

3/7/81

SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CHILE

Archivos de Biología y Medicina Experimentales

ORGANO DE LA
Sociedad de Biología de Chile

Vol. 11

Julio 1978

Nº 1

SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE

PROGRAMA Y RESUMENES DE COMUNICACIONES

II REUNION ANUAL

Y

SIMPOSIO INTERNACIONAL

“Regulatory Aspects of the Kinases of Carbohydrate Metabolism”

18-21 de julio de 1978

Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

Santiago de Chile



SOCIEDAD DE BIOLOGIA DE CHILE

ARCHIVOS
DE BIOLOGIA Y MEDICINA
EXPERIMENTALES

Vol. 11

Julio 1978

Nº 1

Editores: JORGE MARDONES RESTAT. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile, Santiago.

TITO URETA. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago.

Comité Editorial: JUAN CONCHA, EDUARDO DEL SOLAR, LUIS VARGAS, JUAN VIAL.
Ex Oficio: JORGE BABUL

Dirección Postal: Sociedad de Biología de Chile. Casilla 16164, Correo 9, Santiago, Chile.

SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE

PROGRAMA Y RESUMENES DE COMUNICACIONES

II REUNION ANUAL

Y

SIMPOSIO INTERNACIONAL

"Regulatory Aspects of the Kinases of Carbohydrate Metabolism"

18-21 de julio de 1978

Facultad de Ciencias, Universidad de Chile
Santiago de Chile

ÍNDICE

	Página
II Reunión Anual. Programa	3
Simposio Internacional. Programa	7
II Reunión Anual. Resúmenes	9
Simposio Internacional. Abstracts	21
Indice de Autores	29

II REUNION ANUAL

PROGRAMA

Martes 18

Sesión de Trabajos de Incorporación I. (9.00 a 11.05 horas)

- 9.00 ROJAS, M. C., Chayet, L. Sánchez, G. Vial, M. V., Portilla, G. y Cori, O. (Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile). *Biosíntesis de hidrocarburos monoterpénicos cílicos.*
- 9.25 SIERRA, L. F., Ojeda, J. M. (Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina Norte. Universidad de Chile). *Caracterización de RNA liberado por células tumorales.*
- 9.50 CARDEMIL, L. (Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile). *Los polisacáridos que constituyen los envoltorios celulares de heterocistos y esporas de una cianobacteria. Estructura de la unidad repetitiva de la molécula.*
- 10.15 PUCHI, M., Massone, R., Gamboa, E. e Imshenetzky, M. (Departamento de Bioquímica. Instituto de Ciencias Médico-Biológicas. Universidad de Concepción). *Comparación entre histonas de células somáticas con histonas de células embrionarias en estado de clivaje.*
- 10.40 BRONFMANN, M. (Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Católica de Chile). *Alteración de organelos subcelulares por compresión.*

Sesión de Avances de Tesis Doctorales (11.30 a 12.40 horas).

- 11.30 ERRAZURIZ, R. y Allende, J. (Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina Norte. Universidad de Chile). *Regulación de la síntesis de proteínas por un inhibidor obtenido de oocitos de Xenopus laevis.*
- 12.05 SOLARI, A. y Allende, J. (Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina Norte. Universidad de Chile). *Diferentes tRNA metil transferasas en núcleo y citoplasma de oocitos de Xenopus laevis.*

Sesión de Comunicaciones Libres I (14.30 a 16.30 horas).

- 14.30 LUDWIG, U., Garrido, F. y Perretta, M. (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Sede Sur. Universidad de Chile). *Activación diferencial de RNA polimerasas de médula ósea de rata por eritropoyetina y testosterona.*
- 14.50 WAISBLUTH, L., Garrido, F. y Perretta, M. (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Sede Sur. Universidad de Chile). *Efecto selectivo de la eritropoyetina y testosterona sobre la biosíntesis de diferentes tipos de RNA nuclear de médula ósea de rata.*

- 15.10 CARU, M., Garrido, F. y Perretta, M. (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Sede Sur. Universidad de Chile). *Efecto de la eritropoyetina y testosterona sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos de tres fracciones celulares de médula ósea de rata.*
- 15.30 Sánchez, E., DEL VILLAR, M. E. (Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina Norte. Universidad de Chile). *Requerimientos estructurales en las reacciones de UDP-glucuronil transferasa con sustancias opioides.*
- 15.50 MEDEL, R., Sierralta, W. y Pino, A. M. (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Sede Sur. Universidad de Chile). *Estudio comparativo de receptores para 5 α-dihidrotestosterona en próstata normal y adenocarcinoma prostático de rata.*
- 16.10 ARCAYA, G., Corcuera, L. J. y Traverso, G. A. (Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile). *Descomposición fotoquímica de un ácido hidroxámico cíclico (DIMBOA) de Zea Mays L.*

Coloquio de Enseñanza de Postgrado en Bioquímica (17.00 a 18.30 horas).

Organizador: Babul, J. Presidente: Cori O.

Participantes: Allende, J., Eyzaguirre, J., González, G., Krauskopf, M., Niemeyer, H., Pavesi, L.

SESION INAUGURAL (19.00 a 20.00 horas)

Conferencia: Dr. Luis F. Leloir. (Fundación Campomar. Buenos Aires. Argentina). *El papel de los derivados de dolicol en la glucosilación de proteínas.*

Miércoles 19

Sesión de Trabajos de Incorporación II (9.00 a 11.05 horas)

- 9.00 DAVAGNINO, J. y Ureta, T. (Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile). *Glucoquinasas múltiples y extrahepáticas. Su identificación como N-acetylglucosaminaquinasa.*
- 9.25 REINICKE, R. y Garcés, E. (Departamento de Bioquímica. Instituto de Ciencias Médico-Biológicas Universidad de Concepción). *Purificación y caracterización de una β-lactamasa extracelular de Streptomices Sp.*
- 9.50 KETTLUM, A. M., Uribe, L., Silva, S., Valenzuela, M. A. y Traverso-Cori, A. (Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile). *Propiedades cinéticas de dos isoenzimas de S. tuberosum.*
- 10.15 PRELLER, A. y Ureta, T. (Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile). *Isoenzimas de piruvatoquinasa en hígado de vertebrados.*
- 10.40 ZALDIVAR, M. J., Quiroga, M. y Venegas, A. (Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad Católica de Chile). *Purificación y propiedades de la RNA Polimerasa de Thermus thermophilus HB-8.*

Sesión de trabajos de Incorporación III (11.30 a 12.20 horas)

- 11.30 PUENTE, J., Varas, M. A., Beckhaus, G. y Sapag-Hagar, M. (Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile). *Regulación hormonal de la γ -Glutamiltranspeptidasa en hígado de rata, durante el ciclo lactogénico y la preñez inducida.*
- 11.55 HASHAGEN, U., De la Fuente, M., Rojas, M. C., Pérez, L. M., Fernández, L. A., y Cori, O. (Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile). *Prenil sintetasas de flavedo de Citrus sinensis.*

Reunión de socios de la Sociedad de Bioquímica de Chile (12.30 a 13.00 horas)

Sesión de Comunicaciones Libres. II (14.30 a 16.30 horas)

- 14.30 Valenzuela, A., Gómez, P. y HOFMANN, J. (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Sede Sur. Universidad de Chile). *Mecanismos biológicos de defensa: posible participación de las enzimas superoxidodismutasa y catalasa en la formación de un sistema protector de la célula contra la toxicidad del oxígeno.*
- 14.50 PEREZ, L. M., Taucher, G. y Cori, O. (Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile). *Hidrólisis de pirofosfatos alílicos por enzimas de flavedo de naranjas.*
- 15.10 CARDEMIL, E. y Eyzaguirre, J. (Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina Occidente. Universidad de Chile e Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad Católica de Chile). *Residuos esenciales de arginina en piruvatoquinasa de músculo de conejo.*
- 15.30 CALVO, V., Valenzuela, M. A. y Traverso-Cori, A. (Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile). *Análogo de ATP inmovilizado como adsorbente en cromatografía de afinidad. Purificación de Isoapirasa de S. tuberosum.*
- 15.50 Speisky, H., Somlai, A., DONOSO, E. y Sapag-Hagar, M. (Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile). *Modificaciones in vivo de los niveles de glutatión reducido y cisteína por nucleótidos cíclicos, glucagón e insulina en hígado de rata.*
- 16.10 BABUL, J. y Stellwagen, E. (Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile). *La isomerización de prolinas en el plegamiento de proteínas.*

Sesión de Comunicaciones Libres III (17.00 a 18.40 horas)

- 17.00 EGANA, E., Schoelermann, S. y Ramírez, M. T. (Instituto de Medicina Experimental. Departamento de Clínicas. Facultad de Medicina Sur. Universidad de Chile). *Efecto conjunto de EtOH y AcCHO sobre el proceso respiratorio de SNC de ratas A. G. y A. G. / H₂O.*
- 17.20 RIVERA, J., Valenzuela, M. A. y Traverso-Cori, A. (Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile). *Síntesis y purificación de ATPCr y ADPCr. Propiedades cinéticas de las pirofosfohidrolasas de S. tuberosum en presencia de estos complejos.*

- 17.40 GONZALEZ, M., Morales, M. y Zambrano, F. (Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile). *Rol de sulfatidos en la actividad ($Na^+ K^+$) trifosfatasa en membrana plasmática.*
- 18.00 PEDEMONTE, J. y Gil, L. (Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina Norte. Universidad de Chile). *Efectos del estado nutricional en la actividad de algunas monooxigenasas y en el contenido de los componentes de la cadena de transporte de electrones en microsomas de hígado de rata.*
- 18.20 REINBERG, D. Bull, M., Vicuña, R. y Yudelevich, A. (Departamento de Biología Celular. Universidad Católica de Chile). *Purificación y propiedades de una enzima que relaja DNA en pseudomonas marina BAL 31.*

INTERNATIONAL SYMPOSIUM

Regulatory Aspects of the Kinases of Carbohydrate Metabolism

PROGRAM

Thursday, July 20th

09.00 — 09.05 TITO URETA. Wellcome and Introductory Remarks.

SESSION I

In vivo Regulatory Properties

Chairman: Dr. Hermann Niemeyer

09.05 — 09.50 DANIEL E. ATKINSON (University of California, Los Angeles).
*The adenine nucleotides in metabolic regulation.*09.50 — 10.35 ERNESTO BUSTAMANTE (Universidad Cayetano Heredia, Lima).
Mitochondrial hexokinase: key to the high aerobic glycolysis of tumor cells.

SESSION II

Regulation of Glucokinase levels

Chairman: Dr. Athel Cornish-Bowden

11.00 — 11.45 HERMANN NIEMEYER (Universidad de Chile, Santiago).
*Adaptive properties of liver glucokinase.*11.45 — 12.30 DERYCK G. WALKER (University of Birmingham, Birmingham).
Structural and developmental aspects of hepatic glucokinase.

SESSION III

Kinetics of Glucose Phosphorylating Enzymes

Chairman: Dr. Daniel E. Atkinson

15.00 — 15.45 OCTAVIO MONASTERIO (Universidad de Chile, Santiago).
*Kinetic mechanism of glucokinase. Order of addition of the substrates using 2-deoxyglucose as the sugar substrate.*15.45 — 16.30 MARIA L. CARDENAS (Universidad de Chile, Santiago).
*Kinetic cooperativity of glucokinase with glucose.*16.30 — 17.15 ATHEL CORNISH-BOWDEN (University of Birmingham, Birmingham).
Mammalian hexokinases. A system for the study of co-operativity in monomeric enzymes.

The 45 min period assigned to each speaker includes 10 min for questions and discussion.

Friday, July 21st

SESSION IV

Ontogeny and Phylogeny of Hexokinases and Glucokinase
Chairman: Dr. Deryck G. Walker

- 09.00 — 09.45 NICOLA C. PARTRIDGE (University of Western Australia, Nedlands).
Factors regulating the appearance of glucokinase in neonatal rat liver.
- 09.45 — 10.30 TITO URETA (Universidad de Chile, Santiago).
Phylogenetic and ontogenetic studies of glucose phosphorylating isozymes.

SESSION V

The Role and Properties of Pyruvate Kinases
Chairman: Dr. Alberto Sols

- 11.00 — 11.45 JAIME EYZAGUIRRE (Universidad Católica de Chile, Santiago).
Studies on bacterial pyruvate kinase: properties of the enzyme from Pseudomonas and Thermus thermophilus.
- 11.45 — 12.30 ARSENIO MORAN (Universidad de Concepción, Concepción).
Effect of phenylalanine and alanine on the pyruvate kinase from Concholepas concholepas muscle.
- 12.30 — 13.15 JOSEPH KATZ (Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles).
The role of pyruvate kinase in the regulation of gluconeogenesis.

SESSION VI

The Role of Phosphofructokinases
Chairman: Dr. Joseph Katz

- 15.00 — 15.45 JORGE BABUL (Universidad de Chile, Santiago).
The significance of phosphofructokinase allostery.
- 15.45 — 16.30 GOPI A. TEJWANI (Ohio State University, Columbus).
The role of phosphofructokinase in muscle contraction.
- 16.30 — 17.15 ALBERTO SOLS (Universidad Autónoma, Madrid).
The Pasteur effect in the allosteric era.

SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE

II REUNION ANUAL

RESUMENES DE COMUNICACIONES

CONFERENCIA INAUGURAL

El papel de los derivados de dolicol en la glucosilación de proteínas. (The role of dolichol derivatives on protein glycosylation).

