF como soporte de epitopos foráneos abre grandes espectativas para el desarrollo de una vacuna oral viva basada en *S. typhi*, aplicable para la presentación de diversos antígenos.

Financiado por Proyecto FONDECYT 682-91 y UNIDO GE/GLO/89001-CHI88/05.

COMUNICACIONES LIBRES II

ESTRUCTURA DE PROTEINAS

MODELAJE COMPUTACIONAL DE INHIBIDORES DE BETA-LACTAMASAS. AVANCES Y PROYECCIONES. (Computational shaping of beta-lactamase inhibitors). M. CAMPOS, O. VÁSQUEZ, R. PAREDES, C. PARRA, G. BOCAZ, L. FUENTEALBA, H. GONZÁLEZ. Departamento de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción.

El estudio de nuevos inhibidores de ß-lactamasas va a permitir combatir más eficazmente el problema de resistencia bacteriana mediada por estas enzimas. En nuestro laboratorio, hemos utilizado el programa Alchemy, versión de tres TRIPOS Asocciates para modelar el sitio de la proteína que contiene la Ser_{70}, responsable de la catálisis y hemos minimizado la energía de esta cadena peptídica en superposición a diversos inhibidores ensayados in vitro en anteriores experimentos. Los inhibidores estudiados son: sulbactam, ácido clavulánico, ácido olivánico, 6-ß bromopenicilánico, 6-ß-yodopenicilánico y BRL 42715. Con los resultados de interacción y cálculo de energía mínima para los inhibidores y el péptido más importante del sitio activo de la ß-lactamasa, se propone una estructura para un nuevo inhibidor que presente una gran irreversibilidad para la ß-lactamasa, pero cuya estructura sea estable tanto in vitro como in vivo.

Se agradece a los proyectos 93.24.01-1 de DIUC y 2940033 de FONDECYT.

CARACTERIZACION Y DISTRIBUCION TOPOGRAFICA DE GLICOPROTEINAS EPIDIDIMARIAS DE POTROS. (Characterization and topographic distribution of stallion epididymal glycoproteins). J. URZÚA, C.*RETAMAL, M.L. LÓPEZ. Departamento de Biología Celular y Genética, Servicio de Fisiopatología*, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Se ha demostrado que los espermatozoides adquieren la motilidad y capacidad fecundante durante su paso por el epididimo. Sin embargo, poco se conoce sobre el mecanismo que media estos cambios, la naturaleza de estos "mediadores" o su importancia relativa en la adquisición de la capacidad fertilizante. El epitelio epididimario, blanco de la acción androgénica, absorve, secreta y sintetiza varios compuestos presentes en el plasma seminal. El presente trabajo tiene por objeto analizar, mediante técnicas electroforéticas y citoquímicas, proteínas y glicoproteínas presentes en las regiones de conducto eferente, cuerpo y cola epididimaria obtenidas de potros, en y fuera de temporada reproductiva. Nuestros resultados indican que el patrón electroforético de las proteínas epididimarias difiere no sólo del patrón electroforético del plasma sanguíneo, sino también entre los diferentes segmentos epididimarios. Se observó que proteínas de PM 70000, 36000, 23000,21000 y 18000 aparecen o aumentan su concentración hacia las regiones más distales de este órgano. Existen proteínas que mantienen su concentración (PM55000) y otras que disminuyen de la región de cabeza a cola epidedimaria (PM66000 y 14000). Las proteínas de PM 70000, 66000, 55000, 36000, 23000 y 14000 son glicoproteínas. en plama epididimario se observaron proteínas de similar comportamiento electrofóretico. No se detectaron diferencia significativas en las movilidades electroforéticas relativas de los diferentes animales estudiados, como tampoco en los patrones electroforéticos de proteínas obtenidas en animales en estación reproductiva como fuera de ella. Se discute el rol glicoproteínas epididimarias como probables "mediadores" del proceso de maduración espermática

(DTI.3592/9312).

EXPRESION, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DEL PEPTIDO CARBOXILO TERMINAL (394-445) DEL ISOTIPO cBeta2 DE Beta-TUBULINA DE POLLO. (Expression, purification and characterization of C-terminal (394-445) peptide of chicken Beta-tubulin cBeta2 isotype). C. ARANDA, R. LAGOS, J. EVANGELIO*, J.M. DE PEREDA*, J.M. ANDREU* y O.MONASTERIO. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y C.I.B., C.S.I.C., Madrid, España*.

La tubulina, un heterodímero compuesto por dos subunidades denominados α y ß de 55 kDa, autoensambla para formar los microtúbulos. En base a patrones de digestión con enzimas proteolíticas se propuso la existencia de tres dominios estructurales en cada subunidad, lo que concuerda con resultados de difracción de rayos X de baja resolución en microtúbulos hidratados. El dominio carboxilo terminal de ambas subunidades termina en un péptido que es removible con subtilisina u otras proteasas, y tiene un alto contenido de aminoácidos ácidos. Este péptido participa en la interacción de tubulina con proteínas asociadas a microtúbulos, y se piensa que posee el sitio de unión para Ca^{+2}, responsable de inhibición de la polimerización de tubulina. El objetivo de este trabajo es determinar la participación estructural del extremo C-terminal de ß-tubulina en la formación de sitios de alta afinidad para Ca^{+2}. Con este propósito se ha clonado en el vector pT7-7 la secuencia de DNA correspondiente al péptido (394-445) del isotipo cß2, el más abundante de, ß-tubulina de pollo. Su expresión en *E. coli* genera en fragmento de 6,9 kDa. Este péptido se ha purificado a homogeneidad, y se ha determinado su secuencia, susceptibilidad a enzimas proteolíticas y reacctividad a anticuerpos monoclonales. Estimaciones de estructura secundaria por Dicroismo Circular muestran un 51% de estructura ß, 48% al azar, 0% vuelta ß y 0% α-hélice. Análisis preliminares por FT-IT y ^{1}H-NMR apoyan estos resultados.

Financiado por el Proyecto Fondecyt 1051-92 y la Agencia Española de Cooperación Internacional.

ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE ARGINASA DE HIGADO DE RATA INMOVILIZADA (Structural studies of inmobilised rat liver arginase). E. URIBE, M. SALAS, C. TORRES, C. PAQUIEN, M. BAEZA y N. CARVAJAL. Laboratorio de Enzimología, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Para conocer la estructura oligomérica de la arginasa de hígado de rata, se han usado varias técnicas, pero aún no hay consenso respecto al número de subunidades de la enzima nativa. Para abordar el problema, en este trabajo hemos recurrido a un sistema de inmovilización, previamente utilizado para estudiar la enzima humana. Además, usamos este sistema para analizar los siguientes aspectos; (1) renaturación de especies previamente denaturadas con clorhidrato de guanidina (GdnHCl), en condiciones en que está impedida la formación de agregados insolubles, como ocurriría en solución; (2) posibilidad de formación de especies híbridas que contienen subunidades humanas y de rata, considerando la alta homología de las secuencias deducidas para estas dos enzimas, y caracterización cinética de estas especies.
Para la inmovilización, usamos Sepharosa activada y mallas de nylon, demostrándose las ventajas de este último sistema para los objetivos propuestos. Los resultados apoyan una estructura trimérica para la arginasa de rata e indican que la imposibilidad de reactivar completamente la enzima desnaturada con GdnHCl 6M, no resulta sólo de la formación de agregados insolubles. Entre otras alternativas, se discute la posible participación de otro componente, con un rol estructural en la enzima. Por último, se demuestra la formación de híbridos entre subunidades humanas inmovilizadas y subunidades solubles de rata. Se discuten los resultados en base a las propiedades conocidas y otras que se han sugerido para estas y otras arginasas.

