

XX
**REUNION
ANUAL**

Sociedad de Bioquímica
y Biología Molecular
de Chile

24 - 26 de Septiembre de 1997
Valdivia - Chile

Horario

Viernes 26	Jueves 25	Miércoles 24
	9:00 - 10:00 Conferencia PABMB Dr. Juan Ramos	
10:00 - 12:00 Simposio: "Estructura y función de Proteínas"	10:00 - 10:30 Descanso y Café	
	10:30 - 12:15 Comunicaciones Libres 5 y 6	
12:00 - 12:30 Despedida y Café 13:00		11:00 - 13:00 Inscripciones
	13:00 - 14:30 Almuerzo	13:00 - 14:30 Almuerzo
	15:00 - 17:15 Comunicaciones Libres 7 y 8	15:00 - 16:45 Comunicaciones Libres 1 y 2
	17:15 - 18:00 Descanso y Café	16:45 - 17:15 Descanso y Café
	18:00 - 18:30 Medalla Dr. Hermann Niemeier	17:15 - 18:45 Comunicaciones Libres 3 y 4
	18:30 - 19:30 Conferencia Dr. Osvaldo Cori Dr. Jerard Hurwitz	
		19:00 - 19:15 Bienvenida: Dr. Rafael Vicuña
	20:30 Cena	19:15 - 21:00 Simposio: "Genoma humano"
		21:00 Cena
	22:00 Fiesta	

Programa

XX REUNION ANUAL

Auspiciadores:

Pontificia Universidad Católica de Chile
*Universidad de Chile (Departamento de Investigación y Desarrollo)
*The Pan - American Association for Biochemistry and Molecular Biology
Fundación Chilena para la Biología Celular

Patrocinadores:

FERMELO S.A.
Bios Chile IGSA
IVENS S.A.
Weisser Analítica
Perkin Elmer
Applied Biosystems
Trilab
Biocronogen
Eduardo Pérez

* Auspicio Conferencia Dr. Osvaldo Cori

* Auspicio Conferencia PABMB

Comité Ejecutivo

Presidente:

Dr. Rafael Vicuña

Vicepresidente:

Dr. Juan C. Slebe

Secretario:

Dr. Omar Orellana

Tesorera:

Dra. M. Cecilia Rojas

Directores:

Dra. Loreto Holuigne - Dr. Javier Puente

Diagramación:

Rodrigo Torres

*Desde 1972
satisfacción total
en las más variadas necesidades
del mundo del análisis,
la química y
la investigación
científica.*

Weisser

Weisser Analítica
Weisser Reactivos
Weisser Ambiental
Weisser Servicios Técnicos
Weisser Capacitación
Weisser Laboratorio

José Domingo Canas 2001
Fono 2257266 - Fax 2253181
Santiago
Dirección Web:
www.chilnet.cl/weisser
Correo Electrónico:
weisser@chilnet.cl

Miércoles 24 de Septiembre

11:00 - 13:00 Inscripciones

13:00 - 14:30 Almuerzo

15:00 - 16:45 COMUNICACIONES LIBRES 1 (SALA I)

Mesa: Presidente: Dr. Claudio Vásquez

Secretaria: Dra. E. Jedlicki

15:00 - 15:15

Resumen N° 1 Estudios estructurales de las enzimas del sistema de modificación-restricción de *Bacillus stearothermophilus* V por espectroscopía de fluorescencia. C.Saavedra*, C. Vásquez* y M. Victoria Encinas**.* Lab. de Microbiología Molecular y ** Lab. de Fisicoquímica, Facultad de Química y Biología, USACH.

15:15-15:30

Resumen N° 2 Transporte de vitamina C en vesículas selladas de membranas de eritrocitos humanos (Transport of vitamin C on sealed-vesicles from human erythrocytes membranes). Iribarren, R., Vera, J.C.* y Reyes, A.M. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia y *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, USA.

15:30 - 15:45

Resumen N° 3 Caracterización del transporte de vitamina C en espermatozoides de mamíferos. Characterization of vitamina C* transport in mammalian spermatozoa). Rauch, M.C., Vera, J. C.* y Concha, Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile y *MSKCC, New York, N. Y., 10021, USA.

15:45 - 16:00

Resumen N° 4 Germinación y transporte de hexosas en granos de polen (Germination and hexose transport in pollen grain) Valenzuela, V., Otth, C. y Concha, I.I. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile.

16:00 - 16:15

Resumen N° 5 Papel central de los transportadores de glucosa en el transporte de vitamina C en células humanas. Aspectos regulatorios. (Central role of glucose transporters in vitamin C transport by human cells. Regulatory aspects). Juan Carlos Vera. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY10021, USA.

16:15 - 16:30

Resumen N° 6 Inhibición de Pfk-2 de *E. coli* por unión de ATP a un sitio alostérico. (Inhibición of *E. coli* Pfk-2 due to binding of ATP at an allosteric site). Guixé, V. Rodríguez, P. y Babul, J. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 16.30 - 16.45

16:30 - 16:45

Resumen N° 7 Mutagenesis sitio-dirigida en fructosa-1,6-bisfosfatasa: LYS-50 es esencial en la transición alostérica inducida por AMP. (Site-directed mutagenesis in fructose-1,6-bisphosphatase: Lys-50 is essential in the allosteric transition elicited by AMP). Cárcamo, J.G., Yañez, A., Ludwig, H., Pinto, R., & Slebe, J.C. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Programa

15:00 - 16:45 COMUNICACIONES LIBRES 2 (SALA II)

Mesa: Presidente: Dra. Ilona Concha
Secretaria: Dra. María Imschenetzky

15:00 - 15:15

Resumen N° 8 Secuenciación parcial de una glicoproteína de la Fibra de Reissner, RF-Gly I. (Partial sequencing of a Reissner's fiber glycoprotein, RF-Gly I). Hein, S., Yulis, C.R., Zárraga, A.M., Nualart, F., Araya, A., Millán, C. y Rodríguez, E.M. Instituto de Histología y Patología e Instituto de Bioquímica, UACH e Institut de Biochemie et Génétique Cellulaires, CNRS, Francia.

15:15 - 15:30

Resumen N° 9 Diferenciación y expresión de transportadores facilitativos de hexosas en células HL-60 inducidas por vitamina D3. (Differentiation and expression of facilitative hexose transporters in vitamin D3 induced HL-60 cells). Haeger, P. y Concha, I.I. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

15:30 - 15:45

Resumen N° 10 Expresión y función del receptor para GM-CSF en cáncer próstático. (Expression and function of GM-CSF receptors in prostate cancer). Coralía Y. Rivas y David W. Golde. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10021, USA.

15:45 - 16:00

Resumen N° 11 Composición de nucleosomas de pronúcleo masculino en etapas intermedias de su remodelación en erizos de mar. (Nucleosomes composition at intermediate stage of male pronucleus remodeling in sea urchins) M. I. Oliver, S. Gutierrez, M. Puchi, M. Montecino y M. Imschenetzky. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

16:00 - 16:15

Resumen N° 12 Aislamiento y caracterización de endosomas del intestino del pez *C. carpio*. (Isolation and characterization of *C. carpio* intestinal endosomes). Ojeda, V., Villanueva, J., *Goicoechea, O. y Amthauer, R. Instituto de Bioquímica, *Instituto de Embriología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

16:15 - 16:30

Resumen N° 13 CCR5DEL32 en infección perinatal de VIH-1. (CCR5del32 in perinatal HIV-1 infection). Rosseau, C.¹, Just, J.², Abrams, E.³, Casabona, J.⁴, Stein, Z.⁵, King, M-C.¹ Division of Medical Genetics, University of Washington, ²Millennium Pharmaceuticals, Boston, Massachusetts, ³Department of Pediatrics, Harlem Hospital, ⁴Centra d'Estudis Epidemiologica sobre la SIDA de Catalunya, Barcelona, ⁵GH Sergievsky Center, Columbia University.

16:30 - 16:45

Resumen N° 14 Análisis funcional y fenotípico de las células NK en patología: efecto de inmunomodulares. Puente, J., Miranda, D., Weinstein, C., Blanco, L.P., Villegas, R.¹, Sepúlveda, C.² Depto. de Bioquímica y Biol. Molecular. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. ¹División Bioestadística y Biomatemática. Esc. Salud Pública. Fac. de Medicina. ²Unidad de Inmunología. Hospital Clínico. Universidad de Chile.

16:45 - 17:15 Descanso (Café)

17:15 - 18:45 COMUNICACIONES LIBRES 3 (SALA I)

Mesa: Presidente: Dra. Ana Preller
Secretario: Dr. Rodolfo Amthauer

17:15 - 17:30

Resumen N° 15 Un nuevo modelo de oxidación de hierro en *Thiobacillus ferrooxidans*. Posible e inesperada relación con el sistema de fotosíntesis. David S. Holmes*. María Eugenia Cabrejos#, Patricia Varela# y Eugenia Jedlicki C.#. Departamento Ciencias Biológicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.# Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

17:30 - 17:45

Resumen N° 16 Metabolismo de oxalato en *Ceriporiopsis subvermispora*. Vías alternativas de producción de H₂O₂ (Oxalate metabolism in *C. subvermispora*. Alternate pathways for H₂O₂ production). Urzúa, U., Aguilar, C. y Vicuña, R. Depto. de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

17:45 - 18:00

Resumen N° 17 La disponibilidad de glucosa determina la operación de vías directa e indirecta para la síntesis de glicogeno en oocitos de rana. (Glucose availability determines operation of direct and indirect pathways for glycogen synthesis in frog oocytes). Preller, A., Baez., M., Ureta, T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

18:00 - 18:15

Resumen N° 18 Vía degradativa de 2,4,6-triclorofenol en bacterias. Padilla, L., Matus, V., González, B. Laboratorio de Microbiología, Departamento de Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. CHILE.

18:15 - 18:30

Resumen N° 19 Actividades que participan en el metabolismo de nucleótidos extracelulares en placenta humana. García L., Kettlun, A. M., Acevedo*, C. G., Bravo*, Y., Chayet, L., Collados, L., Aravena, P., Traverso-Cori, A y Valenzuela, M.A. Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas Farmacéuticas, Universidad de Chile. *Depto. Fisiología, Facultad Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

18:30 - 18:45

Resumen N° 20 Estudio preliminar de genes que codifican para enzimas con actividad ligninolítica en *Ganoderma applanatum*. Olave, N., Canales, M. y Olate, J. Laboratorio Biofísica y Genética Molecular. Fac. Ciencias Biológicas. U. de Concepción.

17:15 - 18:45 COMUNICACIONES LIBRES 4 (SALA II)

Mesa: Presidente: Dra. María I. Vera
Secretario: Dra. Ana M. Zárraga

17:15 - 17:30

Resumen N° 21 Tirosil tRNA Sintetasas de Bacterias: ¿se expresa la TyrRZ de *Thiobacillus ferrooxidans*? (Bacterial Tyrosyl tRNA Synthetases: Is the *T. ferrooxidans* TyrRZ expressed?) J. Salazar, J. Tapia, D. Soll, y O. Orellana. Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University.

Programa

17:30 - 17:45

Resumen N° 22 Regulación de la expresión de genes nucleolares en la carpa (Regulation of the nucleolar gene expression in the carp fish) M.I.Vera, H.M.Ríos, C.Quezada, J.Figueroa, and M.Krauskopf. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

17:45 - 18:00

Resumen N° 23 Efecto del medio ambiente sobre la expresión del factor de transcripción PIT-1 en carpa (*Cyprinus carpio*). (Environmental effect on the expression of transcription factor Pit-1 in the carp) Kausel, G-. Figueroa, J., Hernández, J., Vera, M-I, and Krauskopf, M. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral, Valdivia, Chile.

18:00 - 18:15

Resumen N° 24 Análisis de reprogramación transcripcional que acontece en la aclimatización de la carpa. (*Cyprinus carpio*). (Analysis of the transcriptional reprogramming which occurs during the aclimatización of the carp) San Martín, R., Kausel, G., Sarmiento, J., Figueroa, J., Vera, M.-I., and Krauskopf, M. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral, Valdivia, Chile.

18:15 - 18:30

Resumen N° 25 Identificación del Transcrito de Kinesina en Espermatozoides (Identificación of Kinesin Transcrip within Human Spermatozoa) Zárraga, A.M., Pérez, C., Brito, M., Muñoz, J.P. y Burzio, L.O.B. Inst. de Bioquímica, Fac. Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia y BioChile IGSA.

18:30 - 18:45

Resumen N° 26 Purificación de dos proteasas activadas post-fecundación en erizos de mar. (Purification of two proteasas activated post-fertilization in sea urchins). V Morín, F Díaz, M Puchi, M Montecino, M Imschenetzky. Dep de Biología Molecular, Universidad de Concepción.

19:00 - 19:15 BIENVENIDA: Dr. Rafael Vicuña (Sala I)

19:15 - 21:00 SIMPOSIO: "Genoma humano: mapeo, estructura y función" (SALA 1)

Coordinadora: Dra. Pilar Carvallo

Resumen III A Gene Identification Program in *Schistosoma mansoni* Based on Expressed Sequence Tags (ESTs). Pena, Sérgio D.J. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil 31270-901.

Resumen IV Human Chromosome 19: A High-resolution Physical Map and Current Sequencing Status. E. Garcia, A.S. Olsen, L.K. Ashworth, H. Mohrenweiser, J. Lamerdin, P. McCready, A. Georgescu, J. M. Elliott, A. Kyle, L. Gordon, and A.V. Carrano. (Human Genome Center, Biology and Biotechnology Research Program, Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, CA 94550.)

Resumen V Telomere shortening, human cellular senescence and cancer. Wright, W. E. and Shay, J. W., Department of Cell Biology and Neuroscience, U.Tx. Southwestern Medical School, 5323 Harry Hines Blvd., Dallas, TX 75235.

21:00 Cena

Jueves 25 de Septiembre

9:00 - 10:00 CONFERENCIA PABMB (SALA I)

Resumen I Transcriptional control of the *Pseudomonas* tol plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid encoded regulators *Juan L. Ramos*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Department of Biochemistry and Molecular and Cellular Biology of Plants. Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain.

10:00 - 10:30 Descanso (Café)

10:30 - 12:15 COMUNICACIONES LIBRES 5 (SALA I)

Mesa: Presidente: Dra. Pilar Carvallo

Secretaria: Dra. Silvia Hein

10:30 - 10:45

Resumen N° 27 Implicancias de un residuo de cisteína central y del dominio HHCC en la funcionalidad de integrasa del virus de leucemia murina (Mu.MLV). (Implications of a central cysteine residue and the HHCC Domain on the activity of Mu-MLV integrase).¹ León, O., ²Donzella, G. y ² Roth, M.J. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Chile. ² Department of Biochemistry, University of Medicine and Dentistry of New Jersey-RWJMS.

10:45 - 11:00

Resumen N° 28 Plant viruses gene expression: the tenuivirus strategies. Pedro I. Bustamante* and Roger Hull. John Innes Centre, Norfolk Research Park, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, UK.

✓ 11:00 - 11:15

Resumen N° 29 Caracterización genético-molecular de habitantes de Isla de Pascua: Análisis de marcadores nucleares y mitocondriales. (Molecular genetic characterization of Easter Island inhabitants: nuclear and mitochondrial DNA markers). Moraga M., Vergara E., Carvallo P. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, CHILE.

11:15 - 11:30

Resumen N° 30 Análisis de un probable efecto fundador para la delección de 7Kb en el locus de la hormona de crecimiento en pacientes chilenos. (Analysis of a possible founder effect for the 7Kb deletion on the GH locus, in Chilean patients). Rodríguez, A., Derpich, M., Carvallo, P. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

11:30 - 11:45

Resumen N° 31 Mutaciones en el gen de la hormona de crecimiento que determinan un anormal procesamiento del mRNA en pacientes chilenos. (Mutations in the growth hormone gene determine an abnormal splicing in Chilean patients). Herrera, L., Misarelli, C. y Carvallo, P. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

11:45 - 12:00

Resumen N° 32 Identificación de variedades de peces de la familia *Genypterus* a través del análisis de su contenido protéico. Valenzuela, M., Gamarra, N., Ortega, X., Kettlun, A.M., Gómez, L., Pérez, L.M. y Vinagre, J*. Depto. Bioquímica y Biología Molecular, *Depto. Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Programa

12:00 - 12:15

Resumen N° 33 Caracterización de MobM, una DNA relaxasa codificada por el plásmido pMV158 de *S. pneumoniae*, e involucrada en su movilización conjugativa. Leda Guzmán* y Manuel Espinosa. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Velázquez 144, E-28006 Madrid - España. Patrocinio: Dr. Bernardo González.

10:30 - 12:15 COMUNICACIONES LIBRES 6 (SALA II)

Mesa: Presidenta: Dra. Gloria León

Secretario: Dr. Carlos Jerez

10:30 - 10:45

✓ **Resumen N° 34** Localización de posibles sitios funcionales en la endonucleasa de restricción BstVI. C. Loyola*, C. Saavedra*, E. González** y C. Vásquez*, *Laboratorio de Microbiología Molecular, Universidad de Santiago y **Instituto de Biología Vegetal, U. de Talca.

10:45 - 11:00

Resumen N° 35 Clonamiento y caracterización parcial de la glucoquinasa de *Renibacterium salmoninarum* (Cloning and partial characterization of the *Renibacterium salmoninarum* glucokinase). Concha, M.I. y León, G. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

11:00 - 11:15

Resumen N° 36 Clonamiento y caracterización de un cDNA y del gen CS-MNP1 que codifican para una isoenzima de manganeso peroxidasa del basidiomicete *Ceriporiopsis subvermispora*. Larrondo L.¹; Lobos S.²; Salas L.¹; Karahanian E.¹ y Vicuña R.² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile. ¹Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

11:15 - 11:30

Resumen N° 37 Aislamiento y caracterización de un gen de lacasa del hongo basidiomicete *Ceriporiopsis subvermispora*. Karahanian, E.¹; Corsini, G.¹; Lobos, S.² y Vicuña, R.¹ ¹Dpto. Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. ²Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

11:30 - 11:45

Resumen N° 38 Caracterización bioquímica de una actividad telurito reductasa de *Bacillus stearothermophilus* V y clonamiento de su gen estructural en *Escherichia coli*. Claudio Vásquez*, Hugo Moscoso* y Sergio Pichuanes**. *Laboratorio de Microbiología Molecular, Universidad de Santiago de Chile y ** Chiron Corporation, USA.

11:45 - 12:00

Resumen N° 39 Clonamiento e inserción cromosomal de los genes tfdCDEF de *tfdCDEF* de *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) que codifican para la degradación de clorocatecoles: expresión bajo el control de promotores heterólogos. Céspedes, R., Varela, C. & González, B. Laboratorio de Microbiología. Departamento de Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile.

12:00 - 12:15

Resumen N° 40 Clonamiento, secuenciación y expresión de *lcrI*, gen de *Leptospirillum ferrooxidans* codificante para una proteína tipo receptor quimiotáctico. M. Delgado, H. Toledo y C. A. Jerez. Lab. de Microbiología Molecular y Biotecnología, Depto. de Biología, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile.

13:00 - 14:30 Almuerzo

Programa

15:00 - 17:15 COMUNICACIONES LIBRES 7 (SALA I)

Mesa: Presidente: Dr. Alejandro Reyes

Secretaria: Dra. Ana M. Jabalquinto

15:00 - 15:15

Resumen N° 41 Estudios de fluorescencia intrínseca y extrínseca en ATP-Difosfohidrolasa de *Solanum tuberosum*. Espinosa, V., Zanoocco*, A., Kettlun, A.M. y Valenzuela, M.A. Depto Bioquímica y Biología Molecular. * Depto Química Orgánica y Físicoquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

15:15 - 15:30

Resumen N° 42 Posibles motivos estructurales para Poli-ADPribosilación de proteínas. (Structural motifs behaving as putative targets of protein PolyADPribosilation) José Martínez y María Imschenetzky, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Casilla 152-C, Concepción.

15:30 - 15:45

Resumen N° 43 Desplegamiento de la carboxiquinasa fosfoenolpiruvica de *Escherichia coli*. Unfolding of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxykinase. María Victoria Encinas y E. Cardemil. Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de Santiago de Chile.