L. F. LELOIR.— Fundación Campomar. Buenos Aires. Argentina.

El 12 de noviembre de 1970 en una conferencia en homenaje al Profesor Cabello en Lo Barrenechea, mencioné los resultados que habíamos obtenido con el Dr. N. Behrens. Desde entonces los conocimientos sobre glicoproteínas y su biosíntesis han aumentado muchísimo.

En esa época habíamos detectado la formación de dolicol fosfato glucosa a partir de uridina difosfato glucosa y dolicol fosfato. Además habíamos observado que la glucosa del dolicol fosfato glucosa se podía transferir a otro compuesto que creímos que era proteína. Trabajos posteriores mostraron que dicha substancia no se disolvía en cloroformo metanol 2:1, pero podía solubilizarse en mezclas de cloroformo metanol agua en la proporción 1:1:0.3. Esto permitió

la purificación del compuesto y el estudio de sus propiedades. Se obtuvo evidencia de que era un oligosacárido combinado con dolicol difosfato, formado por 2 acetilglucosaminas, varias manosas y 2 glucosas. Por otra parte se observó que el dolicol fosfato sirve deceptor para acetilglucosamina formando dolicol difosfato acetilglucosamina y dolicol difosfato N-N-diacetilquiotibiosa. Este último puede luego aceptar manosas, formándose así un oligosacárido que se puede transferir a proteína.

Estudios recientes de varios grupos han demostrado que el compuesto que contiene glucosa que ahora llamamos dolicol difosfato G-oligosacárido actúa como dador para la glucosilación de muchas glicoproteínas. Después de la transferencia del oligosacárido al polipeptido actúan glucosidasas que hidrolizan las glucosas y varias manosas y dejan un pentasacárido sobre el cual se transfieren luego residuos de acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico. Todo esto ha significado un progreso considerable en el conocimiento de la biosíntesis de las glicoproteínas.

Descomposición Fotoquímica de un ácido hidroxámico cíclico (DIMBOA) de Zea mays L. (Photochemical decomposition of a cyclic hydroxamic acid (DIMBOA) from *Zea mays* L.).

ARCAYA, G., CORCUERA, L. y TRAVERSO, G. A.—Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago.

DIMBOA (2,4-Dehidroxi-7-metoxi-benzoxazin-3-ona) es un ácido hidroxámico que inhibe el desarrollo de insectos, hongos y bacterias. Esta molécula es inestable en soluciones acuosas, siendo afectada por pH, temperatura y luz. El propósito de este trabajo es determinar el efecto de la luz sobre la estabilidad de DIMBOA.

DIMBOA fue aislado de extractos acuosos de *Zea mays* L. Soluciones de este compuesto (Succinato 0.1 M, pH 6) fueron irradiados a diferentes longitudes de onda. DIMBOA se descompone al ser expuesto a radiación ultravioleta. Al irradiar con luz monocromática ($\lambda = 315$ nm) se observa una reacción primaria con cinética de primer orden con un rendimiento cuántico de 5.6×10^{-8} (moléculas de DIMBOA transformadas/quantum de luz absorbida); no se observaron reacciones fotoquímicas secundarias a esta longitud de onda de radiación. Sin embargo, cuando el producto primario es expuesto a radiaciones de menor longitud de onda (302-230 nm) se descompone fotoquímicamente.

Por su parte, MBOA (6-metoxibenzoazolinona), producto principal de la descomposición térmica de DIMBOA, también se degrada fotoquímicamente y el producto es espectralmente igual al de DIMBOA. La cinética de su descomposición es de primer orden.

La isomerización de prolinas en el plegamiento de proteínas. (Proline isomerization in protein folding). BABUL, J., y STELLWAGEN, E.— Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Departamento de Bioquímica, Universidad de Iowa.

El plegamiento de muchas proteínas exhibe una multiplicidad de eventos que pueden ser detectados cinéticamente y que sugiere la presencia de intermediarios de estabilidad transitoria entre las conformaciones desnaturalizadas y nativas. De acuerdo con el modelo de isomerización de prolinas, el estado desnaturalizado consiste en una mezcla de isómeros configuracionales (trans/cis) y sólo aquellos que tienen los enlaces peptídicos de prolina en la forma trans se pliegan rápidamente por ser ésta la forma más frecuente en las conformaciones nativas. Esto tendrá como resultado la existencia de dos o más fases cinéticas aun cuando no existan intermediarios de estabilidad transitoria entre las conformaciones nativas y desnaturalizadas. También, según el modelo, la fracción de proteína desnaturalizada que se pliega rápidamente, depende del número total de prolinas por cadena polipeptídica.

En este trabajo se compara la cinética de plegamiento de dos citocromos *c* que difieren en su contenido de prolinas (4 en caballo y 3 en atún) para tratar de esclarecer este proceso y poner a prueba el

modelo de isomerización de prolinas. Para este efecto se estudió, en un aparato de paro de flujo, el plegamiento de ambas proteínas desnaturalizadas por ácido. En forma distinta a los estudios en equilibrio, de las medidas cinéticas se detectaron tres fases cinéticas cuyos tiempos de relajación difieren en un orden de magnitud. Los valores de la fracción de proteína desnaturalizada que se pliega rápidamente, en el caso del citocromo de atún y de caballo, no concuerdan con los predichos por el modelo. Estos resultados no apoyan el modelo de isomerización de prolinas en el plegamiento de proteínas.

Alteración de organelos subcelulares por compresión
(Alteration of subcellular organelles induced by compression).

BRONFMAN, M.— Laboratorio de Citología Bioquímica, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

Se ha demostrado que las mitocondrias de hígado de rata pueden ser alteradas por la presión hidrostática que se genera en los rotores de las ultracentrífugas preparativas.

Con el objeto de evaluar este efecto, se estudió la influencia de la presión hidrostática, generada en una prensa hidráulica, en la integridad estructural de los diversos organelos subcelulares de hígado de rata, mediante determinaciones de latencia de diversas enzimas de localización subcelular conocida.

Los peroxisomas, mitocondrias, lisosomas y vesículas microsómicas son alteradas considerablemente por presiones hidrostáticas en el rango de las que es posible alcanzar en la ultracentrífuga. Estas alteraciones se manifiestan en una liberación de enzimas, normalmente asociadas a la matriz de los organelos, en solución.

La sensibilidad de los diversos organelos a la presión es diferente, siendo los peroxisomas los más sensibles y los elementos de Golgi los más resistentes. La sensibilidad a la presión aumenta al disminuir la temperatura de 20 a 2°C.

Las alteraciones inducidas pueden ser atribuidas a la presión misma, y no a la decompresión. En todos los casos, el grado de deterioración de los organelos aumenta al aumentar el tiempo bajo presión y es independiente de la velocidad de decompresión. Para una presión determinada el tiempo bajo presión necesario para observar alteraciones varía de un organelo a otro. A tiempos cortos (0.5-1 min.) sólo los peroxisomas son afectados.

Mediciones de resistencia a la presión en Micoplasmas (*Acholeplasma laidlawii* B) en los cuales la composición de la membrana celular puede ser variada de acuerdo a la composición del medio de cultivo, revelaron que la resistencia a la presión es significativamente mayor en los micoplasmas cultivados en presencia de colesterol. Este resultado sugiere que la diferencia de sensibilidad entre los organelos es una consecuencia de la diferencia de composición de sus membranas.

Análogo de ATP inmovilizado como adsorbente en cromatografía de afinidad. Purificación de isoapirasa de S. Tuberousum. (Inmobilized ATP analogue as Adsorbent affinity Chromatography. Purification of an isoapyrase from. S. tuberosum).

CALVO, V., VALENZUELA, M. A. y TRAVERSO-CORI, A.— Laboratorio de Bioquímica General, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile.

La apirasa o pirofosfohidrolasa de papa hidroliza enlaces pirofosfóricos en presencia de metales bivalentes.

Hemos informado en trabajos anteriores, que el cambio en la molécula de ATP de un puente de oxígeno del pirofosfato terminal por un puente metíleno, la transforma en un inhibidor de tipo competitivo con una K_i de 1,35 mM para la actividad ATPásica y 0,91 mM para la ADPásica. Considerando estas propiedades cinéticas se usó como adsorbente en cromatografía de afinidad. La síntesis de ATP fosfonato se efectuó por el método de Myer, y colaboradores a partir de 5'AMP y ácido metilendifosfónico usando como agente deshidratante la diciclohexil carbodíimida. El ATP-fosfonato se purificó por una columna de DEAE-cellulosa. Para unir el análogo de ATP a la agarosa se trató con NaIO₄ para obtener el 2,3-dialdehido el cual se unió a la agarosa previamente transformada en una pentanodiamina. La base de Schiff que se forma posteriormente, se estabiliza con reducción con NABH₄.

La enzima parcialmente purificada proveniente de una columna de G-100 se absorbe a baja fuerza iónica en presencia de Mn⁺⁺ ya que hay evidencias que el verdadero substrato de esta pirofosfohidrolasa sería el nucleotido unido a un metal bivalente. En ausencia de metal y con una gradiente de ATP se ha logrado eluir selectivamente la isoenzima.

Con el azul de cibacron unido covalentemente a Sephadex G-100 también se ha obtenido una purificación bastante promisoria. En este caso la elución se ha efectuado con gradiente de fuerza iónica. Se discuten las ventajas de ambos métodos de purificación.

Residuos esenciales de arginina en piruvato quinasa de músculo de conejo. (Essential arginyl residues in pyruvate kinase from rabbit muscle).

CARDEMIL E. y EYZAGUIRRE, J. Unidad de Bioquímica, Facultad de Medicina Occidente, Universidad de Chile, Santiago, y Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile, Santiago.

Diversos estudios han demostrado que los residuos de arginina juegan un rol esencial en muchas enzimas, principalmente en el reconocimiento de sustratos o ligandos aniónicos. En el presente trabajo se investigó si existen residuos de arginina importantes para la unión de los sustratos a piruvato quinasa.

Se obtuvo enzima cristalina a partir de músculo de conejo por técnicas descritas. Los estudios de modifi-

cación química se realizaron usando 2,3-butanodiona en borato de sodio 60 mM a pH 8,4 y 30°C. La actividad residual se determinó usando un ensayo espectrofotométrico acoplado con deshidrogenasa láctica.

La enzima se inactiva con cinética de pseudo-primer orden, estimándose que un residuo de aminoácido se modifica por sitio activo de la enzima. Las constantes cinéticas para la reacción de inactivación (K_1 y K_{-1}) son 4,8 M⁻¹ min⁻¹ y 0,0020 min⁻¹. La inactivación se pudo revertir completamente al eliminar el exceso de borato y butanodiona por filtración en gel. Análisis de aminoácidos de muestras parcialmente modificadas, demostraron que se estarían modificando 3 a 4 residuos de arginina por subunidad catalítica para obtener enzima totalmente inactiva. La inactivación realizada en presencia de sustratos y cofactores, demostró que la presencia de fosfoenolpiruvato 5 mM más K⁺ y Mg⁺⁺ disminuye la constante de inactivación de 0,041 min⁻¹ a 0,014 min⁻¹ mientras que Mg⁺⁺ 10, mM la aumenta a 0,069 min⁻¹. No se observó efecto por ADP, solo o con metales.

La conocida especificidad de butanodiona, la reversión de la inactivación al eliminar el exceso de reactivo y borato y los resultados obtenidos mediante análisis de aminoácidos, indican que la reacción de modificación ocurre en residuos de arginina. Los resultados también indican que hay un residuo de arginina en o cerca del sitio de unión de fosfoenolpiruvato, y no del sitio de unión de ADP, existiendo más de uno (posiblemente 3 a 4) residuos igualmente reactivos de arginina. En consecuencia, el sitio de unión del nucleótido sería diferente a sitios análogos en otras quinasas. El efecto de Mg⁺⁺ puede deberse a un efecto de carga eléctrica o a un cambio conformacional inducido por el metal en la proteína.

Polisacáridos que constituyen los envoltorios celulares de heterocistos y esporas de una cianobacteria. Estructura de la unidad repetitiva de la molécula. (The polysaccharides from heterocyst and spore envelopes of a blue-green alga. Structure of the basic repeating unit).

CARDEMIL L.— Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago - Chile.

Glicosidasas específicas cortan selectivamente los residuos terminales, los que forman las ramas de los polisacáridos que constituyen los envoltorios de heterocistos y esporas de *Anabaena cylindrica*. Así se puede determinar la posición y configuración anomérica de los enlaces glicosídicos que unen el azúcar de la rama a la columna vertebral de la molécula.

La enzima (1 → 3) endogluconasa de *Rhizophorus arrhizus* Q M 1032, puede cortar la columna vertebral de los polisacáridos de heterocistos y esporas cuando sostienen dos ramas. Los productos de esta degradación enzimática son, para ambos polisacáridos, un mono— un tri— y un pentasacárido. Análisis de metilación de estos digosacáridos permiten establecer la secuencia de la estructura de la molécula completa. Ambos polisacáridos (heterocistos y esporas) tienen la misma secuencia de ramificaciones.

Análisis del extremo reductor de la columna vertebral de las moléculas con borohidruro de sodio tritiado, muestran que es glucosa el azúcar ubicada en el extremo reductor y una estimación del peso molecular promedio de la columna vertebral de 130-150 residuos de azúcares.

Una degradación secuencial, por medio de una modificación del método de degradación de Smith, con identificación del azúcar alcohol previamente tritada, sugiere que (Man-glc-glc-glc)_n es la unidad repetitiva de la columna vertebral.

Efecto de la eritropoyetina y testosterona sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos de tres fracciones celulares de médula ósea de rata. (Effect of erythropoietin and testosterone on nucleic acids metabolism from three cellular fractions from rat bone marrow). CARU, M., GARRIDO, A. y PERRETTA, M.—División de Bioquímica y Biophysica. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile. Santiago.