Proyecto FONDECYT 92-0294

LOCALIZACION DEL SITIO ACTIVO DE ß-AGARASAS POR MODIFICACION QUIMICA(Localization of the active site of ß-agarases by chemical modification). O. LEON, G. PERUZZO y J.C. SLEBE. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Las ß-agarasas (EC3.2.1.81) catalizan la hidrólisis de los enlaces ß-1,4 de agarosa. Hasta ahora se han caracterizado tres genes codificantes de estas enzimas. La comparación de sus secuencias en general muestra poca homología, observándose solamente dos pequeñas regiones similares cuya función no ha sido establecida.
Para localizar el sitio activo de las ß-agarasas hemos propuesto realizar estudios de modificación química de grupos funcionales que participan en mecanismos de catálisis ácido-base en otras polisacárido hidrolasas. Este enfoque, que requiere de la modificación de grupos esenciales para la actividad, nos permitiría obtener información de los péptidos que contienen dichos grupos.
En este trabajo se presentan los resultados de la modificación de ß-agarasa de *A.sp* C-1 con 1-etil-3,3-aminopropil-carbodiimida (EDC), que reacciona preferencialmente con grupos carboxilos. La enzima fue inactivada por EDC, presencia de metilamina. La reacción de inactivación ocurre con una cinética de seudo primer orden con respecto a EDC y su velocidad disminuye significativamente por la adición de oligosacáridos. El análisis de las constantes de inactivación obtenidas a diferentes concentraciones de EDC indica que un solo grupo carboxilo estaría involucrado en la reacción de inactivación. Asimismo, se observó que la reacción de modificación produce una disminución de la constante de volocidad K_{cat} sin afectar K_m, lo que sugiere su posible participación en el mecanismo catalítico de la enzima.
Los reultados presentados sugieren que EDC modifica un grupo carboxilo esencial de ß-agarasa de *A.sp* C-1, validando el enfoque propuesto.

(Financiado por: FONDECYT 94-867 y DID UACH S-92-25)

IDENTIFICACION DE RESIDUOS DE LISINA REACTIVOS DE LAS CARBOXIQUINASAS FOSFOENOLPIRUVICAS DE *E. Coli* Y DE *S.CEREVISIAE* (Identification of reactive lysyl residues phosphoenolpyruvate carboxykinases from *E. Coli* and *S. cervisiae*). S. BAZAES[1], H. GOLDIE[3], E. CARDEMIL[2] y A. M. JABALQUINTO[2] .Departamento de Química, UMCE[1], USACH[2]. Chile y [3] Universidad de Saskatchewan, Canadá.

Las carboxiquinasas fosfoenolpirúvicas (PEPCKs) de *E. Coli* y de *S. cervisiae*emplean ATPcomo sustrato nucleotídico. Como parte de un estudio conducente a determinar las bases estructurales de la especificidad nucleotídica, se estudía la reactividad de residuos de lisina frente al piridoxal-5'-fosfato. Ambas enzimas se inactivn al incubarlas con el reactivo a concentraciones equimoleculares. Los sustratos ADP o PEP, en presencia de Mn^{+2} , protegen completamente a la PEPCK de *E. Coli* de la pérdida de actividad, en tanto que el metal-nucleótido confiere protección completa a la enzima de *S. cervisiae*. La inactivación completa de ambas enzimas se correlaciona con la incorporación de aproximadamente 1 mol de reactivo por mol se subunmidad de enzima. Muestras de las dos PEPCKs modificadas con piridoxal-6'-fosfato se carboximetilaron y se trataron con tripsina y proteasa V-8. De ambas enzimas se aisló un péptido preferencialmente marcado con el reactivo. La secuencia de los péptidos reveló que los residuos modificados corresponden a la Lys286 de la enzima de *E. coli* y la Lys289 de la enzima de *S. cervisiae*. Estos residuos están ubicados en una región altamente conservada de las PEPCKs de secuencias conocidas dependientes de ATP. Se concluye que los residuos modificados podrían estar ubicados en el sitio activo de estas enzimas.

Financiado por DICYT-USACH, FONDECYT 1941073 y DIUMCE QM 92-05.

COMUNICACIONES LIBRES III

INCORPORACIONES ENZIMOLOGIA Y ESTRUCTURA DE PROTEINAS

AISLAMIENTO DE ACTIVIDADES ATPásica-ADPásica DE RIÑON DE RATA Y SU POSIBLE FUNCION FISIOLOGICA. (Isolation rat Kidney ATPase-ADPase activities and possible physiological function). S. SANDOVAL, M.A. VALENZUELA, L. GARCÍA, M. MANCILLA, A.M. KETTLUN, L. COLLADOS, L. CHAYET y A. TRAVERSO-CORI. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

En tejido renal se ha descrito la presencia de una actividad ADPásica, que participaría inhibiendo la agregación plaquetaria. Nuestro grupo ha propuesto que esta actividad corresponde a la ATP-difosfohidrolasa, que ha sido detectada en diversos tejidos animales.
Se trabajó con una fracción enriquecida en membrana en cepillo de corteza renal, la que se solubilizó con octilglucósido y se sometió a isoelectroenfoque separando sus proteínas. Sólo se detectó una zona con pI 5,4 con ambas actividades ATPásica y ADPásica.
La caracterización cinética de esta fracción mostró una gran inespecificidad frente a nucleósidos di y trifosfato, pero no tenía actividad 5'-nucleotidásica. Esta fracción fue insensible frente a Ap5A, ouabaína, DES, DCCD y azida; en cambio, oligomicina y vanadato fueron inhibidores.
Si la función propuesta es correcta, esta enzima debe ser ectoproteína. Para demostrarlo se han iniciado estudios de perfusión en riñón. Se encontró que había hidrólisis de ATP y ADP, dependiente de Ca^{2+}, y que ouabaína, o verapamil no alteraban la cantidad de sustratos hidrolizados. La confirmación de que estas actividades ectoenzimáticas correspondan a una misma enzima está sujeta a estudios con su anticuerpo antiATP-difosfohidrolasa.

Financiado por Proyecto Fondecyt 193-1003.