15:45 - 16:00

Resumen N° 44 Modelaje Molecular de manganeso peroxidasa de *Ceriporiopsis subvermispora* y comparacion con otras peroxidasas. Mauricio Canales¹, Sergio Lobos² and Rafael Vicuña³ ¹Laboratorio de Biofísica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. Concepción, Chile. ²Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago, Chile. ³Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

16:00 - 16:15

Resumen N° 45 Mecanismo de acción de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica. Mechanism of action of phosphoenolpyruvate carboxykinase. Krautwurst, H., González, F., Bazaes, S., Jabalquinto, A. M., Frey, P. A., y Cardemil, E. Depto. Ciencias Químicas, U. de Santiago, Depto. Química, UMCE, e Institute for Enzyme Research, U. of Wisconsin.

16:15 - 16:30

Resumen N° 46 Interacción de la carboxiquinasa fosfoenolpiruvica de *Saccharomyces cerevisiae* con análogos del nucleótido. Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase with nucleotide analogues. Carrasco, L., González, F. D., Cardemil, E. Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de Santiago.

16:30 - 16:45

Resumen N° 47 Caracterización de las actividades descarboxilante de oxaloacetato y tipo quinasa piruvica de la carboxiquinasa fosfoenolpiruvica de *A. succiniciproducens*. (Characterization of the oxaloacetate decarboxylase and pyruvate kinase-like activities of *A. succiniciproducens* phosphoenolpyruvate carboxykinase). ¹Jabalquinto, A.M., ²Zeikus, J.G. y ¹Cardemil, E. ¹Dpto Ciencias Químicas, Universidad de Santiago de Chile y ²Michigan State University.

16:45- 17:00

Resumen N° 48 Purification and Characterization of Pyruvate Ferredoxin OxidoReductase from the hyperthermophile *Pyrococcus woesei*. Jenny M. Blamey and Mario Chiong, INUAL, LTD/TEPUALSA, Santiago, Chile. Eugene T. Smith, Chemistry Dept., Florida Tech, Melbourne, FL, USA.

Programa

15:00 - 17:00 COMUNICACIONES LIBRES 8 (SALA II)

Mesa: Presidenta: Dra. Luz María Pérez

Secretario: Dr. Patricio Arce

15:00 - 15:15

Resumen N° 49 El péptido derivado del gen de la calcitonina (CGRP) promueve la diferenciación en células gliales B12. Luza_S.* , Inestrosa N.C. Dpto. Biología Celular y Molecular. P. Universidad Católica de Chile.

15:15 - 15:30

Resumen N° 50 Evaluación del rol de la proteína de movimiento del TMV en la infectividad en plantas de *Arabidopsis* y tabaco. Patricio Arce-Johnson ¹* ¹Departamento de Genética Molecular Microbiología. P. Universidad Católica de Chile. ²Department of Cell Biology, The Scripps Research Institute, USA.

15:30 - 15:45

Resumen N° 51 Producción de isoenzimas de xilanasas por el hongo *Penicillium purpurogenum*. Carlos Aguirre, Alessandra Peirano, Jeannette Steiner y Jaime Eyzaguirre. Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica y Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile.

15:45 - 16:00

Resumen N° 52 Fosforilación de proteínas en la transducción de señales en *Citrus limon* (Protein phosphorylation in signal transduction in *Citrus limon*) Polanco, R., Pérez, L. M. Dep. Bioq. Biol. Mol., Fac. Cs. Quím. y Farm. Univ. De Chile.

16:00 - 16:15

Resumen N° 53 Aumento de una actividad caseína quinasa II nuclear por efecto de ácido salicílico en plantas de tabaco. Hidalgo, P., Ojeda, H., Berríos, C.G., y Holuigue, L. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

16:15 - 16:30

Resumen N° 54 Purificación, caracterización y utilización de b-1,3-glucanasa de *Bacillus subtilis* ToC46 (pPFF1)M. Zuccolo, M.E. Lienqueo, B.A.Andrews y J.A. Asenjo* Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Chile, Beauchef 861, Santiago.

16:30 - 16:45

Resumen N° 55 Clonamiento, secuenciación e identificación de los genes que codifican para la microcina E492 y su inmunidad (Cloning, sequencing, and identification of the genes encoding for microcin E492 and its immunity) Jorge E. Villanueva y Rosalba Lagos. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

16:45 - 17:00

Resumen N° 56 Influencia de la región carboxilo terminal de b-tubulina sobre la actividad GTPasica del heterodimero de tubulina (Influence of b-tubulin carboxy-terminal region on the GTPase activity of tubulin heterodimer). Nova E., Rabajille E. Monasterio O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

17:00: 17:15

Resumen N° 57 Fosforilación de proteínas nucleares como respuesta a ácido salicílico en plantas de tabaco. Hidalgo, P., Berríos, C.G. y Holuigue, L. Departamento de Genética y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile

17:15 - 18:00 Descanso (Café)

Programa

18:00 - 18:30 ENTREGA PREMIO MEDALLA DR. HERMANN NIEMEYER

18:30 - 19:30 CONFERENCIA Dr. Osvaldo Cori (SALA I)

Resumen II Macromolecular assemblies involved in replication complexes. Jerard. Hurwitz. Sloan-Kettering Institute, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10021

20:30 Cena

22:00 Fiesta

Viernes 26 de Septiembre

10:00 - 12:00 SIMPOSIO: "Estructura y función de Proteínas" (SALA I)

Coordinador: Dr. Octavio Monasterio

Resumen VI Folding , Self-assembly and dissociation of tubulin heterodimer. Octavio Monasterio and Patricio Rodríguez. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Casilla 653, Santiago de Chile.

Resumen VII Evolution of enzyme regulation. Gregory D. Reinhart, Department of Biochemistry and Biophysics, Texas A&M University, College Station, Texas, USA 77843-2128

Resumen VIII Structure and dynamics of an integral membrane protein (Fd coat protein) incorporated in micelles using NMR spectroscopy. Fabio Almeida. Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Resumen IX Non-stochastic behavior in protein subunit interactions: possible origins and biological significance. Sergio T. Ferreira, Departamento de Bioquímica Médica, ICB/CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-590.

12:00 - 12:30 Descanso (Café)

TRANSCRIPTIONAL CONTROL OF THE PSEUDOMONAS TOL PLASMID CATABOLIC OPERONS IS ACHIEVED THROUGH AN INTERPLAY OF HOST FACTORS AND PLASMID ENCODED REGULATORS

Karin E. Ramos Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Departamento de Bioquímica y Molecular and Cellular Biology of Plants, Facultad de Biología, Universidad Carlos III de Madrid, Avda de Getafe, 46, 28902 Getafe, Madrid, Spain

and

Y. J. Kim, Departamento de Bioquímica y Molecular and Cellular Biology of Plants, Facultad de Biología, Universidad Carlos III de Madrid, Avda de Getafe, 46, 28902 Getafe, Madrid, Spain

Conferencias

SUMMARY
The *xyi* genes of *Pseudomonas* encode the enzymes for conversion of toluene into toluene sulfonates. The meta operon *xyi*W-CAMBN for conversion of toluene sulfonates into toluene sulfonates, the meta operon *xyi*XZ1-TECH10KII which encodes the enzymes for further conversion of these compounds into Krebs cycle intermediates and *xyi*S and *xyi*L involved in transcriptional control. The *xyi*S and *xyi*L proteins are members of the *Xyl*S/XAC and *Xyl*L/XLC families, respectively, of transcriptional regulators. The *xyi*S gene is constitutively expressed at a low level from the *P*₂₃ promoter. The *xyi*S protein is activated by interaction with allylbenzoates, and this active form stimulates transcription from *P*₁ by σ^{70} or σ^{54} -containing RNA polymerase (the meta loop). The *xyi*L gene is also expressed constitutively. The *xyi*L protein, which in the absence of effector binds to a nonactive form to target DNA sequences, is activated by aromatic hydrocarbons and ATP. It subsequently undergoes multimerization and structural changes that result in stimulation of transcription from *P*₁ of the upper operon. This latter process is assisted by the *xyi*S protein and mediated by σ^{54} -containing RNA polymerase. Once activated, the *xyi*L protein also stimulates transcription from the *P*₁ promoter of *xyi*S without interfering with expression from *P*₂₃. This process is assisted by the *xyi*S protein and is mediated by σ^{54} -containing RNA polymerase. As a consequence of hyperexpression of the *xyi*S gene, the *xyi*S protein is hyperproduced, and stimulates transcription from *P*₁ even in the absence of effector (the cascade loop). The two σ^{54} -dependent promoters are additionally subject to global (catabolite repression) control.

Fundación Chilena para la Biología Celular



SOCIEDAD DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR DE CHILE.

Resumen I

TRANSCRIPTIONAL CONTROL OF THE *PSEUDOMONAS* TOL PLASMID CATABOLIC OPERONS IS ACHIEVED THROUGH AN INTERPLAY OF HOST FACTORS AND PLASMID ENCODED REGULATORS

Juan L. Ramos Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Department of Biochemistry and Molecular and Cellular Biology of Plants. Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

SUMMARY

The *xyl* genes of *Pseudomonas putida* TOL plasmid that specify catabolism of toluene and xylenes are organized in four transcriptional units: the upper operon *xylUWCAMBN* for conversion of toluene/xylenes into benzoate/alkylbenzoates; the *meta* operon *xylXYZLTEGFJQKIH*, which encodes the enzymes for further conversion of these compounds into Krebs' cycle intermediates; and *xylS* and *xylR*, involved in transcriptional control. The XylS and XylR proteins are members of the XylS/AraC and NtrC families, respectively, of transcriptional regulators. The *xylS* gene is constitutively expressed at a low level from the Ps2 promoter. The XylS protein is activated by interaction with alkylbenzoates, and this active form stimulates transcription from Pm by s^{70} - or s^5 -containing RNA polymerase (**the meta loop**). The *xylR* gene is also expressed constitutively. The XylR protein, which in the absence of effectors binds in a nonactive form to target DNA sequences, is activated by aromatic hydrocarbons and ATP, it subsequently undergoes multimerization and structural changes that result in stimulation of transcription from Pu of the upper operon. This latter process is assisted by the IHF protein and mediated by s^{54} -containing RNA polymerase. Once activated, the XylR protein also stimulates transcription from the Ps1 promoter of *xylS* without interfering with expression from Ps2. This process is assisted by the HU protein and is mediated by s^{54} -containing RNA polymerase. As a consequence of hyperexpression of the *xylS* gene, the XylS protein is hyperproduced, and stimulates transcription from Pm even in the absence of effectors (**the cascade loop**). The two s^{54} -dependent promoters are additionally subject to global (catabolite repression) control.

Resumen II

MACROMOLECULAR ASSEMBLIES INVOLVED IN REPLICATION COMPLEXES.

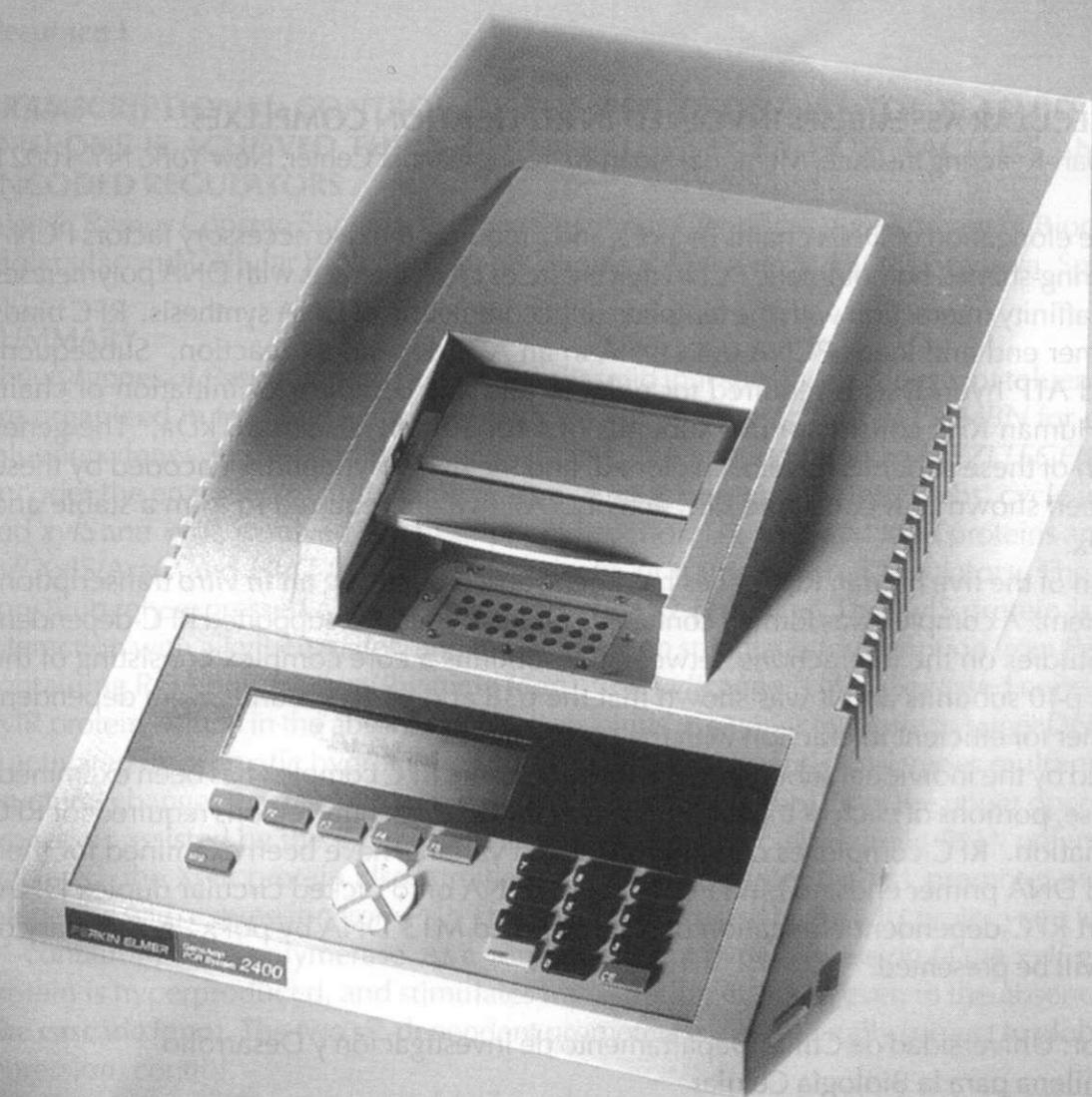
J. Hurwitz. Sloan-Kettering Institute, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10021

The processive elongation of DNA chains by pol δ and ϵ requires the two accessory factors PCNA and RFC. The ring-shaped homotrimeric PCNA that encircles DNA interacts with DNA polymerases ensuring high affinity interaction with the template until completion of DNA synthesis. RFC binds DNA at a primer end and loads PCNA onto DNA in an ATP-dependent reaction. Subsequent RFC catalyzed ATP hydrolysis is required for pol δ to join this complex for initiation of chain elongation. Human RFC consists of five subunits of 140, 40, 38, 37 and 36 kDa. The genes encoding each of these subunits have been cloned, and the five polypeptides encoded by these genes have been shown to reconstitute RFC activity. All five are required to form a stable and active complex.

The expression of the five human RFC genes has been carried out using an *in vitro* transcription/translation system. A complex was formed containing all 5 subunits that supported RFC-dependent replication. Studies on the interactions between the subunits a core complex consisting of the p36, p37 and p40 subunits and it was shown that the p38 and p140 subunits were dependent upon each other for efficient interaction with the core complex.

The role played by the individual subunits in the function of the RFC complex has been examined. For this purpose, portions of each of the subunits were deleted to identify regions required for RFC complex formation. RFC complexes containing deleted variants have been examined for their ability to bind DNA primer ends, to bind PCNA, load PCNA onto nicked circular duplex DNA, and to support RFC-dependent elongation of singly primed M13 DNA by pol δ . A summary of these results will be presented.

Auspiciada por: Universidad de Chile, Departamento de Investigación y Desarrollo
Fundación Chilena para la Biología Celular



The high - performance thermal
cycler that's easy to use - and afford.

PERKIN ELMER

Simposios



SOCIEDAD DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR DE CHILE.

Resumen III

A Gene Identification Program in *Schistosoma mansoni* Based on Expressed Sequence Tags (ESTs)

Pena, Sérgio D.J. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil 31270-901

The trematode worm *Schistosoma mansoni* is responsible for schistosomiasis, a parasitic disease that affects at least 300 million people in tropical and subtropical areas of the world. Despite intense efforts dedicated to eradicating schistosomiasis through sanitary measures, control of the intermediate host and drug treatment, its prevalence remains essentially unaltered. No vaccine is yet available and there is emerging resistance to all but one of the few drugs available for treatment. In late 1992, only approximately 100 cDNA sequences had been deposited in GenBank and only a few dozen genes were characterized in detail. Therefore, efforts at understanding the host parasite relationship as well as the search for targets of chemotherapy and immunoprophylaxis were being undertaken with knowledge of less than 1% of the total potential genetic information. We reasoned that an efficient route for the production of new tools for schistosomiasis control would be a systematic study of the parasite's genome and expressed gene complement. Thus, we initiated a gene identification program based on partial sequencing of cDNA clones to generate Expressed Sequence Tags (EST). Close to 2000 ESTs were generated from seven different cDNA libraries constructed from four distinct stages of the parasite life cycle. When evaluated for their quality, the libraries were shown to have less than 20% useless clones and more than 50% of new genes. When comparing ESTs from distinct libraries, we could detect that most genes were present only in a single library, but others were expressed in more than one developmental stage and may represent housekeeping genes in the parasite. This program allowed discovery of approximately 600 new *S. mansoni* genes: about 27% were identified based on homology with genes from other organisms 73% represented unknown genes. We have also completely sequenced some cDNAs of interest and established their genomic structure and pattern of expression in different developmental states. (Supported by PADCT and WHO)

Resumen IV

Human Chromosome 19: A High-resolution Physical Map and Current Sequencing Status.

E. Garcia, A.S. Olsen, L.K. Ashworth, H. Mohrenweiser, J. Lamerdin, P. McCready, A. Georgescu, J. M. Elliott, A. Kyle, L. Gordon, and A.V. Carrano. (Human Genome Center, Biology and Biotechnology Research Program, Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, CA 94550.)

A strategy that combines high resolution physical mapping and large scale genomic sequencing is being employed to study the structural details and gene organization of human chromosome 19. We have developed a cosmid/BAC ordered physical map that spans approximately 95% of the euchromatin of chromosome 19 (47.5 MB) and that includes complete digest EcoRI maps spanning 42 Mb (~82%) of the region. The map defines the minimal number of cosmid clones which are required to sequence the chromosome while minimizing redundant coverage. The present EcoRI mapped region is represented by 185 contigs with an average size of 220 Kb (range 40-3,300 Kb). Using appropriately spaced clones from the restriction maps we have anchored to the chromosome (either by direct FISH or through hybridization to large-insert clones) the entire framework of the map. Thus, the position and distance of each contig is known. Incorporated within the present restriction map are 251 genes, 132 expressed cDNAs, 150 genetic markers and 276 STSs (one STS/180 Kb average). Specific uses of the physical map for the study of translocations associated with diseases, genes, and gene families present in chromosome 19 will be discussed. The current sequencing status, including a > 1Mb contiguous region in q13.1 encompassing the CNF gene, and a region in p12 spanning the MEF2B gene will be presented in greater detail.

Resumen V

TELOMERE SHORTENING, HUMAN CELLULAR SENESCENCE AND CANCER.

Wright, W. E. and Shay, J. W., Department of Cell Biology and Neuroscience, U.Tx. Southwestern Medical School, 5323 Harry Hines Blvd., Dallas, TX 75235.

The following model integrates the telomere-shortening and two-stage hypotheses for cellular senescence. The repression of telomerase initiates the process of telomere shortening in most somatic cells. A signal that induces the M1 (Mortality Stage 1) mechanism is produced when there are still several kpb of telomeric repeats remaining on most chromosomes. This signal may reflect the activation of a DNA-damage pathway produced from a rare telomere lacking protective repeats, or the activation of regulatory factors located in the subtelomeric DNA and previously silenced by trapping in telomere-induced heterochromatin. The key antiproliferative components of the M1 mechanism (both p53 and a pRB-like protein) are then induced to be in a constitutively active form that prevents cell division in senescent cells. If the M1 mechanism is blocked, cells continue to divide and telomeres continue to shorten until the M2 mechanism causes crisis. M2 probably represents the direct consequences of terminally shortened telomeres. Immortalization occurs when cells escape M2, usually following the derepression of telomerase but sometimes via a telomerase-negative pathway that may involve recombination of telomeres. We show: 1)telomerase is repressed in most human tissues between 16 weeks gestation and birth; 2)telomerase is expressed in approximately 85% of more than 3000 primary human tumor biopsies; 3)telomerase is repressed in immortal/normal cell hybrids; 4)manipulation of telomere length in the immortal parent prior to hybrid formation alters hybrid lifespan; 5)Rates of telomere shortening in telomerase negative cells are likely to be controlled by lagging-strand mechanisms.