La extrema heterogeneidad de las células de la médula ósea de rata en la que están presentes todos los estados de desarrollo de las células sanguíneas circulantes, dificulta los estudios bioquímicos relacionados principalmente con la diferenciación de las diversas series celulares.

El proceso eritropoyético está regulado por la eritropoyetina (EP) y testosterona (T), hormonas que parecen actuar a diferentes niveles bioquímico y citológico.

El propósito de este trabajo es estudiar en qué clase de células actúan ambas hormonas y para ello es necesario disponer de un sistema que tenga fracciones enriquecidas con células de la serie roja.

Utilizando gradientes de densidad de ficoll se obtuvieron tres fracciones celulares de médula ósea, en los cuales se determinó la biosíntesis de RNA y DNA, midiendo la incorporación de formiato-C¹⁴ a las bases a los tiempos de 30, 60, 120, y 180 min, y bajo la acción de eritropoyetina y testosterona.

Utilizando ratas normales, anémicas y policitómicas, la acción de la EP sobre el RNA a los 30 min es muy marcada en las fracciones I y II de las normales y policitómicas, mientras que la T no aumenta la incorporación. La acción conjunta de ambas hormonas es más manifiesta en la fracción III de estos animales.

En la rata anémica, la T ya a los 30 min estimula la síntesis de RNA, siendo esta actividad muy similar a la observada con las dos hormonas.

A los 180 min, la acción de ambas hormonas ya sea separadas o juntas, sobre la síntesis de RNA y DNA es significativa, en especial cuando ambas participan reflejando un real efecto sinérgico.

Por las características del estímulo analizado, se postula que las hormonas parecen actuar a diferente nivel citológico, mientras la EP lo hace en células más inmaduras, la T actuaría sobre células intermedias del tipo de eritroblastos basofílicos.

Glucoquinases múltiples y extrahepáticas: su identificación como N-Acetylglucosamina quinasa (Multiple forms and extrahepatic glucokinases: identification as N-Acetylglucosamine Kinase).

DAVAGNINO J. Y URETA T.—Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Varios grupos de investigadores han comunicado que la glucoquinasa de alta Km de hígado de rata puede presentar dos bandas de movilidad electroforética similar. También se ha comunicado la existencia de esta enzima en varios tejidos extrahepáticos de la rata y otros mamíferos. Estas últimas observaciones son de interés porque su demostración inequívoca permitiría postular mecanismos de regulación del metabolismo hidrocarbonado que se suponen propios del hepatocito. Efectivamente hemos comprobado por cromatografía en DEAE-cellulosa la presencia de actividad fosforilante de glucosa de alta Km en extractos de riñón de rata. Sin embargo, difiere de la glucoquinasa por su especificidad de sustrato, peso molecular ligeramente superior y características cinéticas. Esta actividad corresponde a N-acetylglucosamina quinasa, enzima que es capaz de fosforilar varios azúcares aun cuando con valores de Km muy altos. Resultados similares se obtuvieron al fraccionar extractos de hígado de rata de tres días de edad, placenta humana y eritrocitos de cerdo, tejidos todos en los que se ha comunicado la presencia de glucoquinasa.

NAGA quinasa de bazo de vaca se purificó parcialmente y se injectó en un gallo hasta obtener un anticuerpo que inhibe la actividad enzimática del antígeno. Este anticuerpo no reacciona con glucoquinasa o hexoquininas de baja Km. La incubación del anticuerpo con extractos de riñón de rata y de hígado de rata neonatal hizo desaparecer la actividad glucoquinasa putativa, lo que no ocurre en los controles incubados con suero de gallo no inyectado. La electroforesis en acetato de celulosa de extractos de hígado de rata adulta, permite demostrar la presencia de tres bandas de actividad fosforilante de glucosa de baja Km y dos bandas adicionales que sólo se tifan con altas concentraciones del azúcar. Una de estas bandas de mayor movilidad anódica desaparece si antes de la electroforesis se incuba los extractos con el suero inmune anti-NAGA quinasa.

Los resultados indican que glucoquinasa es una enzima hepática que se presenta compuesta de una sola banda electroforética. Cualquier proposición en contrario debe explícitamente demostrar que la actividad observada no corresponde a NAGA quinasa.

Efecto conjunto de EtOH y AcCHO sobre el proceso respiratorio de SNC de ratas "A. G." y "A. G./H₂O". (Effect of both EtOH and AcCHO on CNS respiratory process in "A. G." and "A. G./H₂O" rats).

EGANA, E., SCHOELERMANN, S. y RAMIREZ, M. T.—(Laboratorio de Neurobioquímica, Instituto de Medicina Experimental, Departamento de Clínicas, Facultad de Medicina, Santiago-Sur, Chile).

Nuestro Instituto ha comunicado previamente sobre efecto del EtOH y del AcCHO sobre el proceso res-

piratorio de SNC, particularmente sobre sitio 1 y 2, y estados 3 y 4 (fosforilación oxidativa de ratas con alcoholismo permanente y filial "A. G." rats (actualmente 63 generaciones) y "A. G./H₂O" (en el presente, 18^a generación). El detalle sobre este tipo de alcoholismo ha sido publicado anteriormente. Este trabajo se relaciona con experimentos en los cuales ambos EtOH y AcCHO, separadamente o en conjunto, actúan sobre el proceso respiratorio de SNC.

Ratas: Normal, A. G. y A. G./H₂O; tres edades: adulto, impúber y neonatal. SNC: corteza cerebral, hipotálamo y cerebelo en las dos primeras edades (cortes y tirillas) y homogenizado de encéfalo total en neonatal; Mitocondria: de las áreas de SNC mencionadas y de encéfalo total. El proceso respiratorio y el efecto de EtOH y AcCHO y substratos, fue medido por el consumo de O₂. Las técnicas usadas fueron: (i) Manométrica: vaso Warburg, Ringer-Elliott-HCO₃, gas fase O₂ 95% - CO₂ 5% o Ringer Krebs-PO₄, gas fase O₂, pH inicial 7.4, 38°, 60 min; cortes de tejido u homogenizado; piruvato 10 mM como substrato; EtOH 11.4 y 22.8 mM; AcCHO 1, 5 y 10 mM (ii) Polarográfica: electrodo Clark, Ringer mitocondria-K⁺-Mg²⁺-PO₄, pH 7.2, N₂ 79% - O₂ 21%, 25°, substrato piruvato 10 mM; ADP 0.05 mM; NAD 0.2 mM, EtOH 11.4 y 22.8 mM y AcCHO 1, 2 y 5 mM. En los experimentos se usó separadamente las dos concentraciones de EtOH, las tres concentraciones de AcCHO y combinaciones de ambos. En las determinaciones manométricas se ensayó la acción estimuladora de KCl 100 mM.

Los resultados obtenidos, en general, son: 1. SNC (cortes, tirillas y homogenizado): 1.1 según las concentraciones de EtOH y AcCHO, respectivamente, estimulan o inhiben la respiración; ambos asociados en general deprimen el proceso. 1.2 Se observó algunas diferencias entre normal, A. G. y A. G./H₂O. 1.3 Las diferentes áreas de SNC estudiadas, presentan diversa reacción frente al EtOH y al AcCHO particularmente en presencia de piruvato y en estimulación con K. 2. Mitocondria. 2.1 Tanto EtOH como AcCHO inhiben la respiración con substrato endógeno y en presencia de piruvato; el R.C.R., también está disminuido. 2.2 NAD no revierte el efecto inhibitorio.

Regulación de la síntesis de proteínas por un inhibidor obtenido de oocitos de *Xenopus laevis* (Regulation of protein synthesis by an inhibitor from *Xenopus laevis* oocytes).

R. ERRAZURIZ y ALLENDE J. E.— Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina (Stgo. Norte) Universidad de Chile.

La síntesis de proteínas en oocitos crecidos de *X. laevis* está aparentemente regulada post-transcripcionalmente, ya que puede ser gatillada por la fertilización, aún cuando no hay síntesis *de novo* de RNA. Para dilucidar el posible mecanismo de esta regulación, se ha estudiado la capacidad biosintética de proteínas usando diferentes componentes celulares de oocitos de *X. laevis*. Los resultados obtenidos han demostrado que la fracción citoplasmática de oocitos crecidos

contiene un factor termolábil que inhibe fuertemente la síntesis de polifenilalanina dirigida por poli U, en un sistema que emplea ribosomas lavados de oocitos de *X. laevis* y una fracción sobrenadante de 105.000x g obtenida de germen de trigo. Este inhibidor está también presente en el lavado con KCl 0.5M de ribosomas de oocitos de *X. laevis*.

La inhibición sería específica para ribosomas de oocitos, ya que prácticamente no se observa al usar ribosomas de germen de trigo, y por otro lado, la inhibición puede revertirse al agregar un exceso de ribosomas de oocitos lavados con KCl 0.5M. Se ha demostrado que al parecer la etapa de la elongación sensible a esta inhibición sería la unión del aminoacil-tRNA al sitio ribosomal A, catalizada por el factor de elongación EF-1. La unión no enzimática de aminoacil-tRNA que ocurre a altas concentraciones de Mg⁺⁺ no es afectada, lo que indicaría que para que el inhibidor sea efectivo se necesita la estructura intacta del ribosoma.

Este inhibidor ha sido parcialmente purificado usando cromatografía en DEAE-cellulosa y filtración en geles. El inhibidor tendría un peso molecular aproximado de 200.000 dalton, determinado por filtración en columnas de Sephadex G-200.

Actualmente se está estudiando la naturaleza y especificidad del inhibidor, así como su posible papel en el desarrollo de los oocitos de *X. laevis*.

Rol de sulfátidos en la actividad (Na⁺ K⁺) Trifosfatasa en membrana plasmática. (A role for sulphatide in membrane-bound sodium potassium ATPase).

GONZALEZ, M., MORALES, M. y ZAMBRANO, F.— Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Varios autores han encontrado una alta concentración de sulfátidos en: médula externa de riñón, glándula de la sal de aves marinas, glándula rectal de Spiny dogfish y órgano eléctrico de anguila. Caracterizándose éstos por alta actividad de (Na⁺ K⁺) ATPasa sensible a ouabaina y por poseer un sistema de transporte de Na⁺ corticoesteroide dependiente. Esto, más los resultados obtenidos en las ATPasas aisladas y purificadas por Hokin del órgano eléctrico de la anguila y de la glándula rectal del dogfish (tollo) que muestran un notorio enriquecimiento en sulfátido, nos hacen postular un posible rol de este glicolípido en la actividad (Na⁺ K⁺) ATPasa.

Estudios realizados en branquias y epitelios abdominal de larvas de *C. caudiverbera* en distintas etapas de desarrollo señalan que: 1) la actividad ATPásica está presente cuando el epitelio es fisiológicamente funcional y esta actividad está directamente asociada a la presencia de sulfátidos, 2) la hidrólisis de sulfátidos mediante Arylsulfatasa provoca una inhibición de la (Na⁺ K⁺) ATPasa similar al efecto de ouabaina, y 3) el contenido de fosfatidilserina es constante en los distintos estados larvales no asociándose a la funcionalidad del epitelio.

Estos resultados más los experimentos de De Pont (descarboxilación de fosfatidilserina *in situ*) parecen

refutar el postulado de Post que señala a fosfatidilserina como el requerimiento lipídico específico de la actividad ($\text{Na}^+ \text{ K}^+$) ATPasa ligada a transporte activo de Na^+ y K^+ .

Prenilsintetasas de flavedo de Citrus sinensis. (Prenylsynthetases of *Citrus sinensis* flavedo).

HASHAGEN, U., DE LA FUENTE, M., CECILIA ROJAS, LILIANA CHAYET, LUZ MARIA PEREZ, LUIS ANTONIO FERNANDEZ, OSVALDO CORI.—(Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile).

Las actividades prenilsintéticas de un polvo cetónico de flavedo de *Citrus sinensis* fueron purificadas entre 30 y 40 veces a partir de un extracto. El rendimiento obtenido fue del 50%. Se estudiaron las propiedades de la fracción purificada, y luego se caracterizó la actividad C_{18} prenilsintética, que produce pirofosfatos alílicos de 15 átomos de carbono de conformación *trans* alrededor del doble enlace 2-3. Se determinaron para ella las K_m aparentes para ambos sustratos: para geranilpirofosfato fue de $7.3 \times 10^{-7} \text{ M}$ y para isopentenilpirofosfato de $4.9 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Los análogos del sustrato alílico como nerilpirofosfato, octilpirofosfato, geranilmmonofosfato, y nerilmmonofosfato fueron inhibidores bastante débiles de la C_{18} prenilsintetasa. La enzima requiere Mg^{++} para su máxima actividad. El Mn^{++} también la activa en cambio el Ca^{++} no tiene ningún efecto.

Se exploró la dependencia de grupos SH activos manifestada por la C_{18} prenilsintetasa ya a lo largo de la purificación. Se encontró inactivación irreversible con parahidroximercuribenzoato y luego, más específicamente, con ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitro-benzoico) una inactivación reversible por ditiotreitol. Geranilpirofosfato- Mg^{++} y nerilpirofosfato- Mg^{++} protegen a la enzima frente al ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitro-benzoico). En cambio estos pirofosfato o bien no tienen efecto protector (nerilpirofosfato) o incluso aceleran la inactivación (geranilpirofosfato) en ausencia de Mg^{++} .