CARACTERIZACION DEL PLEGAMIENTO DE LA TUBULINA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA INTRINSECA DE TRIPTOFANOS.(Tubulin folding characterization by intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy). P. RODRIGUEZ y O. MONASTERIO, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El componente principal de los microtúbulos es la tubulina, un heterodímero de peso molecular 100.000, que para polimerizar microtúbulos *in vitro* requiere de Mg^{2+}, GTP y cosolventes. La tubulina posee 2 sitios de unión para el nucleótido GTP, denominados intercambiables y no-intercambiable. La determinación y localización de los residuos que participan en el sitio no-intercambiables no ha sido resuelta; fundamentalmente debido a la falta de un procedimiento adecuado para remover el nucleótido en forma reversible. En el presente trabajo se muestra la caracterización del replegamiento reversible de la tubulina tratada con cloruro de guanidinio (GuHCl) 4,5M.
Por medio de espectroscopía de fluorescencia intrínseca, tanto de emisión como de polarización, se deteminó que los residuos triptófanos de la tubulina replegada son capaces de ubicarse en un ambiente apolar, similar o igual al de la proteína nativa. Se encontró también, que el cambio de intensidad y el corrimiento del máximo de emisión estudiado en función de la concentración del agente desnaturante, siguen una curva sigmoidea con un punto medio en 1,7 M de GuHCl, tanto al desnaturar como al renaturar. Además, se determinó que la tubulina replegada es recuperada soluble en un 100% y es estable a 50°C por períodos mayores a 30 min, en presencia de concentraciones bajas de magnesio, no obteniendose precipitado, lo que indica que la tubulina replegada tiene una integridad conformacional similar a la nativa, pues ambas no precipitan en estas condiciones.
Estos resultados muestran que es posible replegar reversiblemente a la tubulina en un estado soluble y estable, lo que permitirá elaborar un procedimiento experimental, con el que se espera lograr reemplazar el GTP del sitio no-intercambiable por una sonda apropiada para determinar los aminoácidos involucrados en las interaciones con el nucleótido en este sitio.

(Financiado por Fondecyt, Proyecto 92-1051).

LA FLUORESCENCIA DEL PIRENO COMO SONDA DE LA FLUIDEZ LIPIDICA DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO. (Pyrene fluorescence as probe for lipid fluidity in erythrocyte membrane). G. CELEDÓN, C.L. VALENZUELA, Y. MONTALAR y G. GONZÁLEZ. Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencia, Universidad de Valparaíso e Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso.

La microviscosidad o fluidez de la bicapa puede estimarse por medio de la formación de los excímeros de pireno (Py) o del 1-pirenildodecanoato (PDA). Py además puede ser excitado por transferencia de energía desde proteínas de la membrana (Ro=45A) detectándose así la fluidez del entorno de estas proteínas.
En membranas reselladas de eritrocitos humano la formación de excímeros de Py ubicado cerca de proteínas es mayor que el formado en toda la bicapa. La formación de excímeros de PDA cercano a proteínas y a nivel del C-12 de la cadena acídica de la monocapa externa es inferior al observado en toda la membrana. El apagamiento con KI muestra que éste afecta la fluorescencia de las proteínas, aunque la formación de excímeros de PDA no se modifica. El efecto sobre el Py afecta sólo al ubicado en las zonas más superficiales de la membrana. El alcohol bencílico, un agente fluidificador de la monocapa interna, produce un aumento en la formación de excímeros de Py en igual proporción en zonas cercanas a proteínas como en toda la bicapa. La formación de excímeros de PDA no es modificada.
Estos resultados indican que 1. Py distingue dominios más fluídos cercanos a proteínas, no así PDA. 2. La fluidez de dominios próximos a proteínas corresponde a zonas de la monocapa interna. 3. Establecer la ubicación de Py excitado por transferencia de energía permitiría usarlo para relacionar cambios en el entorno lipídico de zonas definidas con cambios en la función de proteínas ubicadas en esas zonas.

Financiado por Dirección de Investigación, U. de Valparaíso.

DETERMINACION DEL NUMERO DE RECAMBIO DE LA ENZIMA 1-AMINOCICLOPROPANO CARBOXILATO OXIDASA DE MANZANA. (Determination of the turnover number of 1-aminocyclopropane 1- carboxylic acid oxidase). E. HUBERT y P. JOHN. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca y School of Plant Sciences, University of Reading, Inglaterra.

La enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato oxidasa (ACCoxidasa) cataliza la síntesis de etileno a partir del sustrato, el ácido aminociclopropano carboxilico. La enzima requiere Fe^{2+} y ascorbato para su actividad. sin embargo, la ACCoxidasa ha sido dificil de purificar con su máxima actividad porque al romper el tejido (melón,manzana, kiwi, etc.) se pierde la actividad enzimática. En la literatura hay una controveresia en cuanto a la actividad *in vivo* de la enzima, especialmente en cuanto a su número de recambio. El objetivo de este trabajo fue determinar este parámetro usando técnicas inmunológicas. Para ello se construyó una curva de calibración con enzima purificada de tomate y anticuerpos policlonales parcialmente purificados. El estudio de la enzima se realizó utilizando manzana entera, discos de manzana y extractos. Se determinó la actividad enzimática mediante cromatografía de gases determinando el producto formado, el etileno. Los resultdos obtenidos concuerdan con los anteriormente informados en la literatura y corresponde a un número de recambio de aproximadamente dos. Este valor varia según el estado de maduración de la manzana.

DESNATURACION POR UREA DE CARBOXIQUINASAS FOSFOENOLPIRUVICAS DE MICROORGANISMOS. (Urea denaturation of microorganisms phosphoenolpyruvate carboxykinases). M.V. ENCINAS y E. CARDEMIL. Departamento de Química, Universidad de Santiago de Chile.

La estabilidad conformacional de una proteína se puede expresar en términos de su energía libre de desenrrollamiento en agua [delta $G(H_2O)$], y ésta puede calcularse a partir de las curvas de desnaturación. Entre las carboxiquinasas fosfoenolpirúvicas de microorganismos (ATP+oxaloacetato fosfoenolpiruvato + ADP+ CO_2), se ha descrito que la enzima de *Escherichia coli* presenta cambios en al emisión de fluorescencia intrínseca luego de la ligazón de Mn^{2+} o de MgATP, lo que no ocurre con la enzima de *Saccharomyces cerevisiae* [Encinas *et al.*(1993) *BBActa* 1162, 195-202]. Como una manera de obtener información en relación al efecto de la ligazón de los sustratos en la estructura de la proteína, hemos determinado su estabilidad termodinámica en presencia y ausencia de sustratos, midiendo el efecto de la concentración de urea sobre parámetros relacionados con su conformación. Suponiendo un modelo de dos estados, la enzima de *E. coli*, presenta un delta $G(H_2O)$ de 3,5 kcal/mol. La presencia de MgATP causa un aumento en la estabilidad conformacional de la enzima, subiendo la $[urea]_{1/2}$ desde 2,5 a 5,4 M. Para la enzima de levadura se encontró una estabilidad termodinámica similar. Estos resultados indican un notable efecto estabilizador de los sustratos en la conformación de la proteína, lo que podría constituir una herramienta para estudiar la interacción de otras moléculas con el sitio activo de la enzima.

Financiado por FONDECYT 1941073 y DICYT-USACH.