Resumen VI

FOLDING, SELF-ASSEMBLY and DISSOCIATION OF TUBULIN HETERODIMER. Octavio Monasterio and Patricio Rodríguez. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Casilla 653, Santiago de Chile.

Tubulin is a heterodimeric protein (MW 110000, 5.8 S) composed of two non-identical monomers, α - and β -tubulin, that self-assembles reversibly to form microtubules. Highly purified tubulin polymerizes *in vitro* in the presence of GTP⁺ and Mg²⁺, implicating that all the information required for the assembly of microtubules is in the structure of tubulin. Since it is well known that tubulin is a labile protein, the aging process of tubulin has been characterized by several authors. Thus, the assembly of competent β monomer, in near *in vivo* conditions, requires the concerted participation of at least four novel factors, in addition to the c-cpn chaperonin. *In vitro* unfolding studies with purified heterodimer showed the formation of a intermediate specie that resembles a molten globule. However, the attempts to obtain refolded functional protein in this kind of *in vitro* assays has been unsuccessful. The aim of this presentation is to show the *in vitro* mechanism of refolding and self-assembly of tubulin. Steady-state intrinsic fluorescence and circular dichroism experiments showed that tubulin after denaturation with guanidinium hydrochloride was able to refold into a conformation close to the native state. 8-Anilino-1-naphthalene sulfonate binding assays showed that renaturated tubulin recovered almost 80% of its native binding affinity for the fluorescent probe. Non equilibrium refolding studies done by small zone size exclusion chromatography showed that α and β tubulin monomers associated very quickly in a heterodimeric form, which slowly assembled forming polymers of high molecular weight, in a temperature dependent way. We conclude that tubulin is able to refold in a conformational state with similar characteristics to that of aged tubulin. The instability and the aging of the heterodimer would be product of a conformational drift of the monomers. We suggest that in the cell the α and β -monomers of tubulin could exist as kinetic folding intermediates that are stabilized by other proteins during the folding to form the heterodimer, which finally reaches a stable conformation into the microtubule.

Supported by grants FONDECYT 1950556 and 2950001

Resumen VII

EVOLUTION OF ENZYME REGULATION

Gregory D. Reinhart, Department of Biochemistry and Biophysics, Texas A&M University, College Station, Texas, USA 77843-2128

Traditionally enzymes subject to allosteric regulation have been viewed as existing in at least two functionally-defined conformations from which the extremes of functional behavior are presumed to derive. Such a view presents a challenge when one considers the evolutionary pressures which result in protein folding, particularly if the two conformations are presumed to pre-exist. Evolution requires that a mechanism be **envisioned from which** incremental changes in properties can be introduced in response to environmental pressure. Regulatory features of enzymes almost certainly evolved after catalytic function. The acquisition of additional binding sites seems to have been accomplished often through either gene duplication, oligomerization, or the acquisition of a common ligand-binding domain. The imposition of distinct functional states, that are simultaneously stable folded structures and that introduce the proper functional perturbation to catalysis, would appear to be difficult in the general case. An alternative view which is emerging from our analysis of allosteric behavior, however, suggests a much more tractable paradigm may be operative. The nature of allosteric effects, not just their magnitude, can be altered by changes in temperature and pH as well as with relatively minor perturbations in protein and ligand structure. The feature that all of these observations have in common is the nearly completely compensating enthalpic and entropic components of the coupling free energy. When ligands bind to a protein, the influence that is felt by a subsequent ligand binding event is relatively small because the perturbations in AH and AS are nearly completely offsetting. If they completely offset one another, no allosteric effect is observed. This characteristic allows even slight perturbations in solution conditions or structure to change the net magnitude of the coupling free energy in a substantial way, even allowing it to change sign and thereby switch the nature of the allosteric effect. This response to ligand binding seems to be completely general, and so it is relatively easy to imagine that once an enzyme has acquired a binding site for a potential regulatory ligand, evolutionary pressures could easily manipulate the degree and direction of the thermodynamic compensation that ensues to optimize the regulatory response of the enzyme.

This work has been supported by grant GM323216 from the United States National Institutes of Health.

Resumen VIII

Structure and Dynamics of an Integral Membrane Protein (fd coat protein) Incorporated in Micelles Using High Resolution NMR Spectroscopy. Fabio C. L. Almeida, Stanley Opella*. Departamento de Bioquímica Médica - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, Brasil. *Department of Chemistry, University of Pennsylvania, Philadelphia-PA, USA.

Structural determination of membrane proteins is one of the most important goal of structural biology. By performing multidimensional high resolution NMR on micelles samples it was possible to determine the structure of the membrane bound form of fd major coat protein based on distance and dihedral angle constraints using distance geometry and simulated annealing calculations. The dynamics of the protein were described (^{15}N relaxation measurements) using the Lipari-Szabo model free formalism adapted for a membrane protein.

fd coat protein is formed by two α -helical regions: one transmembrane helix and other amphipathic. The angle between the two helix is approximately 90° . The loop region linking the two helices has some structural features that are unique for membrane proteins.

Acknowledgments: FAPESP and NIH.

Resumen IX

NON-STOCHASTIC BEHAVIOR IN PROTEIN SUBUNIT INTERACTIONS:
POSSIBLE ORIGINS AND BIOLOGICAL SIGNIFICANCE

Sérgio T. Ferreira, Departamento de Bioquímica Médica, ICB/CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, BRAZIL

In the past 15 years several research groups have used hydrostatic pressure as a tool to perturb the equilibria of subunit association in oligomeric proteins. Oligomers are generally considered to be in fast, dynamic equilibria with isolated subunits, constituting stochastic systems. Thus, protein subunit association is expected to be subject to the law of mass action, i.e., subunit association should depend predictably on protein concentration. Through the use of hydrostatic pressure a number of oligomers of various sizes and complexities have been investigated, and two important conclusions could be drawn from those studies: 1) for dimers, the equilibrium of subunit association was found to be stochastic, i.e., subunit association exhibited the expected dependence on protein concentration; 2) by contrast, for large protein **aggregates, including** viral particles, subunit association was not dependent on protein concentration. For aggregates of intermediate complexity, such as tetramers, partial dependence on protein concentration was observed. These observations led Gregorio Weber and co-workers to propose that non-stochastic behavior was directly related to the complexity of protein oligomers. Recent findings from our laboratory revealed non-stochastic subunit interactions in trimers and even in relatively simple dimers. This presentation will focus on the investigation of subunit interactions in two dimers, triose phosphate isomerase and b-lactoglobulin. These proteins undergo both subunit dissociation and unfolding under pressures up to 3.5 kbar. Interestingly, however, pressure effects are not dependent on protein concentration, in apparent violation of the law of mass action. This behavior appears related to persistent conformational/energetic heterogeneity in the ensemble of dimers in solution. Detailed studies of the kinetics of subunit dissociation/unfolding and refolding/reassociation in the presence of guanidine hydrochloride suggest that the persistent conformational heterogeneity arises from markedly different rates for unfolding and refolding. Possible implications of non-stochastic behavior in protein subunit association in terms of folding and stability of polypeptides in the cell will be discussed.

Supported by: FAPERJ, FINEP, CNPq, PADCT and HHMI.

1

Estudios estructurales de las enzimas del sistema de modificación-restricción de *Bacillus stearothermophilus* V por espectroscopía de fluorescencia.

C. Saavedra*, C. Vásquez* y M. Victoria Encinas**.* Lab. de Microbiología Molecular y ** Lab. de Físicoquímica, Facultad de Química y Biología, USACH. Los genes del SMR *BsVI* fueron clonados en *E. coli* y cada enzima fue purificada a homogeneidad. El objetivo del presente trabajo fue profundizar el conocimiento de las estructuras de ambas enzimas usando espectroscopía de fluorescencia. Ambas enzimas presentaron fluorescencia característica de residuos de triptofano, con un máximo a 338 nm. Los valores determinados de las constantes de desactivación por NaI y acrilamida fueron relativamente altos, sugiriendo que los triptofanos están moderadamente expuestos a la superficie de las proteínas. Ambas proteínas son termoestables, con temperaturas óptimas que oscilan entre 45-75°C. Incubaciones de la endonucleasa a 60°C indicaron que la enzima sufre cambios en su conformación. La enzima posee 3 cisteínas que no son necesarias para la catálisis y tampoco se encuentran formando puentes disulfuro. El catión Mg^{2+} es esencial para la actividad endonucleolítica. Se detectó cambios en la proteína por la unión del ión metálico. Estos datos se ajustaron a un proceso simple de unión con constantes de 5 y 3,4 mM a 20 y a 60°C, respectivamente. La adición de DNA produce cambios en las características fluorescentes mostrando ambas enzimas una menor accesibilidad a la población de triptofanos.

Financiado por Proyectos Fondecyt 1950440 y DICYT, USACH.

3

CARACTERIZACION DEL TRANSPORTE DE VITAMINA C EN ESPERMATOZOIDES DE MAMIFEROS. (Characterization of vitamin C transport in mammalian spermatozoa). Rauch, M.C., Vera, J.C.* y Concha, I.I. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile y *MSKCC, New York, N.Y., 10021, USA.

La vitamina C es vital para el funcionamiento normal del sistema reproductor masculino. Su ausencia produce disminución— de la calidad espermática. Nuestro grupo ha demostrado que el transporte de vitamina C es mediado por el transportador facultativo GLUT1 en células HL-60. Analizamos la expresión— de los transportadores facultativos (GLUTs) en espermatozoides humanos, de rata y de toro, y estudiamos la captación— de glucosa y vitamina C en espermatozoides de bovino. Los transportadores GLUT1, 2, 3 y 5 presentaron un peso molecular de aproximadamente 50-70k y fueron inmunolocalizados. Estudios de transporte revelaron que los espermatozoides de toro transportaban D-glucosa. El análogo no metabolizable de glucosa, desoxiglucosa, es sustrato específico de los GLUTs, y se utilizó— para demostrar su funcionalidad. Los espermatozoides transportaron la forma oxidada de vitamina C (ácido deshidroascórbico), pero no transportaron la forma reducida (ácido ascórbico). **El transporte de ácido deshidroascórbico no fue afectado por la presencia o ausencia de Na^+ en el medio**, lo que indica la participación de un sistema de transporte independiente de Na^+ . Citocalasina B inhibió el transporte de la forma oxidada de vitamina C, indicando una participación directa de los transportadores facilitativos de hexosas. Los datos muestran que los espermatozoides humanos, de rata y de toro expresan varias isoformas de los GLUTs, lo que permite la captación eficiente de glucosa y de vitamina C. (PROYECTOS DID UACH S-95-24, FONDECYT 196-0485).

2

TRANSPORTE DE VITAMINA C EN VESÍCULAS SELLADAS DE MEMBRANAS DE ERITROCITOS HUMANOS (Transport of vitamin C on sealed-vesicles from human erythrocytes membranes). Iribarren, R., Vera, J.C.* y Reyes, A.M. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia y *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, USA.

En células enteras los transportadores GLUTs parecen ser responsables de la captación facilitada de glucosa y vitamina C. La forma oxidada de la vitamina, el ácido deshidroascórbico (DHA), entra pasivamente a la célula y una vez en su interior es reducido a ácido ascórbico (AA), forma que no es transportable y queda entonces atrapado. Dada esta condición no se ha podido estudiar en detalle la interacción de ácido deshidroascórbico con los transportadores GLUTs. Para lograr este propósito en este trabajo determinamos las características cinéticas del transporte de DHA en vesículas selladas de membranas de eritrocitos humanos, desprovistas de citoplasma, mediante ensayos de transporte empleando filtración rápida. En vesículas normales e invertidas (interior hacia afuera), el transporte de DHA fue saturable, con valores de K_M y V_{max} similares, lo cual sugiere un mecanismo de transporte simétrico para este sustrato. El transporte de DHA fue inhibido por D-glucosa, citocalasina B y genisteína, pero no por L-glucosa o D-sorbitol. Floretina, un inhibidor que se une al lado externo de los GLUTs, inhibió sólo en vesículas normales. No obstante, ambos AA y DHA fueron incapaces de desplazar a citocalasina B desde su sitio de unión en los GLUTs. Proponemos que los GLUTs pueden presentar sitios de unión diferentes para sus sustratos, uno para D-glucosa (y análogos) cercano o compartido por el de D-glucosa y otro para DHA, que no se superpone con el del inhibidor.

Proyectos: FONDECYT 1951215; DID-UACH I, S-97-04 y MSKCC, IF.

4

GERMINACION Y TRANSPORTE DE HEXOSAS EN GRANOS DE POLEN (Germination and hexose transport in pollen grain) Valenzuela, V., Otth, C. y Concha, I.I. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile.

Los tubos polínicos crecen en la matriz extracelular del pistilo, para el transporte de los gametos masculinos hacia el ovario. El pistilo contribuye con materiales secretorios, tales como azúcares libres, aminoácidos, entre otros. En *P. radiata* el polen es depositado en las escamas del estróbillo femenino, donde se encuentra el óvulo. Los polen germinan y forman el tubo polínico, debido en parte a los carbohidratos presentes en la gota de polinización. Datos bibliográficos señalan que la captación de hexosas ocurre principalmente a través de cotransportadores de protones en plantas superiores. En el presente trabajo, mostramos la germinación del polen y crecimiento del tubo polínico en fructosa y/o glucosa. Además, presentamos evidencia inmunohistoquímica y funcional, la que indica que **homólogos de los transportadores facilitativos de hexosas humanos, GLUTs**, se expresan abundantemente en el polen y que esas células tienen la capacidad de transportar glucosa y fructosa. Las características cinéticas del transporte de hexosas en polen, señalan que éste expresa transportadores de alta afinidad. El transporte de glucosa se ve afectado por citocalasina B, conocido inhibidor funcional de GLUT1 y GLUT2. Fructosa, sin embargo, es mínimamente afectado por este compuesto, indicando que GLUT5 es el transportador de fructosa. Este es el primer estudio que apunta a la participación de **homólogos de los transportadores facilitativos de hexosas humanos, en células vegetales.** (Proyecto DID-UACH S-95-24 y proyecto FONDECYT 196-0485).

5

PAPEL CENTRAL DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN EL TRANSPORTE DE VITAMINA C EN CELULAS HUMANAS. ASPECTOS REGULATORIOS. (Central role of glucose transporters in vitamin C transport by human cells. Regulatory aspects).

Juan Carlos Vera. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY10021, USA.

Las células humanas acumulan solamente la forma oxidada de la vitamina C, el ácido ascórbico, a concentraciones milimolares, comparado con una concentración sérica de 50 μ M. Esto ha llevado a la proposición que el ácido ascórbico es transportado en contra de un gradiente de concentración en un proceso acoplado al transporte de iones sodio. Sin embargo, en estudios de expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* demostramos que los transportadores de glucosa transportan eficientemente el ácido deshidroascórbico pero carecen de la habilidad para transportar el ácido ascórbico. La presencia de transportadores de glucosa en todas las células humanas sugiere que ellos podrían ser los transportadores universales de vitamina C. Hemos llevado a cabo un estudio detallado del transporte y acumulación de vitamina C en células sanguíneas humanas normales y cancerosas y hemos identificado al menos tres etapas que pueden ser sujetas a regulación. 1) Las células sanguíneas humanas transportan solamente el ácido deshidroascórbico a través de transportadores de glucosa, la actividad de los cuales puede ser afectada por factores de crecimiento. Estas células carecen de transportadores de ácido ascórbico dependientes de sodio. 2) El ácido deshidroascórbico recién transportado es eficientemente reducido a ácido ascórbico y se acumula en el interior de las células a elevadas concentraciones en una forma independiente de glutatión. 3) El sustrato transportado, el ácido deshidroascórbico, es generado extracelularmente a partir del ácido ascórbico como producto de la respuesta de las células a efectores fisiológicos.

Financiado con fondos del NIH y del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center.

7

MUTAGÉNESIS SITIO-DIRIGIDA EN FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA: LYS-50 ES ESENCIAL EN LA TRANSICION ALOSTERICA INDUCIDA POR AMP. (Site-directed mutagenesis in fructose-1,6-bisphosphatase: Lys-50 is essential in the allosteric transition elicited by AMP). Cárcamo, J.G., Yañez, A., Ludwig, H., Pinto, R., & Slebe, J.C. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

El tetrámero de la fructosa-1,6-bisfosfatasa es estructuralmente un dímero de dímeros. La unión del inhibidor alostérico AMP provoca la rotación del dímero superior con respecto al inferior y también cambios estructurales en cada subunidad. Hemos sugerido que el residuo Lys50, ubicado en la interfase intradimérica, participaría en la transmisión entre subunidades del cambio conformacional inducido por AMP, lo que se traduce en la unión cooperativa del inhibidor. Para probar esta posibilidad se preparó la enzima mutante Lys50Ala, se expresó en *E. coli* y se compararon sus propiedades cinéticas con las de la enzima nativa. No hay diferencias significativas en los valores de K_m , K_s y k_{cat} entre ambas enzimas, pero la respuesta de esta mutante al inhibidor AMP fue diferente. Ambas especies presentan similar sensibilidad ($I_{50} = 10 \mu$ M), pero la mutante no presenta cooperatividad para esta inhibición ($n_H = 1,0$). Se sugiere que en la enzima nativa las interacciones de Lys50 en la interfase intradimérica son esenciales en la propagación del cambio conformacional a la subunidad vecina. Esto supone que la transmisión sería por interacciones dentro de cada dímero (C1C2 ó C3C4) más que por alteración de la interfase interdimérica (C1C4 ó C2C3). Se postula que la cooperatividad no es necesaria para la inhibición de la actividad bisfosfatásica por AMP. (FONDECYT 2960060, 1951215; DID-UACH S-95-41, S-97-02)

6

INHIBICION DE Pfk-2 DE E. coli POR UNION DE ATP A UN SITIO ALOSTERICO (Inhibition of *E. coli* Pfk-2 due to binding of ATP at an allosteric site). Guixé, V. Rodríguez, P. y Babul, J. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La inhibición por ATP es un rasgo común a la mayoría de las fosfofructoquinazas. Estudios cinéticos con Pfk-2 de *E. coli* sugieren que la inhibición por MgATP, a bajas concentraciones de fructosa-6-P, resulta por unión del ligando a un sitio alostérico. Para confirmar esto se estudió la unión de ligandos a Pfk-2 utilizando fluorescencia intrínseca.

La unión de fructosa-6-P a Pfk-2 produce un aumento de 30% de la fluorescencia, con una curva de saturación hiperbólica y un K_d de 7 μ M. MgATP produce un apagamiento de la fluorescencia de 30% y un corrimiento del máximo de emisión de 7 nm hacia el azul. La respuesta es cooperativa con un K_d de 70 μ M y un n_H de 2. AMP-PNP o ATP no producen cambios significativos en el espectro de emisión. La unión de ATP al complejo enzima-fructosa-6-P produce un aumento hiperbólico de la fluorescencia. Experimentos de apagamiento por acrilamida para diferentes complejos enzima-ligando indican que en el complejo enzima-MgATP el triptofano se encuentra menos expuesto al solvente. El tiempo de vida para el triptofano fue de 9 ns y no presentó variaciones en los distintos complejos enzima-ligando. Estos resultados, en conjunto con los datos cinéticos, indican que la inhibición de la actividad de Pfk-2 por MgATP se debe a la unión de este compuesto a un sitio alostérico en la enzima. (Financiado por Fondecyt 1950297)

8

Secuenciación parcial de una glicoproteína de la Fibra de Reissner, RF-Gly I. (Partial sequencing of a Reissner's fiber glycoprotein, RF-Gly I). Hein, S., Yulis, C.R., Zárraga, A.M., Nualart, F., Araya, A., Millán, C. y Rodríguez, E.M. Instituto de Histología y Patología e Instituto de Bioquímica, UACH e Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS, Francia.