Estos resultados sugieren que el verdadero sustrato sea el geranilpirofosfato- Mg^{++} y que sólo éste se ligue al sitio alílico completo de la prenilsintetasa, es decir, tanto al sitio hidrofóbico como al sitio polar.

Activación diferencial de RNA polimerasas de médula ósea de rata por eritropoyetina y testosterona. (Differential activation of rat bone marrow RNA polymerases by erythropoietin and testosterone).

LUDWIG, U., GARRIDO, F. y PERRETTA, M.—División de Bioquímica y Biofísica. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile. Santiago.

Las hormonas participan en la regulación de la expresión génica, induciendo cambios en el espectro enzimático de células blanco cuando sintetizan RNAs muy específicos.

La eritropoyesis constituye un buen sistema biológico para el estudio de los mecanismos moleculares de la regulación de la actividad del gen y en él par-

ticipan las hormonas Eritropoyetina y Testosterona.

El propósito de este trabajo es comprobar la interrelación bioquímica de ambas hormonas en la regulación del proceso y, específicamente, determinar su acción diferencial a nivel de las RNA polimerasas de núcleos de médula ósea.

Para ello se estudió su efecto en la incorporación de un precursor marcado de RNA ($^3\text{H}-\text{UTP}$) a los diversos RNAs sintetizados en núcleos aislados de animales normales, anémicos y policitómicos.

Tomando esta incorporación como medida indirecta de la actividad RNA polimerásica, y usando un sistema de ensayo adecuado para poder discriminar entre las RNA polimerasas I, II y III (distinta fuerza iónica, presencia o ausencia de α -amanitina), se encontró que la eritropoyetina estimula preferencialmente la actividad de la RNA polimerasa II, mientras que testosterona aumenta la actividad de la RNA polimerasa I.

Estos resultados junto a otros encontrados en este laboratorio permiten postular que ambas hormonas actúan sinéricamente para generar la maquinaria bioquímica que sintetiza la hemoglobina, macromolécula que caracteriza el proceso.

Estudio comparativo de receptores para 5 α -dihidrotestosterona en próstata normal y adenocarcinoma prostático de rata. (Comparative study of 5 α -dihidrotestosterone receptors in normal prostate and prostatic adenocarcinoma of rat).

MEDEL, R., SIERRALTA, W. y PINO, A. M.—División de Bioquímica y Biofísica. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile. Santiago 11.

Los tumores que afectan a la glándula prostática muestran concentraciones intracelulares de 5 α -dihidrotestosterona más elevadas que el tejido prostático normal, debido a que presentan una mayor capacidad de retenerlos.

Un estudio de los receptores para este metabolito en adenocarcinoma prostático de rata, muestran diferencias significativas en las características de unión y cinéticas con respecto a la próstata normal. Los receptores del adenocarcinoma poseen constantes de asociación (K_a) de $3.23 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ a 25°C y $8.92 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ a 0°C que son significativamente mayores que las de los receptores del tejido normal ($8.65 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ y $4.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ respectivamente). Los valores obtenidos para las constantes de velocidad de disociación del complejo 5 α -DHT-receptor (K_{-1}) en el caso del adenocarcinoma es menor (5.95×10^{-7}) que para el caso de la próstata normal ($1.25 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}$) lo que coincide con las diferencias encontradas para los valores de K_a .

Aunque estas diferencias indican la posibilidad de una alteración de tipo estructural de los receptores del adenocarcinoma solo se pudieron establecer pequeños cambios en la movilidad electroforética y especificidad de unión de diferentes hormonas. En el caso del análisis electroforético el pequeño cambio de la movilidad se puede deber a una pequeña diferencia de carga, que presentan entre sí los receptores de estos tejidos. El cambio en la especificidad es claro ya que

la inhibición de la unión de 5α -DHT al receptor producido por testosterona y estradiol es mayor en el caso del receptor del tejido tumoral.

Por último los estudios indican que el adenocarcinoma prostático posee una mayor concentración relativa de sitios receptores ($28 \pm 2,5$ fentomoles/mg proteína) que la próstata normal ($17,5 \pm 2,0$ fentomoles/mg proteína), lo que podría dar cuenta junto con los resultados obtenidos para las K_a de las mayores concentraciones de 5α -DHT encontrada por otros autores en tumores prostáticos.

Efectos del estado nutricional en la actividad de algunos mono-oxygenasas y en el contenido de los componentes de la cadena de transporte de electrones en microsomas de hígado de rata. (Effects of the nutritional state on the activity of some mono-oxygenases and on the contents of the components of the electron-transport chain in rat liver microsomes).

PEDEMONTE, J. y GIL, L.— Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

Para estudiar el efecto del estado nutricional en el sistema de oxidases de función mixta, se han utilizado 2 grupos de ratas. a) Grupo Control. Ratones recién nacidos de la cepa Wistar, fueron mantenidas en camadas de ocho ratas por madre nodriza; a los 21 días fueron destetadas y alimentadas *ad libitum* con una dieta 10% ND_p Cal. b) Grupo Desnutrido. Ratones recién nacidos de la misma cepa fueron colocados en camadas de 16 ratas por madre nodriza; a los 21 días fueron destetadas y alimentadas *ad libitum* con una dieta aproteica. A los 35 días de edad las hembras de ambos grupos fueron sacrificadas, preparándose los microsomas correspondientes.

Al comparar la actividad de algunas desmetilasas e hidroxilasas se observó que la capacidad oxidativa estaba fuertemente disminuida en el grupo desnutrido. El contenido de las hemoproteínas citocromo P-450 y citocromo b₆ como la actividad NADH b₆ reductasa fueron también menores en animales desnutridos, sin embargo, la actividad NADPH citocromo P-450 reduc-tasa fue similar en ambos grupos.

Análisis de los espectros de Resonancia Electrónica Paramagnética indican la presencia en ambos grupos de formas de la hemoproteína terminal de bajo spin.

Evidencias espetrales cinéticas, de unión de ligandos y electroforéticas sugieren la presencia en ratas desnutridas de algunas especies de la oxidasa terminal, diferentes a las que se encuentran en ratas controles. Los resultados que se discuten demuestran que el estado nutricional afecta drásticamente la actividad catalítica de algunas monooxigenasas y produce alteraciones en la composición del sistema oxidativo.

Hidrólisis de pirofosfatos alílicos por enzimas de flavedo de naranjas. (Hydrolysis of allylic pyrophosphates by enzymes from orange flavedo).

PEREZ, L. M., TAUCHER, G. Y CORI, O.—Laboratorio de Buiquoquímica General Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile.

En un sistema libre de células obtenido de flavedo de naranjas, existen fosfatases que hidrolizan fosmonoésteres y fosfoanhídridos. También hidroliza pirofosfatos de estructura isoprénica, que son intermediarios en la biosíntesis de mono y sesquiterpenos, dando como productos finales alcoholes que forman parte de los aceites esenciales de la naranja.

Se purificó parcialmente un extracto de polvo cetónico, mediante precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intervención en Sephadex G-25 y cromatografía de intercambio iónico en fosfocelulosa. La actividad prenilfosfatásica se ensayó midiendo la radiactividad soluble en hexano, usando como sustratos 1^{-3}H -geranilpirofosfato y 1^{-3}H -nerilpirofosfato, obtenidos sintéticamente.

La enzima purificada 40 veces con un 35% de rendimiento, se encuentra libre de colorantes, e hidroliza una serie de sustratos fosforados a diferentes velocidades. La hidrólisis de prenilpirofosfatos ocurre en forma secuencial, con formación de monofosfato como intermediario. Este alcanza una concentración de estado estacionario, dando finalmente un alcohol no reordenado (nerol geraniol). La velocidad de hidrólisis de los prenilmonofosfatos es mayor que la de los respectivos pirofosfatos. La acumulación de prenilmonofosfatos es el resultado de una inhibición de la actividad fosfomonoesterásica por pirofosfatos alílicos. Las actividades prenilpirofosfatásicas disminuyen en presencia de EDTA ó 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoato). El pirofosfato inorgánico, ortofosfato y ATP son inhibidores de las prenilfosatasas. Se demostró una supresión parcial de los efectos inhibitorios de ATP por concentraciones crecientes de P_i. Por otra parte, éste puede activar ligeramente a la enzima inhibida por ATP.

Se piensa que la prenilfosatasa tendría dos formas E_A y E_B, de las cuales E_B sería más activa. El ATP desplazaría el equilibrio ligándose con E_A y el P_i a su vez desplaza el equilibrio ATP-E_A hacia E_B.

Isoenzimas de Piruvato Quinasa en hígado de vertebrados. (Pyruvate kinase isoenzymes in vertebrate liver).

PRELLER A. y URETA T.— Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El estudio de las diferencias cualitativas y cuantitativas de componentes de sistemas isoenzimáticos en diversas especies de animales permite establecer correlaciones con algunas peculiaridades de la regulación metabólica en esas especies. En comunicaciones previas se han mostrado estudios de este tipo utilizando las isoenzimas de hexoquinasa de hígado, las que muestran diferencias profundas entre mamíferos y anfibios por una parte y aves y reptiles superiores por otra. Con el objeto de saber si los sistemas isoenzimáticos de una vía metabólica sufren variaciones coordinadas, durante la evolución se estudiaron las piruvato quinasas (EC 2.7.1.40, isoenzimas L, K y M) en el hígado de vertebrados.

Las isoenzimas se aislaron por cromatografía en DEAE-cellulosa de extractos de hígado de mamíferos (rata, degu), aves (pato, gallo, gorrión, codorniz),

reptiles superiores (culebra de cola larga y lagartijas de varias especies), quelonios (tortuga) y anfibios buñidos y leptodactilidos.

La piruvato quinasa tipo K se encontró en el hígado de todas las especies analizadas y es la forma predominante en aves y reptiles. La isoenzima tipo L se observó en mamíferos. Ambas formas presentan cinética sigmaidea y son activadas por fructosa-1,6-bisfosfato. La piruvato quinasa tipo M, de cinética micaeliana e insensible a fructosa-1,6-bisfosfato, se encontró en el hígado de todas las especies analizadas con excepción de mamíferos.

Si bien los diferentes taxa analizados difieren en sus piruvato quinasas, los cambios observados no son equivalentes a los descritos en el caso de las hexoquininas, por lo que no es posible inferir la existencia de un patrón evolutivo coordinado entre isoenzimas de una misma vía metabólica.

Comparación entre histonas de células somáticas con histonas de células embrionarias en estados de clivaje.
PUCHI, M., MASSONE, R., GAMBOA, S. e IMS-CHENETZKY, M.— Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Médico-Biológicas, Universidad de Concepción.

La existencia de histonas típicas durante los primeros estados de desarrollo embrionario ha sido muy discutida, siendo los resultados existentes hasta la fecha poco concluyentes al respecto.

Con el objeto de contribuir a la resolución de este problema se han aislado proteínas solubles en H_2SO_4 0.4 N a partir de cromatina de zigotos de "Tetrapigus Niger" 40 y 90 minutos después de la fecundación del oocito.

Estas proteínas han sido comparadas con: histonas típicas aisladas de células somáticas (timo de ternera e hígado de rata); con histonas provenientes de gametos y de embriones en estado más avanzado de desarrollo (prisma).

Los resultados obtenidos indican que la dotación de histonas de las células en clivaje es muy semejante a la de ovas; tanto en su movilidad electroforética como en su composición de aminoácidos; son sin embargo, muy diferentes a las presentes en gametos masculinos. Tanto los patterns electroforéticos como la relación lisina/arginina sugiere que en células en clivaje estarían presente los 5 tipos fundamentales de proteínas histónicas H2A, H2B, H3, H4 y H1.

Las histonas de células en clivaje difieren principalmente de histonas típicas en la heterogeneidad de la fracción H1 y en un mayor contenido de Ácido Aspártico. Se discute la posibilidad de existencia de histonas tipo H1 (ricas en lisina) atípicas, durante los primeros ciclos replicativos de embriones de "Tetrapigus Niger".

Regulación hormonal de la γ -glutamiltranspeptidasa en hígado y glándula mamaria de rata, durante el ciclo lactogénico y la preñez inducida (Hormonal regulation of γ -glutamyl transpeptidase in liver and mammary gland during the lactogenic cycle and induced pregnancy in the rat).

PUENTE, J., VARAS, M. A., BECKHAUS, G. Y SAPAG-HAGAR, M.—Laboratorio de Química Fisiológica y Patológica. Dpto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile.

Los cambios metabólicos que se producen en la glándula mamaria entre el final de la preñez y el comienzo y mantención de la lactancia son considerables y hasta el momento no del todo conocidos.

La enzima de membrana γ -glutamiltranspeptidasa (γ -GT), característica de los tejidos secretores, es regulada en hígado por AMPc y en vesículas seminales por testosterona. Se le supone la función de transportar aminoácidos al interior de la célula utilizando glutatión reducido (GSH) como acceptor de los aminoácidos. Hemos comparado la γ -GT de glándula mamaria e hígado de ratas en ciclo lactogénico y en la preñez inducida hormonalmente, con el fin de determinar si presentan el mismo patrón de regulación.

Se trabajó con ratas Sprague-Dawley en ciclo lactogénico natural y ovariectomizadas con tratamientos de estradiol-progesterona para inducir preñez. La γ -GT se determinó con L- γ -glutamyl-p-nitroanilida como sustrato, el AMPc y adenilato ciclase radioisotópicamente y GSH con el reactivo de Ellman.