ANALISIS ESTRUCTURAL DEL LA ß-LACTAMASA I DE *B. CEREUS* 569/H.(Structural Analysis of ß-lactamase I from *B. Cereus*. M. BUNSTER, M. CANALES y H. CID. Laboratorio de Biofísica Molecular, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. Incorporación. Patrocinate J. Olate

Se plantea una metodología para realizar análisis estructural desarrollada en base a una familia de proteínas, las ß-lactamasas, y es aplicable a cualquier familia de proteínas estructuralmente relacionadas.
Se requiere disponer de la estructura primaria exacta, la información proveniente de modificaciones químicas, la información estructural proveniente de análisis de difracción de rayos x de cristales de proteínas de la familia, estudios de actividades relativas, estudios de inhibición, y de mofificadores de estos procesos para llegar a postular un modelo válido para explicar la función de una enzima. Como objeto de este estudio se utilizó la ß-lactamasa I de *B. Cereus* 569/H, se hizo analogía de secuencias, se contruyó un modelo minimizado y se comprobó el modelo propuesto para la proteína. El modelo propuesto resulta con alta semejanza estructural con las proteínas de la familia, el análisis estructural informa que el modelo está dentro de los límites empíricos para proteínas globulares, y los datos de dicroísmo circular confirman los porcentajes de estructura secundaria calculados para el modelo.

Proyecto 93.31.51-1, DI-Universidad de Concepción.

REGION N-TERMINAL DE LA ß-LACTAMASA DE *Shigella flexneri* UCSF-129.(N-terminal aminoacid sequence of beta-lactamasa from *Shigella flexneri* UCSF-129). M.CAMPOS, E. BAYER, H.GONZÁLEZ, K. SCHMEER, S. STEVANOVIC, H. JOUCHIN, G. BOCAZ y O. VÁSQUEZ. Departamento de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción.

La actividad ß-lactamásica es el principal mecanismo de resistencia a antibióticos ß-lactámicos, como las penicilinas y las cefalosporinas (penicilin amino ß-lactama hidrolasas, E.C.3.5.2.6.). Están presentes en la mayoría de las cepas bacterianas patogénicas. Se ha convertido en un grave problema, considerando el aumento de la resistencia en dichos microorganismos aún a antibióticos de tercera y cuarta generación. La Shigellosis es la mayor causante de muerte en países en desarrollo. Es importante caracterizar la ß-lactamasa de *Shigella flexneri* UCSF-129 para lograr diseñar y sintetizar su inhibidor óptimo, con el objeto de recuperar los antibióticos como las penicilinas que son todavía medicamentos de elección para muchas infecciones, de bajo costo y sin efectos secundarios. La ß-lactamasa de *Shigella* se purificó en forma muy eficiente mediante un proceso de dos étapas: cromatografía en Sephadex G-75 y h.p.l.c. en C_{18}-columnas de fase reversa. La homogeneidad de la enzima purificada se confirmó por electroforesis zonal capilar, por espectrometría de masas electrospray h.p.l.c. (LC-ESMS) y por el resultado de la secuencia aminoacídica del péptido estudiado. Se determinó que esta enzima es monomérica con un peso molecular de 28.903±2 Da, de acuerdo a LC-ESMS. Se estableció la secuencia de 49 aminóacidos de la región N-terminal de esta proteína, encontrándose similitud con las formas maduras de enzimas plasmidiales de *E. coli*.

Financiamiento: DIUC 93.24.01-1 y FONDECYT 2940033.

COMUNICACIONES LIBRES IV

ENZIMOLOGIA Y BIOLOGIA MOLECULAR

CARACTERIZACION DE LAS CISTEINAS 364 Y 457 DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA (PEPCK) DE *S. CEREVISIAE* (Characterization of cysteines 364 and 457 of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *S. cerevisiae*). H. KRAUTWURST, M.V. ENCINAS y E. CARDEMIL. Departamento de Química, Universidad de Santiago de Chile.

Experimentos de modificación química han demostrado que las cisteínas 364 y 457 de la PEPCK de levadura reaccionan rápidamente con reactivos alquilantes. La presencia de los sustratos de la enzima protege la reacción de modificación. La mutación sitio-específica de estos residuos, cambiándoles aisladamente o en conjunto por residuos de serina, demostró que no son catalíticamente importantes [Cardemil *et al.*(1994) *FASEB J.* 8 (7) R-121]. El disponer de las PEPCKs mutantes C364S y C457S ha permitido caracterizar la reactividad química y el microentorno de estas cisteínas. Estos residuos fueron marcados selectivamente por pireno-maleimida. Las propiedades fluorescentes de este cromóforo se usaron como herramienta para obtener información del microentorno. Se encontró además que las constantes de segundo orden para la reacción de la sonda fluorescente a pH 7,4 y 0 °C con Cis364 y Cis457 fueron $3{,}0x10^3$ $M^{-1}S^{-1}$ y $1{,}4x10^2M^{-1}s^{-1}$, respectivamente. Concluimos que la Cis 457 ocupa una posición más expuesta al solvente que la Cis 364, y que la reactividad química frente a pireno-maleimida de la primera es 21 veces mayor que la de la segunda. La presencia de residuos cargados positivamente en los alrededores de la Cis457 disminuiría su pKa, explicando así la mayor reactividad de este residuo.

Financiado por FONDECYT 941073 y DICYT-USACH.

MODIFICACION QUIMICA DE ATP-DIFOHIDROLASA DE DIVERSOS ORIGENES.(Chemical modification of ATP-diphosphohydrolase from different sources) V. ESPINOSA, M.A. VALENZUELA, A. M. KETTLUN, A. ALVAREZ, L.COLLADOS, M. MANCILLA, A. TRAVERSO-CORI, A. CHAYET. Departamento de Bioquimica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

La ATP-difosfohidrolasa presente en tejidos vegetales y animales, ha sido estudiada desde un punto de vista estructural y mecanístico sólo en *S. tuberosum*. Con el objeto de comparar el mecanismo de acción de la apirasa de diferentes tejidos animales (corazón,glándula mamaria de rata, y placenta humana), se ha procedido al estudio del sitio activo mediante modificadores selectivos de grupo.
Los modificadores usados se seleccionaron pensando en que podrían participar residuos de Arg o Lys neutralizando el pirofosfato, lo que facilitaría un ataque nucleofílico sobre el fósforo; en residuos aromáticos para la unión de la base nitrogenada y finalmente, en un residuo nucleofílico que realizaría una catálisis básica general y que podrían ser grupos -COO-, imidazol o -SH. Las condiciones empleadas de modificación dependieron de la enzima en estudio. Se empleó como protector de la inactivación el sustrato o un análogo.
Se descartó la esencialidad de grupos -SH, característica que diferencia esta enzima de las ATPasas de transporte de iones. Con todas las enzimas, Arg e His parecen ser residuos esenciales. En cambio, se encontraron algunas diferencias con los residuos aromáticos (Tyr y Trp), grupos -COO- y Lys, porque no siempre se observó protección por sustrato.

Proy. Fondecyt 193-1003 y DTI B-3345-9213.