La mayor parte de la secreción del órgano subcomisural (OSC) está formada por dos glicoproteínas, de 450 y 190 kDa, probablemente derivadas de dos precursores diferentes, de 540 y 320 kDa; después de su liberación al III ventrículo cerebral, estas glicoproteínas se agregan formando la Fibra de Reissner (FR). En un trabajo previo, aislamos tres clones de cDNA por rastreo inmunológico de una biblioteca de OSC de bovino, γ gt22A-SCO-cDNA con anticuerpos anti-FR. Estudios de «Northern blot» e hibridización *in situ*, utilizando como sonda un inserto de 2,5 kb contenido en uno de los clones (pOSC-2,5), demostraron que este inserto hibridaba con un mRNA de tamaño superior a 9,5 kb, presente en el OSC y ausente en los tejidos controles. En el presente trabajo demostramos que el inserto contenido en pOSC-2,5 codifica para una de las dos principales proteínas secretorias del OSC. Anticuerpos policlonales producidos contra un péptido sintético, P15, cuya secuencia aminoacídica fue deducida del cDNA de 2,5 kb, reaccionaron específicamente con la FR y el OSC de vaca y también de rata. En «immunoblot» de extractos de OSC, los anticuerpos anti-P15 reaccionaron con los compuestos de 540 y 450 kDa; anticuerpos anti-FR reaccionaron además con el compuesto de 320 kDa. Se concluye que el cDNA de 2,5 kb clonado codifica para la glicoproteína de la FR de 450 kDa, a la que hemos designado como RF-Gly I. Esta proteína presenta homología con proteínas de la familia de las espondinas.

Financiado por DID-UACH (S-93-09 y S-96-14) y FONDECYT (1970627).

9

DIFERENCIACION Y EXPRESION DE TRANSPORTADORES FACILITATIVOS DE HEXOSAS EN CELULAS HL-60 INDUCIDAS POR VITAMINA D3. (Differentiation and expression of facilitative hexose transporters in vitamin D3 induced HL-60 cells). Haeger, P. y Concha, I.I. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. Para estudiar algunos de los cambios celulares y moleculares que ocurren en el proceso de diferenciación, se utilizó la línea celular HL-60 obtenida de pacientes con leucemia promielocítica aguda. Las células HL-60 pueden diferenciarse a una variedad de tipos celulares de la línea mielomonocítica, dependiendo del agente que se use. La vitamina D3, produce la diferenciación de HL-60 hacia monocito a una concentración de 10 nM en un cultivo de 72 horas. En este estudio se comprobó la diferenciación de HL-60 a monocito a través de cambios morfológicos y de cambios en la expresión de los transportadores facilitativos de hexosas, GLUTs. Esta familia de transportadores de membrana (7 isoformas) no utiliza energía proveniente del ATP, ni iones Na⁺ para realizar su función. Por medio de inmunocitoquímica e inmunodetección, se reveló que GLUT1, transportador distribuido en una amplia variedad de tejidos normales y tumorales, es la isoforma mayoritaria en la célula HL-60 y va en aumento a medida que la célula se diferencia a monocito. GLUT5, transporta sólo fructosa y parece también sobreexpresarse en la célula diferenciada. La isoforma GLUT2 que transporta glucosa y fructosa, muestra un pequeño aumento de su expresión en las células inducidas. Para observar si la sobreexpresión va acompañada de un aumento en la captación de hexosas, se realizaron ensayos de transporte. Se usó 2-desoxi-³H-glucosa (DOG) y ¹⁴C-fructosa en función del tiempo y de la concentración del azúcar. El resultado fue, que en células diferenciadas hay una mayor captación de DOG, apreciando una posible participación de un segundo componente que estaría transportando el metabolito con menor afinidad. Esto sugeriría la participación de GLUT2 en la captación de glucosa. Los ensayos de captación de fructosa no fueron reveladores, ya que no hubo incorporación en ninguno de los dos estados celulares. (PROYECTOS DID-UACH S-95-24 y FONDECYT 196-0485)

11

COMPOSICION DE NUCLEOSOMAS DE PRONUCLEO MASCULINO EN ETAPAS INTERMEDIAS DE SU REMODELACION EN ERIZOS DE MAR. (Nucleosomes composition at intermediate stage of male pronucleus remodeling in sea urchins) M. I. Oliver, S. Gutierrez, M. Puchi, M. Montecino y M. Imschenetzky.

Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Post-fecundación el núcleo espermático se decondensa transformándose en pronúcleo masculino. En erizos de mar, durante este proceso se pierden las histonas espermáticas (SpH) siendo reemplazadas por histonas de tipo materno (variantes de histonas CS) preexistentes en óvulos sin fecundar. En etapas intermedias de remodelación del pronúcleo masculino hemos descrito previamente la existencia de nucleopartículas híbridas compuestas tanto por histonas de origen paterno (SpH) como materno (CS). Con el fin de definir si esta composición híbrida representa la composición de cromatina a nivel de mono-nucleosomas, se implementó la purificación de mononucleosomas de erizos de mar en gradientes de sacarosa (5 % p/v -20 % p/v). Esta metodología fue aplicada a cromatina purificada de cigotos que contienen pronúcleos masculinos en etapa intermedia de su remodelación. Del total de nucleosomas aislados, se separó los nucleosomas conformados por SpH por inmunoprecipitación con IGG anti-SPH covalentemente unido a Sepharosa-4B que fue sintetizado con este objetivo. Los nucleosomas así aislados, fueron luego analizados en cuanto a su composición en histonas por dot blots revelados con anticuerpos anti-SpH y anti-CS respectivamente. Utilizando la estrategia descrita se detectó la presencia de histonas tanto de origen paterno como materno (SpH y CS) en mononucleosomas. En base a estos resultados se presenta un modelo que representa las transiciones de histonas paternas y maternas durante la transformación del núcleo espermático en pronúcleo masculino.

Grant 973174-1.2 Universidad de Concepción.

10

EXPRESION Y FUNCION DEL RECEPTOR PARA GM-CSF IN CANCER PROSTATICO. (Expression and function of GM-CSF receptors in prostate cancer).

Coralia I. Rivas y David W. Golde. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10021, USA.

El receptor para el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos-Macrófagos (GM-CSF) está constituido de dos subunidades, α y β . El complejo $\alpha\beta$ une GM-CSF con alta afinidad. La subunidad α aislada une GM-CSF con baja afinidad, mientras que la subunidad β aislada es incapaz de unir el ligando. Estudiamos la expresión y función del receptor para GM-CSF en la línea tumoral de próstata humana LNCaP, y analizamos su expresión en tejido prostático humano normal y neoplásico. Utilizando RT-PCR cuantitativo, inmunolocalización y unión de GM-CSF radioactivo encontramos que las células LNCaP expresan las subunidades α y β , y poseen receptores de alta y baja afinidad. Estudios funcionales indican que GM-CSF induce fosforilación de proteínas y proliferación celular. Estudios de inmunolocalización revelaron baja expresión de ambas subunidades en tejido normal, mediana expresión en hiperplasia benigna y elevada expresión en neoplasias. Máxima expresión fue observada en metástasis a los ganglios linfáticos y hueso. Células tumorales que reaccionaron positivamente con anticuerpos anti- α , también mostraron reactividad positiva con anticuerpos anti- β , indicando que expresan receptores de alta afinidad. Estos resultados sugieren que tanto tejido prostático hiperplásico como neoplásico puede responder a GM-CSF, un factor de crecimiento que inicialmente se pensó ser funcional solamente en células del sistema hematopoiético.

Financiado con fondos del NIH y Memorial Sloan-Kettering Cancer Center.

12

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE ENDOSOMAS DEL INTESTINO DEL PEZ *C. carpio*. (Isolation and characterization of *C. carpio* intestinal endosomes).

Ojeda, V., Villanueva, J.,

*Goicoechea, O. y Amthauer, R. Instituto de Bioquímica, *Instituto de Embriología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Los estudios morfológicos de internalización de proteínas intactas en peces han contribuido a delinear el mecanismo de este proceso. Se ha propuesto que la unión de proteínas a sitios en la membrana desencadenaría una cascada de eventos que culminaría con la endocitosis y posterior transcitosis de la proteína. Con el objeto de disectar el mecanismo de internalización de proteínas hemos comenzado a aislar y caracterizar endosomas que contienen proteína trazadora del proceso. Para ello, segmentos de intestino aislado se incubaron con peroxidasa (HRP). Luego de incubar por 10 min a 20°C, la mucosa se homogenizó y se aisló una fracción cruda de endosomas por centrifugación diferencial y gradiente de sacarosa. La densidad de la fracción endosomal fue de 1.07 g/ml. Este valor es similar al obtenido para endosomas aislados de hígado de salmón. Con el objeto de mejorar el grado de purificación de la fracción de endosomas se introdujo una etapa de cromatografía en concanavalina A-sacarosa. Esta etapa permitió eliminar membranas de ribetes en cepillo (BBM) que contaminaban la preparación. Los endosomas aislados muestran un perfil electroforético (en PAGE-SDS) distinto a las BBM. La HRP contenida en los endosomas, analizada por Western blot, no muestra degradación. Al analizar al microscopio electrónico los endosomas, se observan vesículas selladas conteniendo HRP y con característica semejantes a las reportadas para otras especies. Proyectos Fondecyt 1940847 y DID-UACH S-95-23.

13

CCR5DEL32 EN INFECCIÓN PERINATAL DE VIH-1. (CCR5del32 in perinatal HIV-1 infection). Rousseau, C.¹, Just, J.², Abrams, E.³, Casabona, J.⁴, Stein, Z.⁵, King, M-C.¹

¹Division of Medical Genetics, University of Washington, ²Millennium Pharmaceuticals, Boston, Massachusetts, ³Department of Pediatrics, Harlem Hospital, ⁴Centra d'Estudis Epidemiologica sobre la SIDA de Catalunya, Barcelona, ⁵GH Sergievsky Center, Columbia University.

CCR5, a chemokine receptor, serves as a co-receptor for macrophage tropic Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-1). A 32 base pair deletion within the gene encoding CCR5, CCR5del32, has been shown to prevent HIV-1 infection of T cells in the absence of a wild type allele. This alteration is present in low frequency in Caucasian populations. In order to investigate the effect of CCR5del32 in perinatal HIV-1 transmission and disease progression, two cohorts of perinatally exposed and/or infected children were analyzed for the presence of the allele. PCR was used to identify CCR5del32 in prevalent and prospective cases among 150 African American children from New York City and 73 Caucasian children from Barcelona, Spain. HIV-1 transmission, clinical manifestations of disease including encephalopathy, opportunistic infections and death before 2 years of age, survival, CDC classification and degree of immunosuppression were compared in children with and without CCR5del32. The allele frequency in HIV-1 infected African Americans (0.016) was lower than in Catalan children (0.041). No evidence for a dominant protective effect of CCR5del32 for HIV-1 transmission or disease progression was found in these cohorts. In addition, single stranded confirmational analysis was used to identify four more polymorphisms in the African American cohort. None of these polymorphisms are predicted to disrupt gene expression and none are associated with transmission or disease progression.

15

UN NUEVO MODELO DE OXIDACION DE FIERRO EN THIOBACILLUS FERROOXIDANS. POSIBLE E INESPERADA RELACION CON EL SISTEMA DE FOTOSINTESIS.

David S. Holmes*, María Eugenia Cabrejos#, Patricia Varela# y Eugenia Jedlicki C.#.

*Departamento Ciencias Biológicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.#Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Thiobacillus ferrooxidans es una bacteria Gram-negativa, mesofílica, capaz de oxidar Hierro a pH2. Su pH interno es alrededor de 6.5, lo que determina un gradiente natural de pH a través de su membrana interna. Este gradiente permite sintetizar el ATP requerido por la célula gracias a la acción de una ATP_{asa}. Por otra parte, *T.ferrooxidans* fija el CO₂ atmosférico a través del ciclo de Calvin, para lo cual requiere de la presencia de NADPH. Debido a que esta bacteria no utiliza compuestos orgánicos como fuente de energía, la obtención de todo su NADPH se realiza a partir de los electrones derivados de la oxidación del Hierro. Sin embargo, el E_m de la semi-reacción FeII/FeIII es + 0,72V y el de NADP⁺/NADPH es - 0,314V. Por lo tanto, para que *T.ferrooxidans* produzca NADPH, debe «empujar» los electrones contra el gradiente termodinámico.

Nosotros proponemos un nuevo modelo de oxidación de Hierro que explica el mecanismo por el cual *T.ferrooxidans* puede lograr este transporte de electrones «río arriba». Nuestro modelo se basa en evidencias aportadas por resultados de experimentos de enfoque biofísico, bioquímicos y de biología molecular. Lo más importante de nuestro modelo es que en él se sugiere que la vía de oxidación de Hierro por *T.ferrooxidans* podría constituir, desde un punto de vista evolutivo, un antecesor de la vía fotosintética.

Financiado por proyecto Fondecyt#1950560.

14

ANÁLISIS FUNCIONAL Y FENOTÍPICO DE LAS CELULAS NK EN PATOLOGÍA: EFECTO DE INMUNOMODULADORES.

Puente, J., Miranda, D., Weinstein, C., Blanco, L.P., Villegas, R.¹, Sepúlveda, C.²

Depto. de Bioquímica y Biol. Molecular. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. ¹División Bioestadística y Biomatemática. Esc. Salud Pública. Fac. de Medicina. ²Unidad de Inmunología. Hospital Clínico. Universidad de Chile.

Las células NK presentan actividad citolítica (ACNK) espontánea frente a diversas células y su fenotipo es CD3⁺, CD16-56⁻. La ACNK ha demostrado ser un índice altamente sensible en diversas patologías. En el presente trabajo se ha efectuado el análisis funcional y fenotípico de las células NK y el efecto *in vitro* de inmunomoduladores de la ACNK en dos grupos de pacientes: shock séptico inicial e infección por VIH-1 y su comparación con los controles normales respectivos.

La ACNK se determinó utilizando linfocitos sanguíneos periféricos como células efectoras y células K-562 radiomarcadas con ⁵¹Cr como células blanco. Los resultados se expresan como % de Lisis Específica. Los inmunomoduladores se pre-incubaron por 30 min a 2 h con las células efectoras previo al ensayo de citotoxicidad: IL-2 50 U/mL, IFN-α 500 U/mL, Io 1,0-10 μM, TPA 50-250 ng/mL. El fenotipo, CD3, CD4, CD8, CD16-56 se determinó por citometría de flujo. Ambas patologías mostraron una significativa disminución de la ACNK y moderada disminución del fenotipo NK. En la infección por VIH-1, la ACNK disminuyó en los individuos sintomáticos y asintomáticos. Sólo la mezcla Io+TPA logró estimular la ACNK patológica por lo que concluimos un probable bloqueo en la activación de las células NK.

Proyectos Fondecyt N° 1940570 y 1970226.

16

METABOLISMO DE OXALATO EN *Ceriporiopsis subvermispora*. VÍAS ALTERNATIVAS DE PRODUCCIÓN DE H₂O₂ (Oxalate metabolism in *C. subvermispora*. Alternate pathways for H₂O₂ production).

Urzúa, U., Aguilar, C. y Vicuña, R. Depto. de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Ceriporiopsis subvermispora es un hongo de pudrición blanca cuyo sistema ligninolítico está constituido por manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa. La principal función de la MnP es la oxidación de Mn(II) a Mn(III), siendo este último el oxidante de la lignina. El objetivo de este trabajo es dilucidar el mecanismo de generación de H₂O₂ extracelular necesario para la actividad MnP.

En el fluido extracelular se detectó glioxilato y oxalato. El oxalato, además de actuar como quelante de Mn(III), es oxidado a CO₂ y radical formiato por el mismo Mn(III), iniciando una serie de reacciones vía radicales libres que concluyen con la formación de H₂O₂. El glioxilato se descompone por un mecanismo similar y, dada su mayor reactividad, estimula la oxidación de oxalato.

Como contraparte, en extractos de micelio se detectaron actividades de glioxilato oxidasa y oxalato oxidasa. Esta última enzima fue purificada y se determinó una masa molecular nativa de 300 kDa, un pH y temperatura óptimas de 3.5 y 40°C, respectivamente. Muestra una especificidad absoluta por oxalato, sustrato para el cual se determinó una Km de 0.05 mM. Es inhibida por oxalato en concentraciones superiores a 2 mM y no es activada por metales, a diferencia de la oxalato oxidasa de plantas.

Estos resultados permiten postular que el oxalato es oxidado dentro de la célula produciendo trazas de H₂O₂ que son secretadas al medio extracelular. Allí, la MnP utiliza este H₂O₂ para generar trazas de Mn(III) que gatillan la oxidación de glioxilato y oxalato. El resultado de estas reacciones es la formación de más H₂O₂, y por lo tanto de más Mn(III). Finalmente el Mn(III) puede seguir consumiendo ambos metabolitos o eventualmente, oxidar la lignina. Financiado por Proyecto Fondecyt 2960010.

17

LA DISPONIBILIDAD DE GLUCOSA DETERMINA LA OPERACION DE VIAS DIRECTA E INDIRECTA PARA LA SINTESIS DE GLICOGENO EN OOCITOS DE RANA. (Glucose availability determines operation of direct and indirect pathways for glycogen synthesis in frog oocytes). PRELLER, A., BAEZ, M., URETA, T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

En oocitos de rana el 95% de la glucosa microinyectada se incorpora en glicógeno. La incorporación puede ocurrir tanto por la vía clásica o "directa" como por una vía "indirecta" que requiere degradación de glucosa a triosas y posterior gluconeogénesis con regeneración de glucosa-6-P para la formación de glicógeno. La coinyección de glucosa marcada y fructosa-2,6-bisP (potente inhibidor de la gluconeogénesis) permite medir la contribución de cada vía (vía directa = incorporación insensible a fructosa-2,6-bisP; vía indirecta = incorporación total - vía directa). Con 0,1 mM glucosa intracelular opera casi exclusivamente la ruta indirecta, mientras que entre 1-2 mM prevalece la vía directa, manteniéndose un 30% de la indirecta. La vía directa muestra una curva sigmoidea con una semisaturación a glucosa 0,7 mM, en tanto que la vía indirecta presenta una curva hiperbólica cuya semisaturación se alcanza con glucosa 0,2 mM. La glicógeno sintasa de oocitos, enzima clave en el proceso, es prácticamente inactiva a bajas concentraciones de su sustrato, y es muy activada por glucosa-6-P en el rango milimolar, tanto *in vivo* como *in vitro*. Se propone que la no operación de la ruta directa a concentraciones bajas de glucosa, que no generan suficiente glucosa-6-P ni UDPG, se debe a inactividad de la glicógeno sintasa implicada en esa vía. *Financiado por Fondecyt, proyecto 1970216.*

19

ACTIVIDADES QUE PARTICIPAN EN EL METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS EXTRACELULARES EN PLACENTA HUMANA. García L., Kettlun, A.M., Acevedo*, C.G., Bravo*, I., Chayet, L., Collados, L., Aravena, P., Traverso-Cori, A y Valenzuela, M.A. Depto Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. *Depto Fisiología, Facultad Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

En la placenta se han descrito tres actividades hidrolíticas sobre nucleótidos localizadas como ectoenzimas. Estas enzimas son la ATP-difosfohidrolasa, la fosfatasa alcalina y la 5-nucleotidasa. Las dos primeras actúan sobre nucleósidos di y trifosforilados, siendo las principales diferencias entre ellas el pH óptimo de reacción y el catión activador, donde Ca^{2+} es mejor para la primera y Mg^{2+} para la segunda. Igualmente, la fosfatasa alcalina hidroliza fosfomonoésteres, diferenciándose de la 5-nucleotidasa por el pH óptimo de la reacción.

Se han comparado los niveles de estas tres actividades en placenta mediante estudios de perfusión a través de la circulación fetal (en contacto con el endotelio) y la materna (en contacto con las microvellosidades). Se perfundió con los siguientes complejos: Ca-ATP, Ca-ADP, Mg-AMP o Mg-p-nitrofenilfosfato (p-NFF) y se determinó la cantidad de fosfato liberado al perfusado. En estos experimentos se encontró que las actividades ectonucleotidásicas hidrolizan ATP, ADP y AMP en mayor proporción que p-NFF. La perfusión en presencia de inhibidores específicos de fosfatasa alcalina (fenilalanina o levamisol) y ATP-difosfohidrolasa (lidocaina) indicó que ambas enzimas están presentes como ectoenzimas. Se puede concluir que el endotelio vascular y las microvellosidades placentarias tienen actividad ATP-difosfohidrolásica que actúa preferencialmente sobre ATP y ADP extracelular, nucleótidos que interactúan con receptores purinérgicos presentes en plaquetas y endotelio.