Las variaciones de γ -GT y AMPc en la glándula mamaria no presentan una correlación directa, sin embargo, en hígado son prácticamente coincidentes. El alza de AMPc y γ -GT en la glándula mamaria ocurre al mismo tiempo, límite entre preñez y lactancia, que la disminución de ambos en hígado. El fenómeno es cualitativamente homologado en la preñez inducida, demostrándose que la γ -GT mamaria aumenta dependiendo del tiempo de tratamiento con estradiol-progesterona. Ambas hormonas aumentan la actividad *in vitro* de la adenilato ciclase. Se postula que la señal hormonal de control de AMPc en los dos órganos podría ser directo o indirectamente estradiol-progesterona.

Purificación y propiedades de una enzima que relaja DNA en Pseudomonas marina BAL-31. (Purification and properties of a DNA relaxing enzyme from marine Pseudomonas BAL 31).

REINBERG, D., BULL, M., VICUÑA, R. y YUDELEVICH, A.— Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Celular, Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Se ha purificado parcialmente una enzima capaz de relajar DNA sobreenrollado a partir de *Pseudomonas Bal 31*. La enzima muestra requerimientos absolutos de Mg^{+2} para su actividad. La presencia de sales, tales como Na^+ o K^+ son también requeridas, alcanzándose una actividad máxima en presencia de Na^+ 0.2M. Espermidina no tiene ningún efecto sobre la enzima, N' etil maleimida inhibe parcialmente la actividad de ésta.

Al parecer, la enzima es dependiente del grado de sobreenrollamiento que posee el DNA usado como sustrato, ya que, relaja completamente DNA col E₁ y parcialmente un híbrido formado por col E₁ y DNA de levadura.

Esta enzima posee algunas características similares a las encontradas en otras enzimas "Nicking-Closing" de origen procariontico, tales como, requerimiento absoluto de Mg^{2+} y una fuerte dependencia del grado de sobreenrollamiento del sustrato.

Purificación y caracterización de una Beta-Lactamasa extracelular de streptomyces UCSM 104. (Purification and characterization of an extracellular Beta-Lactamase of streptomyces UCSM 104).

REINICKE, K. y GARCES, E.—Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Médico-Biológicas, Universidad de Concepción.

La producción de la beta-lactamasa por la cepa de *Streptomyces* UCSM-104 es alta y se acompaña de pigmentos que es posible eliminar totalmente con la metodología de purificación descrita en el presente trabajo.

En cromatografía de DEAE-Celulosa manifiesta su carácter aniónico, eluyendo a una fuerza iónica correspondiente a 135 mM de KCl, lo que se corrobora por electroforesis en gel de poliacrilamida. Esta enzima es una proteína globular de bajo peso molecular, con aproximadamente 124 residuos de aminoácidos.

Frente a diferentes sustratos ensayados, se comporta como penicilinasa, presentando mayor actividad con bencilpenicilina y ampicilina. A su vez, cloxacilina y meticilina presentan una inhibición de tipo competitivo lineal frente a bencilpenicilina como sustrato. De acuerdo al criterio de Jack y Richmond, la hidrólisis enzimática decefaloridina es inhibida por meticilina y resistente a cloxacilina. Su actividad catalítica no es influenciada por altas concentraciones de sulfato de amonio (0.2 M) ni por fosfato de sodio (0.1 M), obteniéndose además muy poca variación en un amplio rango de pH. Tampoco requiere la presencia de metales para efectuar la hidrólisis enzimática de bencilpenicilina, manifestando por el contrario, sensibilidad a la inhibición por iones cobre.

Experiencias con reactivos tiólicos indican la presencia de grupos sulfhidrilicos y por lo tanto residuos de aminoácidos de cisteína. Evidencias adicionales indican que por lo menos algunos de los residuos de cisteína participan en el sitio activo de la enzima.

Síntesis y purificación de ATPCr y ADPCr. Propiedades cinéticas de las pirofosfohidrolasas de *S. Tuberosum* en presencia de estos complejos. (Synthesis and purification of ATPCr and ADPCr. Kinetic Properties of Pyrophosphorylases from *S. tuberosum* in the presence of these complexes).

RIVERA, J., VALENZUELA, M. A. y TRAVERSOCORI, A.— Laboratorio de Bioquímica, Depto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile.

Se obtuvieron complejos de ATPCr y ADPCr a partir de $Cr(NO_3)_3$. Estos complejos fueron separados y purificados de su medio de reacción cromatográfica-

mente a través de columnas de intercambio catiónico (Dowex X 2; (H^+)). Los complejos se identificaron mediante los métodos de fósforo total (P_t); cromo total; fósforo ácido lábil (Plábil); absorción a $\lambda = 260$; cromatografía en papel y electroforesis en papel.

Ambos complejos son estables en soluciones ácidas y pueden guardarse a $-20^\circ C$ por meses, sin sufrir modificaciones.

Los complejos de cromo de estos nucleótidos no son substratos de las pirofosfohidrolasas de la papa, comportándose más bien como análogo de substratos químicamente inertes que afectarían en consecuencia ciertas propiedades cinéticas características de estas enzimas vegetales.

El ATPCr es un buen inhibidor de la actividad ADPáctica, sin embargo, un mal inhibidor de la actividad ATPásica tanto en las pirofosfohidrolasas provenientes de *S. tuberosum* var. Pimpernel como la de la var. Desireé.

Estudios de protección por estos complejos de Cr de la acción inactivante específica de algunos reactivos modificadores de residuos de triptofano nos hacen suponer que estos complejos de cromo, químicamente inertes podrían reaccionar más bien con los residuos envueltos en la unión del sustrato y no en la catálisis.

Biosíntesis de hidrocarburos monoterpenicos cílicos (Biosynthesis of cyclic monoterpene hydrocarbons)
ROJAS, M. C., CHAYET, L., SANCHEZ, G., VIAL, M. V., CORI, O.—(Facultad de Ciencias Químicas) y GLORIA PORTILLA (Departamento de Química, Facultad de Ciencias) Universidad de Chile.

Se describe la purificación de una homocicla obtenida de flavedo de *Citrus limonum* usando precipitación con polietilenglicol e intercambio aniónico.

La o las homociclasas producen β -pineno, α -pineno y limoneno a partir de ($1^{-3}H$) nerilpirofosfato (NPP) o de su isómero *trans*, el ($1^{-3}H$) geranilpirofosfato (GPP) sin que medie una isomerización *trans-cis* en el proceso. En algunas partidas de enzima se observa además la aparición de sabineno. Se descartan además isomerizaciones no enzimáticas de los hidrocarburos en el proceso analítico que implica tratamiento con ácido silícico.

Las homociclasas requieren de la presencia de grupos SH, como se demuestra por el requerimiento de mercaptoetanol o ditiotreitol en el proceso de purificación y por la inactivación por (para) cloromercuribenzoato o por 5,5' bis-dito (2 nitrobenzoato).

Los monofosfatos de nerol y geraniol no son substratos, sino que son inhibidores. Lo mismo ocurre con el pirofosfato inorgánico. La enzima requiere Mn^{2+} en forma absoluta; el Mg^{2+} no puede reemplazarlo.

Se estudian las condiciones para la formación no enzimática de limoneno a partir tanto de NPP como de GPP, catalizada por Mn^{2+} y no por Mg^{2+} . Esto sugiere que la transformación del carbocatión *trans* generado por el GPP puede cambiar su conformación sin necesidad de enzima, y que el Mn^{2+} hidratado podría participar en este proceso.

Requerimientos Estructurales en las Reacciones de la UDP-glucuroniltransferasa con compuestos Opíoides. (Structural requirements in the reaction of UDP-glucuronyl transferase with Opioids compounds).
SANCHEZ, E. y DEL VILLAR, E.— Departamento de Farmacología y Departamento de Bioquímica, Fac. Medicina Norte, Universidad de Chile.

Se estudia la influencia de los grupos 3-hidroxilo y N-alquilo presentes en la estructura de narcóticos en su reactividad con la UDP-glucuroniltransferasa. Narcóticos que poseen ambos, uno o ninguno de estos grupos se ensayaron en su capacidad para inhibir la glucuronidación de morfina en microsomas hepáticos de conejo. Aquellos con un solo grupo, ya sea 3-hidroxilo (Normorfina) o N-alquilo (Codeína, Etilmorfina) fueron inhibidores competitivos menos potentes que aquellos, conteniendo ambos grupos (dextrofano, levarfano). Narcodeína que carece de ambos grupos no tuvo efecto inhibitorio. Los narcóticos sintéticos (+) — y (—) —metadonas, (—) —α-acetilmadol y meperidina, que contienen solamente grupo N-alquilo, produjeron notable inhibición competitiva. No se observó estereoselectividad de la morfina-glucuroniltransferasa por los isómeros opioides.

Resultados indican que el grupo N-alquilo en la estructura de opioides juega un papel fundamental en la interacción de narcóticos.

Caracterización de RNA liberado por células tumorales en cultivo. (Characterization of RNA released by tumor cells in culture).

SIERRA TIRADO, L. F. y OJEDA, J. M.— Sección Virología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Santiago Norte, Universidad de Chile.

Cultivos *in vitro* de células HEp-2 son capaces de liberar RNA a su medio de cultivo. Este RNA extracelular fue purificado mediante digestión con pronasa, dialisis exhaustiva, extracción de proteínas con fenol y filtración en columnas de Sephadex G-75. El producto así obtenido se caracteriza por: incorporar ³H-Uridina, da reacción de orcinol positiva, es precipitable por TCA al 15% y tiene un coeficiente de sedimentación tipo 4-5S determinado en gradiente de sacarosa. Además, este RNA tiene un alto contenido en bases metiladas detectables por espectroscopía de luz infrarroja y ultravioleta, y por incorporación de grupos metilo marcados radiactivamente, y presenta una mayor resistencia a la acción hidrolítica por ciertas ribonucleasas que el RNA celular. Se discute una posible asociación con componentes proteicos y polisacáridos, así como su función biológica.

Diferentes tRNA Metil transferasas en núcleo y citoplasma de oocitos Xenopus laevis. (Different Transfer RNA Methyl Transferases in Nuclei and Cyttoplasm of Xenopus laevis Oocytes).

SOLARI, A. y ALLENDE, J. E.— Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina (Norte), Universidad de Chile.

Los tRNA, al igual que otras especies de RNA sufren importantes modificaciones post-transcripcionales que son consideradas como reacciones de "procesamiento". Una de esas modificaciones es la metilación de nucleótidos ya sea en los azúcares o en sus bases. Las enzimas que catalizan estas reacciones usan como donador de grupos metilo S-Adenosil L metionina (SAM) y han sido caracterizadas en múltiples tejidos. Algunos autores han postulado que estas enzimas juegan papeles importantes en la regulación de la proliferación celular. Nosotros hemos comenzado a estudiar las tRNA metil transferasas en oocitos de *Xenopus laevis* como un nuevo enfoque destinado a explorar el procesamiento de los tRNA. Usando extractos crudos de ovarios de *X. laevis* y SAM (³H metil) hemos encontrado que tRNA total de *E. Coli* B sirve como acceptor de grupos metilo. Preparaciones purificadas de tRNA como ovario de *X. laevis*, levadura y germen de trigo fueron pobres aceptores, indicando que probablemente están completamente metilados en las posiciones específicas para las enzimas de ovario.

Con el aislamiento de núcleos por disección manual ha sido posible determinar que el núcleo contiene una actividad de tRNA metil transferasa que representa aproximadamente el 50% de la actividad celular. Esta fracción enzimática difiere de la actividad encontrada en citoplasma (oocitos enucleado), en que es estimulada en gran medida por Mg²⁺ y espermina, los cuales no tienen efecto en la (s) enzima (s) citoplasmática. A su vez las Km para tRNA total de *E. Coli* son distintas para ambos casos: usando tRNA específicos de fenilalanina de *E. Coli* se ha encontrado que resulta ser un excelente sustrato para la fracción enzimática citoplasmática a diferencia de la nuclear. Trabajos futuros nos permitirán caracterizar estas actividades enzimáticas y determinar su posible función.

Modificaciones in vivo de los niveles de glutation reducido y cisteína por nucleótidos cílicos, glucagón e insulina en hígado de rata. (In vivo modifications of reduced glutathione and cysteine levels by cyclic nucleotides, glucagon and insulin in rat liver).

SPEISKY, H., SOMLAI, A., DONOSO, E. y SAPAG-HAGAR, M.— Laboratorio de Química Fisiológica y Patológica. Depto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile.

Se sabe desde hace un tiempo que el ayuno (12-15 horas) en la rata induce a la γ-glutamiltranspeptidasa hepática con una disminución concomitante en los niveles de glutatión reducido (GSH). Se ha descrito igualmente un aumento del AMP cíclico (AMPc) en el hepatocito por el ayuno.

Hemos estudiado el efecto *in vivo* de la inyección i. p. de dibutiril-AMPc y del glucagón sobre la γ-glutamiltranspeptidasa y de los metabolitos GSH y cisteína en hígado de ratas no ayunadas.

Tanto el AMPc, como el glucagón producen una caída del GSH a la tercera parte del valor basal original a las dos horas, con un simultáneo aumento de cisteína.

La γ -glutamiltranspeptidasa en estas condiciones no presenta una modificación apreciable que explique las variaciones de GSH. Por otra parte, la actinomicina D anula el efecto del AMPc o glucagón sobre el GSH y cisteína, sugiriendo la existencia de otro sistema que dé cuenta de dichos cambios.

La inyección i.p. de dibutiril-GMPc no modifica los cambios producidos por el AMPc, sugiriendo que estos dos nucleótidos, en el sistema en estudio, no actuán en forma opuesta. Iguales resultados se obtuvieron con insulina, que se postula actúa vía GMPc.