FRUCTOSA -1,6-BISFOSFATASA DE OOCITOS DE RANA: CARACTERIZACION CINETICA Y DETECCION DE SU ACTIVIDAD *IN VIVO*.(Fructose-1,6-bisphosphatase from frog oocytes: Kinetic characterization and *in vivo*. demonstration of its activity) V. GUIXÉ y A. PRELLER. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

En oocitos de rana aproximadamente 50% de la glucosa se convierte en lactato 1 o 2 min después de ser microinyectada. En vista que estas células más de 90% de la reactividad microinyectada como [^{14}C] glucosa aparece en glicógeno después de 20 min de incubación la síntesis del polisacárido a partir de glucosa debe ocurrir por gluconeogénesis, para lo cual se requiere de la actividad de fructosa-1,6-bisfosfatasa(FBPasa). Esta es una enzima clave en la regulación de la vía gluconeogénica y se encuentra presente en mamíferos, plantas, levaduras y otros microorganismos. En oocitos de anfibios, la presencia de esta ctividad enzimática ha sido motivo de controversia.
En nuestro laboratorio se investigó la actividad de la enzima en la fracción sobrenadante de homogeneizados de oocitos de rana. Se encontró una actividad de 33mU/g de oocito. La caracterización cinética de la enzima parcialmente purificada mostró un valor de Km para fructosa-1,6-bis-P= 17μM, con inhibición por sustrato o concentraciones sobre 100 μM. Se estudió además el efecto de la concentración de AMP y fructosa-2,6-bisP, dos potentes inhibidores de la enzima de mamíferos, sobre la actividad de la FBPasa de oocitos de rana. La enzima es inhibida por AMP en forma cooperativa (n_H 2,2) con un valor de K_i de 19 μM y por fructosa-2,6-bisP con un valor de K_i de 1,8 μM.
Si bien estas características cinéticas son compartidas por todas las FBPasas conocidas de vertebrados, el peso molecular de la subunidad de la enzima de oocitos, constituye una excepción. El valor de éste, determinado por electroforesis en presencia de SDS y posterior detección inmunológica en membranas de nitrocelulosa, fue de 44.000 en comparación con el de 37.000 informado para la mayoría de las enzimas estudiadas. Este valor, sin embargo, es muy parecido al de FBPasa de hígado de rata (PM41.000) la cual posee una región extra de 24-26 aminoácidos donde está localizado el sitio de fosforilación.
La detección de la actividad enzimática *in vivo*. se realizó por microinyección de [U-^{14}C]glucosa o [6-^{32}P]fru/1,6/bisP y posterior separación, por cromatografía líquida de alta resolución, de los intermediarios producidos. En ambos casos se detectó la presencia de un pico de radiocatividad correspondiente a fructosa-6-P, lo que indica que la enzima se encuentra activa *in vivo*.

(Financiado por Fondecyt, Proyecto 0829-91).

¿ES FUNCIONAL LA GLICOLISIS EN OOCITOS DE RANA? (Is glycolysis an operative pathway in frog oocytese?) E. KESSI y T. URETA. Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La presencia de actividad glicolítica en oocitos y embriones tempranos de anfibios ha constituido materia de controversia. Diferentes evidencias y argumentos han favorecido la idea que en estos sistemas el metabolismo de la glucosa está dirigido principalmente hacia la síntesis de glicógeno, y que la glicólisis no es funcional en dichos sistemas. En efecto, la microinyección de [^{32}P]PEP no resulta en la produccion de [^{32}P]ATP sino en la aparición de la marca en glucosa-6-P,glucosa-1-P y posteriormente UDP-glucosa. Por otra parte, el tratamiento de las células con dinitrofenol, resulta en la aparición de ATP marcado a partir de [^{32}P]PEP. Además, la microinyección de oocitos con [6-^{14}C]glucosa no produce CO_2 radiactivo. Finalmente, no es claro si existe actividad de fosfofructoquinasa (PFK) en estas células. Estos hechos considerados en conjunto son consistentes con la idea que la glicólisis no es funcional en estos sistemas.
La presencia de PFK (4 mU/g oocitos) se detectó en homogeneizados de oocitos en presencia de inhibidores de proteasas. Por otra parte, en extractos perclóricos de oocitos microinyectados con [U-^{14}C] glucosa se separaron varios intemediarios, mediante cromatografía líquida de alta resolución. Una fracción radiactiva, producida a tiempos cortos de incubación (1 o 2 min) que constituye hasta 50% de la radiactividad inyectada, fue identificada como lactato mediante tratamiento con lactato deshidrogenasa y alanina transaminasa. La conversión de glucosa en lactato demuesta que la glicólisis es funcional.
La síntesis de ATP a partir de hexosas-P constituye otro criterio para demostrar que la glicólisis es operativa. Para estudiar la producción de ATP, se microinyectaron oocitos con [^{32}P]fructosa-6-P. El análisis de los extractos perclóricos correspondientes mostró la presencia de ATP radiactivo. Para excluir la posibilidad que el ATP producido provenga de la actividad de la cadena respiratoria, se microinyectaron oocitos con [^{32}P]fructosa-6-P en presencia de cianuro a concentraciones que inhiben totalmente el consumo de oxígeno de estas células (0,1 mM). Se observó que la producción de ATP es similar a la del control. Este conjunto de evidencias permite afirmar que la glicólisis es funcional en los oocitos de anfibios.

(Proyecto Fondecyt 91-0829).

EXPRESION EN *Escherichia coli* DE LA TIROSIL tRNA SINTETASA (TyrRZ) DE *Thiobacillus ferrooxidans*. (*T. ferrooxidans* TyrRZ expression in *E. coli*) O. ORELLANA, J. SALAZAR, O. SALAZAR y B. SAGREDO. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Las aminoacil tRNA sintetasas son las enzimas responsables de la fidelidad del proceso de traducción del mensaje genético, mediante la aminoacilación especifica de los tRNA.
En estudios previos realizados en nuetro laboratorio se aisló de *T. ferrooxidans* y secuenció el gen tyrZ, que codifica para una posible tirol tyrZ sintetasa (TyrRZ). Mediante complementación de una mutación termosensible en el gen tyrS de *E. Coli* HB2109, se demostró que el gen tyrZ codifica para una TyrRZ funcional. Adicinalmente se determinó que la TyrRZ aminoacilaba in vitro el $tRNA^{tyr}$ de *E. coli*
Por el clonamiento de *tyrZ* en el vector pET22b y la expresión en *E. coli* se obtuvo la proteína en la fracción insoluble. Al clonar tyrZ en el vector pGEX2t y expresarlo en *E. coli* se obtuvo alrededor de un 40% de la proteína (fusionada con la glutatión transferasa) en la fracción soluble. Esta proteína tiene reacción cruzada con anticuerpos especificos para la proteína proveniente de pET22b. A partir de la fracción soluble se purificará y se analizará las propiedades de la TyrRZ.