18

VÍA DEGRADATIVA DE 2,4,6-TRICLOROFENOL EN BACTERIAS. Padilla, L., Matus, V., González, B.

Laboratorio de Microbiología, Departamento de Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. CHILE

Se estudió la vía degradativa del contaminante ambiental 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCF) en *Ralstonia eutropha* JMP134, *R. eutropha* JMP222 (Don, R., 1981, J. Bacteriol., 145:681-686), y *Burkholderia cepacia* PZK, cepa aislada del río Biobío.

Este trabajo arrojó los siguientes resultados: a) Los análisis por espectrofotometría UV/Visible y de cloruro liberado al medio, demostraron que la capacidad degradativa es inducible por 2,4,6-TCF; b) El análisis por cromatografía de gases permitió detectar 2,6-diclorohidroquinona en suspensiones celulares; c) Se demostró que las cepas son capaces de degradar 2,6-diclorohidroquinona, lo cual corrobora su participación como metabolito en la vía degradativa de triclorofenoles.

También se estudió la actividad enzimática de extractos crudos de *R. eutropha* JMP134 frente a hidroxiquinol, otro posible metabolito de la vía degradativa de 2,4,6-TCF. Los resultados obtenidos indican que extractos de células inducidas con 2,4,6-TCF tienen incrementadas dos actividades enzimáticas: hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa, que produce maleilacetato, y maleilacetato reductasa, la cual transforma maleilacetato en β -ceto adipato, producto canalizable hacia el ciclo de Krebs. Los resultados obtenidos confirman el modelo general propuesto por Lingens et al, para la degradación bacteriana de 2,4,6-triclorofenol (Latus, 1995, Appl. Environ. Microbiol., 61:2453-2460). Este modelo predice la posible participación de 6-clorohidroxiquinol en la vía. Este metabolito está siendo sintetizado para su ensayo como sustrato.

Este trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1960262. V. Matus es becaria de CONICYT.

20

ESTUDIO PRELIMINAR DE GENES QUE CODIFICAN PARA ENZIMAS CON ACTIVIDAD LIGNINOLITICA EN *Ganoderma applanatum*. Olave, N., Canales, M. y Olate, J. Laboratorio Biofísica y Genética Molecular. Fac. Ciencias Biológicas. U. de Concepción. Los genes que codifican enzimas con actividad ligninolíticas son producidas por hongos basidiomicetes o de podredumbre blanca en ambientes pobres en nutrientes nitrogenados y en carbono.

Ganoderma applanatum, es un hongo basidiomicete que forma parte del ecosistema "palo podrido", característico de los bosques del sur de Chile. En "palo podrido", *Ganoderma applanatum* es el principal responsable de la degradación selectiva de la lignina.

Distintos investigadores (Ríos y Eyzaguirre, 1991; Dill y Kraepelin, 1989) han publicado condiciones de cultivo selectiva y extensiva para la degradación de lignina en *Ganoderma applanatum*, características no compartidas con *Phanerochaete chrysosporium*. En cultivo líquido de *Ganoderma applanatum* se ha informado actividad manganeso peroxidasa, pero no se tiene conocimiento de la presencia de genes que codifican para lignina y/o manganeso peroxidasa.

En este trabajo se realizó la búsqueda de genes que codifican para enzimas con actividad ligninolítica en *Ganoderma applanatum*. Para ello el hongo se cultivó en medio líquido a 25°C y con agitación por un periodo de 12 días. A partir del material obtenido por filtración, se aisló el ADN genómico y se procedió a la amplificación por PCR. Se utilizan dos partidores diseñados a partir de las regiones homologas encontradas en las distintas secuencias de los genes que codifican para lignina y manganeso peroxidasa.

El análisis de los productos de PCR permitió visualizar un fragmento de ADN de aproximadamente 900 pb, cuyo tamaño corresponde al producto obtenido con el control positivo *Phanerochaete chrysosporium* (organismo en el que se han encontrado genes que codifican para lignina y manganeso peroxidasa), sugiriendo la presencia de genes que codifican para enzimas deslignificantes en *Ganoderma applanatum*.

21

Tirosil tRNA Sintetasas de Bacterias: ¿se expresa la TyrRS de *Thiobacillus ferrooxidans*? (Bacterial Tyrosyl tRNA Synthetases: Is the *T. ferrooxidans* TyrRS expressed?) J. Salazar, J. Tapia, D. Soll, y O. Orellana. Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University. Sobre la base de la estructura primaria se ha descrito que, en bacterias, existen dos familias de tirosil tRNA sintetasas, TyrRS y TyrRZ (Salazar y col. J. Bacteriol. 176:4409-4415). Se ha postulado que estas dos enzimas se generaron por la duplicación y transferencia horizontal de genes entre distintas especies bacterianas (Brown y col. J. Mol. Evol. 45: 9-16 1997). En el genoma de *B. subtilis* están presentes los genes para cada una de las enzimas (*tyrS* y *tyrZ*) y codifican proteínas funcionales. En el trabajo previo de nuestro laboratorio se describió la presencia en *Thiobacillus ferrooxidans*, una bacteria acidófila y quimioautotrófica que participa en la biolixiviación de minerales, del gen *tyrZ* que codifica para la TyrRZ. Esta enzima es funcional *in vivo* en *E. coli*. *In vitro* puede usar el tRNA^{tyr} de *E. coli* como sustrato. Mediante estudios de la masa molecular relativa por filtración en geles y por electroforesis en condiciones no desnaturalantes demostramos que la TyrRZ de *T. ferrooxidans* es un monómero, a diferencia de la TyrRS de *B. stearothermophilus* y *E. coli* que son homodímeros. En este trabajo se demuestra que la enzima activa también es un monómero. Para analizar la interacción de la enzima con el tRNA, se estudió el efecto de mutaciones en aminoácidos conservados en la región carboxilo terminal de las dos familias de enzimas, en la funcionalidad *in vivo* e *in vitro* de la TyrRZ. Esta región corresponde, en las TyrRS, al dominio de interacción con el tRNA. En estudios previos sobre la expresión del gen *tyrZ* se observó que en *T. ferrooxidans* los niveles del mRNA eran relativamente bajos. En un análisis de tipo Western en extractos de *T. ferrooxidans* se detectó una proteína con un punto isoeléctrico cercano a las TyrRS (pI= 6). Estos resultados sugieren que en *T. ferrooxidans* la TyrRZ no se expresa. Sobre la base de la estructura y la expresión, se discutirá la posible función y el origen evolutivo de la TyrRZ. Financiado por Fondecyt, NIH, ICGEB y U. de Chile

23

EFFECTO DEL MEDIO AMBIENTE SOBRE LA EXPRESION DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION PIT-1 EN CARPA (*Cyprinus carpio*). (Environmental effect on the expression of transcription factor Pit-1 in the carp) Kausel, G., Figueroa, J., Hernandez, J., Vera, M.-I., and Krauskopf, M., Instituto de Bioquímica, Universidad Austral, Valdivia, Chile. En la carpa (*Cyprinus carpio*), teleosteo euritermal, los factores ambientales implícitos en los cambios estacionales provocan una respuesta fisiológica, que adapta al pez a la nueva condición de su hábitat. En el ajuste, se recurre a una profunda reprogramación de la expresión génica. Según nuestra hipótesis de trabajo, la respuesta compensatoria global, que compromete incluso la expresión de genes considerados constitutivos, como los que codifican RNA ribosomal, involucra una coordinación que surge a nivel del eje hipotálamo-hipofisario. En este contexto hemos estudiado el factor de transcripción específico de la glándula pituitaria, Pit-1. Se sintetizó, amplificando por PCR, una sonda homóloga para secuencias de Pit-1 de carpa identificando oligonucleótidos derivados de la región POU, dominio altamente conservado en Pit-1. A partir de una biblioteca genómica de carpa, se aislaron los clones GP1 y GP5. En particular, el subclon pGP5₁₉₀₀, contenía la secuencia codificante de Pit-1. No obstante, sólo estaban contenidos los 4 exones codificantes de la región 3'. Para conocer el resto de la estructura primaria de los exones se secuenció un 5'cDNA generado por PCR (RACE) usando como templado RNA de hipófisis de carpa. Se sintetizaron ribosondas (*sense* y *antisense*) que contienen 450 pb de la región 5' del Pit-1 de carpa y se examinó, por hibridación *in situ*, la transcripción de Pit-1 en cortes de glándulas pituitarias. Aún cuando las hormonas que se sintetizan en la rostral pars distalis, proximal pars distalis y pars intermedia están controladas por Pit-1, se observó una clara zonalización que revelaba una expresión diferencial célula-específica de Pit-1. Se distinguió, además, un significativo efecto de las condiciones estacionales del hábitat sobre la expresión del factor de transcripción Pit-1. En efecto, al dimensionar las señales que generaba la hibridación *in situ*, en hipófisis de capras provenientes de verano e invierno, mientras en la rostral pars distalis se detectó escasa señal en ambas estaciones, tanto en la proximal pars distalis como en la pars intermedia se observó en la estación cálida una transcripción notoriamente más alta que en invierno. El examen inmunocitoquímico de Pit-1, usando anticuerpos generados con un oligopeptido sintético derivado del conocimiento de la estructura primaria de Pit-1 de carpa, sugiere que la síntesis del factor de transcripción sigue el mismo comportamiento que su transcripción. En consecuencia, la expresión de Pit-1 en carpa, está modulada por la condición que impone el medio ambiente. Para identificar posibles variantes de Pit-1 de carpa se aislaron clones genómicos adicionales. El análisis en Southern de un nuevo clon, GP7, reveló que contiene todo el gen de Pit-1 y secuencias que lo distinguen de GP5. La secuenciación de todo el inserto de GP7 evidenció la existencia de dos genes para Pit-1 en carpa y documenta por primera vez la organización completa del gen de Pit-1 en teleosteo. (Financiado por Grants FONDECYT 2950042, 1940845, e ICGEB GE/GLO/90/004)

22

REGULACION DE LA EXPRESION DE GENES NUCLEOLARES EN LA CARPA. (Regulation of the nucleolar gene expression in the carp fish) MIVera, H.M.Ríos, C.Quezada, J.Figueroa, and M.Krauskopf. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. (mvera@valdivia.uca.uach.cl) La reorganización del nucleolo es uno de los rasgos fenotípicos más sobresalientes de la reestructuración celular durante el proceso de aclimatización estacional del pez *Cyprinus carpio*. La notable segregación de los componentes nucleolares junto a una reducida capacidad de transcripción y procesamiento de pre-rRNA durante el invierno, indican una disminución de la actividad de nucleolar. Morfológicamente, la disociación de los componentes nucleolares representa la inactivación temporal de la expresión de los genes de RNA ribosomal. En verano, los componentes nucleolares están entremezclados y hemos detectado una actividad nucleolar francamente distinguible del estado reprimido que caracteriza a las células adaptadas a la condición invernal. Usando ensayos semicuantitativos de hibridación *in situ* hemos demostrado que el nivel de transcripción de genes de rRNA 5,8S y del pequeño RNA nucleolar U3 (snoRNA U3) cambia dramáticamente entre verano e invierno, siendo la expresión de ambos genes notoriamente menor en la estación fría. Estos resultados indican que el nivel de expresión de rRNA en peces euritermales está modulado estacionalmente y sugiere que, en la carpa, la expresión de los genes de rRNA podría ser no constitutiva. Con el propósito de examinar la expresión de genes nucleolares y el procesamiento de los pre-rRNA durante la aclimatización de la carpa, se aislaron clones genómicos que contienen secuencias de rRNA y snoRNA U3. A partir de uno de los 10 clones distintos, aislados con sondas derivadas de rRNA, se subclonó el clon pCRR 5X que contiene el extremo 3' del rRNA 18S, el rRNA 5,8S y el extremo 5' del rRNA 28S, además de los espaciadores transcritos que separan las regiones codificantes. En forma análoga, están siendo subclonadas las regiones del espaciador intergénico del gen de rRNA. Usando una sonda amplificada por PCR con partidores derivados de U3 de *Xenopus laevis* y DNA de carpa como molde, se aislaron dos clones genómicos putativos para U3 RNA. Se subclonó parte del inserto del clon U3C2, obteniéndose el clon pU3C2A2. Su secuencia se está analizando por comparación con las de otros ectotermos euritermales. En estos clones se examinará la estructura primaria del extremo 5' no codificante para identificar elementos *cis* involucrados en la modulación de su expresión. Proyectos 1970663 (FONDECYT), GE/GLO/90/004 (UNIDO/ICGEB), E-96-07 (DID UACH).

24

ANALISIS DE LA REPROGRAMACION TRANSCRIPCIONAL QUE ACONTECE EN LA ACLIMATIZACION DE LA CARPA (*Cyprinus carpio*). (Analysis of the transcriptional reprogramming which occurs during the acclimatization of the carp) San Martín, R., Kausel, G., Sarmiento, J., Figueroa, J., Vera, M.-I., and Krauskopf, M., Instituto de Bioquímica, Universidad Austral, Valdivia, Chile. Los cambios del medio ambiente, en particular la temperatura y el fotoperíodo, demandan en ectotermos euritermales estrategias adaptativas que implican una reprogramación estacional. El ajuste compensatorio a la demanda que impone la característica propia de cada estación compromete respuestas moleculares complejas y coordinadas, entre las que se destaca la articulación de un fenotipo transcripcional cíclico y reversible que, en la carpa (*Cyprinus carpio*), parece alcanzar incluso a genes considerados clásicamente como constitutivos. Esta situación, de seguro, dificulta el estudio de la biología molecular del proceso de aclimatización estacional, en especial, la cuantificación de la transcripción que requiere de parámetros referenciales para su adecuada validación. Aun más, está siendo omitida en investigaciones que podrían generar conclusiones inadecuadas. Así, Tiku y col. (*Science* 271, 815-818, 1996), estudiando la transcripción de Δ^2 -desaturasa en carpas aclimatadas a distintas temperaturas, determinó por *Northern blot*, que la transcripción estaba elevada en el estado más frío. Aunque probablemente el resultado es correcto porque explica adecuadamente los cambios en la fluidez de la membrana que ocurre en frío, se sustenta en patrones considerados constitutivos como la expresión de rRNA y de β -actina. Aunque aclimatización y aclimatación constituyen procesos distintos, nuestros estudios sugieren claramente que la expresión de rRNA está afectada estacionalmente. Para disponer de un método objetivo que supere las limitantes que impone la necesaria identificación de genes constitutivos en ectotermos euritermales y determinar, al mismo tiempo, la conducta transcripcional de β -actina y de los rRNA en la carpa durante la aclimatización estacional, hemos optado por construir sistemas de RT-PCR-MIMICS que permiten la cuantificación de la expresión de un gen recurriendo a DNAs competidores conocidos. Ya que hemos observado, usando hibridación *in situ*, que el factor de transcripción Pit-1 y la hormona de crecimiento se expresan diferencialmente en carpas provenientes de verano e invierno, en conocimiento de la estructura primaria de los mRNA respectivos, construimos DNA competidores no homólogos que comparten en sus extremos los partidores con las secuencias que amplifican los cDNA correspondientes. Los dos sistemas han sido estudiado en detalle y han demostrado su utilidad en la cuantificación de la expresión de Pit-1 y GH de carpa. Con la experiencia acumulada estamos aproximando la cuantificación de la transcripción de β -actina para determinar si se comporta constitutivamente frente a los cambios estacionales del hábitat del pez. (Financiado por Grants de FONDECYT 1940845 y 1970651)

25

Identificación del Transcrito de Kinesina en Espermatozoides (Identification of Kinesin Transcript within Human Spermatozoa) Zárrega, A.M., Pérez, C., Brito, M., Muñoz, J.P. and Burzio, L.O.B. Inst. de Bioquímica, Fac. Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia y BioChile IGSA.

Durante el proceso de fertilización dos células diferenciadas, el espermatozoide y el óvulo, se fusionan de manera precisa y controlada contribuyendo ambos a la formación del desarrollo a término del embrión. Al presente, existe poca información acerca de la naturaleza y función de los factores aportados por el espermatozoide al huevo. La metilación diferencial de alelos y recientemente el hallazgo de la proteína específica de espermatozoide, SPE-11, esencial para la viabilidad del embrión, han sustentado la participación de factores epigenéticos en el desarrollo del embrión.

Uno de los objetivos centrales de nuestro trabajo ha sido la identificación y caracterización de los RNAs contenidos en espermatozoides. Estos han sido propuestos como parte de los factores involucrados en los procesos de fertilización y desarrollo. Con este propósito hemos rastreado una biblioteca de cDNA de testículo utilizando cDNA total derivado de espermatozoide. Varios de los clones aislados correspondieron a una forma diferente del rRNA mitocondrial 16S, modificado en el extremo 5'. En este trabajo se demuestra por análisis de secuencia, hibridación *in situ* y experimentos de RT-PCR, la localización del mensajero de kinesina en espermatozoides humanos, de rata y ratón.

(Financiado por Proyecto Fondecyt # 1960492 y Proyecto DID, UACH # S-97-13)

27

IMPLICANCIAS DE UN RESIDUO DE CISTEINA CENTRAL Y DEL DOMINIO HHCC EN LA FUNCIONALIDAD DE INTEGRASA DEL VIRUS DE LEUCEMIA MURINA (Mu-MLV). (Implications of a central cysteine residue and the HHCC Domain on the activity of Mu-MLV integrase).

¹Le-n, O., ²Donzella, G. y ³Roth, M.J.

¹Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Chile. ²Department of Biochemistry, University of Medicine and Dentistry of New Jersey-RWJMS.

La integrasa retroviral (IN) cataliza la integración del genoma viral inversamente transcrita mediante interacciones complejas proteína-proteína y proteína-DNA que no han sido bien definidas. Ensayos de integración y desintegración realizados *in vitro* han permitido estudiar estas interacciones mediante la complementación funcional de subunidades mutantes de IN. En los estudios que se presentan se ha utilizado un sustrato de desintegración sintético (dumbbell), que imita al intermediario producido durante la integración, en ensayos de complementación funcional de una proteína mutante, que no posee el dominio HHCC (Nd105), por un dominio independiente HHCC. Los resultados obtenidos indican que en ausencia del dominio HHCC, Nd105 es capaz de catalizar la desintegración de un sustrato que posee un dinucleótido no apareado en el extremo 5'. En cambio, en ausencia de dicho dinucleótido la desintegración requiere del dominio HHCC. Por otra parte la alquilación de cualquiera de las proteínas por separado afecta notablemente la reacción de desintegración, sugiriendo que ambos, el dominio HHCC y la cisteína 209 representan sitios de alquilación sensibles, importantes para la interacción IN-IN. El bloqueo de cisteína 209 en Nd105 por agentes alquilantes ha sido también demostrada por la inhibición de la reacción de entrecruzamiento con oligonucleótidos modificados dirigidos a grupos SH. Para investigar la función de cisteína 209 en el contexto de la replicación, se construyó una mutante C209A M-MuLV IN dentro de un clon proviral. En esta mutante se observó un retardo en la producción de viriones y en la cinética de replicación. Financiado por los proyectos NSF-INT 9408501 y American Cancer Society RPG-95-056-03-VM

26

Purificación de dos proteasas activadas post-fecundación en erizos de mar. (Purification of two proteasas activated post-fertilization in sea urchins). V Morín, F Díaz, M Puchi, M Montecino, M Imschenetzky. Dep de Biología Molecular, Universidad de Concepción.

En erizos de mar durante la transformación del núcleo espermático en pronúcleo masculino ocurre una degradación selectiva de histonas espermáticas (SpH) preservándose las histonas de origen materno (variantes CS). Con el fin de identificar la(s) enzima(s) responsables de esta degradación se analizaron las proteasas activadas por fecundación en extractos de óvulos fecundados. Se detectaron dos cisteín-proteasas unidas a cromatina que difieren en su masa molecular, selectividad de sustrato y pH óptimo. Experimentos de inhibición de cisteín-proteasas *in vivo* confirman su participación en la degradación de histonas espermáticas. Ambas proteasas fueron purificadas desde cromatina de cigotos por gradiente de sacarosa seguidos de filtración en Sephadex G100-120 y Biogel P60. Esta última etapa permitió la separación de ambas proteasas. La proteasa de mayor masa molecular (60 kD.) degrada selectivamente las histonas espermáticas dejando a las histonas ovulares intactas y presenta una actividad óptima al pH fisiológico característico de óvulos fecundados (pH 8.0). La proteasa de menor tamaño molecular (30 kD) degrada preferentemente el sustrato sintético (Z-Phe-Arg-NHMEC) y presenta un pH óptimo más ácido (pH 5.5). En base a estas evidencias se postula que la proteasa de 60 kD es responsable de la degradación de histonas espermáticas que ocurre post-fecundación y se propone la denominación de SpH-Proteasa para esta molécula.