Los resultados obtenidos parecen indicar que el reservorio de cisteína representado por el GSH podría movilizarse por efecto del AMPc, segundo mensajero de la acción hormonal, en algunas situaciones neoglucogénicas.

Mecanismos Biológicos de Defensa: Posible participación de las enzimas Superoxidismutasa y Catalasa en la formación de un sistema protector de la célula contra la toxicidad del oxígeno. (Biological Mechanisms of Defense: Possible role of the enzymes Superoxidismutase and Catalase in the formation of a protein system in the cell against oxygen toxicity).

VALENZUELA, A., GOMEZ, P., HOFMANN, J.—Laboratorio de Bioquímica. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile.

El metabolismo del oxígeno molecular implica la formación de radicales libres de alta reactividad como son los radicales superóxidos y los radicales hidroxilos. Estos radicales son iniciadores de la lipoperoxidación celular cuyas consecuencias a nivel celular son bien conocidas. Los productos de este proceso alteran sistemas enzimáticos, estructuras subcelulares, etc. e incluso se les ha relacionado con el envejecimiento celular. Se ha descrito un sistema enzimático, integrado por la enzima glutatión peroxidasa, que permitiría detoxificar la célula al metabolizar los peróxidos derivados de la lipoperoxidación. Nuestros resultados nos permiten postular que las enzimas superoxidismutasa y catalasa integrarían otro sistema enzimático cuya función sería impedir el inicio de la lipoperoxidación al destruir los radicales libres iniciadores del proceso.

Propiedades cinéticas de dos isoenzimas de S. Tuberosum. (Kinetics properties of two isoenzymes of S. tuberosum).

VALENZUELA, M. A., KETTLUM, A. M., URIBE, L., SILVA, S. y TRAVERSO-CORI, A.—Laboratorio Bioquímica General. Dpto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile.

La hidrólisis enzimática de enlaces pirofosfóricos de compuestos orgánicos e inorgánicos la hemos llamado actividad pirofosfotidrolásica o apirásica. Los substratos comúnmente usados son el ATP y el ADP. Según la Vmax, con que hidrolizan a estos substratos

hemos clasificado las isoenzimas en las de cuociente ATPásico/ADPásico: alto, bajo e intermedio. Estas isoenzimas se han obtenido de diferentes variedades de *S. tuberosum*.

El presente trabajo compara las propiedades cinéticas de las actividades ATPásica, ADPásica, tripolifosfatásica y pirofosfatásicas de dos isoenzimas de *S. tuberosum*.

Se encontró que estas cuatro actividades enzimáticas en ambas isoenzimas son absolutamente dependientes de metal bivalente medidas en el pH óptimo correspondiente de cada actividad hidrolítica, aun cuando las actividades con substratos inorgánicos (PPP y PP) son de pH óptimo 5,0.

Los perfiles de pH de las actividades enzimáticas de las dos isoenzimas usando Ca^{++} o bien Mn^{++} saturante tienen máximos de actividades que difieren el uno del otro en 1,0 a 0,5 unidad de pH.

Las Km de las cuatro actividades enzimáticas en las dos isoapiratas son prácticamente las mismas solo difieren en las V_m de ATP lo cual explica los diferentes cuocientes enzimáticos.

Los P.M. para las dos isoenzimas son alrededor de 50.000 Dalton.

Efecto selectivo de la eritropoyetina y testosterona sobre la biosíntesis de diferentes tipos de RNA nuclear de médula ósea de rata. (Selective effect of erythropoietin and testosterone on the biosynthesis of different nuclear RNA types of rat bone marrow).

WAISBLUTH, L., GARRIDO, F. y PERRETTA, M.—División de Bioquímica y Biofísica. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile. Santiago.

La citodiferenciación de los eritrocitos a partir de células basales pluripotenciales (stem cells) en médula ósea de rata, provee de un sistema adecuado para estudiar algunos de los eventos bioquímicos de la acción hormonal. En el presente trabajo se han realizado experimentos tendientes a demostrar la acción de la eritropoyetina y testosterona como moduladores de la eritropoyesis.

Análisis electroforéticos del RNA nuclear muestran que la eritropoyetina activa principalmente la RNA polimerasa II, induciendo la síntesis de RNAs con coeficientes de sedimentación 30S, 21-22S, 15-16S y 9S, correspondiendo los tres primeros a especies precursoras del RNA 9S, que ha sido descrito como el mensajero funcional para las globinas. Por otra parte, la testosterona activa la RNA polimerasa I, aumentando fundamentalmente la síntesis de las especies ribosomales 28 y 18S. Así mismo, aparece aumentada por acción del andrógeno la síntesis de un RNA 4S que correspondería al RNA de transferencia.

Los resultados presentados parecen indicar que la eritropoyetina y testosterona ejercen su acción de manera sinérgica en médula ósea de rata, induciendo la síntesis de diferentes especies de RNA, los que finalmente conformarán la maquinaria bioquímica necesaria para sintetizar las globinas.

Purificación y propiedades de la RNA polimerasa de Thermus thermophilus HB-8. (Purification and properties of Thermus thermophilus RNA polymerase).
ZALDIVAR, M. J., QUIROGA, M. y VENEGAS, A.—
Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile, Santiago.

Para estudiar el proceso de síntesis de RNA a altas temperaturas, hemos purificado, como etapa inicial, la RNA polimerasa de *Thermus thermophilus* HB-8, un termófilo extremo.

La purificación se realizó mediante fraccionamiento con sulfato de protamina y cromatografía en DEAE Sephadex, Sepharosa 6B y DNA celulosa. Se obtuvo una enzima con una actividad específica de alrededor de 5.000 unidades/mg de proteína, lo que corresponde a una purificación de aproximadamente 400 veces. Estudios estructurales indican que esta enzima está

constituida por 5 subunidades de PM 175.000, 130.000, 80.000, 42.000 y 38.000 daltons. Los requerimientos de cofactores y pH son similares a los de la enzima de *E. coli*, pero la diferencia una gran termoestabilidad y resistencia a agentes desnaturalantes.

Se estudió la unión de la enzima a DNA, midiéndose la retención del complejo (enzima-DNA) en filtros de nitrocelulosa, a diferentes temperaturas (entre 20° y 80°). Estudios con la fracción Sepharosa 6B, muestran que este proceso es independiente de la temperatura en el rango estudiado. Estudios de entrecruzamiento entre DNA y la enzima por acción de luz ultravioleta, indican que es la subunidad de PM 170.000 daltons la que se une covalentemente a DNA.

En conclusión, la enzima purificada de este bacterio termófilo presenta propiedades estructurales y rasgos generales similares a las RNA polimerasas de otros procariotes, exceptuando su gran estabilidad frente al calor y agentes desnaturalantes.

SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE

SIMPOSIO INTERNACIONAL

REGULATORY ASPECTS OF THE KINASES OF CARBOHYDRATE METABOLISM

ABSTRACTS

The adenine nucleotides in metabolic regulation
DANIEL E. ATKINSON.— Department of Chemistry,
University of California, Los Angeles, USA.

The adenine nucleotides are the major energy transducing system linking catabolic and anabolic metabolic sequences. Thus we cannot realistically discuss regulation of the kinases of carbohydrate metabolism without considering broader aspects of energy metabolism. In regulating the rate of flow through glycolysis, the kinases are responding to the energy needs of the cell; thus their regulatory properties are not related to glycolysis only, but to the total metabolism of the cell. That is, since the function of glycolysis is to supply ATP and biosynthetic intermediates, glycolysis cannot be self-regulated, but must respond to changes in the amounts of ATP and intermediates required by the cell.

The energy status of the cell is expressed in the

concentration ratio $[ATP]/[ADP]$ or in the mole fractions of the adenine nucleotides. A quantitative measure of the energy status of the adenine nucleotide pool is given by the adenylylate *energy charge*, the mole fraction of ATP plus half the mole fraction of ADP. This parameter is found by analysis to be maintained at a value near 0.9 for most or all normally metabolizing cells. This stabilization must depend on regulation of sequences that use ATP and of those that regenerate ATP (such as glycolysis) by the adenine nucleotides. Thus neither regulation of glycolysis and respiration nor regulation of biosynthesis could exist alone; they interact continuously and are in fact two parts of a single regulatory system.

Some aspects of regulation of enzymes by energy charge and of the stabilization of energy charge *in vivo* will be discussed as background for the more specific treatments of regulatory enzymes to be given by other speakers.

The significance of phosphofructokinase alloster
JORGE BABUL.—Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile.

Escherichia coli contains two fructose-6-phosphate kinases. PFK I is the main activity in the wild type strain, a widely studied allosteric enzyme specified by the *pfkA* gene. PFK II, a non-allosteric enzyme, is present in strains carrying the *pfkB1* mutation, a suppressor of *pfkA* mutants, and very low levels of this enzyme have also been detected in strains not carrying the suppressor (*pfkB1*). The non-allosteric protein has now been purified from three strains, one carrying *pfkB1* and *pfkA⁺*, one carrying *pfkB1* and completely deleted for *pfkA*, and one carrying *pfkB1* and also deleted for *pfkA*. The enzyme is apparently the same (PFK II) in all three strains, indicating that *pfkB1* is a mutation affecting the amount of a normally minor enzyme. PFK II is a tetramer of slightly larger subunit molecular weight than PFK I (36,000 and 34,000 respectively). No immunological cross reactivity was detected between PFK II and PFK I. Pure PFK I, as has been described frequently, shows a sigmoidal dependence of rate on fructose-6-phosphate concentration, inhibition by phosphoenolpyruvate, and activation to hyperbolic kinetics by ADP. Pure PFK II presents hyperbolic curves as a function of fructose-6-phosphate concentration, and is unaffected by ADP or phosphoenolpyruvate. ATP has only a slight effect on the velocity of either enzyme. Fructose-1,6-diphosphate partially inhibits the reaction of PFK II but was without such effect on PFK I. Glucose-6-phosphate and fructose-1-phosphate show marginal activity as substrates for PFK II. Tagatose-6-phosphate was a substrate for PFK II but not for PFK I. Tested as effectors of PFK II, AMP, citrate, and pyruvate were without effect. The normal function of the low level of PFK II in the wild type strain is not known.

Phosphofructokinase was also purified from *E. coli* grown in a glucose limited chemostat, both aerobically and anaerobically. The enzymes had the same electrophoretic mobility, the same subunit size, and the same kinetic characteristics of PFK I. This shows that there is no conversion of PFK I into PFK II under such conditions and that both enzymes are PFK I.

In an isogenic *E. coli* strain series with various combinations and amounts of PFK I and PFK II (J. P. Robinson and D. G. Fraenkel), there was no large difference in growth rates or yields in a minimal medium with glucose, glucose-6-phosphate, and glycerol, aerobically and anaerobically. This suggests that the alloster of PFK I is not an important factor in the regulation of the glycolytic pathway during growth in *E. coli*. When the velocity curve of PFK I as a function of fructose-6-phosphate concentration was carried in the presence of ADP and phosphoenolpyruvate concentrations close to those in growth on glucose, an hyperbolic curve was obtained like PFK II. This indicates that the characteristics of pure PFK I and PFK II *in vitro* and in the cell are alike.

Mitochondrial Hexokinase: Key to the High Aerobic Glycolysis of Tumor Cells.

ERNESTO BUSTAMANTE.—Universidad Peruana Cayetano Heredia. Apartado 5045. Lima, Perú.

A tumorigenic anchorage-dependent cell line (H-91) was established in culture from an azo-dye-induced rat ascites hepatoma. When grown in a glucose-containing medium the cells exhibit high rates of lactic acid production characteristic of rapidly growing tumor cells. However, when glucose is replaced with galactose the cells grow equally well but exhibit only moderately elevated rates of lactic acid production. The molecular basis for this observation cannot be attributed to differences in permeability because initial rates of glucose and galactose entry into hepatoma cells are identical. Rather, the activity of hexokinase is found to be high in hepatoma cells, about 20-fold higher than that of control and regenerating rat liver. Moreover, tumor hexokinase activity is not inhibited by low concentrations of the reaction product glucose-6-P. Additionally, 50% of the hexokinase activity of hepatoma cells is found associated with the mitochondrial fraction. This fraction is 3-fold enriched in hexokinase activity relative to the homogenate and 4-fold enriched relative to the nuclear and post-mitochondrial fractions. Tumor mitochondrial hexokinase appears to be coupled directly to oxidative phosphorylation, because addition of glucose to respiring hepatoma mitochondria (after a burst of ATP synthesis) results in stimulation of respiration. In contrast, glucose has no effect on the respiration of mitochondria from control and regenerating liver. These results suggest that the high glycolytic capacity of H-91 hepatoma cells is due, at least in part, to an elevated form of hexokinase concentrated in the mitochondrial fraction of the cell.

Other rapidly growing, highly glycolytic, tumors (but not low glycolytic tumors) were found to have a significant portion of the total cell hexokinase bound to the mitochondrial fraction. It seems, therefore, that the expression of mitochondrial hexokinase in these hepatoma cells (that originate from hepatocytes which do not have hexokinase but glucokinase) is an apparent function of the growth rate of the tumors and correlates well with their glycolytic activity.

Free ATP and glucose-6-P are specific agents for releasing hexokinase from the outer mitochondrial membrane. The non-hydrolyzable ATP analog AMP-PNP is also effective although not as much as ATP. ITP can partially substitute for ATP, but ADP, AMP, EDTA, and 0.1 M NaCl are ineffective as releasing agents. Addition of Mg⁺⁺ can prevent release of hexokinase by ATP. In addition, inhibitor studies show that energization of mitochondria (either through ATPase action, ATP translocation, or a proton gradient) is not required for the solubilizing effect of ATP.