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

INTERACCION DE LA PROTEINA QUINASA CK2 CON DNA (Interaction of protein kinase CK2 with DNA) G. JACOB, M. GATICA, C. CONNELLY y J.E. ALLENDE. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, y Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La proteína quinasa CK2 (anteriormente llamada caseína quinasa 2) es una serina/treonina proteína quinasa preponderantemente nuclear que fosforila numerosas proteínas que participan en procesos de síntesis de ácidos nucleicos y en el control de la proliferación. El mecanismo fisiológico que regula la actividad de la CK2 no se conoce, a pesar de que *in vitro* se ha estudiado el efecto activador o inhibidor de varios compuestos. En nuestro laboratorio hemos clonado, expresado y purificado la subunidad catalítica α y la subunidad reguladora ß que forman la proteína oligomérica $\alpha_3\beta_2$ de *Xenopus laevis*, lo que nos permite medir la actividad CK2 recombinante. Usando las unidades recombinantes de CK2 hemos estudiado la interacción de la subunidad α con DNA. Hemos detectado que DNA tanto de una hebra como de doble hebra, es capaz de interactuar con CK2α causando la inhibición de su actividad catalítica. La interacción se ha demostrado con DNA total de espermio de salmón, con fragmentos del promotor de la CK2ß humana y con un fragmento de un gen de un receptor muscarínico de *X. laevis*. No parece haber una especificidad de secuencia deoxinucleotídica con estos ácidos nucleicos ensayados. Con un trozo sintético de 86 pb del fragmento del promotor se obtuvo una Ki aparente de 160 nM, siendo la inhibición aparentemente competitiva con respecto a caseína, su sustrato proteico. La presencia de la subunidad ß causa una drástica caída en la inhibición de la actividad catalítica causada por el DNA. Agregando exceso de CK2ß se elimina totalmente la inhibición. La interacción de CK2α con DNA también se ha estudiado mediante la retención de DNA marcando con ^{32}P al ser amplificado con PCR en presencia de α[^{32}P]dATP en filtros de nitrocelulosa. Se observa que esta retención depende de la presencia de CK2α. Experimentos de competencia con DNA no radioactivo demostraron también que la unión de CK2α al promotor de ß humana no es específica. Con este ensayo también se demostró que ß causa una disminución en la interacción de CK2α con DNA. Estos resultados podrían tener un significado fisiológico en el caso de que CK2α estuviera en el núcleo unida a DNA, siendo dicha interacción y la actividad de la enzima regulada por la disponibilidad de ß en dicho compartimiento.

(Apoyado por ICGEB, The Council for Tobacco Research y FONDECYT-Chile).

COMUNICACIONES LIBRES V

METABOLISMO Y REGULACION

LOS EFECTOS Y MODOS DE ACCION DE LAS 1,4-NAFTOQUINONAS AISLADAS DE *Calceolaria sessiles* SOBRE CELULAS TUMORALES Y PARASITOS TRIPANOSOMAS. (Effects and mode of action of 1,4 p-naphthoquinones isolated from *Calceolari sessilis* of tumoral cells and tripanosomes parasites). A. MORELLO, M. PAVANI, *J.A. GARBARINO, *M.C. CHAMY, C. FREY, J. MANCILLA, Y. REPETTO, *A. GUERRERO y J. FERREIRA. Departamento de Bioquímica, y *Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y *Departamento de Química, Universidad Técnica Federico Santa María.

Se estudiaron los efectos de la 2-hidroxi-3-1(1,1-dimetilalil)-1,4-naftoquinona (CS-1),(-)-2,3,3-trimetil-2,3-dihidronafto[2,3/b]furano-4,9-quinona(CS-3) y de la 2-acetoxi-3-(1,1-dimetilalil)-1,4-naftoquinona (CS-5) aisladas de *Calceolaria sessilis* sobre la forma epimastogote de *Tripanosoma cruzi*, el sarcoma TA3 y la sublínea celular resistente a metotrexato TA3-MTX-R.
La naftoquinona CS-3 fue la más activa. Los valores para obtener el 50% de inhibición del crecimiento celular (I_{50}) de *T. cruzi* (cepas Tulahuén y LQ y clon DM28c) fluctuaron entre 2y 5 µM y los I50 calculados en los cultivos de 48 h de las células tumorales TA3 y TA3-MTX- R fueron: 2,05±0,12 y 3,82±0,23 µM, respectivamente.
CS-3 inhibió la respiración de las células tumorales TA3 (I_{50}=0,67 mM) y TA3-MTX-R (I_{50}=0,87 mM) al bloquear el flujo de electrones en alguna región de la NADH deshidrogenasa, lo cual explicaría en parte el efecto citotóxito de este compuesto.
Pero, la respiración de *T. cruzi* no fue inhibida, lo cual está de acuerdo a que este parásito no tiene el sitio I de fosforilación ni una flavoproteina sensible a rotenona. Además, CS-3 provocó un aumento temporal del consumo de O_2 (salto), previamente inhibido por cianuro, tanto en *T. cruzi* como en las células tumorales, sugiriendo que también este efecto citotóxico se debería a la generación y la participación de radicales libres.

Proyectos N° B-2888 DTI y Nos. 1931107,1941048 y 579/92 FONDECYT

CONTENIDO TISULAR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLATICO BASICO (bFGF) EN EL DESARROLLO DEL TEJIDO MAMARIO DEL RATON (bFGF tissue content during the development of mouse mammary tissue). A. CHAPPUZEAU, M. SAPAG-HAGAR, S. LAVANDERO. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Se ha sugerido que diversos factores de crecimiento participan en la regulación del desarrollo de la glándula mamaria. El factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) es un polipéptido de 18 KDa y del cual previamente hemos demostrado que es un potente mitógeno y modulador de la diferenciación "*in vitro*" de las células epiteliales mamarias de ratón. Igualmente por inmunohistoquímica se logró establecer su presencia y distribución en dichas células epiteliales. Sin embargo, se desconocen lo niveles titulares fisiológicos del bFGF durante el desarrollo de la glándula mamaria.
En este trabajo se ha demostrado la presencia del bFGF en los extractos de tejido mamario de ratón mediante la purificación por cromatografía en heparina-sefarosa de un péptido que eluyó a concentración de NaCl 2M y presentó una masa de 18 KDa e inmunoreactividad a un anticuerpo ant.bFGF. Por radioinmunoensayo se determinaron las concentraciones y contenidos tisulares del bFGF en la glándula mamaria. Estos resultados se muestran en la siguiente tabla:

Etapa	n	peso tejido (g)	concent.bFGF (ng/g tejido)	contenido bFGF (ng)
Virginidad	6	0.47±0.09	192±45	90±35
Preñez tardía	6	0.93±0.11*	50±12*	47±14*
Lactancia media	6	1.45±0.28*	41±5*	59±14

*$p<0.05$ respecto a virginidad, n: número animales.

Los resultados permiten concluir: a) que el bFGF está presente en el tejido mamario de ratón y junto con los estudios inmunohistoquímicos previos sugieren una función paracrina-autocrina para este factor en el tejido mamario, y b) el contenido y concentración de bFGF es máximo en la virginidad, faltando a un cuantificar los niveles en al preñez media, período de máxima capacidad proliferativa.

*Proyecto DTI 3113-9333

ACTIVIDAD FRUCTANASA, INVERTASA Y ACUMULACION DE POLISACARIDOS EN TALLOS DE CAÑA DE AZUCAR DURANTE LA GERMINACION. (Fructanase, invertase activities and polysaccharide accumulation in sugar cane stalks during germination). M. PANEQUE, M. MARTÍNEZ, C. RODRÍGUEZ, S. NARANJO, I. MEDINA y R. DE ARMAS. Departamento de Biología, Universidad de la Habana.

La caña de azúcar acumula en sus tallos, además de sacarosa, polisacáridos incluyendo fructanos. La hidrólisis de la sacarosa a fructosa y glucosa, es catalizada por invertasas con distintos valores de pH óptimo.
En tanto los fructanos son heteropolímeros con diferentes grados de polimerización, compuestos por moléculas de fructosa y galactitol, los cuales son hidrolizados por un sistema fructanasa con dos actividades enzimáticas diferentes que requieren Mn^{2+}.
Se propone un modelo experimental que permite estudiar la producción y movilización de sacarosas y estos heterofructanos, así como su reutilización en el crecimiento de la yema de la caña de azucar.
La concentración de azúcare reductores, sacarosas y carbohidratos de mediano (CMP) y alto peso molecular (PS), así como la actividad de las invertasas y fructanasas, mostraron estar influenciadas por el desarrollo fisiológico de los tallos utilizados como semillas agámicas. Al parecer, tanto PS como CMP, son producidos a partir de un polímero estructural que se encuentra en la pared celular de las células parenquimatosas.