Proyecto 973174-1.2 Universidad de Concepción

28

Plant viruses gene expression: the tenuiviruses strategies (A review).

PEDRO I. BUSTAMANTE* and ROGER HULL

John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, UK

Laboratorio de Biotecnología, Universidad Santo Tomás, Av. Ejército 146. Santiago, Chile. Fax (56-2) 360 1376. E-mail: Pedro.Bustamante@usa.net

Plant viruses can cause serious losses to most, if not all, major crops upon which we depend for food. Many viruses are endemic, causing moderate losses each year. Others, such as rice tungro in SE Asia, african cassava mosaic in Africa and potato viruses in UK can cause US\$ 1,500, 2,000 and 30-50 millions per year in losses respectively. However, in recent years the understanding of the genome organisation of plant viruses has increased rapidly in parallel with the development of molecular biological techniques. The ability to obtain nucleotide sequences of complete viral genomes has also permitted the elucidation and understanding of expression strategies used for many different plant viruses.

The overall aim of this work was to gain an insight into the genetic organisation, the coding functions and the expression strategies of plant viruses and the *Tenuivirus* genome. Northern blot analysis determined that subgenomic RNAs for RHBV-N and RHBV-NS3 proteins were detected from both viral RNA preparations and total RNA from infected plants. Phylogenetic analysis provided direct evidence to consider the *Tenuivirus* genus as being within of the *Bunyaviridae* family.

29

CARACTERIZACIÓN GENÉTICO-MOLECULAR DE HABITANTES DE ISLA DE PASCUA: ANÁLISIS DE MARCADORES NUCLEARES Y MITOCONDRIALES. (Molecular genetic characterization of Easter Island inhabitants: nuclear and mitochondrial DNA markers).

MORAGA, M., VERGARA, E., CARVALLO, P. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, CHILE.

Los habitantes de la Isla de Pascua constituyen un grupo fenotípicamente homogéneo, originado presumiblemente de colonizadores de origen polinésico. El análisis del DNA mitocondrial, gracias a su alta variabilidad y herencia materna, ha sido de gran utilidad en el estudio del origen y migración de las poblaciones contemporáneas. Se determinó la ocurrencia de un sitio polimórfico en el mtDNA presente en poblaciones amerindias y polinésicas (haplotipo B), y además se secuenció la región D-loop que permite distinguir entre individuos de origen polinésico o amerindio del haplotipo B. También se realizó un análisis de DNA nuclear, que consistió en caracterizar la frecuencia alélica de dos loci polimórficos, que han sido extensivamente estudiados para otras poblaciones humanas, como son ApoB y D1S80. El análisis de polimorfismos en el mtDNA reveló la presencia del haplotipo B en los 53 individuos estudiados, y no emparentados directamente. La secuenciación de la región D-loop del mtDNA, en 24 individuos, reveló una clara homogeneidad encontrándose cuatro cambios nucleotídicos, con respecto a la secuencia de referencia, tres de los cuales son característicos de mtDNA de origen polinésico. El estudio de la frecuencia de los alelos de los loci ApoB y D1S80 reveló la presencia de un reducido número de alelos, 9 (de 27) para D1S80 y 8 (de 20) para ApoB. Podemos concluir que la población nativa de Isla de Pascua es una población de origen polinésico, y que presenta un alto grado de homogeneidad genética. (FONDECYT 297-0028)

31

MUTACIONES EN EL GEN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO QUE DETERMINAN UN ANORMAL PROCESAMIENTO DEL mRNA EN PACIENTES CHILENOS. (Mutations in the growth hormone gene determine an abnormal splicing in Chilean patients).

HERRERA, L., MISSARELLI, C. y CARVALLO, P. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, CHILE.

Entre las causas mejor estudiadas para la talla baja se encuentra la deficiencia aislada de hormona de crecimiento (IGHD). Según sus características clínicas y su modo de herencia, la IGHD se ha clasificado en cuatro tipos: IGHD IA, IB, II y III. La IGHD II es particularmente interesante dado que tiene una herencia autosómica dominante.

Se estudiaron dos pacientes cuyas características clínicas y familiares sugerían una IGHD de tipo II. La secuenciación del gen de la hormona de crecimiento (GH) en los miembros de ambas familias mostraron mutaciones puntuales dentro del gen. En la primera familia se encontró una transición G→A en la primera base del intrón-3, y en la segunda familia se observó una transición G→A en la quinta base del intrón-3. Ambas mutaciones son heterocigotas, lo cual concuerda con una herencia dominante. Con el fin de estudiar si estas mutaciones alteran el procesamiento de los RNA mensajeros de GH, se transfectaron células COS-7 con un vector de expresión que contenía el gen normal o mutado. Luego se aisló RNA total y se analizaron los RNA mensajeros específicos por transcripción reversa, amplificación por PCR, y finalmente secuenciación de los cDNA. Los resultados indican que ambas mutaciones provocan la pérdida completa del exón 3 durante el procesamiento del RNA mensajero de la GH. Estos resultados sugieren que las mutaciones encontradas serían las responsables de la patología en estos pacientes. (Financiado por FONDECYT 194-0546)

30

ANÁLISIS DE UN PROBABLE EFECTO FUNDADOR PARA LA DELECIÓN DE 7Kb EN EL LOCUS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN PACIENTES CHILENOS.

(Analysis of a possible founder effect for the 7Kb deletion on the GH locus, in Chilean patients).

RODRIGUEZ, A., DERPICH, M., CARVALLO, P., Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, CHILE.

Una de las causas más frecuentes de la talla baja es la llamada deficiencia aislada de la hormona de crecimiento (IGHD). Según sus características clínicas y forma de herencia, la IGHD se ha clasificado en cuatro tipos: IGHD IA, IB, II y III.

La base genética de la IGHD de tipo IA es la delección del gen de GH. Existen diversos estudios que describen delecciones de 7,6 Kb y de 6,7 Kb, que abarcan el gen de GH (2 Kb) y regiones vecinas al gen. Al analizar las causas moleculares de la IGHD en 40 pacientes chilenos se encontró que 4 de ellos presentaban una delección de 7 Kb. Como esta delección sólo ha sido descrita en una familia de origen chino, nos interesó saber si en los 4 pacientes chilenos el cromosoma portador de la delección provenía de un ancestro común. Para esto se realizó un análisis de ligamiento genético con el marcador D17S254, localizado dentro del locus de GH (fuera del gen de GH). Previamente se realizó un análisis de frecuencia alélica para el locus D17S254 en la población chilena. Se encontraron 18 alelos diferentes, siendo los alelos 4 (10,7%), 12 (10,7%) y 14 (12,5%) los de mayor frecuencia. El análisis de los alelos para D17S254 en los cuatro pacientes revelaron los siguientes genotipos: paciente 1 alelos 2/4, paciente 2 alelos 4/4, paciente 3 alelos 8/8 y paciente 4 alelos 7/8. Estos resultados indican la presencia de al menos 4 loci de GH de origen diferente, descartando la posibilidad de un efecto fundador para la delección del gen.

(Financiado por FONDECYT 194-0546)

32

IDENTIFICACIÓN DE VARIEDADES DE PECES DE LA FAMILIA *Genypterus* A TRAVÉS DEL ANÁLISIS DE SU CONTENIDO PROTEICO. Valenzuela, M.A., Gamarra, N., Ortega, X., Kettlun, A.M., Gómez, L., Pérez, L.M. y Vinagre, J*. Depto Bioquímica y Biología Molecular, *Depto Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Los reglamentos de los mercados internacionales exigen disponer de métodos que establezcan patrones moleculares característicos de distintas especies de alimentos e inclusive entre variedades de una misma familia. La caracterización bioquímica puede obtenerse a través del patrón proteico o secuencias de DNA o fragmentos de DNA producto de enzimas de restricción. El método de análisis debe permitir efectuar la identificación aún después del procesamiento de los alimentos.

En este trabajo nos hemos propuesto identificar tres variedades de congrio (familia *Genypterus*) escogiendo la determinación del contenido proteico de un extracto de proteínas sarcoplasmáticas de filete de pescado congelado. Se han comparado tres técnicas electroforéticas de alta resolución para efectuar este análisis. Isoelectroenfoque, electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida y electroforesis capilar (equipo Waters) a pH ácido con agentes modificadores del flujo electro-osmótico. En las dos primeras técnicas se visualizó el patrón de proteínas después de la tinción con azul de Coomassie y en el caso de la electroforesis capilar la detección fue en la zona ultravioleta.

El análisis de los patrones proteicos obtenidos por estos tres métodos ha permitido identificar claramente cada una de las variedades de congrio estudiadas. Considerando la sensibilidad de las tres técnicas y el tiempo invertido en el análisis, la aplicación de la electroforesis capilar ha resultado ser el método más rápido de análisis y posterior comparación computacional.

33

Caracterización de MobM, una DNA relaxasa codificada por el plásmido pMV158 de *S. pneumoniae*, e involucrada en su movilización conjugativa.

Leda Guzmán* y Manuel Espinosa. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Velázquez 144, E-28006 Madrid - España Patrocino. Dr. Bernardo Gozález.

La transferencia plasmídica mediante conjugación es un mecanismo muy extendido y bien caracterizado en replicones aislados de bacterias Gram(-). Este mecanismo de transferencia requiere de dos elementos bien conservados: i) un elemento en *cis*, el origen de transferencia (*oriT*), región donde el proceso de transferencia se inicia, y ii) una endonucleasa específica capaz de reconocer una corta secuencia (sitio de *nic*), dentro del *oriT*. Los plásmidos que replican por círculo rodante (RC), pueden codificar una proteína generalmente denominada Mob, y que podría estar involucrada en su propia movilización, mediada por otros plásmidos. Disponemos de muy poca información sobre la bioquímica del procesamiento del DNA conjugativo. Basado solamente en comparaciones con mecanismos de transferencia bien caracterizados de sistemas Gram(-), se cree que estas proteínas Mob de plásmidos RC introducirían un corte en el *oriT*. El plásmido no conjugativo, pMV158 (5536 bp) de origen estreptocócico, es el prototipo de una familia de plásmidos que replican por RC, aislados de varias bacterias Gram(+). pMV158 contiene un gen *mob* (*mobM*) que codifica para una proteína de 58 Kda, MobM y que es requerido para su movilización conjugativa por otros plásmidos de origen estreptocócico (pAMB1/pIP501). En este trabajo hemos identificado y aislado complejos de relajación en células de *S. pneumoniae* conteniendo a pMV158. La formación de estos complejos se debió a la presencia del producto del gen *mobM*. El gen *mobM* fue clonado en un vector de expresión; MobM fue sobreexpresada y purificada, determinándose su secuencia N-terminal. MobM mostró poseer actividad de corte sobre DNA superenrollado de pMV158 (formas FI) generándose moléculas de DNA abiertas (formas FII) como producto de la reacción. La actividad de MobM fue absolutamente dependiente de la presencia de Mg²⁺ o Mn²⁺. El ataque nucleofílico producido por MobM entre los nt 5'-GpT-3', dentro de la secuencia: 5'-TAGTG'FG/TTA-3' fue determinada por secuenciación y extensión del partidor. MobM mostró permanecer unida covalentemente al extremo 5' de la hebra cortada. El extremo 5' del sitio del corte fue resistente a la fosforilación con T4PNK. Además, las formas FII generadas por MobM fueron precipitadas selectivamente con KCl en presencia de SDS indicando la existencia de una interacción fuerte entre MobM y su DNA blanco. El *oriT* de pMV158 resultó ser una región palindrómica, conteniendo dos secuencias repetidas invertidas (IR1- IR2), parcialmente superpuestas. Mediante ensayos de retardo en gel y "footprinting" con DNasaI, la secuencia dada por el IR2 resultó ser el sitio de unión a MobM. *Actualmente Becaria Postdoctoral, (Proyecto Postdoctorado-Fondecyt: 3970030) Laboratorio de Microbiología, Depto de Genética Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad. Católica- Chile.

35

Clonamiento y caracterización parcial de la glucoquinasa de *Renibacterium salmoninarum*. (Cloning and partial characterization of the *Renibacterium salmoninarum* glucokinase).

CONCHA, M.I. y LEÓN, G. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Recientes hallazgos indican que algunas glucoquinasas bacterianas juegan un papel importante en la regulación de la represión catabólica mediada por glucosa. Este grupo particular de enzimas pertenece a la familia de proteínas bacterianas denominada ROK, a diferencia de otras glucoquinasas bacterianas que no poseen esta función.

Rastreando una genoteca de *R. salmoninarum*, patógeno de peces salmonídeos, se aisló un clon cuyo inserto contiene una secuencia que posee alta homología con la glucoquinasa de *Streptomyces coelicolor*. El análisis de esta secuencia demostró también que contiene el motivo conservado característico de los miembros de la familia ROK.

La identidad y funcionalidad del gen se confirmó por estudios de complementación, utilizando una cepa mutante de *E. coli glk-* y por determinación de la actividad enzimática de la proteína de fusión obtenida después de subclonar la putativa región codificante en el vector de expresión pGEX4T-2. La especificidad de la enzima por D-glucosa se evaluó por cromatografía en capa fina, utilizando diferentes hexosas como sustrato.

El análisis de la secuencia completa del gen determinó que éste codificaría para una proteína de tamaño semejante al de otras glucoquinasas bacterianas (319 residuos). La comparación de secuencias de glucoquinasas bacterianas sugiere que la enzima de *R. salmoninarum* probablemente pertenece al grupo de glucoquinasas que participan en represión catabólica.

Financiado por FONDECYT, proyectos 1951195 y 2950080.

34

Localización de posibles sitios funcionales en la endonucleasa de restricción *BstVI*.

C.Loyola*, C.Saavedra*, E. González** y C. Vásquez*, *Laboratorio de Microbiología Molecular, Universidad de Santiago y **Instituto de Biología Vegetal, U. de Talca.

El gen *bstVI* fue clonado en *E. coli* y se determinó que existen 3 residuos de cisteína (posiciones 134, 167 y 180). Para probar si uno o más de estos residuos está(n) involucrado(s) en alguna(s) función(es) de la enzima, se procedió a alterarlos por mutagénesis sitio dirigida utilizando PCR. La sustitución elegida en todos los casos fue serina. En este trabajo, se presentarán los resultados obtenidos con la enzima mutada C^{167S}.

Fragmentos que contenían el gen mutado fueron clonados en el vector pGEM-T e introducidos a *E. coli* JM109. Se preparó DNA plasmidial y la mutación fue confirmada por secuenciación utilizando PCR. La enzima mutada fue expresada en *E. coli* y purificada a homogeneidad. Esta resultó ser bastante estable a agentes desnaturalizantes de proteínas. Urea 1M, GuHCl 0,015%, SDS 0,005% o Tween-20 35%, no afectaron su actividad, igual a la enzima silvestre. Otros agentes como formamida, DMSO y Tritón X-100, a concentraciones de 1, 10 y 15% respectivamente, tampoco afectaron la actividad de la enzima, aún cuando la endonucleasa *BstVI* silvestre es más resistente a cada uno de estos agentes en las mismas condiciones. Además, la enzima *BstVI* C^{167S} resultó estable y resistente al calor. Períodos de 2 h a 80°C no afectaron su actividad. Preincubaciones de 5 min a 90°C la inactivaron en un 50%. La enzima mutada resultó más susceptible que la silvestre a inactivación por proteasas.

Financiado por DICYT y Proyecto Fondecyrt 1950440.

36

CLONAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN cDNA Y DEL GEN CS-MNP1 QUE CODIFICAN PARA UNA ISOENZIMA DE MANGANESO PEROXIDASA DEL BASIDIOMICETE *Ceriporiopsis subvermispora*.

Larrondo L.¹; Lobos S.²; Salas I.¹; Karahanian E.¹ y Viciuña R.¹

¹Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Ceriporiopsis subvermispora es un basidiomicete que degrada eficientemente lignina, uno de los dos principales biopolímeros presentes en la naturaleza. Su sistema ligninolítico se compone de dos familias de enzimas: las lacasas (fenol oxidasas) y manganeso peroxidases (MnP). Ambos grupos se presentan como familias de isoenzimas con distintos puntos isoelectrónicos (PI). Estudios de N-terminales apuntan a que las MnP serían codificadas por distintos genes. Así el objetivo de este estudio es tratar de verificar si existe una familia génica que codifica para las MnP. De esta manera se construyó una genoteca cDNA en el vector Lambda ZIPLOX aislando un cDNA (MnP13-1) de 1,285 nucleótidos excluyendo la cola poli-A. La secuencia aminocídica deducida muestra un alto grado de identidad con MnP de otros hongos. La proteína madura contiene 364 aa, la cual esta precedida por una secuencia líder de 24 aa. Un gen que codifica para la misma proteína, *Cs-mnp1*, se aisló de una genoteca genómica construida en el vector Lambda GEM-11 usando el cDNA MnP13-1 como sonda. Un fragmento SaeI de 2.5 Kb fue subclonado y secuenciado, mostrando poseer la secuencia completa del gen *Cs-mnp1* incluyendo 162 y 770 bp de las regiones 5' y 3' no codificantes respectivamente. El gen *Cs-mnp1* posee 7 intrones cortos que adhieren a la regla GT-AG. Para examinar en más detalle la región reguladora 5' de dicho gen un fragmento de 1.9 Kb fue amplificado mediante PCR inverso. La región 5' mostró poseer una caja TATAA a 91 bp río arriba del ATG. Así también se identificaron elementos putativos como cajas CCAAT, elementos de respuesta a metales (MRE), elementos de respuesta a stress por calor (HSE) así como también secuencias de reconocimiento SP1 y AP2.

Financiado por Proyecto FONDECYT N° 1971239.

37

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN DE LACASA DEL HONGO BASIDIOMICETE *Ceriporiopsis subvermispora*.

Karahanian, E.¹; Corsini, G.¹; Lohos, S.² y Vicuña, R.¹

¹Dpto. Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

²Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. *C. subvermispora* secreta dos familias de enzimas ligninolíticas: las peroxidadas dependientes de manganeso (MnPs) y las lacasas. Las lacasas son fenol oxidasas, siendo una de sus funciones la de oxidar los grupos fenólicos presentes en la lignina. Para aislar un gen de lacasa de *C. subvermispora* se construyó un banco genómico en el vector Lambda GEM-11. La sonda homóloga utilizada se obtuvo mediante PCR sobre el DNA genómico del hongo. Para ello se diseñaron dos partidores degenerados considerando la frecuencia de uso de codones del organismo; el partidor 5' fue diseñado en base a la secuencia aminoácida N-terminal, mientras que el partidor 3' correspondió a una secuencia aminoácida ubicada aproximadamente a 60 residuos antes del C-terminal, la cual es una región totalmente conservada entre lacasas de diferentes basidiomicetes. Entre varios clones positivos aislados de la genoteca, se subclonó y secuenció uno de ellos. El gen presentó una longitud de 2189 pb en su región codificante, correspondiente a una proteína de 533 aminoácidos, con una secuencia líder de 23 aminoácidos y una masa molecular deducida de 57.5 KDa. El gen posee 10 intrones cortos de aproximadamente 50 pb, los que presentan las secuencias características GT - AG en sus extremos y la secuencia interna CTRAY de formación del lazo de escisión. La secuencia aminoácida deducida presenta entre un 60 y un 66% de identidad con lacasas de otros hongos y en ella se encuentran siete potenciales sitios de N-glicosilación. Absolutamente conservadas se encontraron las diez histidinas y la cisteína que participan en la conformación del sitio activo de la enzima coordinando los cuatro átomos de cobre presentes en las lacasas. Un fragmento de cDNA fue clonado mediante RT-PCR, y su secuencia parcial correspondería al gen previamente aislado.

Financiado por Proyecto FONDECYT N° 1971239

39

CLONAMIENTO E INSERCIÓN CROMOSOMAL DE LOS GENES *tfdCDEF* DE *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) QUE CODIFICAN PARA LA DEGRADACIÓN DE CLOROCATECOLES: EXPRESIÓN BAJO EL CONTROL DE PROMOTORES HETERÓLOGOS.

Céspedes, R., Varela, C. & González, B.