Kinetic studies indicate that the true substrate for hexokinase activity is MgATP and that free ATP is a rather potent competitive inhibitor of the reaction in addition to being a specific agent for releasing the mitochondrially-bound enzyme. The Km (MgATP) is 5-fold lower for both the mitochondrially-bound form

and the cytosolic hexokinase relative to the ATP-solubilized enzyme. However, the K_m (glucose) of the three forms of the enzyme are almost identical.

The release and kinetic data are consistent with the view that there are two different kinds of hexokinase in H-91 hepatoma cells: a) *A mitochondrial form*, which may bind to or be released from the mitochondria depending on metabolic conditions. When bound to the outer membrane, this enzyme has a higher apparent affinity for MgATP than when solubilized. b) *A cytosolic form*, which has a high apparent affinity for MgATP.

Kinetic cooperativity of glucokinase with glucose.

MARIA LUZ CARDENAS.— Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Hepatic glucokinase present in several species of vertebrates shows cooperativity with respect to glucose and mannose as substrates, with a Hill coefficient (n_H) of 1.5-1.6. However, no cooperativity is observed when 2-deoxyglucose is used as the substrate.

Several attempts to modify cooperativity have failed. Thus, photooxidation with methylene blue or heating of the enzyme for variable periods before the assay, as well as the addition of Triton X-100 (0.1%) or urea (0.2 and 1.0 M) to the assay medium, while decrease V_{max} and increase $K_{0.5}$ do not alter significantly the n_H values. Likewise, by lowering the pH of the assay medium down to 6.5, V_{max} decreases to 47% and $K_{0.5}$ increases to 18.5 mM glucose, while n_H does not change. On the other hand, an increase of the ionic strength by KCl or NaCl (up to 0.4 M) does not modify n_H , even though V_{max} and $K_{0.5}$ decrease.

However, the degree of cooperativity for glucose is dependent on the concentration of Mg-ATP. As the concentration of this substrate decreases below 1 mM, $K_{0.5}$ and n_H values diminish. The function becomes hyperbolic at 0.2 mM Mg-ATP (2.5 times lower than K_m). On the other hand, increasing Mg-ATP concentrations up to 20 mM do not change significantly the n_H values, which remain about 1.6. The alternative substrates, mannose and 2-deoxyglucose, and the analog N-acetylglucosamine (GlcNAc), act as competitive inhibitors for glucose, and as $K_{0.5}$ increases, the cooperativity with glucose decreases. For example, increasing mannose concentration up to 20 mM (approximately 2 times its $K_{0.5}$) $K_{0.5Glc}$ varies from 5 to 32.5 mM and n_H from 1.6 to 1.0. In the presence of 10 mM GlcNAc (K_i ca. 0.4 mM) $K_{0.5Glc}$ increases to 208 mM, and n_H decreases to 1.0.

Rat glucokinase is a monomeric protein and does not polymerize under conditions similar to those of the assay. Thus, during gel filtration at 30°C in the presence of substrates and products, singly and in combination, only one symmetrical peak of activity is observed. The apparent molecular weight (54,000) agrees with the values reported for glucokinase in the presence of denaturing agents. GlcNAc does not modify the monomeric nature of the enzyme. The persistent monomeric form of glucokinase excludes the possibility that the cooperativity is the result either from the interaction of subunits or from an association-dissociation equilibrium in which the kinetic properties

of the enzyme depend on the particular molecular weight species.

The observations are compatible with a steady-state model which consider at least two different pathways to convert the substrates into the products, probably derived either from the kinetic mechanism itself or from the existence of more than one conformational isomer of glucokinase with different reactivity.

Mammalian hexokinases: A system for the study of co-operativity in monomeric enzymes.

ATHEL CORNISH-BOWDEN, BERNARD A. CONNOLLY, MARY GREGORIOU, MICHAEL J. HOLROYDE, ANDREW C. STORER AND IAN P. TAYER.— Department of Biochemistry, University of Birmingham, P. O. Box 363, Birmingham B15 2TT.

Glucokinase and hexokinase type II from the rat are both monomeric enzymes, but glucokinase (mol. wt. 48 000) is only half the size of hexokinase type II (mol. wt. 96 000). The amino acid compositions are strikingly similar, and statistical analysis indicates sequence identity of the order of 85%. Thus the sequence of hexokinase type II may consist of two similar halves, each of which resembles the sequence of glucokinase. We have tried to relate these presumed structural similarities to the substantial differences between the catalytic properties of the two enzymes.

Hexokinase type II is relatively unspecific for the hexose substrate; it is very sensitive to product inhibition by glucose 6-phosphate ($K_i = 0.08\mu M$); the K_m for glucose is low (0.2 mM); it displays no co-operativity with either glucose or MgATP²⁻. Glucokinase is relatively specific for glucose; it is insensitive to glucose 6-phosphate ($K_i = 60\text{mM}$); the half-saturation point for glucose is in the physiological range (about 5 mM); the dependence of the rate on the glucose concentration is co-operative, with a Hill coefficient that rises from about 1.2 to about 1.6 as the MgATP²⁻ concentration is raised from low levels to saturation, even though there is no MgATP²⁻ co-operativity.

These observations suggest that the co-operativity of glucokinase is kinetic in origin, with only one binding site for glucose. At low MgATP²⁻ concentrations the binding of glucose to the enzyme can equilibrate and there is no co-operativity, but at high MgATP²⁻ concentrations co-operativity occurs because the enzyme-glucose complex reacts too fast for equilibration. In principle the results might be explained by the existence of two interacting glucose-binding sites, but the structural similarity to hexokinase type II makes this unlikely. Two glucose sites on glucokinase would imply four similar sites on the single chain of hexokinase type II. This is both implausible and in conflict with affinity labelling studies: inactivation of hexokinase type II by N-bromoacetyl-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose is competitively inhibited by glucose, and is complete when 1 mol of reagent is incorporated into 1 mol of enzyme.

The model for glucokinase co-operativity predicts that a less efficient substrate than MgATP²⁻ would also be less efficient than MgATP²⁻ in promoting glucose co-operativity, but the limiting Hill coefficient

would be the same. We are currently testing this prediction with MgITP²⁻ and other poor substrates. Preliminary results are in accordance with those predicted.

*Studies on bacterial pyruvate kinase: properties of the enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* and *Thermus thermophilus*.*

JAIME EYZAGUIRRE PH.— Instituto de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.

Pyruvate kinase is a regulatory enzyme which responds to different kinds of modifiers, depending on its origin. Considerable differences are observed in this respect among bacterial enzymes, the nature of the effectors depending probably on the metabolic properties of a particular species. Although bacterial pyruvate kinases are known from several species, few detailed studies have been performed on their regulatory properties using purified enzymes.

For this work, pyruvate kinase from *Pseudomonas aeruginosa* (aerobic bacterium using the Entner-Doudoroff pathway) and from *Thermus thermophilus* (an extreme thermophile, whose metabolism is little known) have been selected.

Both enzymes have been partially purified, obtaining preparations with over 50% purity, as established by polyacrylamide gel electrophoresis. Kinetic studies show that both enzymes present homotropic cooperativity towards phosphoenolpyruvate while the ADP saturation curve is hyperbolic (in agreements with most other known pyruvate kinases). Glucose-6-phosphate and ribose-5-phosphate are heterotropic activators of both enzymes, while AMP and fructose 1,6 diphosphate (known activators of other bacterial pyruvate kinases) show no effect. Inorganic phosphate inhibits, in agreement with findings in other species. Chemical modification of the active site, using pyridoxal phosphate, suggests that lysine residues participate in their catalytic mechanism.

Despite of their very different origins, both enzymes show great similarity in the properties studied so far. The main difference found is the thermostability presented by the enzyme from *Thermus thermophilus*. The regulatory properties described for the *Pseudomonas* enzyme are compatible with a feed-forward effect by glucose-6-phosphate, but no conclusions can be drawn at present the metabolic significance of the regulatory findings observed with the *Thermus thermophilus* enzyme.

Kinetic mechanism of glucokinase. Order of addition of the substrates using 2-deoxyglucose as the sugar substrate.

OCTAVIO MONASTERIO.— Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile, Santiago.

Glucokinase is a monomeric enzyme exhibiting a sigmoidal function for glucose and mannose. The

sigmoidicity disappears at low concentrations of MgATP. However, 2-deoxyglucose (2-dGlc) shows hyperbolic kinetics throughout a wide range of concentrations of both 2-dGlc and MgATP. The Km values for 2-dGlc and MgATP were 21 and 0.46 mM respectively. In view of the non-sigmoidal dependence of velocity upon 2-dGlc concentration, an attempt was made to learn about the mechanism of the reaction using this substrate.

Glucokinase was purified from rat liver. The kinetic studies were carried with an enzyme having a specific activity of about 1 unit/mg of protein. Test for contaminating enzymes showed that no hexokinase, N-acetyl-glucosamine kinase and adenosine triphosphatase activities were present in the preparation. Samples of partially purified glucokinase with different specific activities showed identical initial-rate behavior. The assay was performed in 0.5 ml total volume by measuring the ADP production through changes in absorbance at 340 nm at 30°. The assay mixture included: 80 mM Tris-HCl, pH 8.0; 12 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 2.5 mM DTT; 1 mM EDTA; 0.3 mM NADH; 2.5 mM PEP; 1 unit of pyruvate kinase; 1 unit of lactic dehydrogenase and variable concentrations of MgATP, 2-dGlc, AMP and N-acetylglucosamine (GlcNAc).

The kinetic data were plotted graphically to determine the patterns. The kinetic constants were calculated by the least-squares method using an Altair 8800 b computer.

Initial velocity double reciprocal plots for both substrates showed straight lines intersecting to the left of the vertical axis, indicating a sequential mechanism. When a constant ratio of concentrations of both substrates was used a parabolic double reciprocal plot gave further support to this view.

Inhibition product studies were not possible, owing to the very low affinity of 2-dGlc-6-phosphate. The dead-end inhibition protocols were used to know the order of addition of substrates in the enzyme reaction. GlcNAc, a competitive inhibitor for 2-dGlc, was a non-competitive inhibitor relative to MgATP at wide range of concentrations of 2-dGlc. On the other hand, AMP was competitive inhibitor for MgATP and uncompetitive inhibitor with respect to 2-dGlc at 0.41 mM MgATP. These observations were compatible with an ordered mechanism in which 2-dGlc is the first substrate. However, the inhibition of AMP against 2-dGlc changed in character as the MgATP concentration increased over twice its Km. Thus, at 1.2 and 3.6 mM MgATP, the inhibition was clearly non-competitive. These results suggest that when the concentration of the nucleotide substrate is relatively high a random mechanism operates, i. e., the reaction flux going through the path in which MgATP is added before 2-dGlc becomes recognizable.

Effect of phenylalanine and alanine on the pyruvate kinase from Concholepas concholepas muscle.

A. MORAN, R. GONZALEZ y S. MUÑOZ.— Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Médico Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.

Pyruvate kinase (ATP: pyruvate phosphotransferase, E. C. 2. 7. 1. 40) catalyzes an essentially unidirectional step in the glycolytic pathway. The enzyme occurs in at least three noninterconvertible forms in mammalian tissues, two of which exhibit a sigmoidal velocity response with respect to one of its substrates (phosphoenolpyruvate), suggesting multimolecular kinetics. In the presence of fructose 1-6 bis phosphate, the response is transformed into a classical hyperbolic relationship and the apparent affinity of the enzyme for the substrate increases.

The enzyme was purified from the muscle of the mollusc *Concholepas concholepas*. The tissue was homogenized with two volumes of ice-cold 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 containing 1 mM EDTA and 1 mM mercaptoethanol. To the supernatant liquid solid $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to 35-55% saturation was added. After centrifugation, the pellet was resuspended in buffer and further purified by gel filtration on Sephadex G100 and DEAE-cellulose chromatography. Pyruvate kinase activity was measured according to the method of Bücher and Pfleiderer. The rate of NADH oxidation at 340 nm, in a coupled reaction with excess lactic dehydrogenase, was used as an estimate of pyruvate formation.

The results show that pyruvate kinase has allosteric properties and that it is activated by K^+ and Mg^{++} ions. The $K_{0.5}$ values for increasing concentrations of PEP (at a constant level of ADP) at pH values of 6.5, 7.0, 7.4, 8.0 and 9.0 were 0.15, 0.14, 0.13, 0.13 and 0.14 mM respectively. The addition of 1 mM phenylalanine produced a marked effect on the substrate cooperative interactions and the $K_{0.5}$ values were raised to 0.40, 0.37, 0.40, 0.50 and 0.47 mM respectively. The Hill coefficient values were 1.2, 1.4, 1.59, 1.75, and 1.70 and were increased to 2.2, 1.80, 2.00, 2.37, and 2.30 in the presence of phenylalanine. Alanine had a similar effect, but to a lesser extent than phenylalanine. 0.1 mM Fructose 1-6 bis phosphate counteracted the inhibition of both aminoacids and hyperbolic kinetics were obtained in its presence.

Adaptive properties of liver glucokinase.

HERMANN NIEMEYER.— Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile Casilla 653, Santiago, Chile.

Glucokinase is one of four glucose phosphorylating enzymes present in the liver of most mammals, amphibians and lower reptiles. The isozymes differ in kinetic properties, electric charge, molecular weight and immunological reactivity. A very distinctive feature of glucokinase is the sigmoidal saturation function for glucose, characterized by a Hill coefficient (n_H) about 1.6 and a rather high $K_{0.5}$ (concentration for half saturation), varying between 1.5 and 8 mM in the different species so far studied.