SINTESIS DE GLICOGENO VIA GLUCONEOGENESIS EN OOCITOS DE ANFIBIO. (Glycogen synthesis via gluconeogenesis in amphibian oocytes), A. PRELLER, V. GUIXÉ, E. KESSI. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

En oocitos de anfibios, más de 90% de la radiactividad microinyectada como [^{14}C]glucosa aparece en glicógeno después de 20 min de incubación; el resto se distribuye entre CO_2 y algunos intermediarios glicolíticos. Sin embargo, después de la inyección se produce un aumento brusco y transitorio de lactato que alcanza su máximo en 1 min y que contiene alrededor de 50% de la marca; la radiactividad comienza a aparecer en glicógeno después de 8 min. Este resultado sugiere que al menos una fracción importante de glicógeno se sintetiza por una vía indirecta usando lactato como precursor, el cual por gluconeogénesis regenera las hexosas-P y finalmente el polisacárido.

Para probar esta hipótesis se estudió el efecto *in vivo* de fructosa-2,6-bisP o 3-mercaptopicolinato, inhibidores de fructosa-bisfosfatasa y PEP-carboxiquinasa, respectivamente , sobre la incorporación de glucosa en glicógeno. Se inyectaron oocitos con [^{14}C]glucosa y fructosa-2,6-bisP o 3-mercaptopicolinato. Después de incubar a distintos tiempos, los oocitos se sometieron a ebullición en KOH y posterior lavado con etanol para aislar el glicógeno.

La coinyección de [^{14}C]glucosa y fructosa-2,6-bisP produjo una marcada disminución de la incorporación de ^{14}C en glicógeno. El efecto es específico y depende de la concentración de glucosa coinyectada: se obtuvo 50% de inhibición (I_{50}) con 10 pmoles del inhibidor a 0,5 nmoles de glucosa. El valor de I_{50} corresponde a una concentración intracelular de 3,3, µM, que se correlaciona muy bien con un K_i de 2 µM estimado para enzima *in vitro*..

La dependencia entre síntesis de glicógeno y gluconeogénesis se ve apoyada por el efecto de 3-mercaptopicolinato. La coinyección de éste con glucosa disminuyó notoriamente la incorporación de glucosa en glicógeno, con un valor de I_{50} similar al presentado por la PEP-carboxiquinasa *in vitro*. Los resultados obtenidos muestran que la inhibición de dos enzimas claves para la gluconeogénesis, fructosa-bisfofatasa y PEP-carboxiquinasa, disminuye significativamente la incorporación de glucosa en glicógeno. La vía gluconeogénica es utilizada para la síntesis de glicógeno en oocitos de anfibios en las condiciones descritas.

(Financiado por Fondecyt, Proyecto 0829-91

FOSFOFRUCTOQUINASA MUTADA PRODUCE CICLO FUTIL DURANTE GLUCONEOGENESIS EN *E. COLI*.(Mutant phosphofructokinase produces futile cycle during gluconeogenesis in *E. coli*). J.C. TORRES, V. GUIXÉ, Y J. BABUL. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

En *E. coli* existen dos isoenzimas de fosfofructoquinasa con propiedades cinéticas diferentes. Pfk-1 es una enzima alostérica, inhibida por fosfoenolpiruvato y activada por ADP. Pfk-2 tiene cinética hiperbólica, pero es inhibida por Mg-ATP a concentraciones bajas de fructosa-6-P. Se ha aislado y caracterizado una Pfk-2 mutada, Pfk-2* que ha perdido la capacidad de ser inhibida por Mg-ATP. Cepas con Pfk-2*, como única fosfofructoquinasa o en combinación con Pfk-1, crecen 4-5 veces más lento en fuentes de carbono gluconeogénicas que cepas con Pfk-1 o Pfk-2. Hemos propuesto que este fenotipo se debería a que la falta de mecanismo regulatorio de Pfk-2* conduce a un ciclo fútil entre fructosa-6-P y fructosa-1,6-P_2 en esas condiciones. Se presentan pruebas que indican que efectivamente Pfk-2* produce ciclo fútil *in vivo*.

A bacterias resuspendidas de cepas con distintas fosfofructoquinasas se les suministró glicerol y se midío el curso temporal de la concentración intracelular de fructosa-1,6-P_2. Una cepa con Pfk-2* exhibió niveles significativamente más altos de fructosa-1,6-P_2 que cepas con Pfk-2 o PfK-1. El área bajo la curva de curso temporal de concentración de fructosa-1,6-P_2 es un 70% mayor en la cepa con Pfk-2* que en las otras cepas. También hemos medido la incorporación de marca radiactiva de origen glicolítico a fructosa-1,6-P_2 durante gluconeogénesis. Se encontró que en una cepa con Pfk-2* una proporción mayor de los carbonos de ^{14}C-(U)-glucosa se incorpora a este metabolito en comparación con cepas con Pfk-2 o Pfk-1. Finalmente, determinaciones de curso temporal de producción de CO_2 radiactivo a partir de ^{14}C-(U)-glicerol, muestran que la cepa con PfK-2* produce niveles más altos de CO_2 que las otras cepas. Esto ocurre principalmente a expensas de las moléculas de carbono destinadas a material insoluble en ácido perclórico (macromoléculas). De acuerdo con un modelo teórico de simulación de la glicólisis, estos resultados apoyan la hipótesis de la asociación entre Pfk-2* y ciclo fútil durante gluconeogénesis.

(Financiado por Fondecyt,Proyecto 92-1136).

farmanuclear s. a.
IMPORTACION - EXPORTACION - REPRESENTACION - DISTRIBUCION
Fonos: 7775042 - 7358925 - Fax: (562) 7378862
Santa Filomena 91, Santiago - Chile

INDICE DE AUTORES

A
Aguillón, J.C. 8
Allende, J.E. 7, 15
Alonso, C. 7
Alvarez, A. 14
Andreu, J.M. 11
Aranda, C. 11

B
Babul, J. 16
Bade, E.G. 5
Baeza, M. 11
Bayer, E. 13
Bazaes, S. 12
Blanco, L.P. 9
Bocaz, G. 10, 13
Bull, P. 9
Bunster, M. 13

C
Calderón, I. 9
Campos, M 10, 13
Canales, E. 13
Cardemil, E. 12, 13
Carvajal, N. 11
Carvallo, P. 10
Celedón, G. 12
Chamy, M.C. 15
Chappuzeau, A. 15
Charng, Y. 6
Chayet, L. 12, 14
Cid, H. 13
Collados, L. 12, 14
Concha, M. 9
Connelly, C. 7, 15
Coronel, C. 6
Crespo, P. 8

D
Daniotti, J.L. 8
de Armas, R. 15
De Pereda, J.M. 11

E
Encinas, M.V. 13, 13
Espinosa, V. 14
Evangelio, J.M. 11
Eyzaguirre, J. 9

F
Feindler, S 5
Felmer, R. 9
Ferreira, A. 8
Ferreira, J. 15
Figueroa, J. 9
Frey, C. 15
Frey, P.A. 6
Fuentealba, L. 10