Laboratorio de Microbiología, Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

R. eutropha JMP134 crece en 3-clorobenzoato y 2,4-diclorofenoxiacetato gracias a los genes *tfd* del plasmidio pJP4 (88 Kb). Las enzimas codificadas en el operón *tfdCDEF*: clorocatecol-1,2-dioxigenasa (*TfdC*), cloromuconato cicloisomerasa (*TfdD*), dienolactona hidrolasa (*TfdE*) y maleilacetato reductasa (*TfdF*) son las responsables de la degradación de clorocatecoles, intermediarios claves en la degradación de compuestos cloroaromáticos. A partir del fragmento EcoRI B (15 kb) del plasmidio pJP4, se obtuvo un fragmento de 4,2 kb, en pUC18Not, conteniendo únicamente los genes *tfdCDEF*, incluyendo la región de unión a ribosoma del gen *tfdC*. Este fragmento fue clonado en pCNB4 y pCNB5 bajo el control de los promotores heterólogos P_{sal} (regulado por salicilato) y P_{IPTG} (regulado por IPTG), respectivamente. Las construcciones obtenidas fueron expresadas en *E. coli* ccl181pir, en *P. putida* KT2442 y en *R. eutropha* JMP222. Los resultados muestran que la expresión de los genes *tfdCDEF* bajo el control del promotor P_{sal} fue dependiente del inductor, mientras que bajo control de P_{IPTG} se observó un comportamiento semiconstitutivo. La actividad específica para *TfdC* y *TfdD* más *TfdE*, en extractos crudos de células crecidas en Luria-Bertani, inducidas con IPTG, mostró ser 3 veces mayor que la actividad de extractos no inducidos, mientras que en extractos inducidos con salicilato, los valores de actividad específica fueron entre 10 y 50 veces mayores que los de extractos no inducidos.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto FONDECYT 1960262. R. Céspedes fue becario de Fundación Andes

38

Caracterización bioquímica de una actividad telurito reductasa de *Bacillus stearothermophilus* V y clonamiento de su gen estructural en *Escherichia coli*.

Claudio Vásquez*, Hugo Moscoso* y Sergio Pichuantes**. * Laboratorio de Microbiología Molecular, Universidad de Santiago de Chile y ** Chiron Corporation, USA.

Desde hace algunos años, el interés de nuestro grupo ha estado ligado fundamentalmente al sistema de restricción-modificación presente en esta bacteria. Sin embargo, últimamente hemos dirigido también nuestros esfuerzos al estudio de la resistencia natural de este organismo a sales de metales pesados tóxicos, como K_2TeO_4 . Cuando se cultiva el bacilo en medios que contienen esta sal, se forma un depósito negro, probablemente telurio metálico. Extractos crudos de la bacteria catalizan la reducción de K_2TeO_4 , en una reacción que requiere NADH. Cromatografías en DEAE-celulosa e hidroxilapatita, permitieron purificar 2 actividades reductoras de telurito. Ambas actividades resultaron ser termoestables. Poseen un pH óptimo alrededor de 7,5 y concentraciones de NaCl 2M, SDS 0,01% o urea 2,5M las inactivan casi completamente. En presencia de EDTA sin embargo, se observó una activación de las mismas. Se transformó *E. coli* con una genoteca de *B. stearothermophilus* V, seleccionándose por Ap^r y Te^r . Se aisló varios clones y se demostró que todos llevaban en común un plasmidio (pTel) de mayor tamaño que el vector. El número de *E. coli* Te^r obtenidas fue proporcional a la concentración de pTel utilizada, indicando que los genes de resistencia están contenidos en el plasmidio. La secuencia nucleotídica del gen se encuentra en desarrollo.

Financiado por DICYT y Proyecto Fondecyt 1950440.

40

CLONAMIENTO, SECUENCIACIÓN Y EXPRESIÓN DE *lcrI*, GEN DE *Leptospirillum ferrooxidans* CODIFICANTE PARA UNA PROTEÍNA TIPO RECEPTOR QUIMIOTÁCTICO. M. Delgado, H. Toledo y C. A. Jerez. Lab. de Microbiología Molecular y Biotecnología, Depto. de Biología, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile.

Leptospirillum ferrooxidans es una bacteria acidofílica quimiolitotrófica que participa en la biolixiviación de minerales, y que podría utilizar la quimiotaxis para reconocer y acercarse al mineral que va a lixiviar.

Previamente, hemos demostrado que *L. ferrooxidans* presenta una respuesta quimiotáctica frente a algunas sustancias. Además, posee proteínas de membrana cuya metilación aumenta en respuesta al atrayente y disminuye en respuesta al repelente, como ocurre con los receptores quimiotácticos (MCPs) conocidos.

En el presente trabajo, se clonó y secuenció un fragmento de DNA de *L. ferrooxidans* que contiene un gen, al que denominamos *lcrI* ("*Leptospirillum* chemotaxis receptor I"), que presenta dos posibles promotores traslapados, uno tipo σ -70 y uno tipo σ -28 (σ -28 dirige la transcripción de genes flagelares, de motilidad y de quimiotaxis). La proteína *LcrI* deducida presenta muchas características comunes con las MCPs descritas.

Este DNA expresó *in vitro* una proteína que se inmunoprecipitó con anticuerpos contra la MCP Tar de *E. coli*, lo que evidencia comunidad antigénica entre ellas. Además, esta proteína se expresó *in vivo* en *E. coli* ubicándose en la membrana citoplasmática, lo que sugiere la localización que poseen las MCPs. Su expresión *in vivo* no fue dependiente del promotor *lac* del vector, por lo que se supone funcionalidad en *E. coli* de uno o ambos promotores propuestos para *lcrI*.

Este trabajo fue financiado por los proyectos FONDECYT: 194/0379, 2950024 y 4950008.

41

ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA INTRINSECA Y EXTRINSECA EN ATP-DIFOSFOHIDROLASA DE *Solanum tuberosum*. Espinosa, V., Zanocco*, A., Kettlun, A.M. y Valenzuela, M.A. Depto Bioquímica y Biología Molecular. * Depto Química Orgánica y Físicoquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

La ATP-difosfohidrolasa se caracteriza por hidrolizar nucleósidos di- y trifosforilados en presencia de cationes bivalentes. Estudios preliminares con modificadores químicos selectivos de grupo sugieren la participación de residuos de triptofano en el sitio de unión del nucleótido. En el presente trabajo se han iniciado estudios de fluorescencia intrínseca de triptofano en presencia y ausencia de nucleótidos (ATP y ADP) y sus respectivos análogos fosfonatos no hidrolizables (β , γ -metilén ATP; α , β -metilén ADP) con el objeto de comparar el efecto de complejos Ca^{2+} -nucleótidos. La adición del nucleótido produce cambios en la fluorescencia intrínseca del triptofano pero no en el máximo de emisión. Igualmente la adición de Ca^{2+} provoca nuevos cambios conformacionales deducido de las alteraciones en la intensidad de la fluorescencia. El apagamiento por yoduro ha indicado que existen dos poblaciones de triptofano que se igualan al titular en presencia de clorhidrato de guanidinio 6 M. Igualmente se ha sintetizado un derivado fluorescente de ADP: el MANT-ADP con el objeto de determinar si en el sitio de unión de nucleótido hubieran algunos residuos de triptofano a una distancia que permita una transferencia de energía entre el triptofano (exitiando a 284 nm) y el grupo antranilo del MANT-ADP (observando su emisión a 440 nm). No se observó ninguna emisión a 440, por lo tanto el aminoácido y la porción fluorescente del sustrato no están a una distancia que permita transferencia de energía.

43

DESPLIEGAMIENTO DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRÚVICA DE *Escherichia coli*. Unfolding of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxykinase. María Victoria Encinas y E. Cardemil. Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de Santiago de Chile.

En este trabajo se presenta un estudio del desplegamiento térmico e inducido por desnaturantes de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de *Escherichia coli*, una enzima importante en el metabolismo de los hidratos de carbono cuya estructura tridimensional ha sido recientemente informada. Se analizó el efecto de la urea en la actividad enzimática, en los espectros de fluorescencia y dicroísmo circular (CD) en el UV lejano, y en la unión de ANS. Estos estudios demostraron la existencia de al menos un intermediario estable alrededor de urea 2,8 M. Diversas combinaciones de ligandos (ATP o PEP en presencia de Mn^{2+} , o la presencia combinada de ATP, oxalato y Mn^{2+}) estabilizaron la enzima frente a la urea, y causaron un desplazamiento en la concentración a la que existe el intermediario. Experimentos de repliegamiento indicaron recuperación completa de la estructura secundaria, en tanto que la estructura terciaria y actividad enzimática sólo se recuperaron a partir de experimentos bajo la concentración del intermediario. Se analizó la estabilidad térmica por calorimetría de barrido diferencial y espectroscopía CD, concluyéndose que el proceso es irreversible y puede ser descrito por dos estados. Los trazos calorimétricos mostraron un único pico y fueron dependientes de la velocidad de barrido, sugiriendo un proceso controlado cinéticamente. La pérdida de estructura secundaria fue evitada en forma notable por sustratos de la enzima. FONDECYT 1970670

42

POSIBLES MOTIVOS ESTRUCTURALES PARA POLI-ADPRIBOSILACION DE PROTEINAS. (Structural motifs behaving as putative targets of protein PolyADPribosilation) JOSÉ MARTÍNEZ Y MARÍA IMSCHENETZKY, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Casilla 152-C, Concepción.

La Poli ADPRibosilación de proteínas se ha correlacionado con la reparación, replicación y recombinación de ADN. Más recientemente se la involucra en transcripción génica, diferenciación celular y apoptosis. Esta modificación post-traduccional es catalizada por la Poli-ADPRibosa Polimerasa (PARP, EC:2.4.2.30), cuya actividad es dependiente de ruptura de ADN bicatenario. Numerosas proteínas nucleares son blanco de esta modificación entre las cuales destaca la enzima misma que aparece como su principal sustrato. PARP ha sido secuenciada en vertebrados e invertebrados, presentando tres dominios funcionalmente definidos: la región de unión al ADN determinada por dos dedos de zinc localizados en el extremo N-terminal, un dominio de automodificación que une el dominio de unión al ADN y la región catalítica de la enzima y sitio de unión de uno de los sustratos (NAD^+), localizada en el extremo C-terminal. Hasta la fecha se desconocen motivos secuenciales o estructurales que actúen como blancos de Poli ADPRibosilación. Muy recientemente se han definido posibles regiones de unión no covalente de polímeros preformados. Para investigar la existencia de posibles motivos secuenciales y/o estructurales que podrían actuar como blancos, se analizó las secuencias de la región de automodificación de PARP de varias fuentes y se comparó con las secuencias de las siguientes proteínas: ADN ligasa III, ADN polimerasa B, ARN polimerasa II, ADN topoisomerasa, Histona H1 y proteína p53, todas blanco de poli ADPRibosilación *in vitro* y algunas *in vivo* (H1 y p53). De esta comparación emergieron zonas de mayor homología ricas en residuos de aspártico, glutámico y lisina. Paralelamente se realizó una predicción de estructura secundaria por siete métodos alternativos, la predicción de consenso resultó en zonas helicoidales en las zonas de mayor homología. Con esta información se procedió a realizar una búsqueda de motivos estructurales por el método de las ruedas helicoidales que definió un motivo compuesto por 3 residuos de glutámico vecinos, enmarcados por residuos de lisina. Se postula este motivo estructural como blanco de Poli ADPRibosilación de proteínas nucleares.

44

Modelaje Molecular de manganeso peroxidasa de *Ceriporiopsis subvermisporea* y comparación con otras peroxidases.

Mauricio Canales¹, Sergio Lobos² and Rafael Vicuña¹ Laboratorio de Biofísica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. Casilla 152-C, Correo 3. Concepción, Chile.

² Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Casilla 174, Correo 22. Santiago, Chile. ³ Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. Casilla 114-D. Santiago, Chile.

Resumen. *Ceriporiopsis subvermisporea* es un hongo basidiomicete de la pudredumbre de la madera que produce varias isoenzimas de manganeso peroxidasa (MnP). Un cDNA de una de ellas (MnP13-1) ha sido aislado y secuenciado. La secuencia de aminoácidos muestra sobre 60% de similaridad con las MnPs de *Phanerochaete chrysosporium*. Basados en la estructura cristalina de MnP, lignina peroxidasa (LiP) de *P. chrysosporium*, y de una peroxidasa de *Arthromyces ramosus* (ARP), hemos modelado por homología la estructura tridimensional de MnP13-1 usando procedimientos de modelaje estándar. Optimizaciones de mecánica molecular locales se realizaron en la región que corresponde al sitio de unión de Ca^{2+} y Mn^{2+} en MnP13-1 demostrando que la estereoquímica y la geometría de unión son conservadas en ambas MnPs. Se describe un probable sitio de unión para sustratos aromáticos en MnP13-1. También informamos diferencias estructurales entre las isoenzimas, que se originan de la inserción en MnP13-1, de las secuencias TGGN entre los residuos S230 y D231 y TDSP en el extremo C-terminal, para los cuales se describe su probable significado funcional. Agradecimientos: este trabajo fue financiado gracias al Proyecto de Inversión 4533 de la Universidad de Concepción y el Proyecto Fondecyt No. 1971239.

45

MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRÚVICA. Mechanism of action of phosphoenolpyruvate carboxykinase. Krautwurst, H., González, F., Bazaes, S., Jabalquinto, A. M., Frey, P. A., y Cardemil, E. Depto. Ciencias Químicas, U. de Santiago, Depto. Química, UMCE, e Institute for Enzyme Research, U. of Wisconsin.

Se postula que la reacción catalizada por la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica [ATP + oxaloacetato (OAA) \rightleftharpoons ADP + PEP + CO₂] ocurre a través de la formación transiente de enolpiruvato (Hanson & Patel 1994 *Adv. Enzymol.* 68, 203-281). En gran parte los argumentos para esta proposición son la existencia de actividades descarboxilante de OAA y tipo quinasa pirúvica en estas enzimas. Por consiguiente, se podría esperar que las dos etapas fueran catalizadas con la ayuda de residuos de aminoácidos diferentes presentes en el sitio activo. Hemos preparado mutantes de la Lys²⁵⁶ de la carboxiquinasa de levadura, los que presentan disminuciones notables en la eficiencia catalítica para la reacción principal y también para la actividad tipo quinasa pirúvica, en tanto la actividad descarboxilante de OAA es afectada en mucho menor grado. En base a estas observaciones, proponemos que la Lys²⁵⁶ participa específicamente en la reacción de transferencia del fosforilo, y no tiene función catalítica en la etapa de descarboxilación. Un modelo tridimensional generado para el complejo enzima-ATP-Mg²⁺ permite postular un papel de auxiliar en la catálisis para el grupo NH de la Ser²⁵², formando un enlace de hidrógeno con el O ubicado en posición puente entre el P β y el P γ del ATP. FONDECYT 1970670 y DICYT-USACH.

47

CHARACTERIZACION DE LAS ACTIVIDADES DESCARBOXILANTE DE OXALOACETATO Y TIPO QUINASA PIRUVICA DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE *A. succiniciproducens*. (Characterization of the oxaloacetate decarboxylase and pyruvate kinase-like activities of *A. succiniciproducens* phosphoenolpyruvate carboxykinase). JABALQUINTO, A.M., ZEIKUS, J.G. y CARDEMIL, E. ¹Dpto Ciencias Químicas, Universidad de Santiago de Chile y ²Michigan State University.

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica es una enzima clave en la gluconeogénesis, que cataliza la siguiente reacción en presencia de Mn²⁺: Oxaloacetato (OAA) + ATP \rightleftharpoons ADP + CO₂ + fosfoenolpiruvato.

En ciertas especies la enzima cataliza también la descarboxilación irreversible de OAA a piruvato y presenta una actividad tipo quinasa pirúvica. En este trabajo, se presenta la caracterización de estas dos actividades en la enzima de *A. succiniciproducens*.

Los resultados indican que la actividad descarboxilante de OAA requiere la presencia de un metal divalente, siendo mejor Mn²⁺ que Mg²⁺. ADP se comporta como un inhibidor competitivo de la reacción, en tanto que AMP es un activador. Por otra parte, la actividad tipo quinasa pirúvica utiliza ADP y GDP como sustratos y presenta un efecto sinérgico entre Mg²⁺ y Mn²⁺. Se han determinado los parámetros cinéticos para ambas actividades los cuales se comparan con los respectivos parámetros de la reacción principal.

Financiado por DICYT-USACH 029441JL y FONDECYT 1970670.

46

INTERACCIÓN DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRÚVICA DE *Saccharomyces cerevisiae* CON ANÁLOGOS DEL NUCLEÓTIDO. Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase with nucleotide analogues. Carrasco, L., González, F. D., Cardemil, E. Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de Santiago. Mediante análogos de sustratos es posible obtener información estructural en enzimas, y esa información permite inferir realaciones espaciales entre los ligandos y zonas de la proteína. En este trabajo hemos estudiado la interacción de análogos del ATP y del ADP sustituidos en la posición 8 del anillo de la adenina o en los hidroxilos libres de la ribosa con la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (ATP + oxaloacetato \rightleftharpoons ADP + PEP + CO₂) de levadura. Hemos encontrado que 8-Br-ATP, 8-N₃-ATP y 8-N₃-ADP son buenos sustratos de la enzima, que no es posible incorporar covalentemente los azido derivados a la proteína, y que el número de grupos sulfhidrilos titulables disminuye al irradiar enzima en presencia de 8-azido-ATP. Los trinitrofenil- y metilnitriloil derivados del ATP y del ADP también se comportan como buenos sustratos de la enzima. Estas observaciones predicen escasa interacción de la proteína con las regiones sustituidas del nucleótido, y sugieren que la conformación del ATP unido a la enzima es *syn*. Los resultados están de acuerdo con un modelo tridimensional para el complejo enzima-ATP-Mg²⁺ construido tomando como base las coordenadas cristalinas del complejo equivalente de la enzima de *Escherichia coli* (Tari et al., 1996 *Nature Struct. Biol.* 3, 355-363). FONDECYT 1970670 y DICYT-USACH.

* Phone (56 41) 234985, Ext. 2587; fax (56 41) 245975;

e-mail: mcanale@buho.dpi.udec.cl

• Abreviaciones: MnP, manganese peroxidasa; LiP, lignina peroxidasa; ARP, peroxidase de *Arthromyces ramosus*

48

Purification and Characterization of Pyruvate Ferredoxin Oxidoreductase from the hyperthermophile *Pyrococcus woesei*. Jenny M. Blamey and Mario Chiong, (INUAL, LTD/TEPUALSA, Santiago, Chile. Eugene T. Smith, Chemistry Dept., Florida Tech, Melbourne, FL, USA.

Pyruvate ferredoxin oxidoreductase (POR) which catalyzes the reversible oxidation/reduction of pyruvate, a key intermediate in carbohydrate fermentation, was isolated from the archaeon *Pyrococcus woesei*. This unusual marine microorganism thrives near hydrothermal vents, and it is capable of growing at 100 °C. Cultivation parameters were optimized for small scale anaerobic growth of this microorganism. It was determined that the purified POR enzyme was inactivated in the presence of trace levels of oxygen. It was determined to be catalytically inactive at room temperature, and it had high catalytic activity at 85 °C. Spectroscopic data indicated that POR is an iron-sulfur protein. Other physical properties of the protein will be presented. This extremely thermostable enzyme, which represents one of the few POR's isolated to date and only the second POR isolated from the *Pyrococcus* genus (Blamey and Adams, 1994), will be used to elucidate its fermentative mechanism, and it will be compared to other hyperthermophilic POR's.

Funding from FONDECYT 1960171 is acknowledged.

49

El péptido derivado del gen de la calcitonina (CGRP) promueve la diferenciación en células gliales B12. Luza S.* , Inestrosa N.C. Dpto. Biología Celular y Molecular. P. Universidad Católica de Chile.

CGRP es un neuropéptido de diversas acciones fisiológicas entre las cuales destacan su potente acción vasodilatadora y la regulación del receptor de acetilcolina en la unión neuromuscular. En el sistema nervioso central se ha estudiado su participación en la diferenciación y proliferación de células astrocíticas y neuronales. En estos casos se ha reportado un aumento de las fibras nerviosas que contienen CGRP y la proliferación de células del tipo astrocítico por acción del péptido. Las células B12 corresponden a una línea de células gliales muy poco caracterizada. La incubación de células B12 con concentraciones entre 10^{-8} a 10^{-5} M de CGRP, promueve el crecimiento y la extensión de neuritas a partir de las 3 horas de incubación. Este efecto es inhibido en un 70% por la preincubación de las células con H-89, un inhibidor específico de la proteína quinasa A (PKA); y en un 100% por MDL-222, un inhibidor específico de la adenilil ciclasa. CGRP aumenta los niveles intracelulares de AMPc, los resultados indican que el péptido aumenta los niveles del segundo mensajero en un 60% a los 10 minutos de incubación. Estos resultados indican que CGRP promueve la diferenciación en células B12 y que este efecto es mediado por adenilil ciclasa.