In order to explain the cooperativity with glucose it is important to consider that glucokinase is a monomeric enzyme under reacting conditions, and thus any mechanism implying an oligomeric structure must be disregarded.

The levels of glucokinase in rat liver depend strictly on the supply of carbohydrate in the diet. Thus glucokinase decays with a half-life of 33 hr when rats are starved or fed a carbohydrate-free diet, and is induced by the administration of glucose. The adaptive character is not exhibited by all mammals, indicating evolutionary discrimination probably related to feeding habits. The endocrine system plays an important role in glucokinase adaptation. Insulin is essential for glucose-dependent glucokinase induction and, in contradistinction, glucagon and catecholamines prevent the induction. Glucocorticoids and some pituitary hormones modulate the rate of induction. The variations in liver glucokinase correspond to changes in the amount of enzyme protein as assessed by immunochemical titration.

The kinetic parameters would permit an increased efficiency of the liver uptake of glucose at the changeable concentrations in the portal blood resulting from variations in the amount of dietary glucose. Considering the variable levels and the kinetic properties of glucokinase and glucose 6-phosphatase it is possible to estimate the relative contribution of the two enzymes to the balance of glucose uptake and release by the liver under different physiological conditions.

Factors regulating the appearance of glucokinase in neonatal rat liver.

NICOLA C. PARTRIDGE.— Department of Biochemistry, University of Western Australia, Nedlands, Western Australia. Present address: Department of Medicine, University of Melbourne, Repatriation General Hospital, Heidelberg, Victoria, Australia.

The liver, in overall glucose homeostasis, has several unique features compared to other tissues. One of these is the presence of glucokinase (EC 2. 7. 1. 2). The kinetic properties of glucokinase allow the liver to control instantly the uptake of glucose in relation to the portal blood glucose concentration. This ability is lacking in the neonatal rat since glucokinase appears late in development; at weaning in the rat which is 21 days after birth. Once glucokinase activity appears, the liver can carry out blood glucose regulation with a capability equivalent to that found in adult tissue.

Although glucose and insulin regulate glucokinase activities in the adult animal, these factors do not seem to be responsible for the initial appearance of glucokinase in the weanling animal. The involvement of glucocorticoids and thyroid hormones in controlling the development of other parameters at this time has suggested a similar role for either of these hormones in the development of glucokinase. The appearance of glucokinase around weaning has been shown to coincide with high circulating thyroid hormone concentrations. The role of thyroid hormones, glucocorticoids, growth hormone and corticotropin in controlling the appearance of glucokinase has been examined. Only thyroid hormones are capable of prematurely inducing glucokinase although administration of glucose is always required. A normally functional thyroid gland is necessary for development of glucokinase and,



as well, for premature induction of glucokinase by glucose alone.

Since glucose is an absolute requirement for premature induction of glucokinase, its role has been investigated in relation to insulin, glucagon, adrenalin and glucocorticoids. Following the primary inductive event caused by administration of thyroid hormones, glucose together with insulin is responsible for the appearance of glucokinase while the gluconeogenic hormones are inhibitory in action.

It is concluded that increased circulating thyroid hormones in the late-suckling period cause the initial appearance of glucokinase. The ingestion of increased carbohydrate and decreased fat associated with weaning to an adult diet appears to modulate the rate of accumulation of the enzyme via the diet-related hormones insulin and glucagon.

The role of phosphofructokinase in muscle contraction
GOPI A. TEJWANI.— Departments of Pharmacology and Radiology, College of Medicine, The Ohio State University, Columbus, Ohio, 43210.

Skeletal muscle contraction results from interactions between troponin, tropomyosin and actin in the thin filament and myosin in the thick filament, in the presence of Ca^{2+} and energy. The energy for this process is provided by hydrolysis of ATP. The ATP used must be replenished for continued muscle contraction. There are four different sources for the availability of ATP. 1. *ATP Reserves*: The normal ATP concentration in muscle is about 7 $\mu\text{moles/g}$ wet weight. However, this concentration of ATP is not sufficient for even one second of rigorous muscle contraction; 2. *Phosphocreatine*: Its high energy phosphate group is very rapidly transferred to ADP, by the action of creatine kinase present in sarcoplasm. Even though the concentration of phosphocreatine in muscle is about five times that of ATP, it is sufficient to produce energy for only a few seconds; 3. *Oxidative phosphorylation*: ATP is synthesized by this process in the mitochondria, which are sparse and present in a small number in skeletal muscle. This system is too slow for the needs of muscle cells which consume energy at a high rate. Also, the oxygen supply for this process becomes limiting to the muscle contracting for prolonged periods; 4. *Anaerobic glycolysis*: The last and most important method by which sarcoplasmic reticulum synthesizes ATP is by means of anaerobic glycolysis, the process that generates energy already stored in glycogen.

The glycolytic rate in the skeletal muscle stimulated at different frequencies, may be increased 10 to 100 fold over the rate observed in resting muscle. This increase is correlated with the activation of phosphorylase *a*, and phosphofructokinase (PFK) which is the rate-limiting enzyme in the glycolytic pathway. It is inhibited by a high concentration of ATP, and this inhibition is reversed by fructose 6-P, AMP, ADP and P_i . Karpatkin *et al.* (J. Biol. Chem. 239: 3139, 1964) concluded that the observed alterations in the concentrations of these effectors in stimulated muscle, are not sufficient to activate PFK by 10 to 100 fold,

on the basis of the individual effect these effectors on the enzyme, as observed under *in vitro*. They therefore suggested that the activation of PFK is geared to the contractile process itself.

However, we (Tejwani *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 158: 195, 1973) observed that the decrease in the "energy charge", and the increase in fructose 6-P, P_i and especially NH_4^+ concentrations observed in stimulated muscle act *synergistically* to increase the activity of muscle PFK 300-fold over its activity observed at the concentrations of above effectors and substrates found in the muscle at rest. An increase in the concentration of Mg^{2+} , which may occur in the sarcoplasm during muscle contraction, is also associated with an increase in the activity of PFK. It is concluded that contraction of the muscle is associated with a favorable ratio of positive to negative effectors of PFK. Positive effectors increase the activity of PFK in a synergistic manner, leading to the activation of enzyme by several hundred fold in contracting muscle, and that this activation of enzyme may not necessarily be geared to the contractile process itself. (Supported in part by EPA Grant No R804201-01-0).

Phylogenetic and ontogenetic studies of glucose phosphorylating isozymes.

T. URETA.— Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile.

ATP: Hexose 6-phototransferases (isozymes A, B, C, and D, EC 2.7.1.1.; trivial name: hexokinases) have been separated by DEAE-cellulose column chromatography from a variety of vertebrates. Marked differences, both qualitative and quantitative, have been observed when individuals of different taxa are compared. Hexokinase A is present in all mammals and turtles studied, bufo and toads and some leptodactyl frogs. Hexokinase B has been found in some mammals, all turtles and amphibians analyzed. Hexokinase C, the substrate-inhibited isozyme, is present in some mammals and amphibians but not in birds, reptiles and fishes. Isozyme D, the so-called glucokinase, has so far been found in most mammals, turtles and amphibians. It is conspicuously absent in the liver of birds, higher reptiles and most fishes.

Hexokinases from birds and higher reptiles, although similar in general properties to isozymes A and B from other Vertebrates, differ nevertheless in their Michaelis constants, substrate specificities and chromatographic mobilities. Nomenclatural designations for the two or three saurospid hexokinase isozymes is pending until further studies on purer preparations are performed.

The hexokinase pattern from mammalian skeletal muscle (isozymes A and B only), characterized by a marked preponderance of isozyme B, is very different to the liver pattern. A similar situation occurs in amphibian muscle. On the other hand, the hexokinase profiles from saurospid muscle are undistinguishable from those of liver.

Quantitative analyses of the developmental patterns

of rat liver hexokinases show that hexokinase D is absent before and around birth appearing rather abruptly at weaning. The levels of hexokinases A, B, and C on the other hand reach maximal values (4-fold higher than in adults) at days +1, +3 and +7, respectively. Subsequently, the activity levels of these isozymes decrease sequentially to the low adult values. In chicken liver, the hexokinase profiles change very little during development. In frog liver, however, hexokinase D is very high at the tadpole stages to decrease gradually after the final step to the adult frog has been completed. Frog hexokinase C levels are very low at the tadpole stages to rise gradually to the high adult values (Supported by Servicio de Desarrollo Científico y Creación Artística, Universidad de Chile, PNUD-UNESCO RLA 76/006 and the Organization of American States).

Structural and developmental aspects of hepatic glucokinase

D. G. WALKER, M. B. ALLEN, M. J. O. WAKELAM, C. GIMENEZ AND C. ARAGON— Department of Biochemistry, University of Birmingham, P. O. Box 363, Birmingham B15 2TT, UK.

An improved procedure for the purification of hepatic glucokinase in high yield resulted in a preparation that appeared homogenous by sedimentation-equilibrium ultracentrifugation and by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and having a mol. wt. of 48,000. Further studies have been made on preparations of glucokinase purified by procedures designed to achieve maximum recovery

of activity. Electrophoresis on agarose gels, immunodiffusion against an antibody raised to the purified enzyme, shallow salt-concentration gradients on DEAE-Sephadex, immunotitration and immunoelectrophoresis have revealed heterogeneity of kinase activity in these preparations. The several forms appear to be glucokinase in that their substrate specificities are identical. An electrophoretically-slower and quantitatively minor form, tentatively designated GK_A, has a higher mol. wt. (\sim 90,000), is immunologically different, appears to be non-adaptive physiologically yet also has similar substrate specificity and a high Km.

The availability of an improved electrophoretic technique for detecting low glucokinase activity has facilitated a reappraisal of factors affecting glucokinase development in the neonatal rat. Following a reported suggestion that the thyroid hormones may be a natural trigger of normal glucokinase development, we have reached three conclusions:

a) While treatment with tri-iodothyronine does enhance the precocious development of hepatic glucokinase by glucose in the neonatal rat, glucokinase does appear and substantial activities can be induced in grossly hypothyroid animals. Increased circulating thyroid hormone concentrations are not therefore an essential requirement for development.

b) Even if the lactose, and hence carbohydrate, content of rat milk was substantially higher than it is, an earlier appearance of glucokinase is prevented by an inhibitory effect of galactose upon the "inducing" potential of glucose.

c) Precocious development of glucokinase is also prevented by the known neonatal hormonal status controlling in some way the synthesis of glucokinase and experiments suggest this operates via cyclic AMP.

INDICE DE AUTORES — AUTHOR INDEX

- Allen, M. B. 27
Allende, J. E. 13, 18
Aragón, C. 27
Arcaya, G. 10
Atkinson, D. E. 21
Babul, J. 10, 22
Beckhaus, G. 16
Bronfmann, M. 10
Bull, M. 16
Bustamante, E. 22
- Calvo, V. 11
Cardemil, E. 11
Cardemil, L. 11
Cárdenes, M. L. 23
Carú, M. 12
Connolly, B. A. 23
Corcuera, L. 10
Cori, O. 14, 15, 17
Cornish-Bowden, A. 23
- Chayet, L. 14, 17
- Davagnino, J. 12
De la Fuente, M. 14
Del Villar, E. 18
Donoso, E. 18
- Egaña, E. 12
Errázuriz, R. 13
Eyzaguirre, J. 11, 24
- Fernández, L. A. 14
- Gamboa, S. 16
Garcés, E. 17
Garrido, A. 12
Garrido, F. 14, 19
Gil, L. 15
Giménez, C. 27
Gómez, P. 19
González, M. 13
González, R. 24
Gregoriou, M. 23
- Hashagen, U. 14
Hofmann, J. 19
Holroyde, M. J. 23
- Imschenetzky, M. 16
Kettlum, A. M. 19
Leloir, L. F. 9
Ludwig, U. 14
- Massone, R. 16
Medel, R. 14
Monasterio, O. 24
Morales, M. 13
Morán, A. 24
Mufioz, S. 24
- Niemeyer, H. 25
- Ojeda, J. M. 18
- Partridge, N. C. 25
Pedemonte, J. 15
Pérez, L. M. 14, 15
Perretta, M. 12, 14, 19
Pino, A. M. 14
Portilla, G. 17
Preller A. 15
Puchi, M. 16
Puente, J. 16
- Quiroga, M. 20
- Ramírez, M. T. 12
Reinberg, D. 16
Reinicke, K. 17
Rivera, J. 17
Rojas C. 14, 17
- Sánchez, E. 18
Sánchez, G. 17
Sapag-Hagar, M. 16, 18
Schoelermann, S. 12
Sierra, L. F. 18
Sierralta, V. 14
Silva, S. 19
Solari, A. 18
Somlai, A. 18
- Speiisky, L. H. 18
Stellwagen, E. 10
Störger, A. C. 23

- Taucher, G. 15
 Tejwani, G. A. 26
 Traverso, G. A. 10
 Traverso-Cori, A. 11, 17, 19
 Trayser, I. P. 23
 Ureta, T. 12, 15, 26
 Uribe, L. 19
 Valenzuela, A. 19
 Valenzuela, M. A. 11, 17, 19
 Varas, M. A. 16
 Venegas, A. 20
 Vial, M. V. 17
 Vicuña, R. 16
 Waisbluth, L. 19
 Wakelam, M. J. O. 27
 Walker, D. G. 27
 Yudelevich, A. 16
 Zaldivar, M. J. 20
 Zambrano, F. 13

**Impreso en los talleres de
EDITORIAL UNIVERSITARIA
San Francisco 454
Santiago - Chile**

UNIVERSIDAD DE CHILE



3 5601 15637 8428