G
Garbarino, J.A. 15
García, L. 12
Garretón, V. 7
Garrido, O. 9
Gatica, M. 7, 15
Goldie, H. 12
González, G. 12
González, H. 10, 13
Gudrun, 10
Guerrero, A. 15
Guixé, V. 14, 16
Gulkind, S. 8

H
Herrera, L. 7
Hinrichs, M.V. 7
Holuigue, L. 7
Hubert, E. 13

J
Jabalquinto, A.M. 12
Jacob, G. 7, 15
Jedlicki, A. 7
John, P. 13
Jouchin, H. 13

K
Kausel 10
Kessi, E. 14, 16
Kettlun, A.M. 12, 14
Kornblihtt, A. 7
Krauskopf, M. 10
Krautwurst, H. 13

L
Lagos, J. 11
Lavandero, S. 15
León, G. 9
León, O. 11
Lopetegui, R. 7
López, M.L. 11

M
Mancilla, J. 15
Mancilla, M. 12, 14
Marcus, F. 5
Martínez, M. 15
Martínez-Carrión, M. 6
Medina, I. 15
Metz, C. 8
Meyer, C. 6
Miranda, D. 8
Monasterio, O. 11, 12
Montalar, Y. 12
Mora, G. 9
Moraga, M. 10
Morales, P. 9
Morello, A. 15
Muro, A.F. 7

N
Naranjo, S. 15
Nusser, B. 5

O
Olate, J. 7
Orellana, O. 14

P
Paneque, M. 15
Paquien, C.M. 11
Paredes, R. 10
Parodi, A.J. 5
Parra, C. 10
Pavani, M. 15
Peirano, A. 9
Peña, A. 5
Peruzzo, G. 11
Pesce, C.G. 7
Preiss, J. 6
Preller, A. 14, 16
Puente, J. 8

R
R.Mayer-Jaeckel, R. 5
Ramírez, I. 7
Rayment, I. 6
Repetto, Y. 15
Retamal, C. 11
Ríos, H.M. 10
Rodríguez, C. 15
Rodríguez, P. 12
Romero, J. 9
Ruzicka, F.J. 6

S
Sagredo, B. 14
Salas, M. 11
Salazar, J. 14
Salazar, O. 14
Sandoval, S. 12
Sapag-Hagar, M. 15
Schmeer, K. 13
Slebe, J.C. 11
Srebrow, A. 7
Stange, C. 7
Steiner, J. 9
Stevanovic, S. 13
Strehle, M. 5

T
Torrejón, M. 10
Torres, C. 11
Torres, J.C. 16
Traverso-Cori, A. 12, 14

U
Ureta, T. 14
Uribe, E. 11
Urra, S. 10
Urzúa, J. 11

V
Valenzuela, C.L. 12
Valenzuela, M.A. 12, 14
Vásquez, O. 10, 13
Venegas, A. 10
Vera, M.I. 10

W
Wedekind, J.E. 6
Werbajh, S. 7

X
Xu, N. 8

SUDELAB S.A.

- EQUIPOS PARA LABORATORIOS
- MATERIAL DE VIDRIO Y PLASTICO
- REACTIVOS ANALITICOS Y TECNICOS
- PAPEL FILTRO

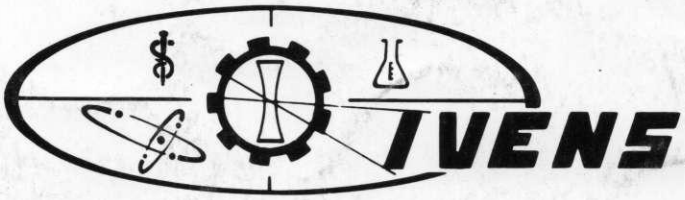
PRESENTE EN LA EDUCACION, LA INVESTIGACION Y LA INDUSTRIA

Lira 1396 - Fonos : 5517542 - 5559487 - 5562880 - Fax : 5559487 Stgo.

PARRAGUEZ Y BENEZET S.A.
Artículos para Laboratorios

BIO-RAD	**Reactivos y equipos para electroforesis, electroporación, multiscreen, trans blot semi-seco, fuentes de poder.**
MFS	**Membranas y papel de filtración, filtros para jeringas, sistemas de filtración de polisulfona, bombas de vacio.**
VILBER LOURMAT	**Transiluminadores UV, lámparas UV, protectores contra luz UV.**
POLAROID	**Soluciones fotográficas para geles de electroforesis, cámaras DS34, sistemas MP4, películas 667.**
NUAIRE	**Incubadores de CO2, freezer de -85 C, gabinetes de seguridad biológica.**
EPPENDORF	**Micropipetas, repipeteadores y microcentrífugas.**
DRUMMOND	**Llenadores de pipetas Pipet AID.**
TAYLOR-WHARTON	**Tambores criogénicos.**
SCIENTECH	**Balanzas analíticas y granatarias.**
SIGMA	**Reactivos.**

Teléfono 2743432 - Teléfono/Fax 2747318



REPRESENTANTE EN CHILE DE
EQUIPOS PARA
LABORATORIO
GARANTIA Y SERVICIO EFECTIVOS

SHIMADZU

ESPECTROFOTOMETROS
ESP. ABSORCION ATOMICA
CROMATOGRAFOS DE LIQUIDOS
CROMATOGRAFOS DE GASES
ESPECTROMETROS
BALANZAS ELECTRONICAS

Nikon

MICROSCOPIOS
MICROFOTOGRAFIA
LUPAS ESTEREOSCOPICAS
ACC. PARA MICROSCOPIA
EQ. OPTICOS ESPECIALIZADOS

Sorvall®

ULTRACENTRIFUGAS
CENTRIFUGAS DE SOBREMESA
CENTRIFUGAS REFRIGERADAS
CENTRIFUGAS DE ALTA VELOC.

Forma Scientific

REFRIG.BANCO DE SANGRE
FREEZERS ULTRAFRIOS
INCUBADORAS DE LAB.
CAMPANAS FLUJO LAMINAR
GABINETE SEG. BIOLOGICO

RADIOMETER COPENHAGEN

A. DE GASES EN SANGRE
ANALIZADORES DE ELECTROLITOS
HEMOXIMETROS
FOTOMETROS DE LLAMA
MEDIDORES DE PH

LABCONCO
LABCONCO CORPORATION

LIOFILIZADORES
FUENTES DE PODER
ELECTROFORESIS
EVAPORADORES ROTATORIOS
CAMPANAS EXTRACTORAS

Lambrecht
18 59

INST. METEOROLOGICOS
ESTACIONES AUTOMATICAS
REGISTRADOR DE DATOS

LI-COR.

SENSORES RADIACION
POROMETROS
EQ. FOTOSINTESIS
AGROMETEOROLOGIA
DATALOGGERS

Casa Matriz: LOS LEONES 1088 / FONOS: 2336014 - / FAX: 2310734 / CASILLA 3956 SANTIAGO
Servicio Técnico: LOS LEONES 2749 / FONO-FAX: 2097695 / PROVIDENCIA - SANTIAGO