Financiado por proyecto Fondecyt 29600-48 de S.L y por Catedra Presidencial en Ciencias conferida a N.I.

* Candidata a Dr en Bioquímica de la Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

51

Producción de isoenzimas de xilanasas por el hongo *Penicillium purpurogenum*. Carlos Aguirre, Alessandra Peirano, Jeannette Steiner y Jaime Eyzaguirre. Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica y Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la influencia de la fuente de carbono y del tiempo de cultivo sobre la producción de endoxilanasas, beta xilosidasa y acetil xilano esterasas, utilizando como modelo el hongo *Penicillium purpurogenum*, productor de una variedad de enzimas xilanolíticas. Se utilizaron varias fuentes naturales, xilano comercial y algunos monosacáridos. Además, se analizó, mediante zimogramas e inmunodetección, la producción de las distintas isoformas de estas enzimas.

Se observó una mayor producción de actividad endoxilánica con algunas fuentes de carbono naturales (paja y coronta de maíz, 40 y 47 U/ml), mientras que los monosacáridos glucosa y xilosa tuvieron un fuerte efecto represor (menos de 0,2 U/ml). La producción mayor de beta xilosidasa se obtuvo en cultivos con muestras comerciales de xilano de cáscara de avena y abedul (1,3 U/ml), y nuevamente la glucosa y xilosa mostraron un fuerte efecto represor (menos de 0,01 U/ml). La más alta producción de acetil xilano esterasa se logró en cultivos con xilano acetilado (2,1 U/ml), y no se detectó actividad en el medio conteniendo glucosa. Los análisis zimográficos de endoxilanasas mostraron hasta seis formas diferentes de enzima, las que variaron en número y actividad según la fuente de carbono utilizada. El número mayor de isoformas se observó en los medios con paja, coronta de maíz y xilano de cáscara de avena. En todos los casos la principal isoforma detectada es la endoxilanasas B. El análisis de las acetil xilano esterasas, en todas las fuentes de carbono analizadas mostró como isoenzima principal a la forma I, de un máximo de 4 formas detectadas. Los estudios inmunológicos utilizando sueros contra las endoxilanasas A y B y las acetil xilano esterasas I y II, confirman los hallazgos anteriores.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1960241.

50

Evaluación del rol de la proteína de movimiento del TMV en la infectividad en plantas de *Arabidopsis* y tabaco. Patricio Arce-Johnson¹ Consuelo Medina¹, Paola Cañón¹, Jorge Delgado¹, Roger N. Beachy². ¹Departamento de Genética Molecular y Microbiología. P. Universidad Católica de Chile. ²Department of Cell Biology, The Scripps Research Institute, USA.

Para que un virus pueda desarrollar una infección eficiente en una planta, debe replicarse en las células inicialmente infectadas y desplazarse al resto de ellas utilizando una proteína de movimiento (PM) viral. Durante este proceso, ocurren interacciones a diferentes niveles entre el virus y la planta, los que determinan la severidad de los síntomas.

TMV-Cg y TMV-U1 son dos Tobamovirus que infectan e inducen síntomas en plantas de tabaco. Sin embargo, sólo TMV-Cg infecta eficientemente *Arabidopsis thaliana*. Para evaluar el rol de la PM viral en el rango diferencial de hospedero y la sintomatología provocada por TMV-Cg y TMV-U1, hemos construido un virus híbrido en la PM (U1ΔMP::MPCg). Los dos virus silvestres y el híbrido fueron clonados bajo el promotor del bacteriófago T7 para generar transcritos infecciosos. Transcritos de estos virus fueron utilizados como inóculo en plantas de tabaco y los síntomas observados fueron similares a los de partículas virales. También se inocularon los ecotipos Columbia y RLD de *A. thaliana*. En este caso la infección fue medida por detección de la proteína de la cápsida en las hojas superiores. TMV-Cg fue detectado en el 100% de las plantas inoculadas, mientras que TMV-U1 fue detectado solamente en el 60% de ellas. El virus híbrido mostró un comportamiento intermedio al de los virus silvestres. Plantas transgénicas de *A. thaliana* para el gen de la PM del TMV-U1, están siendo evaluadas en su capacidad de complementar la función de movimiento viral al infectalas con un mutante de TMV (TMVΔMP) deficiente en la función de movimiento. Se presentarán y discutirán la eficiencia de la complementación y el posible rol de la PM en estas respuestas. Financiamiento Fondecyt 1971228. Fundación Andes P.A.-J.

52

FOSFORILACION DE PROTEINAS EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES EN *Citrus limon* (Protein phosphorylation in signal transduction in *Citrus limon*) Polanco, R., Pérez, L. M. Dep. Bioq. Biol. Mol., Fac. Cs. Quím. y Farm. Univ. De Chile. E-mail: lperez@abello.dic.uchile.cl

Las plántulas de *C. limon* responden a la infección por *Alternaria alternata* activando la vía fenilpropanoide (inducción de la fenilalanina amonio liasa, PAL), sintetizando fitoalexinas e induciendo proteínas relacionadas con patogénesis (PR). Se ha demostrado la participación de calcio, de canales de calcio y de calmodulina en la transducción de la señal elicitada por este hongo. Sin embargo, se desconoce si existen eventos de fosforilación de proteínas en la transducción de la señal mencionada. Para establecer la participación de quinasas se analizó la inducción de la PAL en respuesta a ionóforo de calcio A23187 y a conidias fúngicas, en presencia y ausencia de inhibidores de proteína quinasa C (PKC) como staurosporina (Stau), y de proteína tirosina quinasa (PYK) como lavendustina A (lav-A) y 2,5-dihidroxicinamato de metilo (DHCM). Posteriormente, las proteínas se separaron por PAGE-SDS, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se trataron con anticuerpos, para estimar temporalidad, número de péptidos fosforilados en tirosina, y su eventual cambio por efecto de los inhibidores. Los resultados mostraron que tanto Stau, como lav-A y DHCM suprimieron la inducción de la PAL. Lav-A y DHCM suprimieron la fosforilación en Y de numerosas proteínas, cuyo máxima fosforilación se obtenía después de 20 minutos del tratamiento con los elicitores. El patrón de fosforilación observado en respuesta a los mismos resultó equivalente. El efecto de los inhibidores de PK permiten sugerir que existen eventos de fosforilación de proteínas en la transducción de la señal elicitada por *A. alternata* en plántulas de *C. limon*. La fosforilación en Y y el patrón similar de fosforilación en respuesta a los elicitores ensayados sugiere que la entrada de calcio ligada a fosforilación de proteínas en Y forman parte de la misma ruta de transducción de señales. Financiado por FONDECYT 1940441 y 1970532.

53

AUMENTO DE UNA ACTIVIDAD CASEÍNA QUINASA II NUCLEAR POR EFECTO DE ÁCIDO SALICÍLICO EN PLANTAS DE TABACO. Hidalgo, P., Ojeda, H., Berrios, C.G., y Holuigue, L. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile. lholuig@genes.bio.puc.cl

La resistencia a la infección por patógenos en plantas se asocia a la inducción de diversas reacciones de defensa. Estas reacciones ocurren tanto en el sitio de la infección (reacción local) como en tejidos no infectados de la planta (reacción sistémica), y llevan a la activación transcripcional de genes de defensa. Una de las señales endógenas que median esta activación transcripcional es el ácido salicílico (SA).

Se ha reportado que el SA activa la transcripción de algunos genes de defensa (genes *PR*), pero el mecanismo por el cual ocurre esta activación aun no está claro. En el estudio de este mecanismo, se han identificado algunas secuencias de DNA que responden en forma temprana a SA (SARE), como por ejemplo la secuencia *ast* del promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor. Esta secuencia activa la expresión de un gen reportero por efecto de SA en plantas transgénicas. Además, la unión del factor de transcripción ASF1 a *ast* también se ve aumentada en extractos nucleares de plantas tratadas con SA, respecto a plantas controles tratadas con agua. Este aumento de la actividad de unión DNA - proteína es mediado por eventos de fosforilación de proteínas endógenas. Experimentos realizados en presencia de inhibidores de proteínas quinasas (PK), sugieren la participación de una actividad Caseína Quinasa II (CKII) nuclear. En este trabajo se estudia si el SA produce la activación de una CKII nuclear, lo cual explicaría el aumento de unión DNA - proteína observado. Nuestros resultados indican que en plantas tratadas con SA se detecta una mayor actividad proteína quinasa en extractos nucleares, utilizando caseína como sustrato. Con el fin de corroborar la identidad de la quinasa, hemos utilizado el péptido RRRDDDSIDD, un sustrato específico de CKII. Con este sustrato, pudimos determinar que los extractos nucleares de plantas de tabaco tratadas con SA presentan mayor actividad CKII que los controles. Esta actividad es inhibida por heparina, inhibidor de CKII. Al medir la actividad enzimática en presencia de espermina, un estimulador de CKII, se obtiene la misma actividad en el extracto control que en el extracto de plantas tratadas con SA. Estos resultados apoyan la hipótesis de la participación de una quinasa nuclear, identificada como CKII, en la vía de transducción de señales del SA que lleva a activar la transcripción de genes tempranos de defensa.

Financiado por Proyecto Fondecyt 1960336.

55

Clonamiento, secuenciación e identificación de los genes que codifican para la microcina E492 y su inmunidad (Cloning, sequencing, and identification of the genes encoding for microcin E492 and its immunity)

Jorge E. Villanueva y Rosalba Lagos. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (rolagos@abello.dic.uchile.cl)

La microcina E492 es un antibiótico polipeptídico de peso molecular 6000 que es producido y secretado por *K. pneumoniae* RYC492, y que es activo en cepas de *E. coli* y otras bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Su acción la ejerce a través de la despolarización de la membrana citoplasmática, inducida por la formación de poros. Se clonaron y secuenciaron los determinantes genéticos que codifican para la microcina E492 y su inmunidad. La identificación del gen de microcina se realizó mediante la comparación de la secuencia del DNA con la obtenida por microsecuenciación del extremo N-terminal de la microcina recombinante expresada en *E. coli*. La secuenciación del extremo N-terminal demostró además que la microcina es sintetizada como un precursor, y que es procesada en el aminoácido 19. La secuencia "leader" de la pre-microcina E492 presenta similitud con la extensión N-terminal de la colicina V con las secuencias "leader" de lactococinas. Por otro lado, mediante comparación de secuencias de DNA, se asignó el gen de la inmunidad a un ORF que codifica para una proteína de 95 aminoácidos. Esta asignación fue confirmada amplificando por PCR esta región codificante del DNA y subclonándola en el vector de expresión pT7-7. El plasmidio resultante confirió inmunidad a *E. coli*. El peso molecular de la proteína sintetizada a partir de este plasmidio fue cercano a 10000 y se localizó en la fracción particulada de *E. coli*. Financiado por proyecto Fondecyt 1961009.

54

PURIFICACION, CARACTERIZACION Y UTILIZACION DE β -1,3-GLUCANASA DE *Bacillus subtilis* ToC46 (pPFF1)

M. Zuccolo, M.E. Lienqueo, B.A. Andrews y J.A. Asenjo* Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología,

Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Chile, Beauchef 861, Santiago. E-mail: juasenjo@cec.uchile.cl

La permeabilización enzimática es un proceso suave y selectivo que permite la lisis de la pared celular y, con ello, la liberación de producto intracelulares. Este proceso utiliza complejos líticos compuestos por varias y diferentes enzimas, en las que se incluyen β -1,3-glucanasas (β gl), β -1,6-glucanasas, proteasas y quitinasas. Estas enzimas actúan en forma sinérgica. La β gl degrada la membrana interna de glucano de la pared celular. La β gl ha sido clonada en *Bacillus subtilis* ToC46 (pPFF1) a partir de los genes que codifican dicha enzima en *Oerskovia xanthineolytica* LL109. En el presente trabajo se describe la purificación y caracterización de la enzima con actividad β -1,3-glucanasa (β gl IIa) presente en el sobrenadante de un cultivo de *B. subtilis* ToC46 (pPFF1). La purificación se llevó a cabo por medio de dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico. La caracterización de la enzima recombinante β gl IIa indicó un peso molecular de 31 kDa, un punto isoeléctrico de 4.5 y una actividad lítica óptima entre 45 y 55 °C y pH 5.5 y 6.5. La actividad específica es de 13 U/mg. Se encuentra en estudio una comparación de la actividad lítica de la β gl producida en *O.xanthineolytica* LL109 y *B. subtilis* ToC46 (pPFF1).

Este trabajo es financiado por el Proyecto FONDECYT 1950620

56

INFLUENCIA DE LA REGION CARBOXILO TERMINAL DE β -TUBULINA SOBRE LA ACTIVIDAD GTPÁSICA DEL HETERODIMERO DE TUBULINA (Influence of β -tubulin carboxy-terminal region on the GTPase activity of tubulin heterodimer). Nova E., Rabajille E. Monasterio O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El heterodímero, compuesto por α - y β -tubulina, autopolimeriza *in vitro*, formando microtúbulos y otras estructuras de acuerdo a las condiciones y composición del medio de reacción. Contiene dos sitios para el GTP, uno denominado no intercambiable que se piensa está ubicado en la α -tubulina y el otro intercambiable (sitio E) ubicado en la β -tubulina. La inestabilidad dinámica de los microtúbulos está controlada por la hidrólisis de GTP. En solución el heterodímero tiene una actividad GTPásica basal de 0,6 nmoles de GTP hidrolizados/min, la cual es estimulada alrededor de tres veces por Ca^{2+} , y aproximadamente diez veces cuando se digieren controladamente con subtilisina los extremos C-terminales de ambas subunidades. Esto último indica que la región C-terminal controla la actividad GTPásica del heterodímero, lo que se ve reforzado por el hecho que los sitios de unión de calcio desaparecen una vez removidos los extremos C-terminal. Para determinar si ambos o uno de los extremos C-terminal regula la hidrólisis de GTP en el sitio E, se midió la actividad GTPásica de los productos de digestión del heterodímero a diferentes tiempos. La estimulación de esta actividad se debió casi exclusivamente al corte en β -tubulina, pues la influencia de α -tubulina fue despreciable. Para conocer la naturaleza de esta estimulación se determinaron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} , que para tubulina fueron 50 μM y 2 nmoles de GTP hidrolizados por min, respectivamente. En presencia de Ca^{2+} la K_m disminuyó 5,9 veces y la V_{max} fue aproximadamente la misma. Estos resultados indican que calcio produce un cambio conformacional que afectaría principalmente la unión de GTP a la tubulina. Las energías de activación de la actividad GTPásica para tubulina, tubulina Ca^{2+} y tubulina S, fueron 12000, 13980 y 14020 cal/mol, respectivamente, lo que indica que el paso limitante de la reacción sería similar para tubulina Ca^{2+} y tubulina S. El conjunto de resultados nos permite postular un modelo donde la regulación alostérica del extremo C-terminal de β -tubulina afectaría la unión de GTP al sitio E. Proyecto FONDECYT # 1950556

INDICE

Abrams, E.	13	González, B.	18,39	Nova, E.	56	Valenzuela, V.	47
Acevedo, C.G.	19	González, E.	34	Nualart, F.	8	Varela, P.	15
Aguilar, C.	16	González, F.	2	Ojeda, H.	53	Vásquez, C.	1,34,39
Aguirre, C.	51	González, F.D.	3	Ojeda, V.	12	Vera, J.C.	45,46,48
Amthauer, R.	12	Gordon, L.	11	Olate, J.	20	Vera, M.I.	22,23,24
Andrews, B.A.	54	Guixe, V.	6	Olave, N.	20	Vergara, E.	29
Aravena, P.	19	Gutiérrez, S.	11	Oliver, M.L.	11	Vicuña, R.	16,36,37,44
Araya, A.	8	Guzmán, L.	33	Orellana, O.	21	Villanueva, J.	12
Arce-Johnson, P.	50	Haeger, P.	9	Olsen, A.S.	11	Villanueva, J.E.	55
Asenjo, J.A.	54	Hein, S.	8	Ortega, X.	32	Villegas, R.	14
Ashworth, L.K.	11	Hernández, J.	23	Otth, C.	47	Vinagre, J.	32
Babul, J.	6	Herrera, L.	31	Padilla, L.	18	Weistein, C.	14
Baez, M.	17	Hidalgo, P.	53,57	Peirano, A.	51	Wright, W.E.	111
Bazaes, S.	2	Holmes, D.S.	15	Pena, S.D.J.	1	Yáñez, A.	7
Berrios, C.G.	53,57	Holuigue, L.	53,57	Pérez, C.	25	Yulis, C.R.	8
Blamey, J.M.	5	Hull, R.	28	Pérez, L.M.	32,52	Zanocco, A.	41
Blanco, L.P.	14	Hurwitz, J.	V	Pichuantes, S.	38	Zárraga, A.M.	8,25
Bravo, Y.	19	Imschenetzky, M.	11,26,42	Pinto, R.	7	Zeikus, J.G.	4
Brito, M.	25	Inestrosa, N.C.	49	Polanco, R.	52	Zuccolo, M.	54
Burzio, L.O.B.	25	Iribarren, R.	45	Preller, A.	17		
Bustamante, P.I.	28	Jabalquinto, A.M.	2,4	Puchi, M.	11,26		
Cabrejos, M.E.	15	Jedlicki, E.	15	Puente, J.	14		
Canales, M.	20,44	Jerez, C.A.	40	Quezada, C.	22		
Carrano, A.V.	11	Just, J.	13	Rabajille, E.	56		
Cárcamo, J.G.	7	karahianan, E.	36,37	Ramos, J.L.	IV		
Cardemil, E.	2,3,4,43	Kausel, G.	23,24	Rauch, M.C.	46		
Carrasco, L.	3	Kettlun, A.M.	19,32,41	Reinhart, G.D.	VII		
Carvallo, P.	29,30,31	Kyle, A.	11	Reyes, A.M.	45		
Casabona, J.	13	King, M.C.	13	Ríos, H.M.	22		
Céspedes, R.	39	Krauskopf M.	22,23,24	Rivas, C.I.	10		
Chayet, L.	19	Krautwurst, H.	2	Rodríguez, A.	30		
Chiong, M.	5	Lagos, R.	55	Rodríguez, E.M.	8		
Collados, L.	19	Lamerdin, J.	11	Rodríguez P.	6,VI		
Concha, I.I.	9,46,47	Larrondo, L.	36	Rosseau, C.	13		
Concha, M.I.	35	León, G.	35	Saavedra, C.	1,34		
Delgado, M.	40	León, O.	27	Salas, L.	36		
Dérpich, M.	30	Lienqueo, M.E.	54	Salazar, J.	21		
Díaz, F.	26	Lobos, S.	36,37,44	San Martín, R.	24		
Donzella, G.	27	Loyola, C.	34	Sarmiento, J.	24		
Elliot, J.M.	11	Ludwig, H.	7	Sepúlveda, C.	14		
Encinas, M.V.	1,43	Luza, S.	49	Silva, J.D.L.	VIII		
Espinosa, M.V.	33	McCready, P.	11	Shay, J.W.	111		
Espinosa, V.	41	Martínez, J.	42	Slebe, J.C.	7		
Eyzaguirre, J.	51	Matus, V.	18	Smith, E.	5		
Figuroa, J.	22,23,24	Millán, C.	8	Soll, D.	21		
Frey, P.A.	2	Miranda, D.	14	Stein, Z.	13		
Gamarra, N.	32	Misarelli, C.	31	Steiner, J.	51		
García, E.	11	Monasterio, O.	56,VI	Tapia, J.	21		
García, L.	19	Montecino, M.	11,26	Toledo, H.	40		
Georgescu, A.	11	Moraga, M.	29	Traverso-Cori. A.	19		
Goicochea, O.	12	Mohrenweiser, H.	11	Ureta, T.	17		
Valenzuela, M.	32	Morín, V.	26	Urzúa, U.	16		
Golde, D.W.	10	Moscoso, H.	38	Valenzuela, M.	32		
Gómez, L.	32	Muñoz, J.P.	25	Valenzuela, M.A.	19,41		



SOCIEDAD DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR DE CHILE.